

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM TP. HỒ CHÍ MINH  
KHOA SINH HỌC  
๓๓๓๓๓

TRẦN THỊ MINH ĐỊNH

**KHẢO SÁT MỘT SỐ CHỦNG NẤM SỢI  
CÓ HOẠT TÍNH KHÁNG SINH  
CHỐNG VI SINH VẬT GÂY BỆNH**

**LUẬN VĂN TỐT NGHIỆP**  
**KHOA SINH HỌC**  
CHUYÊN NGÀNH VI SINH

*Người hướng dẫn khoa học:*  
**TS. TRẦN THANH THỦY**

Tp.HCM-2007

## LỜI CẢM ƠN

Em xin chân thành bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới **Tiến sĩ Trần Thanh Thủy** đã tận tình hướng dẫn, giúp đỡ và động viên em hoàn thành luận văn tốt nghiệp.

Em xin chân thành cảm ơn cô **Nguyễn Thị Kim Tuyền**, cô **Nguyễn Ngọc Phương** đã hết lòng giúp đỡ và tạo mọi điều kiện thuận lợi cho em hoàn thành luận văn này.

Em xin bày tỏ lòng biết ơn Quý thầy cô Khoa Sinh học Trường Đại học Sư Phạm Tp.HCM đã dạy dỗ em trong suốt 4 năm qua.

Xin cảm ơn các bạn lớp Sinh K29 đã động viên tôi trong suốt quá trình tôi tiến hành đề tài.

*Tp.HCM, ngày 28 tháng 5 năm 2007*

Trần Thị Minh Định

# MỤC LỤC

|                                                                                                                                 |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>PHẦN I. MỞ ĐẦU.....</b>                                                                                                      | <b>1</b>  |
| <b>PHẦN II. NỘI DUNG .....</b>                                                                                                  | <b>3</b>  |
| <b>CHƯƠNG I. TỔNG QUAN TÀI LIỆU .....</b>                                                                                       | <b>3</b>  |
| <i>1.1. Sơ lược lịch sử nghiên cứu CKS trên thế giới và ở Việt Nam ....</i>                                                     | <i>3</i>  |
| <i>1.2. Chất kháng sinh .....</i>                                                                                               | <i>4</i>  |
| <i>1.2.1. Sơ lược về chất kháng sinh .....</i>                                                                                  | <i>4</i>  |
| <i>1.2.2. Đặc điểm của các CKS có nguồn gốc từ nấm sợi.....</i>                                                                 | <i>6</i>  |
| <i>1.2.3. Một số điều kiện môi trường ảnh hưởng đến khả năng sinh<br/>            kháng sinh của nấm sợi .....</i>              | <i>7</i>  |
| <i>1.2.4. Ứng dụng của CKS từ nấm sợi trong phòng chống vi sinh vật<br/>            gây bệnh và trong bảo vệ thực vật .....</i> | <i>9</i>  |
| <i>1.3. Nấm sợi.....</i>                                                                                                        | <i>12</i> |
| <i>1.3.1. Một số đặc điểm sinh học và phân loại của nấm sợi.....</i>                                                            | <i>12</i> |
| <i>1.3.2. Đặc điểm sinh lí, sinh hóa của nấm sợi.....</i>                                                                       | <i>16</i> |
| <i>1.3.3. Một số nhóm nấm sợi chính có hoạt tính kháng sinh .....</i>                                                           | <i>19</i> |
| <i>1.3.4. Sự phân bố và vai trò của nấm sợi trong tự nhiên.....</i>                                                             | <i>21</i> |
| <b>CHƯƠNG II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU ....</b>                                                                       | <b>23</b> |
| <i>2.1. Vật liệu.....</i>                                                                                                       | <i>23</i> |
| <i>2.1.1. Mẫu thí nghiệm .....</i>                                                                                              | <i>23</i> |
| <i>2.1.2. Dụng cụ và thiết bị.....</i>                                                                                          | <i>24</i> |
| <i>2.2. Các môi trường nghiên cứu đã sử dụng .....</i>                                                                          | <i>24</i> |

|                                                                                                     |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>2.3. Phương pháp nghiên cứu.....</b>                                                             | <b>26</b> |
| 2.3.1. Phương pháp bảo quản giống.....                                                              | 26        |
| 2.3.2. Phương pháp khảo sát khả năng kháng khuẩn.....                                               | 26        |
| 2.3.3. Phương pháp khảo sát khả năng đối kháng với nấm gây<br>bệnh.....                             | 28        |
| 2.3.4. Phương pháp tách chiết kháng sinh.....                                                       | 28        |
| 2.3.5. Phương pháp khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố lí, hóa đến<br>hoạt tính kháng sinh .....      | 29        |
| 2.3.6. Phương pháp thử khả năng diệt sâu hại cây trồng.....                                         | 29        |
| 2.3.7. Phương pháp quan sát hình thái và định danh nấm sợi.....                                     | 30        |
| 2.3.8. Phương pháp khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ lên khả năng<br>sinh trưởng của nấm sợi RNM..... | 31        |
| 2.3.9. Phương pháp khảo sát ảnh hưởng của độ mặn lên khả năng<br>sinh trưởng của nấm sợi RNM .....  | 32        |
| 2.3.10. Phương pháp khảo sát khả năng đồng hoá nguồn carbon<br>của nấm sợi RNM.....                 | 32        |
| 2.3.11. Phương pháp khảo sát khả năng đồng hoá nguồn nitơ .....                                     | 32        |
| 2.3.12. Phương pháp khảo sát khả năng sinh enzyme .....                                             | 32        |
| 2.3.13. Phương pháp khảo sát khả năng phân giải dầu.....                                            | 33        |
| 2.3.14. Phương pháp xử lí số liệu bằng toán thống kê đơn giản....                                   | 33        |
| <b>CHƯƠNG III. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN.....</b>                                                         | <b>35</b> |
| <b>3.1. Hoạt tính kháng sinh của 3 chủng nấm sợi nghiên cứu .....</b>                               | <b>35</b> |

|                                                                               |           |
|-------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.1.1. Khả năng sinh tổng hợp CKS của 3 chủng nấm sợi RNM ...                 | 35        |
| 3.1.2. Tách chiết CKS.....                                                    | 38        |
| 3.1.3. Xác định thời gian sinh tổng hợp CKS nhiều nhất .....                  | 40        |
| 3.1.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên độ bền CKS.....                             | 44        |
| <b>3.2. Các đặc điểm sinh học và phân loại của ba chủng nấm sợi RNM .....</b> | <b>48</b> |
| 3.2.1. Phân loại các chủng nấm sợi RNM .....                                  | 48        |
| 3.2.2. Khả năng chịu nhiệt của nấm sợi RNM.....                               | 56        |
| 3.2.3. Khả năng chịu mặn của nấm sợi RNM .....                                | 57        |
| 3.2.4. Khả năng đồng hóa nguồn carbon của nấm sợi RNM .....                   | 58        |
| 3.2.5. Khả năng đồng hóa nguồn nitơ của nấm sợi RNM .....                     | 60        |
| 3.2.6. Khả năng sinh enzyme ngoại bào .....                                   | 61        |
| 3.2.7. Khả năng phân giải dầu của nấm sợi RNM.....                            | 64        |
| <b>3.3. Bước đầu tìm hiểu khả năng ứng dụng của 3 chủng nấm sợi RNM .....</b> | <b>65</b> |
| <b>PHẦN III. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ .....</b>                                    | <b>72</b> |
| <b>TÀI LIỆU THAM KHẢO .....</b>                                               | <b>73</b> |



## **DANH MỤC CÁC BẢNG, BIỂU ĐỒ, HÌNH TRONG LUẬN VĂN**

### **DANH MỤC CÁC BẢNG**

|                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Bảng 3.1. Hoạt tính kháng vi khuẩn và nấm men của ba chủng nấm sợi .....                                 | 34 |
| Bảng 3.2. Hoạt tính kháng nấm gây bệnh của ba chủng nấm sợi .....                                        | 34 |
| Bảng 3.3. Hoạt tính kháng sinh của các chủng nấm sợi khi chiết tách bằng các phương pháp khác nhau ..... | 37 |
| Bảng 3.4. Thời gian sinh tổng hợp CKS của ba chủng nấm sợi .....                                         | 40 |
| Bảng 3.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt tính CKS 3 chủng nấm sợi .....                                 | 43 |
| Bảng 3.6. Đặc điểm phân loại của 3 chủng nấm sợi nghiên cứu .....                                        | 51 |
| Bảng 3.7. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên khả năng sinh trưởng của ba chủng nấm sợi .....                     | 55 |
| Bảng 3.8. Ảnh hưởng của độ mặn lên khả năng sinh trưởng của 3 chủng nấm sợi .....                        | 56 |
| Bảng 3.9. Khả năng đồng hoá các nguồn carbon của ba chủng nấm sợi .....                                  | 57 |
| Bảng 3.10. Khả năng đồng hoá nguồn nitơ của ba chủng nấm sợi .....                                       | 58 |
| Bảng 3.11. Hoạt tính enzym của ba chủng nấm sợi RNM .....                                                | 59 |
| Bảng 3.12. Khả năng diệt tảo của ba chủng nấm sợi rừng ngập mặn .....                                    | 63 |
| Bảng 3.13. Khả năng diệt sâu tơ của ba chủng nấm sợi RNM .....                                           | 64 |

### **DANH MỤC CÁC BIỂU ĐỒ**

|                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Biểu đồ 3.1. Hoạt tính kháng sinh của các chủng nấm sợi khi tách chiết bằng các phương pháp khác nhau ..... | 37 |
| Biểu đồ 3.2. Thời gian sinh tổng hợp CKS của ba chủng nấm sợi .....                                         | 40 |
| Biểu đồ 3.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt tính CKS chủng N20 .....                                       | 43 |
| Biểu đồ 3.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt tính CKS chủng NHA7.3 <sub>1</sub> .....                       | 44 |
| Biểu đồ 3.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt tính CKS chủng TH1.9 .....                                     | 44 |

|                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Biểu đồ 3.6. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên khả năng sinh trưởng của ba chủng nấm sợi ..... | 55 |
| Biểu đồ 3.7. Hoạt tính enzyme của ba chủng nấm sợi.....                                 | 60 |
| Biểu đồ 3.8. Khả năng diệt tằm bằng DKS và BT của ba chủng nấm sợi .....                | 63 |
| Biểu đồ 3.7. Khả năng diệt sâu tơ bằng DKS và BT của ba chủng nấm sợi .....             | 64 |
| Biểu đồ 3.8. So sánh khả năng diệt sâu tơ và tằm của 3 chủng nấm sợi .....              | 65 |

## DANH MỤC HÌNH

|                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------|----|
| Hình 1.1. <i>Staphylococcus aureus</i> .....                                     | 10 |
| Hình 1.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....                                    | 11 |
| Hình 1.3. <i>Candida albicans</i> .....                                          | 11 |
| Hình 1.4. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....                                | 11 |
| Hình 1.5. Bào tử <i>Trichoderma</i> .....                                        | 19 |
| Hình 1.6. Khuẩn lạc <i>Trichoderma</i> .....                                     | 19 |
| Hình 1.7. <i>Acremonium</i> .....                                                | 20 |
| Hình 3.1. Hoạt tính kháng <i>B.subtilis</i> của chủng TH1.9 .....                | 36 |
| Hình 3.2. Hoạt tính kháng <i>E.coli</i> của chủng TH1.9.....                     | 36 |
| Hình 3.3. Hoạt tính kháng <i>E.coli</i> kháng thuốc của chủng TH1.9.....         | 36 |
| Hình 3.4. Hoạt tính kháng <i>Salmonella</i> của chủng TH1.9 .....                | 36 |
| Hình 3.5. Khả năng hòa tan CKS chủng TH1.9 vào cồn .....                         | 38 |
| Hình 3.6. Khả năng hòa tan CKS chủng TH1.9 vào acetone.....                      | 38 |
| Hình 3.7. Khả năng hòa tan CKS chủng NHA7.31 vào cồn.....                        | 38 |
| Hình 3.8. Hoạt tính kháng <i>B.subtilis</i> của dịch lên men chủng N20.....      | 38 |
| Hình 3.9. Hoạt tính kháng <i>B.subtilis</i> của dịch lên men chủng NHA7.31 ..... | 39 |
| Hình 3.10. Hoạt tính kháng <i>B.subtilis</i> của dịch lên men chủng TH1.9 .....  | 39 |
| Hình 3.11. Hoạt tính kháng <i>B.subtilis</i> của chủng NHA7.31 sau 48h .....     | 42 |
| Hình 3.12. Hoạt tính kháng <i>B.subtilis</i> của chủng N20 sau 120h .....        | 42 |
| Hình 3.13. Hoạt tính kháng <i>B.subtilis</i> của chủng TH1.9 sau 72h.....        | 42 |



|                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Hình 3.14. Hoạt tính kháng sinh của chủng TH1.9 khi xử lí ở 40 <sup>0</sup> C trong 10 phút..... | 45 |
| Hình 3.15. Hoạt tính kháng sinh chủng TH1.9 khi xử lí ở 100 <sup>0</sup> C trong 60 phút.....    | 45 |
| Hình 3.16. Khuẩn lạc chủng N20.....                                                              | 47 |
| Hình 3.17. Khuẩn ty chủng N20 .....                                                              | 48 |
| Hình 3.18. Cơ quan sinh sản của chủng N20.....                                                   | 48 |
| Hình 3.19. Khuẩn lạc chủng NHA7.31 .....                                                         | 49 |
| Hình 3.20. Khuẩn ty của chủng NHA7.31 .....                                                      | 49 |
| Hình 3.21. Cơ quan sinh sản chủng NHA7.31.....                                                   | 50 |
| Hình 3.22. Khuẩn lạc chủng TH1.9 sau 3 ngày nuôi cấy .....                                       | 51 |
| Hình 3.23. Khuẩn lạc chủng TH1.9 sau 7 ngày nuôi cấy .....                                       | 51 |
| Hình 3.24. Cơ quan sinh sản chủng TH1.9.....                                                     | 52 |
| Hình 3.25. Khả năng sinh trưởng của chủng N20 trên môi trường chứa nguồn carbon là CMC .....     | 57 |
| Hình 3.26. Khả năng đồng hóa các nguồn nitơ của chủng NHA7.31.....                               | 59 |
| Hình 3.27. Hoạt tính amylase chủng TH1.9.....                                                    | 61 |
| Hình 3.28. Hoạt tính cellulase chủng NHA7.31 .....                                               | 61 |
| Hình 3.29. Hoạt tính pectinase chủng TH1.9.....                                                  | 61 |
| Hình 3.30. Hoạt tính protease chủng NHA7.31 .....                                                | 61 |
| Hình 3.31. Khả năng phân giải dầu của ba chủng nấm sợi .....                                     | 62 |
| Hình 3.32. Tầm xử lí bằng dịch lên men chủng TH1.9 .....                                         | 66 |
| Hình 3.33. Tầm nuôi đối chứng .....                                                              | 67 |
| Hình 3.34. Tầm xử lí bằng dịch lên men chủng N20.....                                            | 67 |
| Hình 3.35. Tầm xử lí bằng bào tử chủng N20 .....                                                 | 67 |
| Hình 3.36. Tầm xử lí bằng dịch lên men chủng NHA7.31 .....                                       | 67 |
| Hình 3.37. Tầm xử lí bằng bào tử chủng TH1.9 .....                                               | 67 |
| Hình 3.38. Tầm xử lí bằng bào tử chủng NHA7.31.....                                              | 67 |



## **NHỮNG TỪ VIẾT TẮT TRONG LUẬN VĂN**

|       |                           |
|-------|---------------------------|
| BT    | Bào tử                    |
| CKS   | Chất kháng sinh           |
| CMC   | Carboxyl methyl cellulose |
| DKS   | Dịch kháng sinh           |
| KL    | Khuẩn lạc                 |
| MT    | Môi trường                |
| PTN   | Phòng thí nghiệm          |
| RNM   | Rừng ngập mặn             |
| VK    | Vi khuẩn                  |
| VK(+) | Vi khuẩn Gram dương       |
| VK(-) | Vi khuẩn Gram âm          |
| VSV   | Vi sinh vật               |
| ase   | đuôi enzym                |
| ose   | đuôi cơ chất              |

## **PHẦN I. MỞ ĐẦU**

Nấm sợi là đối tượng hấp dẫn cho các nghiên cứu cơ bản và đa dạng sinh học. Đây là nguồn VSV vô tận và giàu tiềm năng sản sinh các chất có hoạt tính sinh học quý trong đó có CKS. Từ lâu, nhiều CKS nổi tiếng có nguồn gốc từ nấm sợi như penicillin, cephalosporium, griseofulvin đã được con người biết đến và ứng dụng có hiệu quả trong việc trị bệnh cho người, vật nuôi và cây trồng. Theo thời gian, các CKS được tìm thấy ngày càng đa dạng về chủng loại, dồi dào về số lượng. Tuy nhiên, việc sử dụng kháng sinh không hợp lý trong công tác điều trị cùng với sự xuất hiện các bệnh nan y mới là nguyên nhân khiến cho nhiều CKS hiện nay không còn tác dụng chữa bệnh. Thế giới giờ đây đang lo ngại con người sẽ thua trong cuộc chiến chống lại các bệnh nhiễm trùng. Do đó, việc tìm kiếm, phát hiện các CKS mới trở thành một nhiệm vụ cấp thiết hơn bao giờ hết, thu hút sự quan tâm của rất nhiều nhà khoa học trong và ngoài nước. Trong quá trình tìm kiếm ấy, con người luôn luôn quan tâm đến các nhóm VSV sinh CKS ở các hệ sinh thái đặc biệt, trong đó có nấm sợi RNM. Với kiểu trao đổi chất khác thường trong điều kiện môi trường khắc nghiệt, người ta hy vọng rằng có thể tìm được các CKS mới từ nguồn nguyên liệu đầy tiềm năng này.

Hơn nữa, để hạn chế đến mức thấp nhất việc sử dụng các chất hóa học trong nông nghiệp, những năm gần đây người ta tăng cường sử dụng các chế phẩm sinh học trong công tác phòng trừ dịch bệnh cho cây. Nấm sợi sinh CKS là một trong những đối tượng không thể thiếu được trong các chế phẩm sinh học này.

Ở Việt Nam các công trình nghiên cứu về nấm sợi sinh CKS từ đất liền đã có từ rất lâu song các nghiên cứu về nấm sợi RNM sinh CKS còn quá ít ỏi và chưa đầy đủ.

Để góp phần tìm hiểu khả năng sinh CKS từ VSV nói chung, từ nấm sợi nói riêng, chúng tôi đã tiến hành đề tài: ***“Khảo sát một số chủng nấm sợi có hoạt tính kháng sinh chống vi sinh vật gây bệnh”***.

**Mục tiêu của đề tài:** nghiên cứu khả năng sinh kháng sinh chống vi sinh vật gây bệnh của một số chủng nấm sợi từ RNM.

**Đối tượng của đề tài:**

- Các chủng nấm sợi có hoạt tính kháng sinh được phân lập từ RNM (trong bộ sưu tập giống PTN Vi sinh-Sinh hóa Trường ĐHSP Tp.HCM).
- Các VSV kiểm định nhận từ bộ sưu tập giống PTN Vi sinh-Sinh hóa Trường ĐHSP Tp.HCM, Viện Pasteur, Phòng Vi sinh, Bệnh viện Bình Dân.

**Nhiệm vụ của đề tài:**

- Khảo sát khả năng hình thành CKS của ba chủng nấm sợi.
- Nghiên cứu một số điều kiện lí, hoá ảnh hưởng đến hoạt tính CKS của ba chủng nấm sợi.
- Nghiên cứu các đặc điểm sinh học và đặc điểm phân loại của ba chủng nấm sợi nói trên.
- Bước đầu thử nghiệm tác dụng kháng sinh của các chủng nấm sợi trên đối tượng sâu tơ và tằm.

**Địa điểm tiến hành đề tài:** PTN Vi sinh-Sinh hoá Trường ĐHSP Tp.HCM

**Thời gian:** từ tháng 10/2006 đến tháng 05/2007.



## PHẦN II. NỘI DUNG

### CHƯƠNG I. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

#### 1.1. Sơ lược lịch sử nghiên cứu CKS trên thế giới và ở Việt Nam

Vào những năm 70 của thế kỷ XIX, Manaxêin (1871), Polochepnốp (1872) và Tyndal (1876) đã phát hiện thấy một nấm sợi thuộc chi *Penicillium* có khả năng tiết ra một chất ức chế sinh trưởng của một số VK.

Năm 1877, Paxtơ và Jubect đã khẳng định rằng một số VK gây thối có khả năng ức chế VK than *Bacillus anthracis*. Tuy nhiên, những phát kiến này không có ý nghĩa thực tiễn, bởi vì các nhà khoa học ấy đã không có trong tay một thứ thuốc công hiệu.

Mãi hơn 50 năm sau, vào năm 1928 tại bệnh viện Xanh Mari ở Luân Đôn, A.Fleming mới phát hiện thấy bên cạnh VK *Staphylococcus aureus* có khuẩn lạc nấm *Penicillium*. Nấm này tiết ra một chất có tính kháng sinh ức chế sinh trưởng của *Staphylococcus aureus*. Fleming phân lập nấm ấy, nghiên cứu tính CKS của nó và phát hiện ra penicillin. Và đến năm 1940, một nhóm các nhà bác học (gọi là nhóm Oxford) bao gồm Florey, Chain và Heatley đã tách và chế tạo thành công chế phẩm penicillin. Kể từ đó penicillin mới được bắt đầu dùng để chữa bệnh và cũng từ đó một kỷ nguyên mới-kỷ nguyên CKS chính thức ra đời.[3]

Sau penicillin, hàng loạt CKS được phát hiện. Năm 1939, Dubos phát hiện ra gramixidin và tiroxin. Năm 1944, Waksman phát hiện ra streptomycin. Năm 1947, Ehrlich phát hiện ra cloramphenicol. Năm 1948, Duggar phát hiện ra clotetracyclin,...

Tốc độ tìm kiếm các CKS ngày càng được đẩy mạnh. Năm 1945 người ta mới phát hiện được 30 chất, đến năm 1953 được gần 150 chất và đến năm 1965 được hơn 1500 chất.[8]



Đến năm 1998, người ta đã biết trên 8000 CKS và mỗi năm có khoảng vài trăm CKS mới được phát hiện. [2]

Ngày nay, nhiều CKS mới vẫn đang được tìm kiếm và phát hiện.

Ở Việt Nam, việc nghiên cứu và sản xuất CKS bắt đầu từ năm 1949 khi giáo sư Đặng Văn Ngữ thu được dịch lọc penicillin từ các chủng thuộc chi *Penicillium*.

Trường Đại học Tổng hợp Hà Nội, Trường Đại học Sư phạm I Hà Nội đã nghiên cứu sự phân bố, sự lên men các chủng xạ khuẩn sinh CKS có hoạt tính mạnh, hoạt phổ rộng từ đất Việt Nam. Viện Khoa học Việt Nam đã nghiên cứu sản xuất và khả năng ứng dụng của các chế phẩm Biovit, Teravit, Baxitraxin vào chăn nuôi và bảo vệ cây trồng. Trường Đại học Dược và các xí nghiệp Dược đã thực hiện hàng trăm thí nghiệm lên men các CKS: clotetracyclin, oxytetracyclin, neomixin, dekamixin, fumajilin... đã thu được những kinh nghiệm nhất định về công nghệ sinh học và công nghệ kháng sinh.[14]

Cho đến nay những nghiên cứu về CKS được sự quan tâm của nhiều nhà khoa học đầu ngành, mặc dù có nhiều cố gắng nhưng tình hình nghiên cứu CKS của nước ta vẫn còn nhiều hạn chế so với thế giới.

## **1.2. Chất kháng sinh (Antibiotic)**

### ***1.2.1. Sơ lược về chất kháng sinh***

Chất kháng sinh là những chất đặc hiệu do vi sinh vật tiết ra trong quá trình sống mà ngay ở nồng độ thấp có khả năng ức chế hoặc tiêu diệt vi sinh vật gây bệnh một cách chọn lọc.[4]

CKS là một nhóm đa dạng về mặt hoá học. Trong một số chất phân tử của nó chỉ chứa C và H hoặc thường chứa C, H, O, N. Một số CKS còn chứa cả S, P và halogen trong phân tử. CKS thường chứa các nhóm chức đã biết

trong hoá hữu cơ như hydroxyl, carbonil, nhóm chức có chứa N,... đồng thời có cấu trúc đặc trưng của chất hữu cơ.[14]

Các CKS có thành phần hoá học hết sức khác nhau, do đó không thể có một cơ chế tác dụng chung của các CKS đối với tất cả các loại VSV.

Đặc tính và cơ chế tác dụng của CKS trước hết phụ thuộc vào bản chất hóa học của từng chất. Thứ hai là phụ thuộc vào nồng độ. Cơ chế tác dụng của mỗi CKS lên VSV mỗi khác. Thậm chí cùng một chất nhưng điều kiện tác động khác nhau thì cơ chế có thể cũng không giống nhau. Cơ chế tác dụng của các CKS có thể được biểu hiện ở các hướng chủ yếu sau:

- *Làm ngừng tổng hợp thành tế bào hoặc làm tan thành tế bào VK* do đó phá hủy tính thấm thấu của tế bào. Thuộc nhóm này gồm có penicillin, cephalosporin, bacitracin, vacomycin, ristocetin, o-carbamin, D-cerin, D-cyclocerin. Trong số này chỉ có penicillin là được nghiên cứu nhiều hơn cả. CKS bám vào thành tế bào, phá vỡ tổ chức thành tế bào, do đó làm chết VK.

- *Ảnh hưởng tới quá trình tổng hợp protein của VSV*: Thuộc nhóm này đã được nghiên cứu gần 70 chất, trong số đó có streptomycin, chloramphenicol, các tetracyclin,... CKS có thể phong bế tổng hợp protein hoặc đưa đến tổng hợp các protein bất thường.

- + CKS dẫn đến tổng hợp protein bất thường: streptomycin. Bằng thực nghiệm, Davis, Jilbert và Gorini đã chứng minh rằng streptomycin gắn vào phần 30S của ribosome làm thay đổi hình dạng của phần này. Do đó làm ảnh hưởng đến việc gắn mRNA vào ribosome, làm rối loạn việc đọc mã của mRNA, đưa đến việc gắn sai acid amin vào chuỗi polypeptid, kết quả là tạo ra những loại protein bất thường.



+ CKS phong bế tổng hợp protein: chloramphenicol, tetracyclin, các CKS thuộc nhóm macrolid. Các chất thuộc nhóm này gắn vào phần 50S của ribosome và ngăn cản mạch polypeptid kéo dài bằng cách ức chế men transferase là men chuyển acid amin từ tRNA vào mạch.

- *Ảnh hưởng đối với acid nucleic*: Cụ thể là phá hủy sự trao đổi của DNA và RNA. Hiện nay đã biết 20 chất phá hủy sự trao đổi RNA và 16 chất phá hủy sự trao đổi DNA. Thuộc nhóm này gồm có: actinomycin, mytomycin,...[8]

- *Làm hỏng màng nguyên sinh chất của VSV*: các nhóm polypeptid thường gây tổn thương cho màng nguyên sinh chất của VSV. Ví dụ polymixin phá vỡ lớp photpholipid tạo nên cấu trúc của màng, làm cho các chất rò rỉ ra khỏi tế bào làm tế bào bị chết [14].

- *Ức chế các con đường trao đổi chất chung*.

- *Ngăn cản sự nhận diện một tác nhân gây bệnh hoặc phong tỏa sự gắn của nó vào vật chủ*.

Một CKS tác động lên cả VKG(+) lẫn VKG(-) được gọi là CKS phổ rộng. CKS có phổ rộng sẽ được ứng dụng rộng rãi trong thực tiễn y học hơn so với một số CKS có phổ hẹp chỉ tác động lên một nhóm riêng biệt. CKS có phổ hẹp rất có giá trị trong việc khống chế các VSV không miễn cảm với các CKS khác.[2]

### **1.2.2. Đặc điểm của các CKS có nguồn gốc từ nấm sợi**

Các CKS từ nấm sợi chiếm tỉ lệ khá lớn, có độ độc tương đối cao nên đa số chưa được ứng dụng trong thực tiễn. Hầu hết nấm sinh CKS thuộc nhóm Nấm bất toàn (Fungi imperfecti).[21]



❖ **Một số CKS có nguồn gốc từ nấm sợi phổ biến:**

- **Penicillin:** được A.Fleming phát hiện năm 1928. Loại kháng sinh này do các loài nấm thuộc chi *Penicillium* sinh ra : *P.notatum*, *P.baculatum*, *P.chrysogenum*,... Người ta sử dụng các biến chủng của loài *P.chrysogenum* để sản xuất CKS này ở quy mô công nghiệp. Penicillin là loại CKS phổ rộng, được ứng dụng rộng rãi trong điều trị và được sản xuất với lượng lớn nhất trong số các CKS đã biết hiện nay. Chúng tác dụng lên hầu hết các VKG(+) và thường được dùng để điều trị hầu hết các trường hợp viêm nhiễm do liên cầu khuẩn, tụ cầu khuẩn, ví dụ viêm màng não, viêm tai mũi họng,...

- **Cephalosporin:** điển hình là Cephalosporin C, được Newton và Abraham phát hiện năm 1956. Người ta thường dùng các chủng của loài *Cephalosporium acremonium* để sản xuất CKS này ở quy mô công nghiệp. Cephalosporin C có tác dụng kháng khuẩn đối với cả các cầu khuẩn có hoạt tính  $\beta$ -lactamaza, nhiều VKG(-) và hầu như không độc.

- **Griseofulvin:** được Oxford và đồng nghiệp phát hiện năm 1939 từ nấm *Penicillium griseofulvum*. Loại kháng sinh này do nhiều loài nấm sợi sinh ra: *P.janczewskii*, *P.nigricans*, *P.urticae*, *P.raistrickii*, *Aspergillus versicolor*,... Hoạt tính kháng sinh điển hình của Griseofulvin là kháng nấm, nhất là các loài nấm có chứa kitin trong thành tế bào như các chi *Trichophyton*, *Epidermophyton* và *Microsporum*, nhưng hầu như không tác dụng lên nguyên sinh động vật, VK, nấm men và các loài nấm sợi khác.[3]

**1.2.3. Một số điều kiện môi trường ảnh hưởng đến khả năng sinh kháng sinh của nấm sợi**

**1.2.3.1. Một số điều kiện ảnh hưởng đến quá trình lên men các CKS.**

Quá trình sinh tổng hợp CKS cũng là một quá trình chuyển hóa sinh học do đó nó chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố khác nhau của môi trường như

thành phần môi trường, nhiệt độ lên men, pH, nồng độ oxy, cường độ sục khí,...

Thành phần môi trường lên men có vai trò rất quan trọng quyết định hiệu quả của quá trình lên men VSV sinh tổng hợp CKS. Thành phần quan trọng nhất phải kể đến là nguồn thức ăn carbon và nguồn thức ăn nitơ. Nhìn chung, nguồn thức ăn carbon thường được chọn là các loại đường (glucose, fructose, maltose,...), các loại bột và hạt ngũ cốc, cám gạo, vỏ khoai mì,... Nguồn thức ăn nitơ thường là bột đậu tương, nước chiết ngô, cao nấm men, nước chiết nấm men, peptone,...

Trong công nghệ lên men các CKS, mỗi cơ chất nhất định sẽ tác động lên CKS theo những hướng khác nhau.[3]

Việc tối ưu hoá thành phần môi trường và điều kiện lên men có vai trò rất quan trọng, quyết định hiệu quả của quá trình lên men CKS.

#### ***1.2.3.2. Tách chiết CKS.***

Việc tách chiết và tinh sạch CKS sau quá trình lên men là rất quan trọng vì trong dịch lên men ngoài CKS còn chứa nhiều tạp chất khác. Việc lựa chọn phương pháp tách và tinh chế CKS phụ thuộc vào bản chất chủng sinh kháng sinh, tính chất lí hoá của CKS.[14]

❖ Quy trình tách và làm sạch CKS thường theo các bước sau:

- **Tách sinh khối từ dịch nuôi cấy:** có thể tách sinh khối bằng phương pháp lọc hoặc li tâm[14]. Đối với nấm sợi người ta thường dùng phương pháp lọc.[3]

- **Tách CKS từ sinh khối:** rửa sinh khối với nước để loại bỏ các thành phần của dịch lên men, sau đó tách chiết CKS bằng các dung môi hữu cơ khác nhau như ethyl acetat, butanol,...

- **Tách chiết CKS từ dịch lọc:** bổ sung dung môi hữu cơ vào dịch lọc, ta thu được CKS trong dung môi, sau đó cô trong điều kiện chân không ở



nhiệt độ thấp để loại bỏ dung môi. Ngoài ra, người ta còn dùng các phương pháp khác như phương pháp trao đổi ion, hấp phụ bằng than hoạt tính hay sắc ký cột.

- **Tách các hợp chất của CKS:** có thể tách bằng cách sử dụng các hệ thống dung môi hoặc dùng phương pháp sắc ký.

- **Tinh chế CKS:** có thể tinh chế bằng cách kết tinh hoặc dùng phương pháp sắc ký hấp phụ, sắc ký bản mỏng hay sắc ký lỏng cao áp.[14]

#### ***1.2.4. Ứng dụng của kháng sinh từ nấm sợi trong phòng chống VSV gây bệnh và trong bảo vệ thực vật***

##### ***1.2.4.1. Ứng dụng trong y học***

Việc ứng dụng CKS trong y học có ý nghĩa quan trọng hơn bất kỳ ứng dụng nào khác của CKS. Trước đây các bệnh nhiễm trùng là mối đe dọa rất lớn đối với con người và các động vật khác. Ngày nay, CKS được ứng dụng rộng rãi trong y học để chữa trị các bệnh nhiễm khuẩn, nhiễm nấm, trong phẫu thuật, trong điều trị các vết thương... Các CKS được sử dụng phổ biến: penicillin, tetracyclin, cephalosporin, ampicillin,...

Tuy nhiên, cùng với việc ứng dụng CKS là việc xuất hiện hiện tượng kháng thuốc.

Hiện tượng mầm bệnh vẫn còn sống sót sau khi đã điều trị kháng sinh gọi là hiện tượng kháng thuốc (kháng kháng sinh).[3]

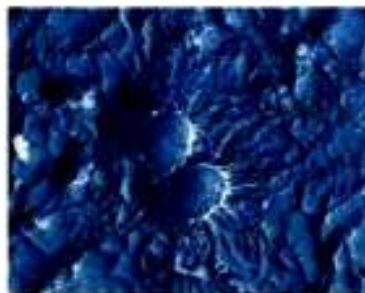
Vấn đề kháng thuốc của VSV đã được người ta biết đến từ lâu. Nhưng hiện nay hiện tượng kháng thuốc đã trở nên hết sức nghiêm trọng và đe dọa trực tiếp đến tính mạng của toàn nhân loại.[8]

Cơ chế của sự kháng thuốc rất đa dạng và thường khác nhau với từng chủng VSV.[3]



❖ **Một số vi sinh vật kháng thuốc:**

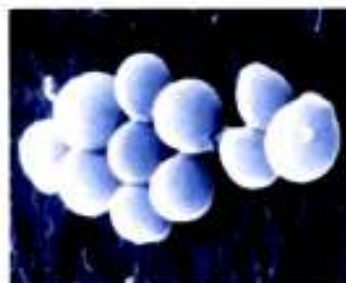
Các chủng *Staphylococcus aureus* gây các bệnh đường tai, mũi, họng đã kháng lại tất cả các kháng sinh hiện có, kể cả methicillin, cephalosporin và các CKS có vòng  $\beta$ -lactam khác, cũng như các kháng sinh macrolid như erythromycin, streptomycin,... Kháng sinh duy nhất chống *S.aureus* có hiệu lực là vancomycin mà loại thuốc này lại độc và gây nhiều phản ứng phụ cho cơ thể. Gần đây một số chủng trong loài này cũng đã kháng cả vancomycin.



Hình 1.1. *Staphylococcus aureus* [33]

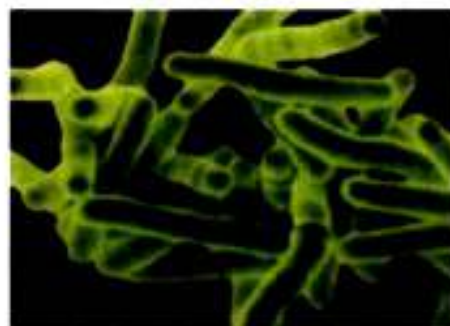
*Pseudomonas aeruginosa*-trực trùng mũ xanh gây nhiều bệnh nghiêm trọng ở các vết mổ, vết bỏng, viêm niệu đạo, viêm phổi, màng não mũ... là loại nhờn nhiều kháng sinh. Khi kiểm nghiệm trên bệnh nhân và in vitro *P.aeruginosa* đã nhờn hàng loạt kháng sinh như mezlocilline, ceftazidine, netilmicin, aztreonam, imipenem, mezopenen, gentamycin, tobramycin, amikacin, ciproffloxacin, levfloxacin và cả các kháng sinh thế hệ mới như cephalosporin, imipinem, floruoquinol.

*Candida albicans* là tác nhân gây nhiều bệnh, đặc biệt là ở các niêm mạc (niêm mạc miệng, lưỡi, dạ dày hành tá tràng, đường ruột, niệu đạo, sinh dục,...). Hiện tại, 25% bệnh tai-mũi-họng do *C.albicans* trở nên không kiểm soát nổi do đã nhờn với tất cả các kháng sinh chống nấm hiện có như amphotericin B, vaclotrimazole, nystatin và 5-flourocytosine. Đặc biệt *C.albicans* đối với bệnh nhân AIDS là vấn đề nan giải nhất.



Hình 1.2. *Pseudomonas aeruginosa* [34] Hình 1.3. *Candida albicans* [35]

VK lao *Mycobacterium tuberculosis* đã trở nên nhờn nhiều loại kháng sinh hiện có, đang đe dọa tính mạng của toàn nhân loại.



Hình 1.4. *Mycobacterium tuberculosis*[36]

#### 1.2.4.2. Sử dụng CKS trong chăn nuôi

Trong chăn nuôi CKS được dùng để phòng và chữa các bệnh cho gia súc, gia cầm và để kích thích sinh trưởng của động vật, nhất là các động vật còn non. Các chất được sử dụng rộng rãi hơn cả là penicillin, biomicilin, tetracyclin, grizin, teramycin, xintomycin. Ngoài ra người ta còn sử dụng một số chất khác như streptomycin, nixtatin,... [6]

#### 1.2.4.3. Sử dụng CKS trong bảo vệ thực vật

Trong trồng trọt người ta sử dụng CKS để phòng và chống các bệnh thực vật. Lúc đầu người ta sử dụng các CKS đã được dùng cho y học, chẳng hạn như penicillin, streptomycin,... nhưng sau khi các CKS đã được sử dụng khá phổ biến trong y học thì việc dùng quá rộng rãi các CKS này có thể làm xuất



hiện các loại VSV kháng thuốc, và do đó có thể ảnh hưởng trực tiếp đến tác dụng chữa bệnh cho người. Cho nên về sau người ta đã quyết định sản xuất những CKS dành riêng cho trồng trọt.[6]

Ngoài tác dụng chữa bệnh, CKS còn được sử dụng có hiệu quả như là một chất kích thích sinh trưởng của thực vật. Người ta đã chứng minh được rằng CKS có tác dụng là cho cây mau lớn và làm tăng tỉ lệ nảy mầm của hạt. Chẳng hạn penicillin và chlortetracyclin kích thích sự sinh trưởng của củ cải và đậu.

Một số CKS có tác dụng gián tiếp kích thích sinh trưởng của thực vật bằng cách làm tăng số lượng các VSV có lợi trong vùng rễ thực vật, một số khác lại làm tăng số lượng nốt sần của cây họ đậu.

Tuy nhiên, một số CKS lại có ảnh hưởng xấu đến thực vật. Chẳng hạn trong nhiều trường hợp streptomycin có thể ức chế sự hình thành diệp lục (H. Euler, L. Heller, 1950).[8]

### **1.3. Nấm sợi (Filamentous fungi)**

#### ***1.3.1. Một số đặc điểm sinh học và phân loại của nấm sợi***

- Nấm sợi có cấu tạo khuẩn ty dạng sợi, sợi nấm (hypha) là những ống dài phân nhánh hay không phân nhánh, có hay không có vách ngăn, đường kính sợi từ 3-3,5 $\mu$ m. Cấu trúc sợi nấm gồm có thành tế bào, màng, tế bào chất và nhân. Thành tế bào nấm sợi chứa kitin-cellulose hoặc kitin-glucan (theo W. Loeffler, 1976). Bên trong tế bào nấm còn có không bào, ti thể, mạng lưới nội chất, bào nang, thể màng biên,...

- Đỉnh sợi nấm bao gồm một chóp nón, không tăng trưởng và có tác dụng che chở bảo vệ cho phần ngọn của sợi nấm. Dưới chóp nón là một phần có thành rất mỏng. Dưới nữa là phần tạo ra thành tế bào. Dưới nữa là phần tăng trưởng. Ngọn sợi nấm tăng trưởng được là nhờ phần này. Dưới nữa là phần cứng hay phần thành thực của sợi nấm. Bắt đầu từ phần này trở xuống là



chấm dứt sự tăng trưởng của sợi nấm. Đây là phần quyết định sự tăng trưởng và sự phân nhánh của sợi nấm.

- Bào tử nấm khi rơi vào một điều kiện thích hợp nó sẽ nảy mầm mọc ra theo cả ba chiều thành một hệ sợi nấm, còn gọi là khuẩn lạc. Ta phân biệt thành hai loại sợi: sợi cơ chất và sợi khí sinh. Sợi cơ chất cắm sâu vào môi trường và hấp thụ chất dinh dưỡng còn sợi khí sinh phát triển tự do trong không khí, từ sợi nấm khí sinh sẽ có một số sợi phát triển thành sợi nấm sinh sản mang các bào tử gọi là cuống sinh bào tử.[9]

☞ Các đặc điểm về sợi nấm và khuẩn lạc là một trong các chỉ tiêu phân loại của phân loại học hình thái. Người ta căn cứ vào đặc điểm sợi nấm có hay không có vách ngăn, màu sắc, hình dạng sợi nấm,... để xếp nấm sợi vào các nhóm phân loại khác nhau. Thường các nấm sợi bậc thấp sợi nấm không có vách ngăn thuộc hai chi phổ biến là *Rhizopus* và *Mucor*. Các nấm sợi có vách ngăn thuộc nấm sợi bậc cao, có thể thuộc các lớp Ascomycetes, Basidiomycetes hoặc Deuteromycetes. Sau đó, người ta phân loại chi tiết hơn căn cứ vào đặc điểm về khuẩn lạc như: màu sắc, kích thước khuẩn lạc, tốc độ phát triển, có hay không có giọt tiết, sắc tố,...

#### ❖ Sự sinh sản nấm sợi

Nấm sợi có 2 hình thức sinh sản chính: sinh sản vô tính và sinh sản hữu tính.

##### • Sinh sản sinh dưỡng

##### • Sinh sản vô tính

- *Sinh sản bằng đoạn sợi*: từ một đoạn khuẩn ty riêng rẽ có thể nhanh chóng phát triển thành khuẩn ty nếu gặp điều kiện thuận lợi.
- *Sự tạo bào tử áo (Clamydospore)*: trên sợi nấm xuất hiện những tế bào tròn có màng dày bao bọc bên trong có chứa rất nhiều chất dự trữ.
- *Hạch nấm*: từ hạch nấm có thể phát triển thành sợi nấm.

- Sự sinh sản bằng bào tử vô tính ở nấm sợi có thể gặp ở 2 hình thức: bào tử kín và bào tử đỉnh.
  - Sự tạo bào tử kín (*Sporangiospore*): thường gặp ở chi *Rhizopus* và *Mucor*.
  - Sự tạo bào tử đỉnh (*Conodiospore*): nhiều loài nấm sợi và tất cả các nấm trong lớp Deuteromycetes sinh sản bằng hình thức này. Các bào tử đỉnh được hình thành trên thể bình. Bào tử đỉnh có nhiều màu sắc khác nhau do đó tạo các khuẩn lạc nấm có nhiều màu sắc khác nhau.

- **Sự sinh sản hữu tính**

Sự hình thành bào tử hữu tính ở nấm sợi bao gồm các hình thức sau:

- *Bào tử noãn (Oospore)*

Gặp ở lớp Nấm noãn Oomycetes, các noãn khí được sinh ra trên đỉnh khuẩn ty phân nhánh, bên trong noãn khí chứa nhiều noãn cầu. Hùng khí có dạng ống được sinh ra gần noãn khí trên cùng một sợi nấm với noãn khí. Hùng khí đâm qua màng noãn khí tìm đến noãn cầu để thụ tinh tạo ra noãn bào tử ( $2n$ ). Noãn bào tử được bao bọc bởi màng dày, sau đó phân chia nhiều lần, lần đầu giảm nhiễm để tạo ra nhiều bào tử  $1n$ . Bào tử được phóng thích ra ngoài và phát triển thành sợi nấm.

- *Bào tử tiếp hợp (Zygospore)*

Gặp ở lớp Nấm tiếp hợp Zygomycetes, bào tử hữu tính được sinh ra trên hai sợi nấm khác giới nhau được gọi là sợi âm và sợi dương. Hai sợi nấm này tiếp hợp tạo bào tử tiếp hợp, bào tử tiếp hợp này mầm tạo ra bào tử kín. Bào tử kín sẽ phân chia nhiều lần, lần đầu giảm nhiễm để tạo ra các bào tử  $1n$ . Bào tử được phóng thích ra ngoài nảy mầm tạo sợi nấm mới.



– *Bào tử túi (Ascospore)*

Gặp ở lớp nấm túi Ascomycetes, cơ quan sinh sản là túi bào tử (ascus), gồm có túi bào tử đực và túi bào tử cái. Khi sinh sản thì xảy ra quá trình phối chất giữa túi bào tử đực và túi bào tử cái, sau đó xảy ra quá trình phân chia tạo các bào tử đơn bội.

– *Bào tử đảm (Basidiospore)*

Gặp ở lớp Nấm đảm Basidiomycetes, cơ quan sinh sản là đảm bào tử. Trên đảm sẽ hình thành các bào tử đảm. Bào tử đảm sẽ nảy mầm thành sợi nấm mới. Ngoài ra đảm còn có thể được sinh ra trực tiếp trên khuẩn ty thể hoặc ở những cơ quan đặc biệt gọi là quả đảm.[4]

✎ Đặc điểm về sinh sản là đặc điểm quan trọng nhất của phân loại hình thái. Người ta căn cứ vào hình thức sinh sản, đặc điểm cơ quan sinh sản (hình dạng, kích thước, màu sắc, đặc điểm phân nhánh của cuống sinh bào tử, thể bình, đặc điểm bào tử) để phân loại chi tiết hơn. Dựa vào, đặc điểm sợi nấm, khuẩn lạc, sinh sản và một số đặc điểm sinh lí, sinh hóa khác, người ta có thể phân loại các nấm sợi đến loài.

❖ **Phân loại vi nấm:**

Cho đến nay, phân loại vi nấm nói chung và phân loại nấm sợi nói riêng vẫn đang ở thời kì phân loại học hình thái dựa vào các đặc điểm hình thái, nuôi cấy, một số đặc điểm sinh lí, sinh hoá và phương thức sinh sản. Các phương pháp sinh hoá và sinh học phân tử vẫn chỉ được sử dụng rất ít trong phân loại vi nấm.

Hiện nay, có hai hệ thống phân loại nấm được sử dụng phổ biến hơn cả là: hệ thống phân loại hình thái học và hệ thống phân loại phát sinh, với nhiều khoá phân loại được sử dụng như: Saccardo P.A (1880-1886), Barron G.L



(1968), Hughes. SJ (1953), Ellis M.B (1971), Ainsworth G.C (1973), Bùi Xuân Đồng (1977, 1984), Barnett H.L và cộng sự (1972).

Theo khoá phân loại của Ainsworth và Bisby (1973) giới nấm gồm các nhóm phân loại chính sau:

- ❖ Ngành Nấm nhầy Myxomycota.

- ❖ Ngành Nấm thực Eumycota.

- ↳ Ngành phụ Mastigomycotina: Lớp Chytridiomycetes, Lớp Hyphochytridiomycetes, Lớp Oomycetes.

- ↳ Ngành phụ Zygomycetina: Lớp Zygomycetes, Lớp Trichomycetes.

- ↳ Ngành phụ Ascomycetina: Lớp Hemiascomycetes, Lớp Loculoascomycetes, Lớp Plectomycetes, Lớp Laboulbeniomyces, Lớp Pyrenomyces, Lớp Discomycetes.

- ↳ Ngành phụ Basidiomycotina: Lớp Teliomycetes, Lớp Hymenomycetes, Lớp Gasteromycetes.

- ↳ Ngành phụ Deuteromycotina: Lớp Blastomyces, Lớp Hyphomycetes, Lớp Coelomycetes.[13]

### ***1.3.2. Đặc điểm sinh lí, sinh hóa của nấm sợi***

- Nấm sợi là một trong những đại diện điển hình của VSV nhân chuẩn, chúng thuộc loại hiếu khí bắt buộc, không có diệp lục, không có khả năng tự dưỡng, sống kí sinh hoặc hoại sinh.[9]

- Nấm sợi là VSV ưa mát (Psychrotropes), có nhiệt độ tối ưu khoảng 25<sup>0</sup>C, nhưng cũng có thể thích nghi với 0<sup>0</sup>C.[10]

- Nấm sợi ưa sống trong môi trường có pH axit (3-6).[10]

- Sự tăng trưởng của nấm sợi mặc dù không cần ánh sáng nhưng ánh sáng lại cần cho sự kết bào tử của nhiều loài. Ánh sáng cũng quan trọng trong sự phát tán bào tử, nhiều loài bào tử tung về phía có ánh sáng.[16]

- Trong hoạt động sống của mình, nấm sợi sinh ra nhiều chất có hoạt tính sinh học có ý nghĩa quan trọng đối với sống con người và đã được con người ứng dụng rộng rãi trong đời sống cũng như trong công nghệ sản xuất (như enzyme, vitamin, kháng sinh, kích thích tố sinh trưởng,...)[1]. Đặc biệt nấm sợi có khả năng sinh enzyme rất lớn, hiện nay người ta đã sản xuất trên 80 loại enzyme khác nhau từ nấm sợi, trong đó có 10 enzyme được ứng dụng rộng rãi.[20]

❖ Một số enzyme từ nấm sợi:

- **Amylase:** là enzyme thủy phân các liên kết  $\alpha$ -1,4-glucosit trong polysaccharid tạo thành maltose và dextrin. Enzyme amylase từ nấm sợi được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực như trong sản xuất bánh mì, công nghiệp bánh kẹo, công nghiệp rượu, bia, sản xuất các sản phẩm rau quả, công nghiệp giấy,...

+ Trong công nghiệp sản xuất rượu: khoảng vài chục năm nay enzyme amylase từ nấm sợi đã hoàn toàn thay thế malt, người ta thường dùng enzyme amylase từ *Aspergillus awamori*, *A.oryzae*, *A.usamii*. Ở Việt Nam, các nhà máy rượu thường dùng chế phẩm enzyme từ *A.usamii*.

+ Trong sản xuất bia, người ta dùng enzyme  $\alpha$ -amylase để đường hoá các nguyên liệu phi malt, thường dùng chế phẩm enzyme từ *A.oryzae*.

+ Trong sản xuất bánh mì, thêm 0,002-0,003% chế phẩm amylase vào bột sẽ làm tăng hương vị, màu sắc, thể tích riêng, độ xốp của bánh mì,... thường dùng enzyme từ *A.oryzae*. Người ta nhận thấy enzyme amylase từ nấm sợi vượt xa so với enzyme từ VK hoặc thực vật.

- **Protease:** là enzyme thủy phân liên kết peptid trong các polypeptid, được ứng dụng trong công nghiệp bột giặt, trong công nghiệp sữa, công nghiệp dược, công nghiệp thuộc da, công nghiệp thực phẩm,...[15]

+ Trong công nghiệp thịt: enzyme protease được sử dụng để làm mềm thịt, tăng chất lượng thịt, rút ngắn thời gian chín.

+ Trong công nghiệp sữa: Nhật Bản dùng chế phẩm enzyme protease từ *Mucor* để sản xuất phomat, một số nước khác dùng enzyme protease từ *A.candidus*.

+ Trong công nghiệp da: dùng chế phẩm enzyme protease để làm mềm và tách lông, thường dùng chế phẩm enzyme protease từ nấm *A.oryzae*, *A.flavus*, *A.parasitucus*.

+ Trong sản xuất tơ tằm: dùng để tách xerixin còn lại trên sợi tơ tằm sau khi đã xử lí để làm tăng chất lượng tơ tằm.[26]

- **Cellulase:** là enzyme thủy phân liên kết 1-4 $\beta$  glucosit trong cellulose, được ứng dụng trong công nghiệp thức ăn gia súc, công nghiệp thực phẩm, công nghiệp sợi dệt và chất tẩy rửa, xử lý môi trường,...[15]

+ Trong công nghiệp thức ăn gia súc: các nguyên liệu có nguồn gốc thực vật nếu được gia công bằng enzyme cellulase sẽ mềm ra, tăng hệ số đồng hoá và nói chung chất lượng được tăng lên. Ngoài ra, người ta còn dùng enzyme cellulase thủy phân gỗ và các phế liệu từ gỗ tạo thành các đường đơn giản, sau đó dùng các đường này để chế biến thức ăn gia súc.

+ Trong công nghiệp thực phẩm: enzyme cellulase được dùng để làm tăng hiệu suất trích ly các chất khác nhau từ nguyên liệu thực vật như protein, acid amin, vitamin từ đậu tương, thạch từ rong, tinh bột từ bã khoai mì,...[26]



- **Pectinase:** là enzyme xúc tác sự phân hủy của các polymer pectin, sản phẩm tạo thành là axit galacturonic, galactose, metanol, arabinose,... được ứng dụng trong sản xuất nước quả, rượu vang, trích ly các dược liệu đông y, ứng dụng trong chăn nuôi, sản xuất nước giải khát, sản xuất cà phê và cà phê hoà tan, chế biến đậu, gai... [15], [26]

### 1.3.3. Một số nhóm nấm sợi chính có hoạt tính kháng sinh

#### 1.3.3.1. *Trichoderma* [15],[29]

Hầu hết các loài *Trichoderma* không sinh sản hữu tính, chúng sinh sản vô tính bằng bào tử đỉnh.

Khuẩn lạc nấm có màu trắng hoặc từ trắng đến lục, vàng xanh, lục xin đến lục đậm. Các chủng của chi *Trichoderma* có tốc độ phát triển nhanh, chúng có thể đạt đường kính khuẩn lạc từ 2-9cm sau 4 ngày nuôi cấy ở 25<sup>0</sup>C.

Khuẩn ty không màu, cuống sinh bào tử phân nhánh nhiều, ở cuối nhánh phát triển thành một khối tròn mang các bào tử trần không có vách ngăn, không màu, liên kết với nhau thành chùm nhỏ ở đầu cành nhờ chất nhầy. Bào tử hình cầu, hình ellip hoặc hình thuôn.

Các loài *Trichoderma* phân bố khá rộng, chúng có thể tồn tại trong tất cả các vùng khí hậu từ miền cực Bắc đến những vùng núi cao cũng như miền nhiệt đới.



Hình 1.5. Bào tử *Trichoderma* [31]



Hình 1.6. Khuẩn lạc *Trichoderma* [32]

Trong số các loài thuộc chi *Trichoderma* có loài *Trichoderma viridae* sinh CKS tricolorin.

Các loài *Trichoderma* có khả năng ức chế VSV gây bệnh thực vật rất hiệu quả, trong đó phải kể đến *Trichoderma harzianum*, do đó các loài nấm thuộc chi này được ứng dụng rộng rãi trong bảo vệ thực vật, cải thiện năng suất cây trồng. Ngoài ra, các loài nấm thuộc chi *Trichoderma* còn có khả năng sinh nhiều enzyme ngoại bào và được ứng dụng trong công nghệ sản xuất enzyme.

#### *1.3.3.2. Acremonium[11]*

Các loài thuộc chi *Acremonium* năm 1839 được Corda mô tả với tên *Cephalosporium*, năm 1971 được Gams chuyển sang chi *Acremonium*.

Khuẩn lạc màu trắng, hồng nhạt hoặc da cam nhạt. Giá bao tử không có hoặc ngắn, nếu có, phân nhánh ít hoặc không phân nhánh. Thể bình thon dần từ gốc đến đỉnh.



Hình 1.7. *Acremonium* [38]

Trong chi này có loài *Acremonium strictum* W.Gams (*Cephalosporium acremonium*) sinh CKS tự nhiên là cephalosporin C có tác dụng trên *Staphylococcus aureus* và *Salmonella typhi* nhưng hoạt phổ hẹp và tác dụng yếu, do đó người ta chú ý đến các sản phẩm bán tổng hợp của CKS cephalosporin. Tuy nhiên trong vài năm gần đây, nhờ việc áp dụng các kỹ thuật tiên tiến, đã mở ra triển vọng mới cho nhóm kháng sinh này nên việc



nghiên cứu xây dựng và hoàn thiện công nghệ lên men cephalosporin tự nhiên lại được tiếp tục triển khai.

#### **1.3.3.3. *Botryotrichum*[12]**

*Botryotrichum* được Saccardo và Marchal mô tả năm 1885. Khuẩn ty màu nâu. Giá bào tử trần ít phân hoá về hình thái, nhẵn, không màu, phân nhánh. Có hai loại tế bào sinh bào tử trần: loại thứ nhất hình trụ, tạo thành các aleurioconodi; loại thứ hai hình chai, tạo các phialoconodi.

Các loài thuộc chi này ít phổ biến, có ít tài liệu mô tả, do đó ở đây chúng tôi chỉ trình bày sơ lược.

#### **1.3.4. *Sự phân bố và vai trò của nấm sợi trong tự nhiên***

- Nấm sợi phân bố rộng rãi trong tự nhiên: đất, nước, không khí, nguyên vật liệu, lương thực, thực phẩm.[23]

- Đặc biệt hệ sinh thái RNM là môi trường lí tưởng cho sự phát triển của nấm sợi. Các nấm sợi ở RNM có vai trò rất quan trọng trong chu trình tuần hoàn vật chất ở RNM, chúng tham gia phân giải một cách tích cực các cơ chất chứa cellulose, lignin-cellulose vốn rất nhiều trong rừng ngập mặn. Các nấm sợi trong khu hệ sinh thái này có con đường trao đổi chất đặc biệt và người ta tin rằng chúng sẽ tạo ra nhiều sản phẩm trao đổi chất mới lạ. Trong những năm gần đây, nấm sợi rừng ngập mặn thu hút sự quan tâm nghiên cứu của nhiều nhà khoa học với mong muốn tìm ra các chất hoạt động sinh học quý, trong đó có các CKS mới.[26]

- Nấm sợi sinh ra nhiều chất có hoạt tính sinh học như các enzyme, các CKS, kích thích tố sinh trưởng,...

- Bên cạnh đó nấm sợi cũng là nguyên nhân gây ra nhiều tổn thất lớn cho việc bảo vệ mùa màng, lương thực, thực phẩm, hàng hóa, vải vóc, khí tài, dụng cụ quang học, phim ảnh, sách vở.



- Nhiều loại nấm sợi gây nên những bệnh khá phổ biến và khó điều trị ở người, gia súc, cây trồng. Đặc biệt những loài nấm sợi tiết độc tố gây ngộ độc thức ăn như *Aspergillus*, gây tổn thất lớn trong chăn nuôi.[23]

## **CHƯƠNG II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.1. Vật liệu**

#### **2.1.1. Mẫu thí nghiệm**

- Ba chủng nấm sợi phân lập được từ RNM có hoạt tính kháng sinh (kí hiệu là N20, TH1.9, NHA7.3<sub>1</sub>), trong bộ sưu tập giống của Phòng thí nghiệm Vi sinh Trường ĐHSP Tp.HCM.

- Các VSV kiểm định gồm:

- + *E.coli* gây bệnh tiêu chảy nhận từ Viện Pasteur, Tp.HCM.
- + *Pseudomonas aeruginosa*: gây viêm phế quản, viêm màng não, viêm tai giữa nhận từ Viện Pasteur.
- + *Candida albicans* gây bệnh ở đường sinh dục nhận từ Viện Pasteur.
- + *Salmonella* gây bệnh thương hàn, gây ngộ độc thức ăn, nhận từ bộ sưu tập giống của PTN Vi sinh-Sinh hóa Trường ĐHSP Tp.HCM.
- + *B. subtilis*, *A. niger* gây bệnh thối cổ rễ cho cây con ở các cây họ đậu, bắp cải,... nhận từ bộ sưu tập giống của PTN Vi sinh-Sinh hóa Trường ĐHSP Tp.HCM.
- + *Fusarium oxysporum* gây bệnh héo vàng cho nhiều loại cây trồng cạn như bông, đậu, nhiều loại đậu, nhiều loại cà, khoai tây, nhận từ bộ sưu tập giống của PTN Vi sinh-Sinh hóa Trường ĐHSP Tp.HCM.
- + Vi khuẩn *E.coli* kháng thuốc nhận từ Phòng Vi sinh, Bệnh viện Bình Dân. Vi khuẩn này đã kháng nhiều loại kháng sinh: cefuroxime, ceftazidim, cefoperazone, amikacin, tobramycin, gentamycin, ciprofloxacin, piperacillin+tazobactam, amoxicillin+acid clavulanic, ampi+sulbact, fosmicin.

- + Sầu tơ nhận từ công ty VIPESCO, Tp.HCM.
- + Tầm nhận từ công ty Dầu tầm tơ, Lâm Đồng.

### **2.1.2. Dụng cụ và thiết bị**

Nồi hấp vô trùng Autoclave (Đài Loan), Tủ sấy (Mettler, Đức), Máy lắc (Gerhardt, Đức), Tủ cấy vô trùng (Việt Nam), Máy li tâm (Hettich, Đức), Máy đo độ ẩm (Sartorius, Đức), Tủ giữ giống (SANYO, Nhật), Tủ ủ mẫu (SANYO, Nhật), Tủ lạnh (National, Nhật), Kính hiển vi (Olympus, Nhật), Máy chụp ảnh kỹ thuật số (Olympus, Nhật), Cân phân tích điện tử (Sartorius, Đức), Máy đo pH (Windaus, Mỹ).

## **2.2. Các môi trường nghiên cứu đã sử dụng**

**MT1. Môi trường *Glucose Yeast Extract Agar* (Môi trường nuôi cấy và giữ giống nấm sợi RNM YEA):** cao nấm men 4g, glucose 20g, agar 20g, nước cất 1l.

**MT2. Môi trường *Malt Extract Agar* (môi trường phân loại nấm sợi RNM MEA):** cao malt 20g, peptone 1g, glucose 20g, agar 20g, nước cất 1l.

**MT3. Môi trường *Czapek-dox nước biển* (nuôi cấy nấm sợi RNM):**  $\text{NaNO}_3$  3.5g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.5g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5g, KCl 0.5g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1g, glucose 20g, agar 20g, nước biển 1l.

**MT4. Môi trường *Potato Glucose Agar* (môi trường nuôi cấy nấm gây bệnh PDA):** khoai tây 300g, glucose 50g, nước cất 1l

Khoai tây gọt vỏ, rửa sạch, thái nhỏ, cân lấy 300g cho vào 500ml đun sôi trong 30 phút. Lọc lấy nước trong, bổ sung nước cất cho đủ 1000ml, cho 50g glucose vào, đun cho tan là được. Nếu làm môi trường đặc bổ sung thêm agar.

**MT5. Môi trường *Meat Extract Peptone Agar* (môi trường nuôi cấy và giữ giống vi khuẩn MPA):** cao thịt 5g, peptone 5g, NaCl 5g, agar 20g, nước cất 1l.



**MT6. Môi trường Hansen** (nuôi cấy và giữ giống nấm men kiềm định): glucose 5g, peptone 5g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2g, agar 20g, nước cất 1l

**MT7. Môi trường King's B** (nuôi cấy và giữ giống *Pseudomonas aeruginosa*): peptone 20g, glycerol 10g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.5g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.5g, agar 15g, nước cất 1l.[36]

**MT8. Môi trường cảm ứng sinh tổng hợp enzyme amylase:** thành phần tương tự như môi trường Czapek-dox nhưng thay 20g glucose bằng 20g tinh bột dễ tan.

**MT9. Môi trường cảm ứng sinh tổng hợp enzyme protease:** thành phần tương tự như môi trường Czapek-dox nhưng thay 20g glucose bằng 20g casein.

**MT10. Môi trường cảm ứng sinh tổng hợp enzyme cellulase:** thành phần tương tự như môi trường Czapek-dox nhưng thay 20g glucose bằng 20g CMC.

**MT11. Môi trường cảm ứng sinh tổng hợp enzyme pectinase:** Cà rốt 200g, nước cất 1l.

Cách pha: cà rốt gọt vỏ, xay nhỏ, đun sôi với 1l nước cất trong một giờ, thêm một ít  $\text{CaCO}_3$  để trung hòa môi trường, lọc lấy nước trong, bổ sung agar.

**MT12. Môi trường bán rắn khảo sát khả năng sinh tổng hợp các hệ enzyme thủy phân amylase:** trấu 55g, cám 30g, bột bắp 5g, bã khoai mì 5g, đường 4g,  $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$  0.1g, urê 0.2g,  $\text{CaCl}_2$  0.1g, KCl 0.05g,  $\text{MgSO}_4$  0.05g, HCl 0.05g, độ ẩm 50-60%.

**Cách pha:** lần lượt cho các chất khoáng hòa tan trong nước cất trước khi trộn chung. Trộn đều hỗn hợp với nhau, bổ sung nước sao cho độ ẩm đạt 50-60%.

Cho 15g môi trường vào bình tam giác 250ml, hấp khử trùng.

**MT13. Môi trường bán rắn khảo sát khả năng sinh tổng hợp các hệ enzyme thủy phân cellulase:** tương tự môi trường bán rắn khảo sát khả năng sinh tổng hợp enzyme amylase nhưng thay 5g bột bắp thành 5g bã mía.

**MT14. Môi trường bán rắn khảo sát khả năng sinh tổng hợp các hệ enzyme thủy phân pectinase:** tương tự môi trường bán rắn khảo sát khả năng sinh tổng hợp enzyme amylase nhưng thay 5g bột bắp và 5g bã khoai mì thành 10g bột cà rốt.

**MT15. Môi trường bán rắn khảo sát khả năng sinh tổng hợp các hệ enzyme thủy phân protease:** 60% cám, 30% bột đậu nành, 10% bột ngô, 20-25% trấu.

**MT16. Môi trường khảo sát khả năng phân giải dầu:**  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3g,  $\text{MgSO}_4$  0.4g,  $\text{KNO}_3$  3g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.7g, dầu 50ml, nước biển 950ml.

## **2.3. Phương pháp nghiên cứu**

### **2.3.1. Phương pháp bảo quản giống**

Giống cấy trên thạch nghiêng được bảo quản ở  $4^\circ\text{C}$  trong tủ lạnh, sau 2-3 tháng cấy truyền định kì sang môi trường mới.

### **2.3.2. Phương pháp khảo sát khả năng kháng khuẩn**

**Nguyên tắc:** hoạt tính kháng khuẩn được sơ bộ xác định bằng kích thước của vòng vô khuẩn D-d (cm). Trong đó: D là đường kính vòng vô khuẩn (cm), d là đường kính khối thạch (cm).

D-d  $\geq$  2,5 cm: rất mạnh

D-d  $\geq$  2 cm: mạnh

D-d  $\geq$  1,5 cm: trung bình

D-d < 1,5 cm: yếu

D-d = 0: không kháng, kí hiệu (-)

#### *2.3.2.1. Phương pháp khối thạch*

Cấy nấm sợi RNM trên MT2, ủ ở nhiệt độ phòng từ 3-4 ngày. Dùng khoan nút chai vô trùng khoan các khối thạch có đường kính 9mm.

Chuẩn bị môi trường nuôi cấy VSV kiểm định (MPA: vi khuẩn, Hansen: nấm men), đổ môi trường thành một lớp mỏng lên đĩa petri, cấy trái VSV kiểm định lên bề mặt môi trường tương ứng.

Dùng kẹp gấp các khối thạch chùng nấm sợi RNM nghiền cứu đặt lên các đĩa thạch có VSV kiểm định.

Đặt mẫu trong tủ lạnh từ 4-8 giờ, sau đó ủ ở nhiệt độ phòng 2 ngày.

Xác định sơ bộ hoạt tính kháng sinh bằng cách đo kích thước vòng vô khuẩn D-d (cm).

#### *2.3.2.2. Phương pháp đục lỗ*

Cấy nấm sợi trong ống thạch nghiêng, sau 3 ngày cho 5ml nước cất vô trùng vào ống giống, lăn nhẹ trên tay để cho các bào tử thấm nước tạo thành dịch huyền phù. Dùng pipet vô trùng hút 1ml dịch huyền phù cho vào bình tam giác chứa 50ml MT1 dịch thể. Ủ ở nhiệt độ phòng, sau 3-5 ngày thu dịch lên men.

Cấy trái VSV kiểm định lên môi trường tương ứng. Dùng khoan nút chai khoan một lỗ giữa đĩa VSV kiểm định. Hút 0,1ml dịch lên men chùng nấm sợi RNM nghiền cứu cho vào lỗ khoan.

Đặt mẫu 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 (cm).

#### *2.3.2.3. Phương pháp khoanh giấy lọc*

Nuôi cấy nấm sợi RNM trong các bình tam giác chứa MT1 dịch thể, sau 3-5 ngày thu dịch lên men. Dùng pipet hút 0,1 ml dịch lên men nói trên cho vào khoanh giấy lọc vô trùng có đường kính 1 cm, để khô tự nhiên hoặc sấy nhẹ ở 35<sup>0</sup>C.



Cấy trải VSV kiểm định lên môi trường tương ứng. Dùng kẹp gấp các khoanh giấy lọc có tấm CKS, đặt lên đĩa thạch có VSV kiểm định.

Đặt mẫu trong tủ lạnh từ 4-8h. Ủ ở nhiệt độ phòng 2 ngày, xác định hoạt tính kháng sinh bằng cách đo vòng vô khuẩn D-d (cm).

### **2.3.3. Phương pháp khảo sát khả năng đối kháng với nấm gây bệnh [5],[20]**

**Nguyên tắc:** dựa vào mức độ phát triển của nấm gây bệnh để đánh giá mức độ kháng nấm gây bệnh của các chủng nấm sợi rừng ngập mặn.

Nấm sợi RNM không kháng nấm gây bệnh thì nấm gây bệnh phát triển mạnh, kí hiệu: (-).

Nấm sợi RNM kháng nấm gây bệnh thì nấm gây bệnh phát triển yếu đi hoặc không phát triển. Tùy theo mức độ mà chúng tôi kí hiệu là +, ++, +++.

+ : kháng yếu

++ : kháng khá mạnh

+++ : kháng mạnh

**Thí nghiệm:** nuôi nấm sợi RNM trong các bình tam giác chứa 50ml MT1 dịch thể. Sau 3-5 ngày thu dịch lên men.

Cho vào mỗi ống nghiệm 4ml MT4 đã vô trùng và 1ml dịch lên men nói trên (tổng thể tích trong mỗi ống nghiệm là 5ml). Cấy nấm gây bệnh vào.

**Đối chứng:** cấy nấm gây bệnh vào ống nghiệm chứa 5ml MT4 dịch thể.

Quan sát từng ngày: sự phát triển của nấm gây bệnh, màu sắc khuẩn lạc, sắc tố tiết ra môi trường. Dựa vào sự phát triển của nấm gây bệnh để đánh giá sơ bộ khả năng kháng nấm của ba chủng nấm sợi nghiên cứu.

### **2.3.4. Phương pháp tách chiết kháng sinh [23]**

#### **2.3.4.1. Chiết rút kháng sinh bằng dung môi hữu cơ**

- Cấy nấm sợi trên các đĩa MT1, ủ 3-5 ngày.

- Cắt nhỏ khối thạch cho vào bình tam giác, bổ sung 4 lần thể tích dung môi acetone, n-butanol, ethyl acetat, nước 80<sup>0</sup>C, cồn tuyệt đối.

- Lắc 200 vòng trong 4h để chất kháng sinh hòa tan hết vào dung môi, lọc, thu được dịch chứa kháng sinh thô. Kiểm tra hoạt tính kháng sinh bằng phương pháp khoan giấy lọc.

#### *2.3.4.2. Chiết rút kháng sinh từ dịch lên men*

Nuôi nấm sợi trong bình tam giác chứa 50 ml MT1 dịch thể. Sau 3-5 ngày, lắc các bình tam giác nuôi nấm sợi nói trên với tốc độ 200 vòng/phút trong 2h. Li tâm tách riêng sinh khối và dịch lên men. Lọc dịch lên men qua màng lọc bảo tử, thu được dịch chứa kháng sinh thô. Thử hoạt tính kháng sinh bằng phương pháp khoan giấy lọc.

#### *2.3.5. Phương pháp khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố lý, hóa đến hoạt tính kháng sinh*

##### *2.3.5.1. Phương pháp xác định thời gian sinh tổng hợp CKS nhiều nhất [23]*

Nuôi nấm sợi trong các bình tam giác chứa 50ml MT1 dịch thể. Thu dịch chiết kháng sinh sau các khoảng thời gian: 48h, 72h, 96h, 120h, 144h, 168h. Kiểm tra hoạt tính kháng sinh bằng phương pháp đục lỗ.

##### *2.3.5.2. Phương pháp xác định ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt tính kháng sinh[23]*

**Thí nghiệm:** dịch chiết kháng sinh được xử lý nhiệt ở 40<sup>0</sup>C, 60<sup>0</sup>C, 80<sup>0</sup>C, 100<sup>0</sup>C trong 10 phút, 20 phút, 40 phút, 60 phút.

Kiểm tra hoạt tính kháng sinh bằng phương pháp đục lỗ.

**Đối chứng:** dịch chiết kháng sinh để ở nhiệt độ phòng, kiểm tra hoạt tính kháng sinh bằng phương pháp đục lỗ.

#### *2.3.6. Phương pháp thử khả năng diệt sâu hại cây trồng[13]*

**Nguyên tắc:** khả năng diệt sâu của các chủng nấm sợi RNM được đánh giá thông qua tỉ lệ sâu tơ, tằm chết và LD<sub>50</sub>.

Số sâu, tằm chết  $\geq 70\%$ : mạnh

$\geq 60\%$ : khá mạnh

$\geq 40\%$ : trung bình

$< 40\%$  yếu

*2.3.6.1. Phương pháp thử khả năng diệt sâu hại cây trồng bằng dịch lên men.*

**Thí nghiệm:** Chọn 30 tằm, sâu tơ khỏe mạnh cho vào đĩa petri vô trùng. Phun 3ml dịch lên men lên mỗi đĩa petri chứa 30 cá thể tằm, sâu tơ.

**Đối chứng:** tằm, sâu tơ không phun dịch lên men.

Sau một khoảng thời gian nhất định (4 giờ đối với tằm, 1 ngày đối với sâu tơ), bổ sung thức ăn.

Theo dõi trong 15 ngày, đếm số lượng tằm, sâu tơ chết sau mỗi ngày.

*2.3.6.2. Phương pháp thử khả năng diệt sâu hại cây trồng của bào tử nấm sợi RNM.*

**Thí nghiệm:** cấy nấm sợi trong các ống thạch nghiêng.

Nuôi tằm, sâu tơ trong các đĩa petri (30 cá thể/ đĩa), dùng que cấy vô trùng gạt bào tử nấm thuần khiết từ các ống giống lên tằm, sâu trong đĩa petri thí nghiệm.

**Đối chứng:** tằm, sâu tơ để nguyên không nhiễm nấm.

Bổ sung thức ăn sau những khoảng thời gian nhất định.

Theo dõi thí nghiệm trong 10 ngày, đếm số lượng tằm, sâu tơ chết qua mỗi ngày.

*2.3.7. Phương pháp quan sát hình thái và định danh nấm sợi [5],[20]*

❖ *Quan sát đại thể*

Cấy nấm sợi vào ống thạch nghiêng, sau 3 ngày cho 5 ml nước cất vô trùng vào ống giống, lắc 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 đồ một lớp mỏng MT2. Ủ ở nhiệt độ phòng, quan sát từng ngày khuẩn lạc về các đặc điểm sau:

- Tốc độ phát triển của khuẩn lạc.
- Màu sắc và sự biến đổi màu sắc của khuẩn lạc.
- Hình dáng khuẩn lạc, mép khuẩn lạc và sợi nấm.
- Giọt tiết
- Sắc tố tiết vào môi trường.

❖ *Quan sát vi thể.*

Đặt một miếng thạch mỏng có kích thước 0.5 x 0.5 cm lên một miếng lam vô trùng đặt ở giữa đĩa petri có 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 lam lên, đẩy nắp đĩa petri lại và ủ ở nhiệt độ phòng 2 ngày. Lấy lam ra, nhỏ lactophenol hoặc xanh methylen Löffler vào giữa lam và lamen, quan sát bằng kính hiển vi ở vật kính x40 và x100 về các đặc điểm sau:

- Hình dáng khuẩn ty: màu sắc, có vách ngăn hay không có vách ngăn, có phân nhánh hay không.
- Đặc điểm cơ quan sinh bào tử.
- Hình dáng bào tử.

**2.3.8. Phương pháp khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ lên khả năng sinh trưởng của nấm sợi RNM[14]**

Cấy nấm sợi trong các ống thạch nghiêng, ủ 3-5 ngày. Cho 5ml nước cất vô trùng vào mỗi ống giống, lăn nhẹ trên tay cho bào tử thấm nước tạo thành dịch huyền phù. Dùng que cấy nhúng nhẹ vào dịch huyền phù bào tử, cấy một điểm vào giữa đĩa petri có đồ một lớp mỏng MT3.

Ủ ở các nhiệt độ 20<sup>0</sup>C, 25<sup>0</sup>C, 30<sup>0</sup>C, 35<sup>0</sup>C, 40<sup>0</sup>C, 45<sup>0</sup>C, 50<sup>0</sup>C. Sau 3 ngày đo đường kính khuẩn lạc để xác định khả năng sinh trưởng của nấm sợi RNM.

**2.3.9. Phương pháp khảo sát ảnh hưởng của độ mặn lên khả năng sinh trưởng của nấm sợi RNM[14]**

Cấy nấm sợi trên môi trường Czapek-dox bổ sung NaCl với nồng độ 0%, 1%, 2.5%, 3%, 4%, 5%. Ủ ở nhiệt độ phòng. Sau 3 ngày đo đường kính khuẩn lạc để xác định khả năng sinh trưởng của nấm sợi RNM.

**2.3.10. Phương pháp khảo sát khả năng đồng hoá nguồn carbon của nấm sợi RNM[14]**

Cấy nấm sợi RNM trên MT3 lần lượt thay đường glucose bằng các đường fructose, sucrose (saccharose), lactose, galactose, maltose, tinh bột, CMC. Ủ 3 ngày ở nhiệt độ phòng, xác định khả năng sinh trưởng bằng cách đo đường kính khuẩn lạc.

**2.3.11. Phương pháp khảo sát khả năng đồng hoá nguồn nitơ của nấm sợi RNM[14]**

Cấy nấm sợi RNM trên MT3 lần lượt thay đường NaNO<sub>3</sub> bằng các nguồn nitơ khác như bột đậu nành, cao thịt, NH<sub>4</sub>Cl, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub>, NaNO<sub>2</sub>. Ủ 3 ngày ở nhiệt độ phòng, xác định khả năng sinh trưởng bằng cách đo đường kính khuẩn lạc.

**2.3.12. Phương pháp khảo sát khả năng sinh enzyme ngoại bào[14]**

**Nguyên tắc:** Hoạt tính enzyme được sơ bộ đánh giá qua kích thước vòng phân giải D-d (cm). Trong đó D: đường kính vòng phân giải (cm), d: đường kính lỗ thạch (cm).

D-d ≥ 2,5 cm: mạnh

D-d ≥ 2 cm: khá mạnh

D-d ≥ 1,5 cm: trung bình

$D-d < 1 \text{ cm}$ : yếu

**Thí nghiệm:** chuẩn bị môi trường bán rắn sinh tổng hợp các hệ enzyme thủy phân: MT12, MT13, MT14, MT15. Cấy vào mỗi bình tam giác 1ml dịch bào tử, ủ từ 3-5 ngày.

Cho vào mỗi bình tam giác 100ml nước cất vô trùng, lắc với tốc độ 200 vòng/phút trong 2h, lọc qua giấy lọc và màng lọc bào tử, thu được dịch chứa enzyme thô.

Chuẩn bị môi trường cảm ứng sinh tổng hợp enzyme (MT8, MT9, MT10, MT11), đổ một lớp mỏng vào các đĩa petri. Dùng khoan nút chai, khoan một lỗ giữa đĩa môi trường, dùng pipet vô trùng hút 0.1 ml dịch chiết enzyme thô nhỏ vào lỗ khoan.

Đặt mẫu trong tủ lạnh 4h. Sau đó, ủ ở nhiệt độ phòng 2 ngày.

Nhỏ thuốc thử tương ứng (lugol đối với enzyme amylase, pectinase và cellulase,  $\text{HgCl}_2$  đối với protease), xác định đường kính vòng phân giải.

#### **2.3.13. Phương pháp khảo sát khả năng phân giải dầu**

Cấy nấm sợi vào bình tam giác chứa 50 ml MT16, ủ ở nhiệt độ phòng, theo dõi sự sinh trưởng của nấm sợi RNM. Dựa vào khả năng sinh trưởng của nấm sợi để xác định khả năng phân giải dầu của chúng.

#### **2.3.14. Phương pháp xử lý số liệu bằng toán thống kê đơn giản**

Các thí nghiệm được lặp lại ít nhất 3 lần, các số liệu ghi trong luận văn là kết quả trung bình.

Phương pháp tính giá trị trung bình:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Trong đó:  $\bar{X}$  là giá trị trung bình.

$x_i$  là kết quả các lần thí nghiệm.

$n$  là số lần tiến hành thí nghiệm.



## CHƯƠNG III. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

### 3.1. Hoạt tính kháng sinh của ba chủng nấm sợi nghiên cứu

#### 3.1.1. Khả năng sinh tổng hợp chất kháng sinh của 3 chủng nấm sợi

Ba chủng nấm sợi phân lập từ RNM được sơ bộ xác định hoạt tính kháng sinh với các VSV kiểm định bằng phương pháp khối thạch.

Hoạt tính kháng sinh của các chủng nấm sợi được trình bày trong Bảng 3.1, Bảng 3.2 và được minh họa bằng các hình 3.1 đến hình 3.4:

**Bảng 3.1. Hoạt tính kháng vi khuẩn và nấm men của ba chủng nấm sợi**

| Các chủng VSV kiểm định   | Khả năng gây bệnh                | Hoạt tính kháng sinh (D-d, cm) |                     |       |
|---------------------------|----------------------------------|--------------------------------|---------------------|-------|
|                           |                                  | N20                            | NHA7.3 <sub>1</sub> | TH.19 |
| <i>E.coli</i>             | Tiêu chảy và một số bệnh cơ hội  | -                              | 1,6                 | 2,4   |
| <i>E.coli</i> kháng thuốc | nt                               | -                              | 0,7                 | 1,8   |
| <i>B.subtilis</i>         | -                                | 1,7                            | 1,0                 | 2,5   |
| <i>Salmonella</i>         | Thương hàn, ngộ độc thực phẩm    | 1,3                            | 1,3                 | 2,5   |
| <i>P.aeruginosa</i>       | Viêm phế quản, viêm tai giữa,... | -                              | -                   | -     |
| <i>C.albicans</i>         | Bệnh đường sinh dục              | -                              | 1,2                 | -     |

**Bảng 3.2. Hoạt tính kháng nấm gây bệnh của ba chủng nấm sợi**

| Các chủng nấm mốc kiểm định | Khả năng gây bệnh                | Hoạt tính kháng sinh |                     |       |
|-----------------------------|----------------------------------|----------------------|---------------------|-------|
|                             |                                  | N20                  | NHA7.3 <sub>1</sub> | TH.19 |
| <i>A.niger</i>              | Bệnh thối cổ rễ ở cây họ đậu,... | -                    | +++                 | -     |
| <i>F.oxysporum</i>          | Bệnh héo vàng ở nhiều cây trồng  | +                    | +++                 | ++    |

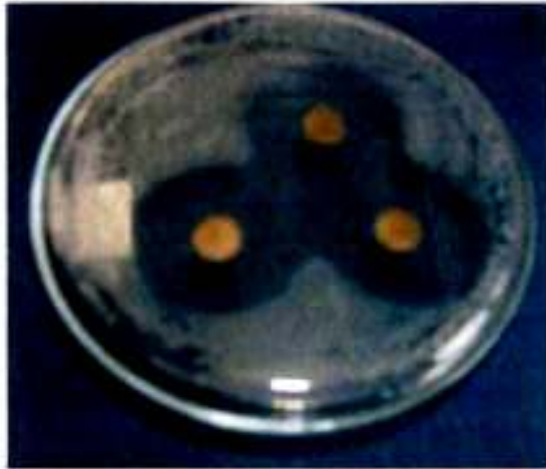
Ghi chú: -: không kháng, +: kháng yếu, ++: kháng khá mạnh, +++: kháng mạnh

Từ kết quả trên cho thấy, trong ba chủng nấm sợi RNM nghiên cứu thì chủng TH1.9 có hoạt tính kháng *B.subtilis*, và *Salmonella* rất mạnh (D-d = 2.5cm), kháng VK *E.coli* mạnh (D-d = 2.4cm), kháng VK *E.coli* kháng thuốc trung bình (D-d = 1.8cm), kháng *F.oxysporum* khá mạnh (nấm *F.oxysporum* sinh trưởng rất yếu trên môi trường chứa dịch lên men của chủng TH1.9), nhưng không kháng *Pseudomonas aeruginosa*, *C.albicans* và *Aspergillus niger*. Như vậy CKS của chủng TH1.9 kháng cả VKG(+), VKG(-) và nấm mốc, nên CKS của chủng TH1.9 được xem là CKS sinh phổ rộng.[2]

Chủng N20 kháng *B.subtilis* ở mức trung bình (D-d = 1.7 cm) và kháng *Salmonella* (D-d = 1.3 cm), kháng *F.oxysporum* yếu (nấm *F.oxysporum* có khả năng phát triển trên môi trường chứa dịch lên men chủng N20 nhưng yếu hơn so với đối chứng), nhưng không kháng *E.coli*, *E.coli* kháng thuốc, *Ps.aeruginosa*, *A.niger*. Như vậy, CKS của chủng N20 kháng nấm yếu, kháng VKG(+) mà không kháng VKG(-), CKS của chủng N20 được xem là CKS phổ hẹp.[2].

Chủng NHA7.3<sub>1</sub> kháng *B.subtilis*, *Salmonella*, *C.albicans* và *E.coli* kháng thuốc yếu ( $0.7\text{ cm} \leq D-d \leq 1.3\text{ cm}$ ), kháng *E.coli* ở mức trung bình (D-d = 1.6 cm), nhưng có hoạt tính kháng nấm *F.oxysporum* và *A.niger* mạnh, khi cấy nấm *A.niger* và *F.oxysporum* trên môi trường có chứa dịch lên men của chủng NHA7.3<sub>1</sub> thì hai loại nấm này hoàn toàn không phát triển được. Như vậy, CKS của chủng NHA7.3<sub>1</sub> kháng VKG(+), VKG(-), nấm men và nấm mốc nên CKS của chủng này được xem là CKS phổ rộng.[2]

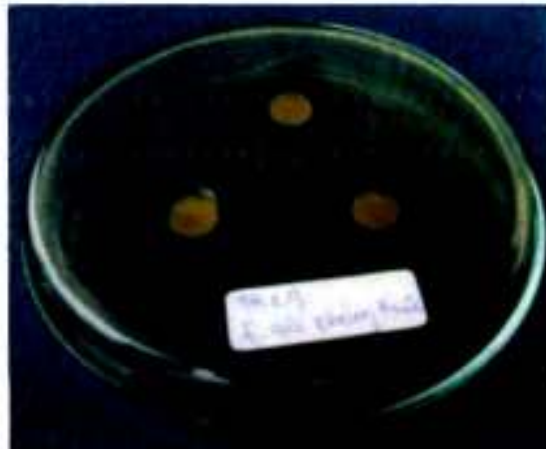
VK *E.coli* kháng thuốc sử dụng trong thí nghiệm trên đã kháng rất nhiều loại kháng sinh (theo kết quả kháng sinh đồ của Bệnh viện Bình Dân, VK *E.coli* trên đã kháng 14 loại kháng sinh), kể cả những kháng sinh mới như imipenem, tazobactam,...hai chủng nấm sợi RNM NHA7.3<sub>1</sub> và TH1.9 có khả năng kháng lại chủng VK này là một điều đáng quý.



Hình 3.1. Hoạt tính kháng *B.subtilis* của chủng TH1.9



Hình 3.2. Hoạt tính kháng *E.coli* của chủng TH1.9



Hình 3.3. Hoạt tính kháng *E.coli* kháng thuốc của chủng TH1.9



Hình 3.4. Hoạt tính kháng *Salmonella* của chủng TH1.9

### **Kết luận:**

Trong ba chủng nấm RNM nghiên cứu:

- Chủng TH1 có khả năng đề kháng mạnh nhất với các VK, đặc biệt là VK kháng thuốc.
- Chủng NHA7.3, kháng nấm mạnh nhất đồng thời là chủng có phổ kháng khuẩn rộng nhất.

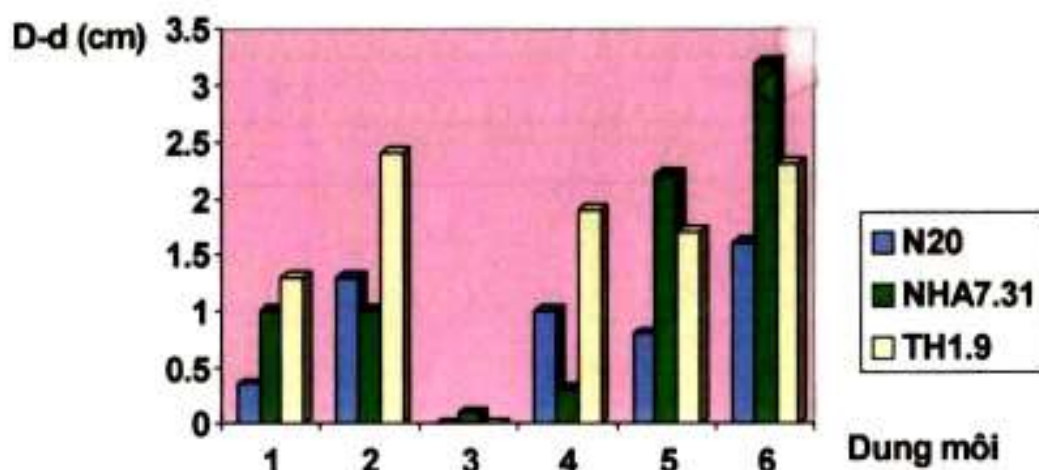


### 3.1.2. Tách chiết chất kháng sinh

Nhằm thu được dịch chiết chứa CKS với hoạt tính cao nhất, chúng tôi tiến hành tách chiết bằng các phương pháp khác nhau. Sau khi tách chiết, chúng tôi tiến hành kiểm tra lại hoạt tính kháng sinh với VK *B.subtilis*. Kết quả được trình bày trong Bảng 3.3, được minh họa bằng Biểu đồ 3.1 và các hình từ hình 3.5 đến hình 3.10:

**Bảng 3.3. Hoạt tính kháng sinh của các chủng nấm sợi khi chiết tách bằng các phương pháp khác nhau**

| Dung môi               | Hoạt tính kháng sinh (D-d, cm) |                     |       |
|------------------------|--------------------------------|---------------------|-------|
|                        | N20                            | NHA7.3 <sub>1</sub> | TH1.9 |
| Butanol                | 0,35                           | 1                   | 1,3   |
| Acetone                | 1,3                            | 1                   | 2,4   |
| Nước 80 <sup>0</sup> C | 0                              | 0,1                 | 0     |
| Ethyl acetat           | 1                              | 0,3                 | 1,9   |
| Cồn tuyệt đối          | 0,8                            | 2,2                 | 1,7   |
| Dịch lên men           | 1,6                            | 3,2                 | 2,3   |



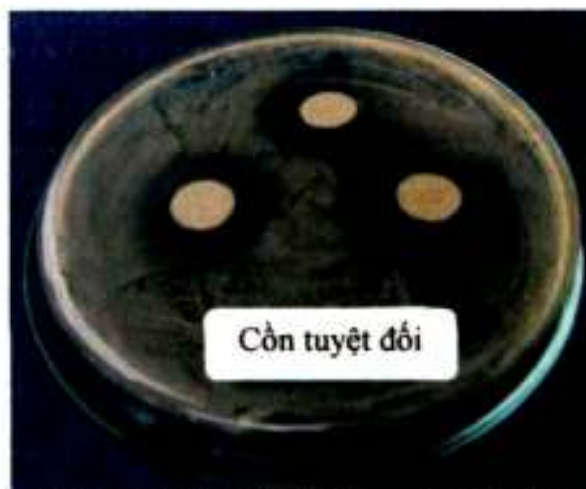
**Biểu đồ 3.1. Hoạt tính kháng sinh của các chủng nấm sợi khi tách chiết bằng các phương pháp khác nhau**

**Ghi chú** 1:butanol, 2: acetone, 3: nước 80<sup>0</sup>C, 4: ethyl acetat, 5: cồn, 6: dịch lên men.

Qua kết quả trên ta thấy, CKS của chủng N20 hoà tan tốt nhất vào dung môi acetone CKS của chủng NHA7.3<sub>1</sub> hòa tan tốt nhất vào dung môi cồn tuyệt đối và CKS của chủng TH1.9 thì hoà tan tốt nhất vào dung môi acetone.

Tuy nhiên, hoạt tính kháng sinh của cả ba chủng nấm sợi RNM đều mạnh hơn khi tách từ dịch lên men. Trong đó CKS của chủng NHA7.3<sub>1</sub> thể hiện hoạt tính rất mạnh khi thu từ dịch lên men. Điều này cho thấy môi trường lòng thích hợp cho việc tổng hợp CKS của nấm sợi hơn môi trường agar.

Do đó trong những thí nghiệm về sau chúng tôi chỉ tiến hành trên CKS thu từ dịch lên men của các chủng nấm nghiên cứu mà không sử dụng CKS tách chiết từ môi trường agar bằng các dung môi khác nhau.



Hình 3.5. Khả năng hòa tan CKS chủng TH1.9 vào cồn



Hình 3.6. Khả năng hòa tan CKS chủng TH1.9 vào acetone



Hình 3.7. Khả năng hòa tan CKS chủng NHA7.3<sub>1</sub> vào cồn



Hình 3.8. Hoạt tính kháng *B.subtilis* của dịch lên men chủng N20





Hình 3.9. Hoạt tính kháng *B.subtilis* của dịch lên men chủng NHA73.1



Hình 3.10. Hoạt tính kháng *B.subtilis* của dịch lên men chủng TH1.9

**Kết luận:** phương pháp thu dịch chứa kháng sinh của ba chủng nấm sợi nghiên cứu tốt nhất là thu từ dịch lên men.

### **3.1.3. Xác định thời gian sinh tổng hợp chất kháng sinh nhiều nhất**

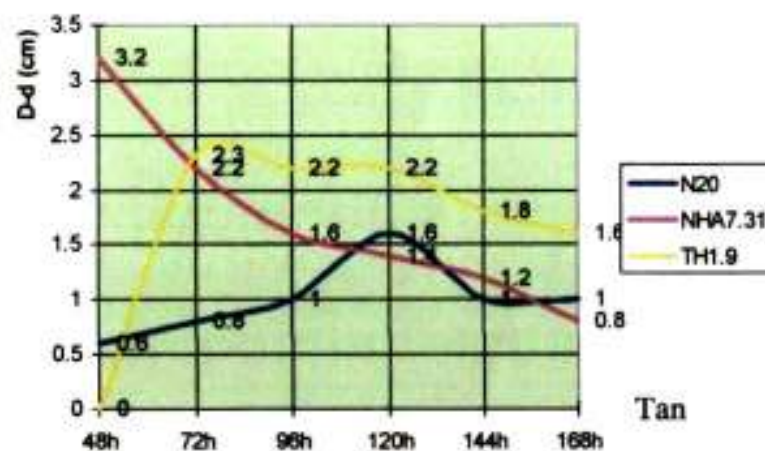
Các chủng nấm sợi RNM nghiên cứu đã được xác định hoạt tính kháng sinh, xác định được phương pháp thu CKS thô có hoạt tính mạnh nhất, để phục vụ cho việc tách chiết CKS, chúng tôi tiếp tục khảo sát một số ảnh hưởng của đến hoạt tính kháng sinh của các chủng nấm sợi RNM nghiên cứu.

Ba chủng nấm sợi RNM được nuôi trên MT1 dịch thể và tiến hành thử hoạt tính kháng sinh với VK *B.subtilis* sau những khoảng thời gian nhất định. Kết quả được trình bày trong Bảng 3.4, được minh họa bằng Biểu đồ 3.2 và các hình 3.11, 3.12, 3.13:



**Bảng 3.4. Thời gian sinh tổng hợp CKS nhiều nhất của ba chủng nấm sợi**

| THỜI GIAN<br>(h) | Hoạt tính kháng sinh (D-d, cm) |                     |            |
|------------------|--------------------------------|---------------------|------------|
|                  | N20                            | NHA7.3 <sub>1</sub> | TH1.9      |
| 48               | 0,6                            | <b>3,2</b>          | 0          |
| 72               | 0,8                            | 2,2                 | <b>2,3</b> |
| 96               | 1                              | 1,6                 | 2,2        |
| 120              | <b>1,6</b>                     | 1,4                 | 2,2        |
| 144              | 1                              | 1,2                 | 1,8        |
| 168              | 1                              | 0,8                 | 1,6        |



**Biểu đồ 3.2. Thời gian sinh tổng hợp CKS của ba chủng nấm sợi**

Qua kết quả trên ta thấy, thời gian sinh tổng hợp CKS nhiều nhất của chủng N20 là 120h, chủng NHA7.3<sub>1</sub> là 48h và chủng TH1.9 là 72h-120h.

Chủng N20 hoạt tính CKS tăng theo thời gian nuôi cấy từ 48h đến 120h, sau đó giảm dần.

Chủng NHA7.3<sub>1</sub> hoạt tính CKS mạnh nhất sau 48h nuôi cấy, sau đó giảm dần đi, thời gian nuôi cấy càng lâu thì hoạt tính kháng sinh của chủng NHA7.3<sub>1</sub> càng yếu.

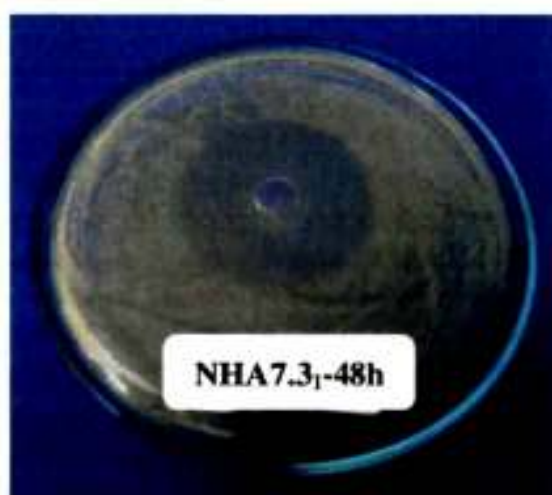
Chủng TH1.9 sau 48h nuôi cấy chưa thể hiện hoạt tính kháng sinh, sau đó hoạt tính kháng sinh tăng dần đến 72h nuôi cấy hoạt tính kháng sinh mạnh nhất, sau 72h hoạt tính kháng sinh giảm dần, tuy nhiên giảm rất chậm, chúng tôi nhận thấy có thể thu dịch lên men có hoạt tính kháng sinh mạnh của chủng này từ 72h đến 120h.

Thời gian sinh kháng sinh nhiều nhất không giống nhau ở ba chủng nấm sợi nghiên cứu, điều này là do mỗi chủng nấm có đặc điểm riêng về tốc độ phát triển, về đặc điểm sinh lí sinh hoá, hơn nữa CKS là sản phẩm trao đổi chất bậc hai của nấm sợi, do đó thời gian sinh kháng sinh có thể không trùng khớp với thời gian sinh trưởng của chúng.

Kết quả trên tạo cơ sở cho việc tách chiết chất kháng sinh ở đúng thời điểm các chủng nấm sợi sinh CKS nhiều nhất để thu được CKS có hoạt tính mạnh hơn.

Kết quả trên còn cho thấy chủng NHA7.3<sub>1</sub> khi thử hoạt tính kháng sinh bằng phương pháp khối thạch thì kháng *B.subtilis* yếu nhưng khi đã xác định được thời gian sinh kháng sinh nhiều nhất thì hoạt tính kháng *B.subtilis* rất mạnh. Có thể ở thời điểm sinh nhiều kháng sinh nhất thì hoạt tính kháng các VSV kiểm định khác của chủng NHA7.3<sub>1</sub> cũng mạnh hơn., tuy nhiên do thời gian tiến hành đề tài có hạn nên chúng tôi chưa khảo sát vấn đề này.

**Kết luận:** *Thời gian sinh kháng sinh nhiều nhất của chủng N20 là 120h, chủng NHA7.3<sub>1</sub> là 48h, chủng TH1.9 là 72h.*



Hình 3.11. Hoạt tính kháng *B.subtilis* của chủng NHA7.3<sub>1</sub> sau 48h



Hình 3.12. Hoạt tính kháng *B.subtilis* của chủng N20 sau 120h



Hình 3.13. Hoạt tính kháng *B.subtilis* của chủng TH1.9 sau 72h

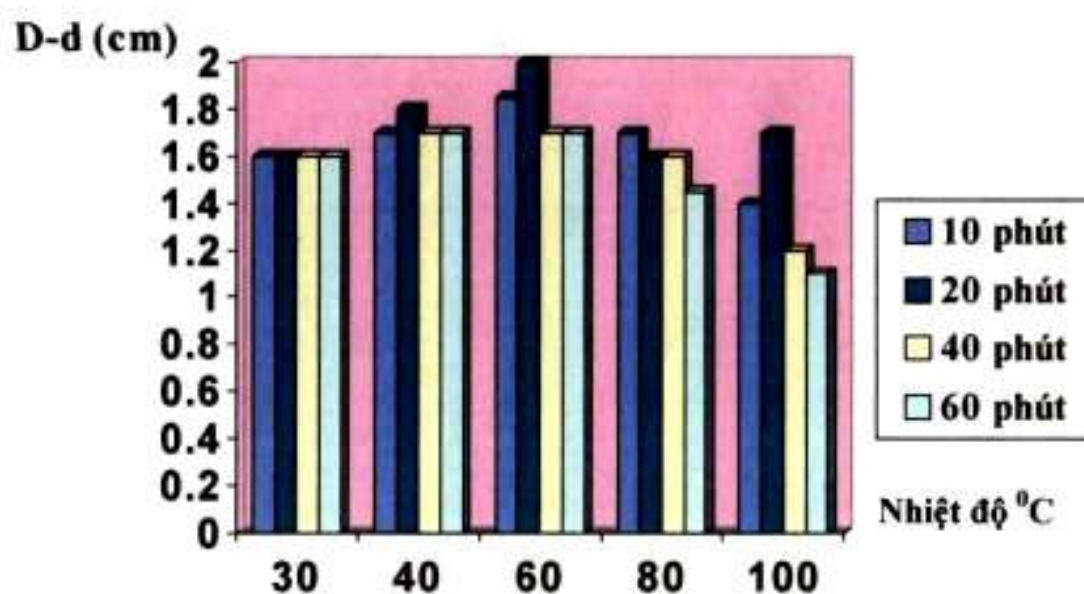
#### **3.1.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên độ bền chất kháng sinh**

Dịch chiết kháng sinh của ba chủng nấm sợi RNM được xử lý nhiệt ở 40°C, 60°C, 80°C, 100°C trong 10 phút, 20 phút, 40 phút, 60 phút. Sau đó kiểm tra lại hoạt tính của CKS với *B.subtilis*, kết quả được trình bày trong Bảng 3.5, được minh họa bằng Biểu đồ 3.3, Biểu đồ 3.4, Biểu đồ 3.5 và các hình từ hình 3.14 và hình 3.15:

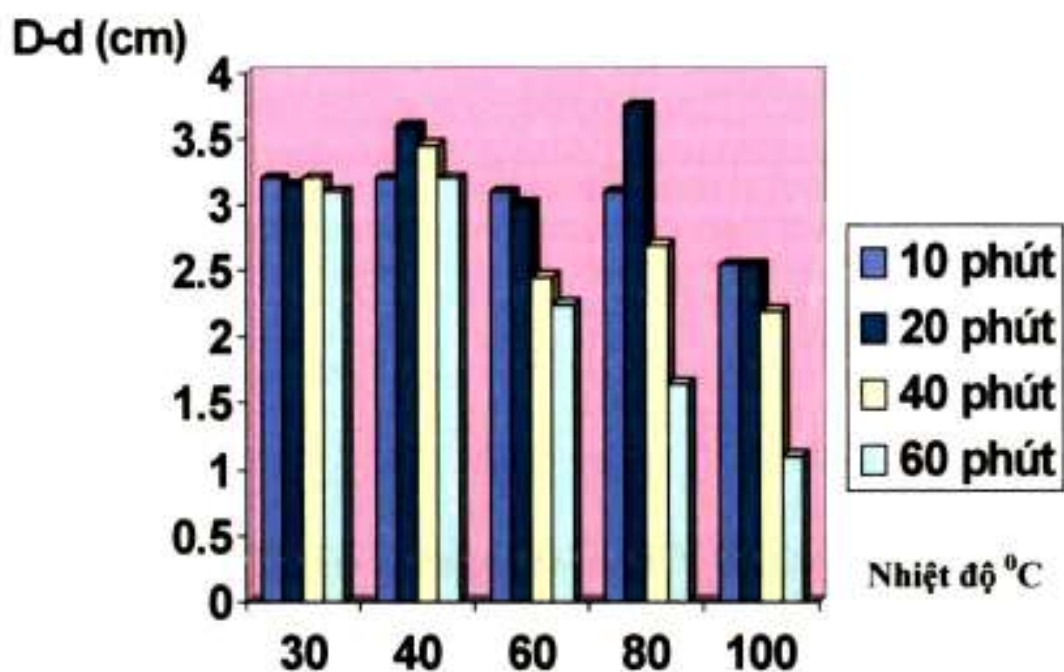


**Bảng 3.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt tính CKS 3 chủng nấm sợi**

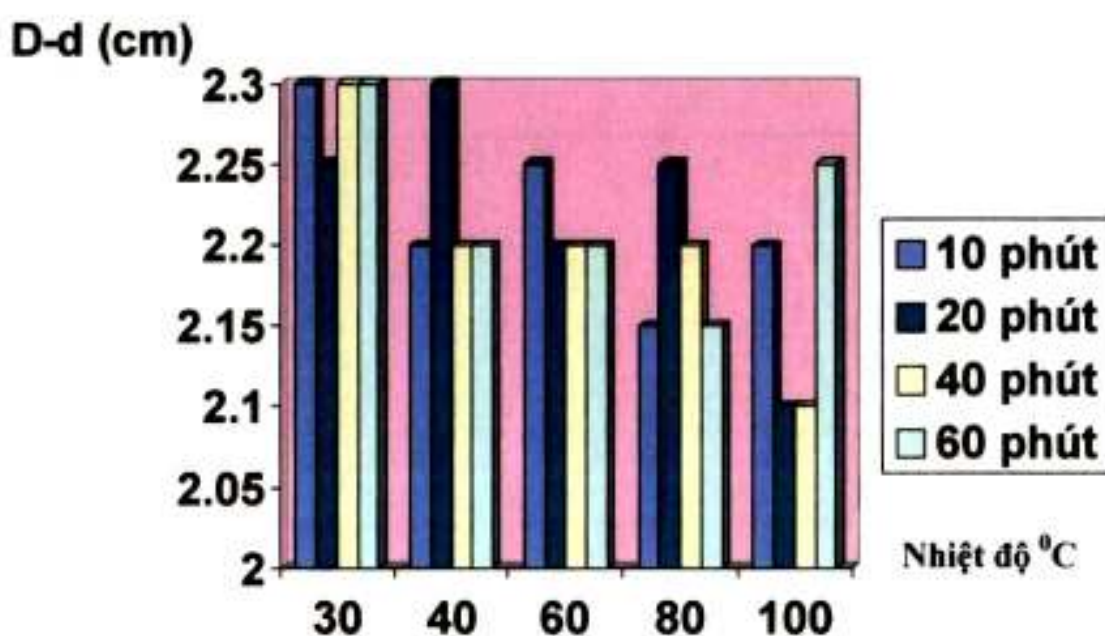
| Chủng               | Nhiệt độ<br>Thời gian (phút) | 30 <sup>0</sup> C              | 40 <sup>0</sup> C | 60 <sup>0</sup> C | 80 <sup>0</sup> C | 100 <sup>0</sup> C |
|---------------------|------------------------------|--------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
|                     |                              | Hoạt tính kháng sinh (D-d, cm) |                   |                   |                   |                    |
| N20                 | 10                           | 1,6                            | 1,7               | 1,85              | 1,7               | 1,4                |
|                     | 20                           | 1,6                            | 1,8               | <b>2</b>          | 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                |
| NHA7.3 <sub>1</sub> | 10                           | 3,2                            | 3,2               | 3,1               | 3,1               | 2,55               |
|                     | 20                           | 3,15                           | <b>3,6</b>        | 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                |
| TH1.9               | 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               |



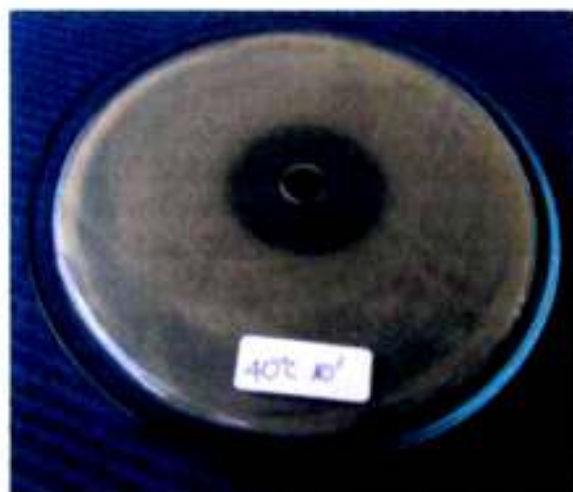
**Biểu đồ 3.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt tính CKS chủng N20**



**Biểu đồ 3.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt tính CKS chủng NHA7.3<sub>1</sub>**



**Biểu đồ 3.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt tính CKS chủng TH1.9**



Hình 3.14. Hoạt tính kháng sinh của chủng TH1.9 khi xử lý ở 40<sup>0</sup>C trong 10 phút



Hình 3.15. Hoạt tính kháng sinh chủng TH1.9 khi xử lý ở 100<sup>0</sup>C trong 60 phút

Từ kết quả trên, ta thấy CKS của chủng N20 hoạt động tốt nhất ở 60<sup>0</sup>C trong thời gian 20 phút (D-d = 2 cm). Khi tăng nhiệt độ thì hoạt tính của CKS tăng lên, hoạt tính của CKS mạnh nhất ở 60<sup>0</sup>C, sau 60<sup>0</sup>C khi tăng nhiệt độ thì hoạt tính của CKS giảm dần. Tuy nhiên khi tăng nhiệt độ xử lý lên đến 100<sup>0</sup>C trong 40 phút thì CKS vẫn còn thể hiện hoạt tính kháng VSV kiểm định (D-d = 1,2 cm). Điều này cho thấy CKS của chủng N20 ít bị phân hủy bởi nhiệt độ cao.

CKS của chủng NHA7.3<sub>1</sub> thể hiện hoạt tính mạnh nhất khi xử lý ở 40<sup>0</sup>C trong 20 phút (D-d = 3,6 cm). Khi tăng nhiệt độ thì hoạt tính của CKS giảm dần, trong cùng một nhiệt độ khi thời gian xử lý tăng thì hoạt tính CKS tăng nhưng thời gian xử lý quá 20 phút thì càng để lâu hoạt tính của CKS càng giảm. Tuy nhiên, khi tăng nhiệt độ xử lý đến 100<sup>0</sup>C trong 40 phút thì CKS của chủng NHA7.3<sub>1</sub> vẫn còn thể hiện hoạt tính mạnh (D-d = 2,2 cm). Chỉ khi xử lý 100<sup>0</sup>C trong 60 phút thì hoạt tính của CKS mới giảm đi rõ rệt (D-d= 1,1 cm).



CKS của chủng TH1.9 thể hiện hoạt tính mạnh ở tất cả các nhiệt độ và thời gian xử lý, điều này cho thấy hoạt tính CKS của chủng TH1.9 không bị ảnh hưởng bởi nhiệt độ, không bị phân hủy bởi nhiệt độ cao.

Nhìn chung các CKS của các chủng nấm sợi nghiên cứu chịu nhiệt tốt, điều này tạo điều kiện thuận lợi cho việc tách chiết CKS, hoặc sử dụng CKS trong công nghiệp, trong sản xuất phân bón.

**Kết luận:**

- *CKS của chủng N20 và NHA7.3, bền nhiệt đến 100<sup>o</sup>C trong 40 phút.*
- *CKS của chủng TH1.9 bền nhiệt đến 100<sup>o</sup>C trong 60 phút.*

**3.2. Các đặc điểm sinh học và phân loại của ba chủng nấm sợi**

Từ kết quả của những thí nghiệm trên, cho thấy rằng ba chủng nấm sợi RNM chúng tôi đang nghiên cứu có hoạt tính kháng sinh tương đối mạnh, có thể ứng dụng vào thực tiễn. Để giúp cho những nghiên cứu sâu hơn về ba chủng nấm nói trên cũng như giúp cho việc ứng dụng chúng vào thực tiễn chúng tôi tiến hành định danh và khảo sát các đặc điểm sinh học của chúng. Tuy nhiên do thời gian tiến hành đề tài có hạn, chúng tôi chỉ chọn định danh đến loài một chủng có hoạt tính kháng sinh mạnh nhất (chủng TH1.9), hai chủng còn lại chúng tôi chỉ tiến hành định danh đến chi.

### 3.2.1. Phân loại các chủng nấm sợi RNM

#### 3.2.1.1. Phân loại đến chi hai chủng nấm sợi N20 và NHA7.3<sub>1</sub>

##### ❖ Chủng N20

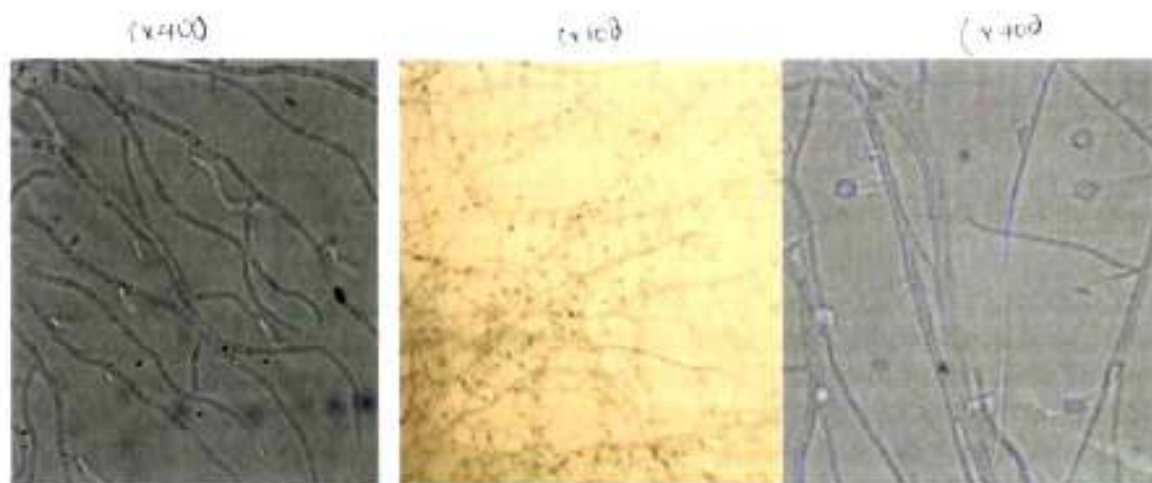
Khuẩn lạc màu vàng nhạt, tròn, sau 3 ngày nuôi cấy trên môi trường MEA ở nhiệt độ 30<sup>0</sup>C đạt đường kính trung bình 5-6 mm. Bề mặt khuẩn lạc gồ ghề có các rãnh theo hướng phóng xạ, mép liền. Mặt trái khuẩn lạc cũng có các rãnh theo hướng phóng xạ, khuẩn lạc tiết sắc tố màu nâu vào môi trường. Nuôi cấy đến ngày thứ 5 thì thấy trên bề mặt khuẩn lạc xuất hiện giọt tiết trong suốt, màu vàng (hình 3.16).



Hình 3.16. Khuẩn lạc chủng N20

Sợi nấm màu xanh lục, phân nhánh, có vách ngăn, kích thước sợi nấm tương đối đều, chỗ vách ngăn hơi co hẹp, những nhánh mới mọc ra từ sợi nấm có đỉnh nhọn (hình 3.17).

Cuống sinh BT không phân nhánh mọc ra từ khuẩn ty khi sinh, mang một chùm BT (hình 3.18).



Hình 3.17. Khuẩn ty chủng N20 (x400) Hình 3.18. Cơ quan sinh sản của chủng N20

Từ những đặc điểm về khuẩn lạc, khuẩn ty và cơ quan sinh sản như trên và dựa vào mô tả của các tác giả **Robert A. Samson, Ellen S. Hoekstra, Jens C. Frisvad (2004)**, [30] và tác giả **Bùi Xuân Đồng (2000)** [11], chúng tôi kết luận chủng N20 thuộc chi *Acremonium* (*Cephalosporium*).

❖ **Chủng NHA7.31.**

Khuẩn lạc tròn, lúc đầu có màu trắng sau chuyển sang vàng chanh và cuối cùng là màu xanh lục.

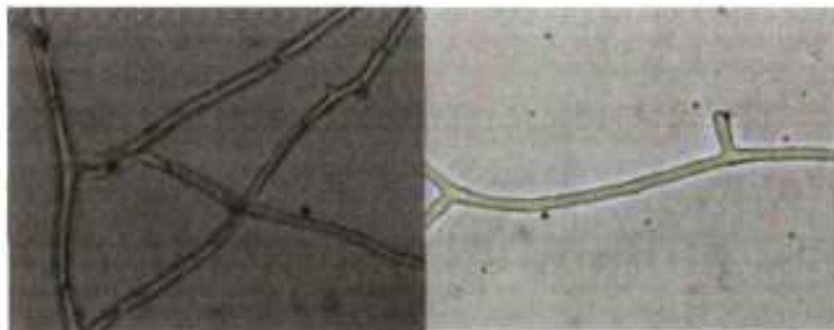
Khuẩn lạc có tốc độ phát triển nhanh, nuôi cấy trên môi trường MEA ở nhiệt độ 30°C sau 3 ngày đạt đường kính trung bình 8cm. Bề mặt khuẩn lạc xốp, mép khuẩn lạc hình tia, không xuất hiện giọt tiết. Mặt trái khuẩn lạc không tiết sắc tố (hình 3.19).





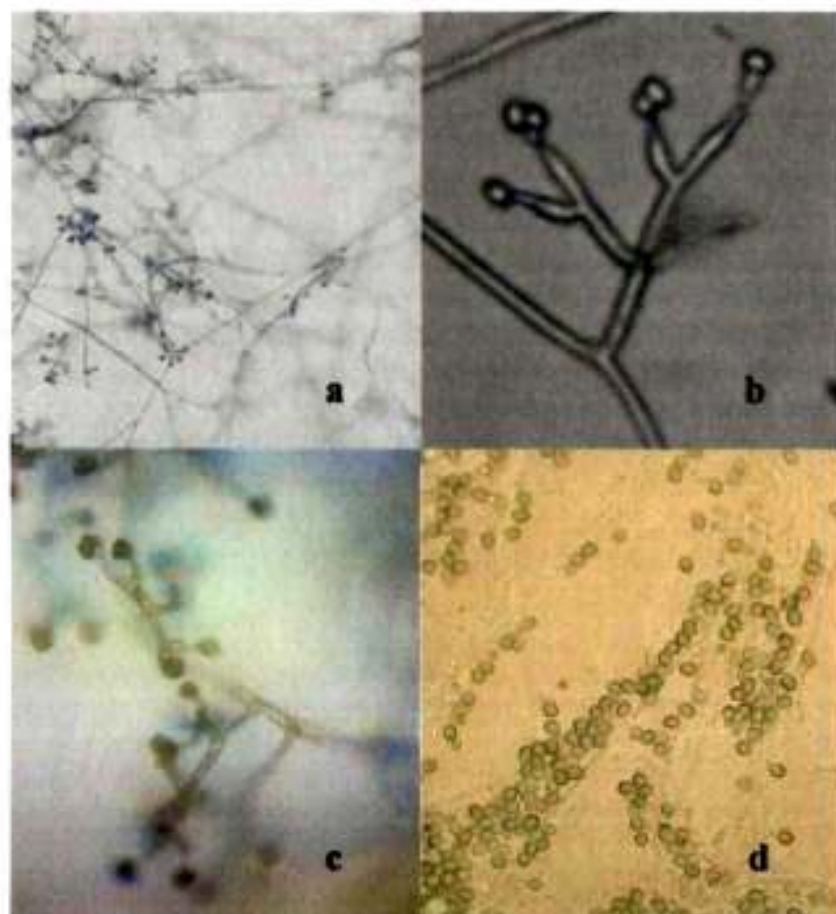
Hình 3.19. Khuẩn lạc chủng NHA7.3<sub>1</sub>

Khuẩn ty không màu, phân nhánh, có vách ngăn, kích thước khuẩn ty tương đối đồng đều (hình 3.20).



Hình 3.20. Khuẩn ty của chủng NHA7.3<sub>1</sub> (x400)

Cuống sinh BT ngắn, không phân nhánh hoặc phân nhánh không đều, mang nhiều thể bình hình chai cụm lại, ngắn, mập. BT hình ellip, màu xanh (hình 3.21).

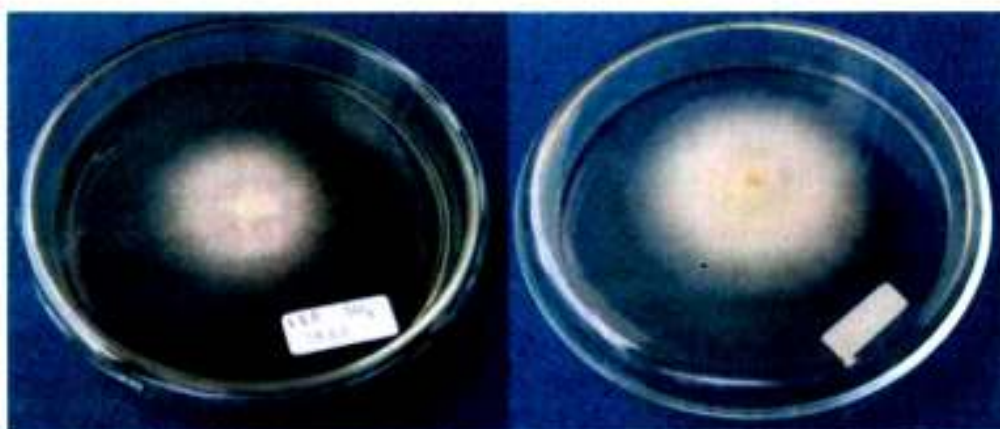


(Vũ) Hình 3.21. Cơ quan sinh sản chủng NHA7.3<sub>1</sub>  
a: bào tử (x10), b,c: bào tử và thể bình (x100), d: bào tử (x100)

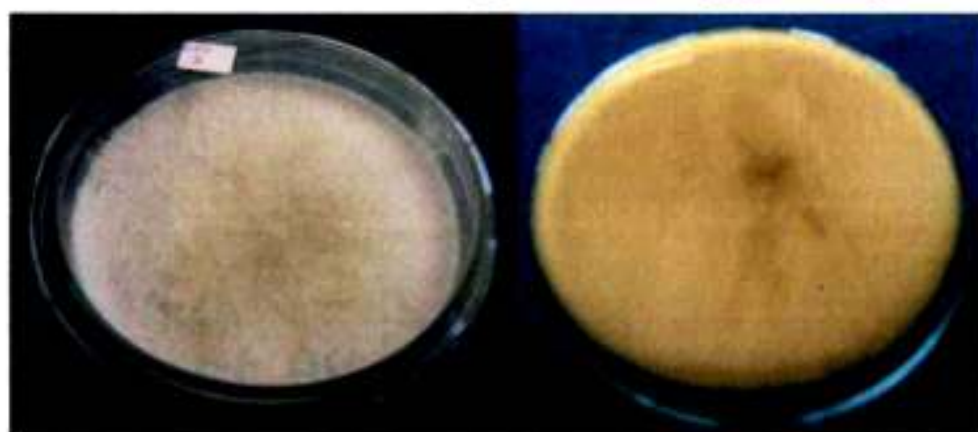
Dựa vào những đặc điểm về khuẩn lạc, khuẩn ty và cơ quan sinh sản như trên, dựa vào mô tả của các tác giả **Robert A. Samson, Ellen S. Hoekstra, Jens C. Frisvad (2004)**, [30], và tác giả Đặng Vũ Hồng Miên [17], chúng tôi kết luận chủng NHA7.3<sub>1</sub> thuộc chi *Trichoderma*.

#### 3.2.1.2. Phân loại đến loài chủng TH1.9

Khuẩn lạc tròn, màu trắng sau chuyển sang màu xám. Bề mặt khuẩn lạc xốp, mịn, rìa khuẩn lạc dạng tia. Mặt trái khuẩn lạc tiết sắc tố màu vàng nâu. Sau 5 ngày nuôi cấy trên bề mặt khuẩn lạc xuất hiện giọt tiết trong suốt, không màu (hình 3.22, hình 3.23).

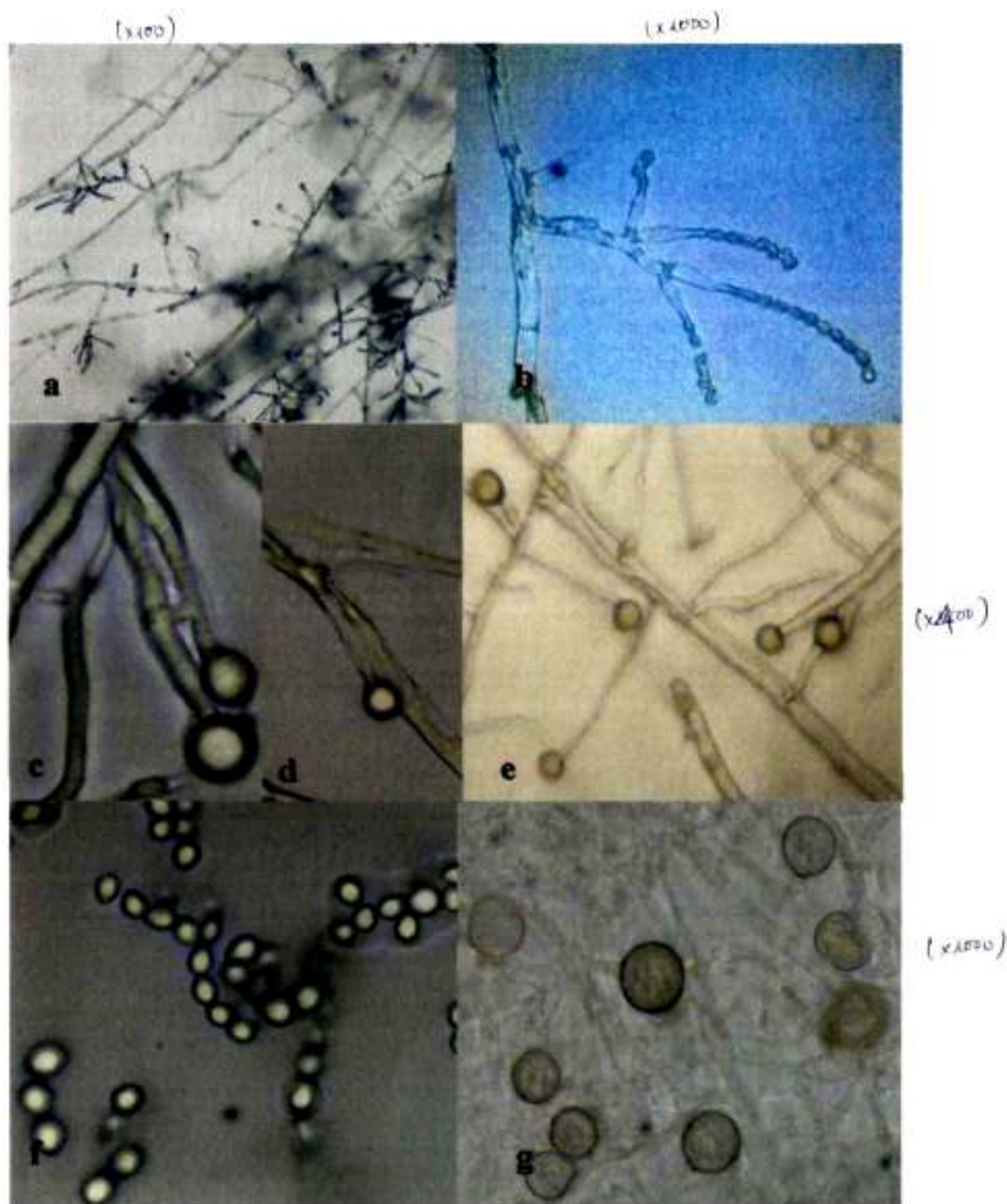


Hình 3.22. Khuẩn lạc chủng TH1.9 sau 3 ngày nuôi cấy



Hình 3.23. Khuẩn lạc chủng TH1.9 sau 7 ngày nuôi cấy





Hình 3.24. Cơ quan sinh sản chủng TH1.9

**Ghi chú** a: bào tử nhỏ và bào tử lớn (x10), b: thể bình hình chai và bào tử nhỏ (x100), c,d,e: thể bình hình trụ và bào tử lớn (x100), f: bào tử nhỏ (x100), g: bào tử lớn (x100).

Cuống sinh BT không phân nhánh hoặc phân nhánh không đều, một hoặc hai lần, có hai loại BT: BT lớn và BT nhỏ, có hai loại thể bình: thể bình hình chai và thể bình hình trụ.

BT nhỏ: các thể bình mang BT nhỏ là thể bình hình chai, các BT nhỏ tạo thành chuỗi dài trên đỉnh của thể bình, chuỗi này có thể mang từ 6-14 BT nhỏ, các BT nhỏ có hình gần tròn, hình ellip hoặc hình quả chanh.

BT lớn: các thể bình mang BT lớn có thể là hình chai hoặc hình trụ, cuống sinh BT có thể không phân nhánh chỉ mang một thể bình, hoặc có thể phân nhánh và mang hai hay nhiều thể bình. Trên mỗi thể bình chỉ mang một BT lớn hình tròn (hình 3.24).

Các thể bình hình chai thường mọc ra từ lóng của sợi nấm (phần ở giữa hai vách ngăn), các thể bình hình trụ thường mọc ra từ chỗ có vách ngăn.

Dựa vào những đặc điểm về khuẩn lạc, khuẩn ty và cơ quan sinh sản như trên, dựa vào mô tả của tác giả Bùi Xuân Đồng (1986) [12], chúng tôi kết luận chủng TH1.9 thuộc loài *Botryotrichum piluliferum* Sacc & March.

Kết quả này hoàn toàn phù hợp với kết quả của công ty Giám định và khử trùng F.C.C mà chúng tôi gửi chủng TH1.9 đến định danh (phụ lục).

Bảng 3.6. 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) |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|---------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>N20</b>                            | <ul style="list-style-type: none"> <li>- KL màu vàng nhạt.</li> <li>- Cuống sinh BT không phân nhánh.</li> <li>- BT có nhiều hình dạng.</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                             | <i>Acremonium</i>                                                                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>- KL màu trắng, hồng nhạt hoặc da cam nhạt.</li> <li>- Cuống sinh BT phân nhánh ít hoặc không phân nhánh.</li> <li>- BT nhiều hình dạng.</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                              |
| <b>NHA7.3<sub>1</sub></b>             | <ul style="list-style-type: none"> <li>- KL tròn, từ màu trắng → xanh lục, phát triển nhanh.</li> <li>- Khuẩn ty không màu.</li> <li>- Cuống sinh BT ngắn phân nhánh nhiều lần. Các BT trần tập trung thành một chùm nhỏ.</li> <li>- BT hình ellip.</li> </ul>                                                                                                                                                                                 | <i>Trichoderma</i>                                                                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>- KL có màu trắng hoặc từ trắng đến lục, phát triển nhanh.</li> <li>- Khuẩn ty không màu.</li> <li>- Cuống sinh BT phân nhánh nhiều, các BT trần liên kết → một chùm nhỏ.</li> <li>- BT hình ellip, hình cầu hoặc hình thuôn.</li> </ul>                                                                                                                                                         |
| <b>TH1.9</b>                          | <ul style="list-style-type: none"> <li>- KL tròn, màu trắng → màu xám, mặt trái KL màu vàng nâu.</li> <li>- Khuẩn ty phân nhánh.</li> <li>- Cuống sinh BT không phân nhánh hoặc phân nhánh không đều, có hai loại thể bình: hình chai và hình trụ.</li> <li>- Có hai loại BT: <ul style="list-style-type: none"> <li>+ BT lớn mọc đơn độc, hình cầu.</li> <li>+ BT nhỏ mọc thành chuỗi dài, hình ellip, hình quả chanh.</li> </ul> </li> </ul> | <i>Botryotrichum piluliferum</i>                                                        | <ul style="list-style-type: none"> <li>- KL màu trắng → màu xám, đôi chỗ có xám lục, lục, mặt trái KL màu vàng nâu.</li> <li>- Khuẩn ty phân nhánh.</li> <li>- Cuống sinh BT ngắn, phân nhánh không đều, một hoặc hai lần với các nhánh và nhánh phụ ngắn hơn.</li> <li>- Có hai loại BT: <ul style="list-style-type: none"> <li>+ BT lớn đơn độc, hình cầu, gần cầu.</li> <li>+ BT nhỏ thành chuỗi, hình trứng.</li> </ul> </li> </ul> |

### 3.2.2. Khả năng chịu nhiệt của nấm sợi RNM

Chúng tôi tiến hành khảo sát khả năng chịu nhiệt của 3 chủng nấm sợi RNM trên môi trường Czapek-dox. Khả năng sinh trưởng của các chủng nấm sợi được đánh giá bằng đường kính khuẩn lạc (mm) sau 3 ngày nuôi cấy. Kết quả được trình bày trong Bảng 3.11 và được minh họa bằng Biểu đồ 3.6:

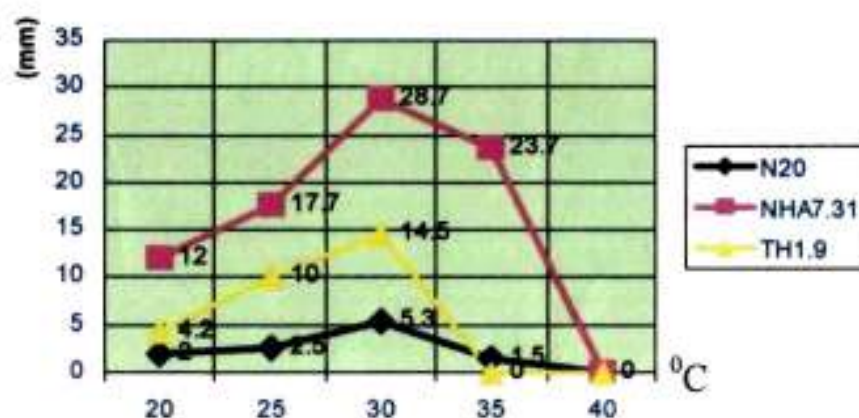


**Bảng 3.7. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên khả năng sinh trưởng của ba chủng nấm sợi**

| Chủng \ Nhiệt độ    | 20 <sup>0</sup> C         | 25 <sup>0</sup> C | 30 <sup>0</sup> C | 35 <sup>0</sup> C | 40 <sup>0</sup> C |
|---------------------|---------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                     | Đường kính khuẩn lạc (mm) |                   |                   |                   |                   |
| N20                 | 2                         | 2,5               | <b>5,3</b>        | 1,5               | -                 |
| NHA7.3 <sub>1</sub> | 12                        | 17,7              | <b>28,7</b>       | 23,7              | -                 |
| TH1.9               | 4,2                       | 10                | <b>14,5</b>       | -                 | -                 |

Qua kết quả trên ta thấy, cả ba chủng nấm sợi RNM đều sinh trưởng tốt nhất ở 30<sup>0</sup>C, kết quả này phù hợp với quan điểm của tác giả Lương Đức Phẩm (1998) [20] cho rằng các chủng nấm sợi có nhiệt độ tối ưu là 28-30<sup>0</sup>C.

Cả ba chủng nấm sợi đều không thể phát triển ở 40<sup>0</sup>C điều này không đúng so với quan điểm của tác giả Nguyễn Thị Huệ, Từ Thị Hương (1997) [15] và nhiều tác giả khác cho rằng nấm sợi có nhiệt độ tối ưu 20-39<sup>0</sup>C.



**Biểu đồ 3.6. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên sinh trưởng của 3 chủng nấm sợi**

### 3.2.3. Khả năng chịu mặn của nấm sợi RNM

Chúng tôi tiến hành khảo sát khả năng chịu mặn trên môi trường Czapek-dox và đánh giá khả năng chịu mặn dựa trên đường kính khuẩn lạc (mm) của chủng nấm sợi sau 3 ngày nuôi cấy. Kết quả được trình bày trong Bảng 3.8:

Bảng 3.8. Ảnh hưởng của độ mặn lên khả năng sinh trưởng của ba chủng nấm sợi

| Độ mặn              | 0%                        | 1%   | 2.5% | 3%   | 4%  | 5%  |
|---------------------|---------------------------|------|------|------|-----|-----|
| Chủng               | Đường kính khuẩn lạc (mm) |      |      |      |     |     |
| N20                 | 8,7                       | 5,2  | 5,3  | 4    | 3,8 | 3,5 |
| NHA7.3 <sub>1</sub> | 44,3                      | 36,2 | 28,7 | 22,2 | 12  | 9,3 |
| TH1.9               | 21,5                      | 15   | 14,5 | 2,8  | -   | -   |

Từ kết quả trên ta thấy, cả ba chủng nấm sợi đều sinh trưởng tốt nhất trên môi trường không có muối, mặc dù các chủng nấm này được phân lập từ RNM, điều này cho thấy có thể ba chủng trên được phân lập từ thân, lá của cây sống ở RNM nên chúng không ưa mặn, hoặc chúng là VSV ở đất liền hoặc VSV chịu mặn chứ không phải là VSV ưa mặn.

Hai chủng N20 và NHA7.3<sub>1</sub> vẫn có thể sinh trưởng ở độ mặn 5%, tuy nhiên chủng TH1.9 chỉ chịu được độ mặn 3%.

### 3.2.4. Khả năng đồng hóa nguồn carbon của nấm sợi RNM

Chúng tôi tiến hành khảo sát khả năng đồng hóa nguồn carbon của ba chủng nấm sợi RNM trên môi trường Czapek-dox, khả năng sinh trưởng của các chủng nấm sợi được đánh giá bằng đường kính khuẩn lạc sau 3 ngày nuôi cấy. Kết quả được trình bày trong Bảng 3.9 và được minh họa bằng hình 3.25:

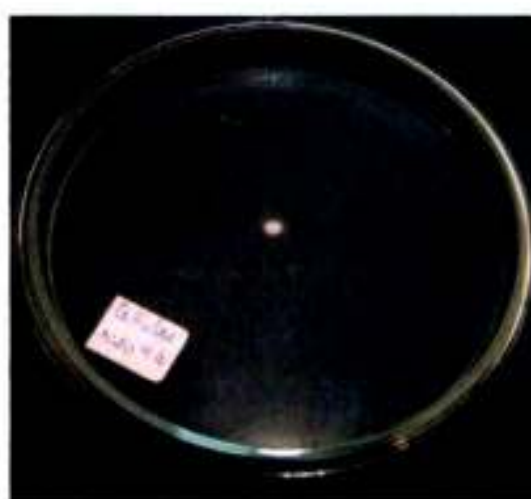
Bảng 3.9. Khả năng đồng hoá các nguồn carbon của ba chủng nấm sợi

| <b>Nguồn<br/>C</b>        | <b>Glucose</b>                   | <b>Maltose</b> | <b>Sucrose</b> | <b>Tinh<br/>bột</b> | <b>Lactose</b> | <b>Galactose</b> | <b>CMC</b> |
|---------------------------|----------------------------------|----------------|----------------|---------------------|----------------|------------------|------------|
| <b>Chủng</b>              | <b>Đường kính khuẩn lạc (mm)</b> |                |                |                     |                |                  |            |
| <b>N20</b>                | 5,7                              | 7,8            | 6,2            | 8,3                 | 7              | 6                | 5,2        |
| <b>NHA7.3<sub>1</sub></b> | 23                               | 18             | 14             | 17,2                | 17             | 4,6              | 10         |
| <b>TH1.9</b>              | 14,5                             | 5,5            | 6              | 4,5                 | 3              | 6,5              | 7          |

Kết quả trên cho thấy ba chủng nấm sợi có khả năng đồng hóa tất cả các nguồn carbon trong thí nghiệm. Chủng N20 sinh trưởng tốt nhất trên môi trường chứa nguồn carbon là tinh bột. Chủng NHA7.3<sub>1</sub> và TH1.9 sinh trưởng tốt nhất trên môi trường chứa nguồn carbon là glucose.

Các chủng nấm nay có khả năng đồng hoá nhiều nguồn carbon khác nhau cho thấy chúng có khả năng phân bố rộng rãi trong tự nhiên.

Theo tài liệu nghiên cứu của tác giả Nguyễn Vĩnh Hà (2002) [13], các loài nấm sợi thường không đòi hỏi khắt khe lắm với một loại thức ăn carbon nào đấy, chúng thường có khả năng sử dụng nhiều nguồn thức ăn carbon khác nhau, nhưng cũng có thể là loại hợp chất hữu cơ này được đồng hoá tốt hơn loại hợp chất hữu cơ khác.



Hình 3.25. Khả năng sinh trưởng của chủng N20 trên môi trường chứa nguồn carbon là CMC



### 3.2.5. Khả năng đồng hóa nguồn nitơ của nấm sợi RNM

Chúng tôi tiến hành khảo sát khả năng đồng hóa nguồn nitơ của ba chủng nấm sợi RNM trên môi trường Czapek-dox, trong đó  $\text{NaNO}_3$  được lần lượt thay thế bằng các nguồn nitơ khác, khả năng sinh trưởng của các chủng nấm sợi được đánh giá bằng đường kính khuẩn lạc (mm) sau 3 ngày nuôi cấy. Kết quả được trình bày trong Bảng 3.10 và được minh họa bằng hình 3.26:

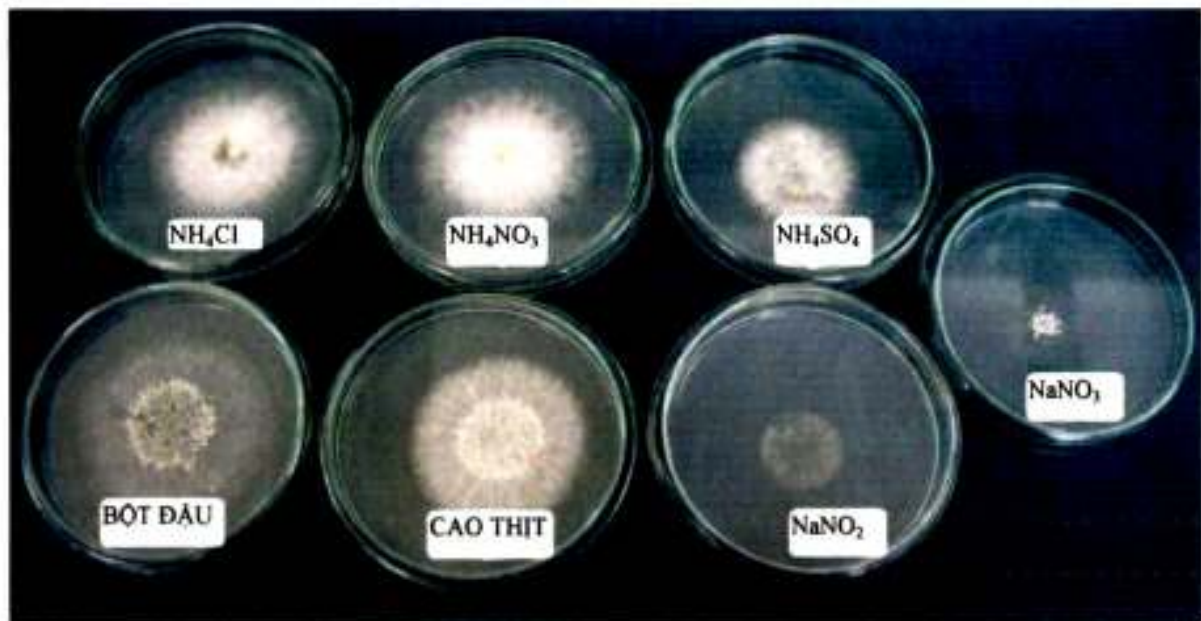
**Bảng 3.10. Khả năng đồng hoá nguồn nitơ của ba chủng nấm sợi**

| Chủng               | $\text{NaNO}_3$ | Bột đậu     | Cao thịt   | $\text{NH}_4\text{Cl}$ | $\text{NH}_4\text{NO}_3$ | $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | $\text{NaNO}_2$ |
|---------------------|-----------------|-------------|------------|------------------------|--------------------------|------------------------------|-----------------|
| N20                 | 4,3             | 4,8         | <b>5,5</b> | 5,0                    | 5,1                      | 4,9                          | 4,2             |
| NHA7.3 <sub>1</sub> | 32,2            | <b>68,2</b> | 60         | 64,2                   | 65,2                     | 49                           | 29,1            |
| TH1.9               | 10,5            | 23,2        | 24,5       | <b>25</b>              | 19,7                     | 17                           | 3               |

#### ❖ Qua kết quả trên ta thấy:

- Cả ba chủng nấm sợi đều có khả năng sinh trưởng trên tất cả các nguồn nitơ trong thí nghiệm.
- Chủng N20 sinh trưởng tốt nhất trên môi trường chứa nguồn nitơ là cao thịt.
- Chủng NHA7.3<sub>1</sub> sinh trưởng tốt nhất trên môi trường chứa nguồn nitơ là bột đậu.
- Chủng TH1.9 sinh trưởng tốt nhất trên môi trường chứa nguồn nitơ là  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .
- Nhìn chung cả ba chủng nấm sợi đều sinh trưởng tốt trên môi trường chứa nguồn nitơ tự nhiên, điều này cho thấy các chủng nấm sợi này có khả năng phân bố rộng trong tự nhiên.
- Chủng N20 và chủng NHA7.3<sub>1</sub> có khả năng sinh trưởng khá tốt trên môi trường chứa nguồn nitơ là  $\text{NaNO}_2$ , đây là nguồn nitơ phổ biến trong RNM, nơi có nhiều xác bã động thực vật. Điều này cho thấy hai chủng nấm này tham gia tích cực vào quá trình chuyển hoá vật chất của RNM, điều này

cũng cho thấy tiềm năng ứng dụng hai chủng nấm sợi này vào việc xử lý ô nhiễm môi trường.



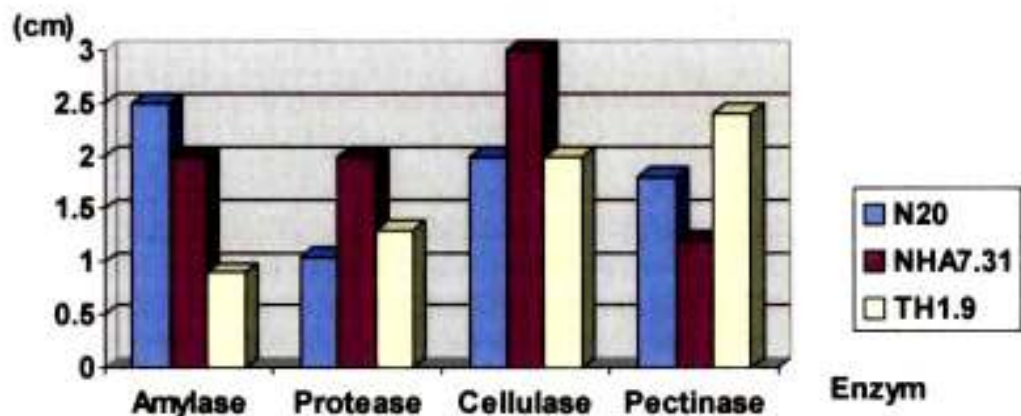
Hình 3.26. Khả năng đồng hóa các nguồn nitơ của chủng NHA7.3<sub>1</sub>

### 3.2.6. Khả năng sinh enzyme ngoại bào

Ba chủng nấm sợi RNM được kiểm tra khả năng sinh các enzyme amylase, cellulase, pectinase, protease, kết quả được trình bày trong Bảng 3.11, được minh họa bằng biểu đồ 3.10 và các hình từ hình 3.27 đến hình 3.30:

Bảng 3.11. Hoạt tính enzym của ba chủng nấm sợi

| Enzyme<br>Chủng                     | Amylase | Protease | Cellulase | Pectinase |
|-------------------------------------|---------|----------|-----------|-----------|
| ĐƯỜNG KÍNH VÒNG PHẢN GIẢI (D-d, cm) |         |          |           |           |
| N20                                 | 2,5     | 1,05     | 2         | 1,8       |
| NHA7.3 <sub>1</sub>                 | 2       | 2        | 3         | 1,2       |
| TH1.9                               | 0,9     | 1,3      | 2         | 2,4       |



**Biểu đồ 3.7. Hoạt tính enzym của ba chủng nấm sợi**

Qua kết quả trên ta thấy, cả ba chủng nấm sợi RNM đều có khả năng sinh các enzyme ngoại bào amylase, protease, cellulase, pectinase. Điều này phù hợp với quan điểm của Nguyễn Lân Dũng (1997) [9], tác giả Nguyễn Xuân Thành (2005) [22], tác giả Tô Minh Châu (2003) [4], và nhiều tác giả khác cho rằng nấm sợi có khả năng sinh nhiều enzym.

Các chủng nấm này có khả năng sinh nhiều loại enzym cho thấy chúng có khả năng phân giải nhiều cơ chất để sử dụng làm nguồn thức ăn, do đó chúng có khả năng phân bố rộng trong tự nhiên.

Chủng N20 sinh enzyme amylase mạnh hơn NHA7.3<sub>1</sub> và TH1.9.

Chủng NHA7.3<sub>1</sub> sinh enzyme protease và cellulase mạnh hơn hai chủng còn lại.

Chủng TH1.9 sinh enzyme pectinase mạnh hơn hai chủng còn lại.

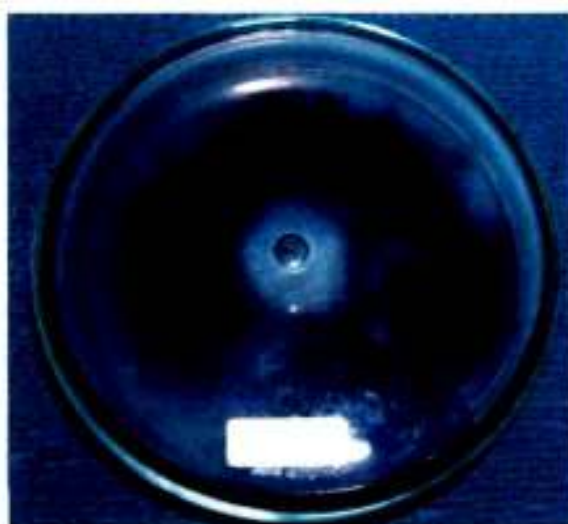
Cả 3 chủng đều sinh enzyme cellulase ở mức rất mạnh và khá mạnh. Trong hệ sinh thái RNM có rất nhiều cơ chất có cellulose như thân, lá, gỗ,... các chủng nấm này sống trong RNM do đó chúng có hệ enzym thủy phân cellulase mạnh để thích nghi với môi trường sống của mình.



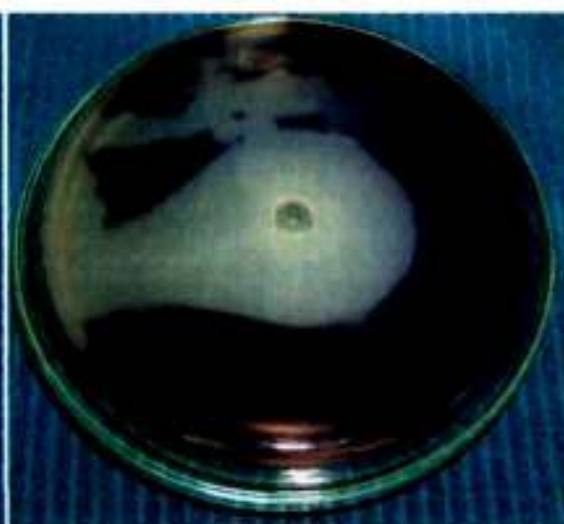
Hoạt tính cellulase mạnh cũng cho thấy khả năng ứng dụng ba chủng nấm này trong xử lý rác thải chứa cellulose, vốn rất khó phân giải và gây ô nhiễm môi trường nghiêm trọng.

Kết luận:

- **Chủng N20 có hoạt tính enzyme amylase mạnh nhất.**
- **Chủng NHA7.3<sub>1</sub> có hoạt tính protease và cellulase mạnh nhất.**
- **Chủng TH1.9 có hoạt tính pectinase mạnh nhất.**



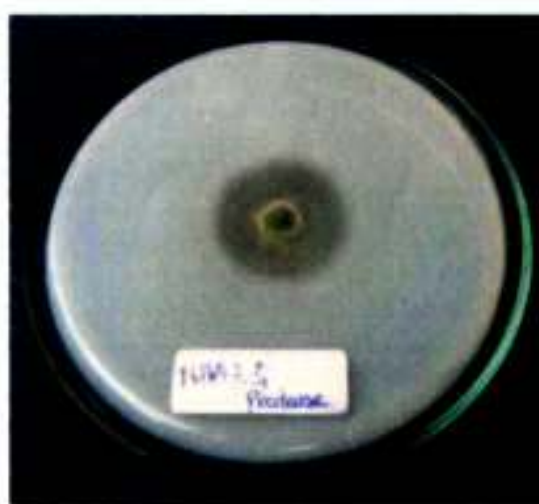
Hình 3.27. Hoạt tính amylase chủng TH1.9



Hình 3.28. Hoạt tính cellulase chủng NHA7.3<sub>1</sub>



Hình 3.29. Hoạt tính pectinase chủng TH1.9



Hình 3.30. Hoạt tính protease chủng NHA7.3<sub>1</sub>

### **3.2.7. Khả năng phân giải dầu của nấm sợi RNM**

Ba chủng nấm sợi được nuôi cấy trong MT16 và theo dõi sự phát triển của khuẩn lạc. Kết quả cho thấy cả ba chủng N20, NHA7.3<sub>1</sub>, TH1.9 có khả năng phát triển trên MT16.

MT16 chỉ chứa nguồn carbon duy nhất là dầu, các chủng nấm sợi này có thể phát triển được chứng tỏ chúng có khả năng phân giải dầu. Trong đó chủng N20 có khả năng phân giải dầu mạnh nhất, còn hai chủng NHA7.3<sub>1</sub> và TH1.9 có khả năng phân giải dầu yếu (hình 3.31).



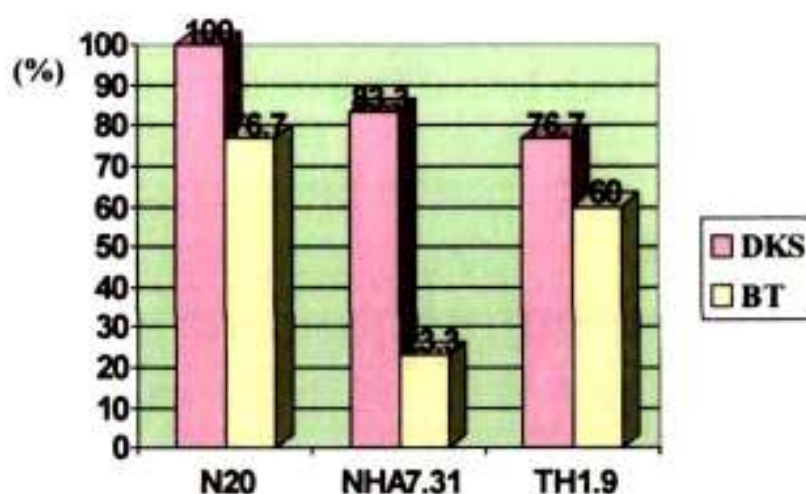
Hình 3.31. Khả năng phân giải dầu của ba chủng nấm sợi RNM

### **3.3. Bước đầu tìm hiểu khả năng ứng dụng của ba chủng nấm sợi RNM**

Các chủng nấm sợi RNM nghiên cứu đều có khả năng sinh kháng sinh và để tìm ra hướng ứng dụng cho ba chủng nấm sợi này, chúng tôi tiến hành khảo sát khả năng diệt sâu tơ, tằm của dịch lên men và BT của chúng. Kết quả được trình bày trong Bảng 3.12 và Bảng 3.13, được minh họa bằng các Biểu đồ 3.6, Biểu đồ 3.7, Biểu đồ 3.8 và các hình từ hình 3.21 đến hình 3.28:

**Bảng 3.12. Khả năng diệt tằm của ba chủng nấm sợi**

| Chủng               |     | Số tằm chết (%) | Thời điểm (ngày) | Mức độ diệt tằm |
|---------------------|-----|-----------------|------------------|-----------------|
| N20                 | DKS | 100             | 11               | Mạnh            |
|                     | BT  | 76,7            | 15               | Mạnh            |
| NHA7.3 <sub>1</sub> | DKS | 83,3            | 15               | Mạnh            |
|                     | BT  | 23,3            | 15               | Yếu             |
| TH1.9               | DKS | 76,7            | 15               | Mạnh            |
|                     | BT  | 60              | 15               | Khá mạnh        |



**Biểu đồ 3.8. Khả năng diệt tằm bằng DKS và BT của ba chủng nấm sợi**

**Nhận xét:**

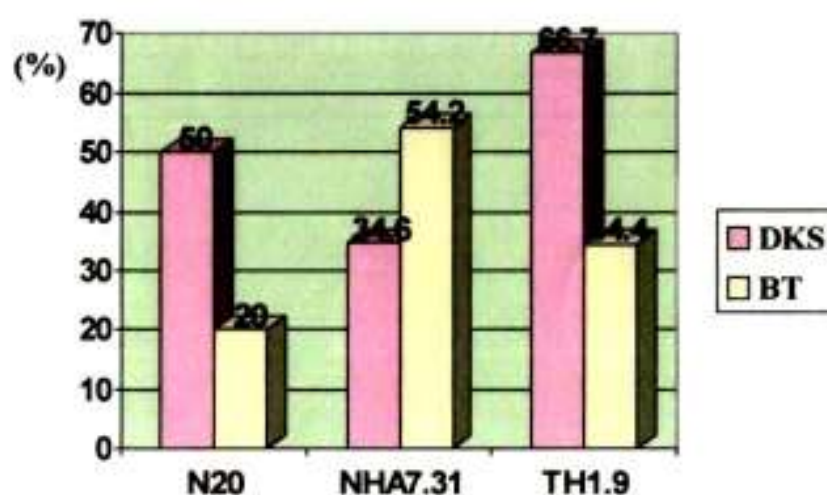
- Cả ba chủng nấm sợi RNM đều có khả năng diệt tằm. DKS của ba chủng nấm nghiên cứu có hoạt lực với tằm mạnh hơn so với BT.
- DKS của chủng N20 có khả năng diệt tằm mạnh (50% tằm chết sau 5 ngày, 100% tằm chết sau 11 ngày).
- BT chủng N20 có khả năng diệt tằm mạnh (50% tằm chết sau 11 ngày, 76.7% tằm chết sau 15 ngày).



- DKS chủng NHA7.31 có khả năng diệt tằm mạnh (50% tằm chết sau 5 ngày, 83.3% tằm chết sau 15 ngày).
- BT chủng NHA7.31 có khả năng diệt tằm yếu (23.3% tằm chết sau 15 ngày).
- DKS chủng TH1.9 có khả năng diệt tằm mạnh (50% tằm chết sau 11 ngày, 76.7% tằm chết sau 15 ngày)
- BT chủng TH1.9 có khả năng diệt tằm khá mạnh (50% tằm chết sau 11 ngày, 60% tằm chết sau 15 ngày).

**Bảng 3.13. Khả năng diệt sâu tơ của ba chủng nấm sợi RNM**

| Chủng               |     | Tỉ lệ sâu tơ chết (%) | Thời điểm (ngày) | Mức độ diệt sâu tơ |
|---------------------|-----|-----------------------|------------------|--------------------|
| N20                 | DKS | 50                    | 10               | Khá mạnh           |
|                     | BT  | 20                    | 10               | Yếu                |
| NHA7.3 <sub>1</sub> | DKS | 34,6                  | 10               | Yếu                |
|                     | BT  | 54,2                  | 10               | Khá mạnh           |
| TH1.9               | DKS | 66,7                  | 10               | Khá mạnh           |
|                     | BT  | 34,4                  | 10               | Yếu                |

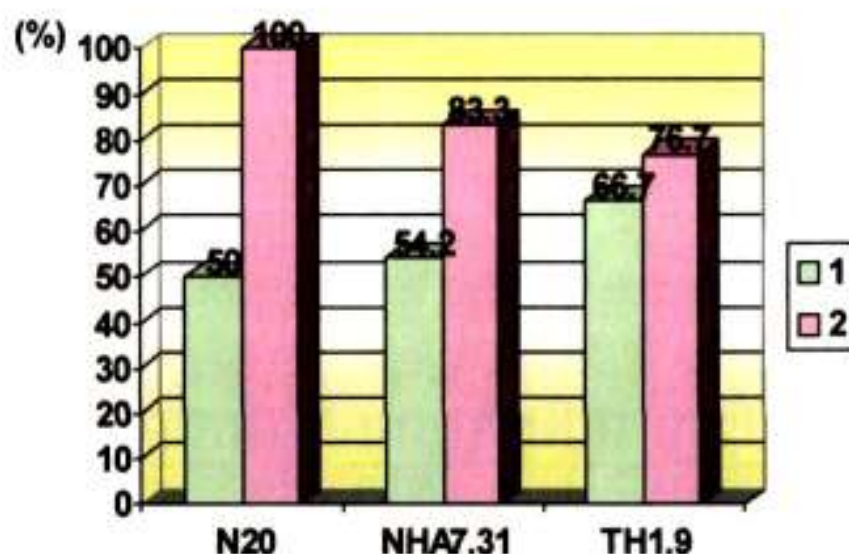


**Biểu đồ 3.9. Khả năng diệt sâu tơ bằng DKS và BT của ba chủng nấm sợi**

**Nhận xét:**

- Cả ba chủng nấm sợi đều có khả năng diệt sâu tơ.

- DKS chủng N20 có khả năng diệt sâu tơ khá mạnh (50% sâu tơ chết sau 5 ngày)
- BT chủng NHA7.3<sub>1</sub> có khả năng diệt sâu tơ khá mạnh (50% sâu tơ chết sau 2 ngày, 54,2% sâu tơ chết sau 10 ngày)
- DKS chủng TH1.9 có khả năng diệt sâu tơ khá mạnh (50% sâu chết sau 3 ngày, 66,7% sâu chết sau 10 ngày).
- BT chủng N20, DKS chủng NHA7.3<sub>1</sub> và BT chủng TH1.9 có khả năng diệt sâu tơ yếu.



**Biểu đồ 3.10. So sánh khả năng diệt sâu tơ và tằm của ba chủng nấm sợi**

**Ghi chú** 1: sâu tơ, 2: tằm.

Kết quả trên cho thấy, các chủng nấm sợi có khả năng diệt tằm mạnh hơn sâu, điều này phù hợp với nghiên cứu của tác giả Nguyễn Vĩnh Hà (2002) [13]. Có thể do sâu tơ sống trong điều kiện tự nhiên luôn phải chống chịu với các điều kiện bất lợi của môi trường nên sức đề kháng cao hơn so với tằm.

Thời gian chết của sâu tơ nhanh hơn so với tằm, điều này cũng dễ hiểu vì thời gian trưởng thành của sâu tơ ngắn hơn thời gian trưởng thành của tằm rất nhiều.

**Kết luận:**

- Cả ba chủng nấm sợi nghiên cứu đều có khả năng diệt tằm mạnh, trong đó DKS của chủng N20 có hoạt lực với tằm mạnh nhất.
- Cả ba chủng nấm sợi đều có khả năng diệt sâu tơ khá mạnh, trong đó DKS chủng TH1.9 có hoạt lực với sâu tơ mạnh nhất.
- Hoạt lực trên tằm của cả ba chủng nấm sợi nghiên cứu mạnh hơn hoạt lực trên sâu tơ.

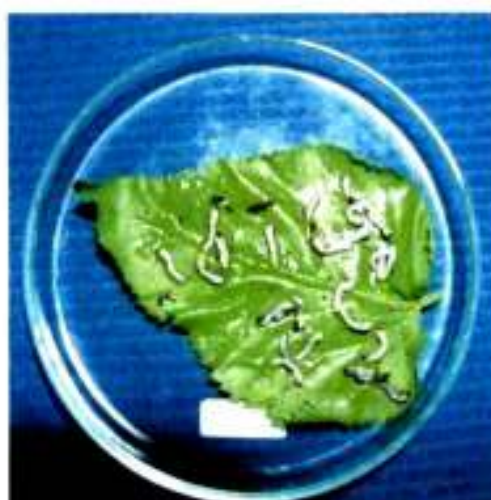


Hình 3.32. Tằm xử lý bằng dịch lên men chủng TH1.9





Hình 3.33. Tằm nuôi đối chứng.



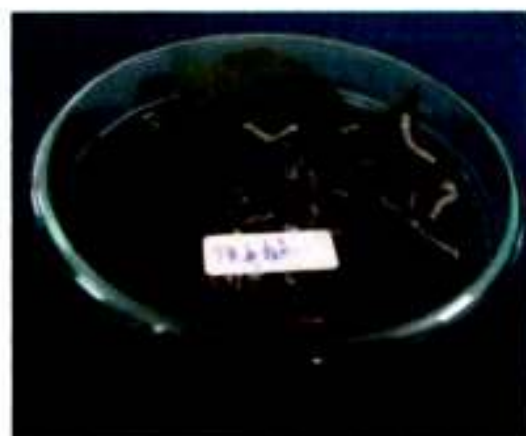
Hình 3.34. Tằm xử lí bằng dịch lên men chủng N20



Hình 3.35. Tằm xử lí bằng bào tử chủng N20



Hình 3.36. Tằm xử lí bằng dịch lên men chủng NHA7.31



Hình 3.37. Tằm xử lí bằng bào tử chủng TH1.9



Hình 3.38. Tằm xử lí bằng bào tử chủng NHA7.31

## PHẦN III. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

### I. Kết luận

1. Kết quả khảo sát hoạt tính kháng sinh của ba chủng nấm sợi RNM cho thấy:
  - Chủng TH1.9 kháng khuẩn mạnh nhất. Chủng NHA7.3<sub>1</sub> 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 N20 là 120h, NHA7.3<sub>1</sub> là 48h, TH1.9: 72-120h.
  - Đã xác định được độ bền nhiệt của CKS của ba chủng nấm sợi: N20 và NHA7.3<sub>1</sub> là 100<sup>0</sup>C/40 phút, TH1.9 là 30-100<sup>0</sup>C/60 phút.
2. Đã định danh
  - Chủng N20 thuộc chi *Acremonium*.
  - Chủng NHA7.3<sub>1</sub> thuộc chi *Trichoderma*,
  - Chủng TH1.9 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.
3. Bước đầu thử nghiệm DKS và BT của ba chủng nấm sợi trên sâu tơ và tằm cho thấy : DKS chủng N20 có tác dụng trên tằm mạnh nhất, DKS chủng TH1.9 có tác dụng trên sâu tơ mạnh nhất.

### II. Đề nghị

1. Xác định điều kiện nuôi cấy tối ưu để ba chủng nấm sợi sinh chất kháng sinh nhiều nhất và có hoạt tính mạnh nhất.
2. Tiếp tục nghiên cứu xác định bản chất CKS do ba chủng nấm sợi trên sinh ra.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

### Tiếng Việt

1. **Hà Lan Anh (2001)**, *Phân lập và nghiên cứu đặc điểm sinh học của một số chủng nấm mốc trong cơ chất có chứa tinh bột*, Luận văn tốt nghiệp, ĐHSP Tp.HCM, tr. 3-16.
2. **Kiều Hữu Ảnh (1999)**, *Giáo trình vi sinh vật học công nghiệp*, NXB Khoa học và kỹ thuật, tr. 167-177.
3. **Nguyễn Văn Cách (2004)**, *Công nghệ lên men các chất kháng sinh*, NXB Khoa học và kỹ thuật, 144 tr.
4. **Tô Minh Châu (2003)**, *Vi sinh cơ sở*, Trường Đại học Mở bán công Tp.HCM, tr. 53-103.
5. **Phạm Thị Kim Chi (2001)**, *Nghiên cứu đặc điểm sinh lý, sinh hóa của các chủng loại nấm mốc được phân lập từ chế phẩm EM có khả năng sinh kháng sinh kháng nấm gây bệnh*, Luận văn tốt nghiệp, ĐHSP Tp.HCM, tr. 2-19.
6. **Nguyễn Thị Chính, Trương Thị Hòa (2005)**, *Vi sinh vật y học*, NXB Đại học Quốc gia Hà Nội, tr. 135-154.
7. **Nguyễn Lâm Dũng, Phạm Thị Trân Châu, Nguyễn Thanh Hiền (1978)**, *Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật*, tập 3, NXB Khoa học và kỹ thuật, tr. 160-235.
8. **Nguyễn Lâm Dũng (1975)**, *Vi sinh vật học*, tập 1 và 2, NXB Đà Nẵng và trung học chuyên nghiệp, 596 tr.
9. **Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Đình Quyền, Phạm Văn Ty (1997)**, *Vi sinh vật học*, NXB Giáo dục, tr. 90-108.
10. **Nguyễn Thành Đạt (2005)**, *Cơ sở sinh học vi sinh vật*, tập 1, NXB Đại học Sư phạm, tr. 82-87.



11. **Bùi Xuân Đồng (2000)**, *Vì nấm dùng trong công nghệ sinh học*, NXB Khoa học và kỹ thuật, Hà Nội, 201 tr.
12. **Bùi Xuân Đồng (1986)**, *Nhóm nấm Hyphomycetes ở Việt Nam*, tập 1-2, NXB Khoa học và kỹ thuật, tr. 91-92.
13. **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, ĐHSP Hà Nội, 83tr.
14. **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, ĐHSP Hà Nội.
15. **Trương Phước Thiên Hoàng (2007)**, *Khảo sát hoạt tính một số hệ enzym thủy phân amylase, cellulase, pectinase thu từ ba chủng Trichoderma phân lập từ miền Đông Nam Bộ*, Luận văn thạc sĩ, ĐH KHTN Tp.HCM, tr. 3-40.
16. **Nguyễn Thị Huệ, Từ Thị Hường (1997)**, *Kỹ thuật kiểm nghiệm vi sinh vật và nấm trong thực phẩm*, Viện vệ sinh y tế công cộng-tài liệu nghiệp vụ, tr.35-39.
17. **Đặng Vũ Hồng Miên**, *Bảng phân loại các loài nấm mốc thường gặp*.
18. **Lê Thị Thanh Nga (2001)**, *Nghiên cứu đặc điểm của chủng xạ khuẩn THsd sinh kháng sinh chống bệnh hại cây trồng*, Luận văn tốt nghiệp, ĐHSP Tp.HCM, tr. 11-19.
19. **Lê Văn Nhương, Đặng Hanh Khôi, Hoàng Tuyển Minh (1978)**, *Thu nhận và ứng dụng các chất hoạt động sinh học từ vi sinh vật*, NXB Khoa học và kỹ thuật, 183 tr.
20. **Lương Đức Phẩm (1998)**, *Công nghệ vi sinh vật*, NXB Nông nghiệp, tr. 233-302.
21. **Nguyễn Ngọc Phương (2000)**, *Tìm hiểu khả năng ức chế nấm gây bệnh ở các cây trồng của các chủng nấm mốc phân lập từ chế phẩm EM*

(*EFFECTIVE MICROORGANISMS*), Luận văn tốt nghiệp, ĐHSP Tp.HCM, tr. 3-16.

22. **Trần Xuân Phương (1999)**, *Phân lập, tìm hiểu đặc điểm của một số chủng nấm mốc trong chế phẩm E.M (EFFECTIVE MICROORGANISMS)*, Luận văn tốt nghiệp, ĐHSP Tp.HCM, tr. 7-9.

23. **Nguyễn Xuân Thành, Nguyễn Bá Hiên, Hoàng Hải, Vũ Thị Hoan (2005)**, *Giáo trình vi sinh vật học công nghiệp*, NXB Giáo dục, tr.37.

24. **Nguyễn Thị Thu (2005)**, *Nghiên cứu đặc tính sinh học và khả năng sinh kháng sinh của các chủng Streptomyces phân lập từ rừng ngập mặn Việt Nam*, Luận văn tốt nghiệp, ĐHSP Hà Nội, 73tr.

25. **Trần Thanh Thủy (1998)**, *Hướng dẫn thực hành vi sinh vật học*, NXB Giáo dục, 191 tr.

26. **Lê Ngọc Tú (1997)**, *Hoá sinh công nghiệp*, NXB Khoa học và kỹ thuật, tr. 422-440.

### **Tiếng Anh**

27. **A.D.Agate, C.V.Subramanion, M.Vannucci (1988)**, *Mangrove biology*, published by UNDP/UNESCO regional project research and its application to the management of the mangroves of Asia and the Pacific (RAS/86/120), pp.4-6.

28. **Alcamo, I.Edward (1991)**, *Fundamentals of microbiology*, NXB California,

29. **Miguel Ulloa, Richard T.Hanlin (1991)**, *Illustrated dictionary of Mycology*, NXB APS PRESS, 448 pp.

30. **Robert A. Samson, Ellen S.Hoekstra, Jens C.Frisvad (2004)**, *Introduction to food- and airborne fungi*, Centraalbureau voor Schimmelcultures\_Utrecht, 389 pp.

**Trang web:**

31. <http://www.mycology.adelaide.edu.au/images/trichoderma.gif>
32. [http://www.moldbacteria.com/Trichoderma\\_culture.gif](http://www.moldbacteria.com/Trichoderma_culture.gif)
33. <http://emu.arsusda.gov/typesof/images/staph.jpg>
34. <http://www.biologie.de/linker/upfile/43beffc7666047efdc3644d19cde3792>
35. <http://www.wadsworth.org/databank/hirez/wongp1.gif>
36. [http://www.molecularlab.it/public/news/\\_20051130\\_mycobacterium\\_tbc.jpg](http://www.molecularlab.it/public/news/_20051130_mycobacterium_tbc.jpg)
37. <http://www.atcc.org/common/documents/mediapdfs/2441.pdf>
38. [http://www.medmicro.wisc.edu/resources/imagelib/mycology/images/acremoniu  
mX40.jpg](http://www.medmicro.wisc.edu/resources/imagelib/mycology/images/acremoniu<br/>mX40.jpg)



## **PHỤ LỤC**



# FCC

**CÔNG TY CỔ PHẦN GIÁM ĐỊNH VÀ KHỬ TRÙNG FCC**  
FCC CONTROL AND FUMIGATION JOINT STOCK CO.

45 Dinh Tien Hoang St., Dist. 1, Ho Chi Minh City, Vietnam  
Tel : (84-8) 8223183 - 8297857 - Fax : (84-8) 8290202 - 9103070  
E-mail: fcc@fcc.com.vn - Website: http://www.fcc.com.vn



TN 643

Ngày : 20/5/2007

Số : CF 17/01.50.1826

## PHIẾU KẾT QUẢ ĐỊNH DANH

TÊN MẪU : ỐNG GIỐNG NĂM MỐC  
KHỐI LƯỢNG MẪU : 01 MẪU  
NGÀY NHẬN MẪU : 27/4/2007  
NGƯỜI YÊU CẦU : TRẦN THỊ MINH ĐỊNH

### KẾT QUẢ ĐỊNH DANH

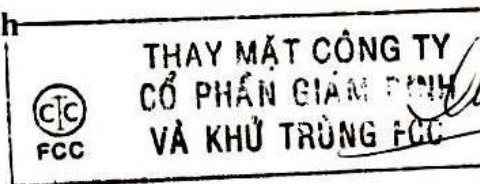
| Chỉ tiêu định danh | Phương pháp định danh           | Kết quả định danh                                |
|--------------------|---------------------------------|--------------------------------------------------|
| Định danh tên loài | Nhóm nấm Hypomycetes ở Việt nam | <i>Botryotrichum piluliferum</i><br>Sacc & March |

\* Kết quả trên đây chỉ có giá trị đối với mẫu nhận được.

**CÔNG TY CỔ PHẦN GIÁM ĐỊNH và  
KHỬ TRÙNG FCC**

Trưởng phòng Phân Tích Hóa - Sinh

TRẦN THỊ TRANG THANH



*Đàm Thị Anh Thư*

**KẾT QUẢ ĐỊNH DANH****5. MỘT SỐ GIỐNG *HYPHOMYCETES* KHÁC****TÊN:** *Botryotrichum piluliferum* Saec & March**Syn:** J.643**Ký hiệu:****Số bảo quản:****Xuất xứ:** từ ống nghiệm**Người phân lập:****Thời điểm phân lập:****Phương pháp phân lập:****Môi trường phân lập:****Điều kiện nuôi cấy:** Môi trường: PDA**Nhiệt độ:**  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ **Ánh sáng:** thường**Ngày phân loại:** 6/5/07**Tuổi nấm khi phân loại:** 4, 8, 10 ngày**Khuẩn lạc:****Tốc độ mọc:** nhanh**Kích thước:** 7cm / 4 ngày**Dạng khuẩn lạc:** tổ ong kết cụm**Màu sắc:** Mặt phải: khuẩn lạc màu trắng sau chuyển thành xám lục**Mặt trái:** màu vàng nâu**Sắc tố ra môi trường:** không**Sợi nấm dinh dưỡng:** có sợi nhỏ**Vị trí mọc:** mọc từ môi trường**Kích thước:** (200 - 250) x (3 - 3,5) mm **Màu sắc:** nâu**Vách ngăn:** có vách ngăn**Tế bào màng dày:****- Vị trí:****Hình dạng:****- Kích thước:****Số lượng:****Cơ quan sinh sản:****Dạng chung:** mọc từ đỉnh**Cuống sinh conidi:** có 2 dạng**Sự phân nhánh:** phân nhánh không đều, 1 hoặc 2 lần**Hình dạng:** hình trụ và hình chai**Kích thước:** hình trụ (20-49) x (3-3,5) mm **Màu sắc:****Bào tử:** chai (7-8,5) mm x (3-4) mm**Hình dạng:** cầu lớn, nhỏ**Kích thước:** cầu lớn (10-15) mm**Màu sắc:****Các đặc điểm khác (nếu có):** cầu nhỏ (3-4) mm



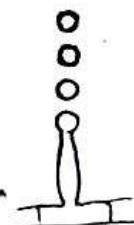
# *Botryotrichum piluliferum* Sacc & Mai



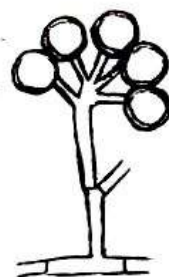
lượng mủ bào tử



Sợi nấm đơn đường



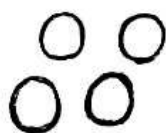
thể bình hình chai  
(7 - 8,5) x (3-4) μm



thể bình hình chai  
(20 - 49) x (3-3,5) μm



bào tử nhỏ (3-4) μm



bào tử lớn (10-15) μm