

# Phân loại 2 chủng vi nấm phân lập tại Viện 69 và xác định khả năng phân giải một số cơ chất sinh học của chúng

Phùng Công Thường\*, Nguyễn Văn Bắc, Nguyễn Cao Vũ

Viện 69

Ngày nhận bài 11/10/2018; ngày chuyển phân biện 16/10/2018; ngày nhận phân biện 23/11/2018; ngày chấp nhận đăng 27/11/2018

## Tóm tắt:

Mục tiêu của đề tài là nghiên cứu định danh 2 chủng vi nấm bằng phương pháp hình thái và giải trình tự gen đoạn ITS rDNA, đồng thời xác định khả năng phân giải các cơ chất collagen, gelatin, cellulose của chúng. Các phương pháp thực hiện bao gồm: nghiên cứu thực nghiệm, mô tả, so sánh các dữ liệu thu thập được với dữ liệu khóa phân loại và dữ liệu genbank. Nghiên cứu được tiến hành trên 2 chủng vi nấm phân lập được ở Viện 69. Kết quả cho thấy, chủng ĐTĐL-032 thuộc về loài *Aspergillus versicolor* và chủng ĐTĐL-207 thuộc về loài *Aspergillus sydowi*. Đây là 2 loài vi nấm cùng nhóm (*Aspergillus versicolor* group), chúng có các đặc điểm hình thái khá giống nhau và gần gũi nhau về mặt di truyền. Chủng vi nấm ĐTĐL-032 có khả năng phân hủy cơ chất collagen và gelatin, chủng ĐTĐL-207 có khả năng phân hủy 3 cơ chất collagen, gelatin, cellulose.

Từ khóa: cellulose, collagen, gelatin, hình thái, ITS, vi nấm.

Chỉ số phân loại: 3.5

## **Đặt vấn đề**

Nghiên cứu về vi nấm, trước hết cần phân loại (định danh) các chủng thu thập được. Định danh vi nấm hiện nay có nhiều phương pháp, trong đó hình thái là phương pháp truyền thống, cơ bản và tới nay vẫn là phương pháp chính để phân loại vi nấm ở các labo trong và ngoài nước. Phương pháp này dựa vào các đặc điểm hình thái đại thể, vi thể, siêu vi thể và căn cứ vào các khóa phân loại để định danh tên chi, loài vi nấm. Phương pháp sinh học phân tử dựa vào các kỹ thuật PCR, giải trình tự gen... để định danh vi nấm. Trong giải trình tự gen rDNA, một số cặp mồi (ITS1, ITS2, NL1, NL4...) thường được sử dụng để có được trình tự gen đích cho phân tích, định danh loài. Hiện nay, việc kết hợp nhiều phương pháp trong định danh xác định loài vi nấm đang là hướng phát triển mạnh mẽ nhằm có được kết quả chẩn đoán chính xác và nhanh chóng [1, 2].

Vi nấm là các vi sinh vật có thành phần loài phong phú và đa dạng, có khả năng sản sinh hệ các enzyme protease, lipase, cellulase... giúp chúng tồn tại, phát triển trên nhiều loại cơ chất, sống được ở nhiều điều kiện môi trường khắc nghiệt [3]. Viện 69 có một số phòng thí nghiệm có điều kiện khô lạnh (nhiệt độ 16°C, độ ẩm 70%) để bảo quản tiêu bản

sinh học. Các thành phần trong các tiêu bản sinh học bảo quản ở Viện chính là các cơ chất sinh học giúp cho các vi nấm phát triển, có thể gây hư hỏng các tiêu bản. Khảo sát hệ vi nấm ở các phòng thí nghiệm này đã thu được nhiều chủng vi nấm, trong đó các loài thuộc chi *Aspergillus* chiếm tỷ lệ cao.

Từ những lý do trên, chúng tôi tiến hành nội dung nghiên cứu với mục tiêu định danh 2 chủng vi nấm ĐTĐL-207 và ĐTĐL-032 thuộc chi *Aspergillus* thu thập được bằng phương pháp hình thái kết hợp với giải trình tự gen và xác định khả năng phân giải một số cơ chất sinh học của các loài vi nấm này.

## **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu**

### *Đối tượng nghiên cứu*

Hai chủng vi nấm ĐTĐL-207 và ĐTĐL-032 phân lập được tại Viện 69.

### *Phương pháp nghiên cứu*

*Phương pháp phân loại vi nấm dựa vào hình thái:*

Tiến hành nuôi cấy chủng vi nấm thuần khiết, xác định đặc điểm hình thái khuẩn lạc trên môi trường Czapek Dox

\*Tác giả liên hệ: Email: phungcongthuong@gmail.com

# Classification of two fungal strains isolated at the Institute 69 and determining their ability to dissolve some biological substrates

Cong Thuong Phung\*, Van Bac Nguyen,  
Cao Vu Nguyen

Institute 69

Received 11 October 2018; accepted 27 November 2018

## Abstract:

The study aims at the identification of two fungal strains by the morphological method and the sequencing of the ITS rDNA region, and the determination of their ability to dissolve collagen, gelatin, and cellulose. **Methods:** Experimental study, description, and comparison of the collected data with the key classification data and database of GenBank. The study was conducted with two strains of fungi at the Institute 69. Results showed that the strain DTDL-032 belonged to *Aspergillus versicolor* and DTDL-207 belonged to *Aspergillus sydowi*. These are two species of the *Aspergillus versicolor* group, which are quite homogenous in morphological and genetic characteristics. DTDL-032 is capable of decomposing collagen and gelatin substrates; the strain DTDL-207 is capable of decomposing collagen, gelatin, and cellulose.

**Keywords:** cellulose, collagen, fungi, gelatin, IST, morphology.

**Classification number:** 3.5

Agar (CZA) [4]. Làm tiêu bản, soi trên kính hiển vi quang học. Xác định các đặc điểm vi thể của sợi nấm và cơ quan sinh sản theo các tiêu chí trong hệ thống phân loại [4, 5]. Làm tiêu bản, quan sát đặc điểm vi nấm trên kính hiển vi điện tử quét (SEM): chuẩn bị mẫu, vi nấm, cố định mẫu bằng Osmic, mạ phủ mẫu bằng vàng. Soi mẫu trên kính hiển vi điện tử quét JSM-5410LV của hãng JEOL. Quan sát, chụp ảnh các đặc điểm siêu vi thể, nhất là đặc điểm của bào tử và cơ quan sinh sản [6]. Xác định vị trí chủng nấm trong hệ thống phân loại: căn cứ vào các khoá phân loại Chi *Aspergillus* của Raper, Fennell (1965) [7]; khoá phân loại của Katsuhiko Ando "Identification of fungi Imperfecti", 2002, NITE [5]. Từ các đặc điểm hình thái khuẩn lạc, vi thể, siêu vi thể, xác định và phân loại, viết tên các chủng nấm theo

đúng danh pháp quốc tế.

*Phương pháp phân loại vi nấm dựa vào các trình tự gen:*

Nuôi cấy chủng nấm thuần khiết trong môi trường Malt Broth: đặt trong tủ nuôi cấy lắc, tốc độ 180 vòng/phút/25°C trong 3-5 ngày. Thu sinh khối bằng giấy lọc. Tách chiết DNA tổng số bằng kit tách chiết của hãng GeneAll, Hàn Quốc. Kiểm tra nồng độ, độ sạch của DNA tổng số bằng máy đo quang (Nano photometer, IMPLLEN). Điều chỉnh nồng độ DNA tổng số để đạt khoảng 50 đến 150 ng/μl.

Thực hiện phản ứng PCR nhân gen vi nấm với cặp mồi ITS1 và ITS4. Trình tự của mồi ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGGG-3' (mồi xuôi), ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3 (mồi ngược). Chu trình nhiệt: 94°C/1'; (94°C/30''- 56°C/30''- 68°C/45'') x 35 chu kỳ; 68°C/7'.

Tinh sạch sản phẩm DNA vi nấm sau PCR bằng kit tinh sạch của hãng GeneAll, Hàn Quốc. Kiểm tra nồng độ, độ tinh sạch DNA bằng máy đo quang. Điều chỉnh nồng độ DNA tổng số, đạt khoảng 20 ng/μl đến 30 ng/μl.

Giải trình tự gen trực tiếp sử dụng mồi ITS1 trên hệ thống ABI 3130. Phân tích trình tự gen, xây dựng cây phát sinh chủng loại sử dụng phần mềm Bioedit, DNASTAR, công cụ Blast và các dữ liệu trên genbank [1, 2, 8].

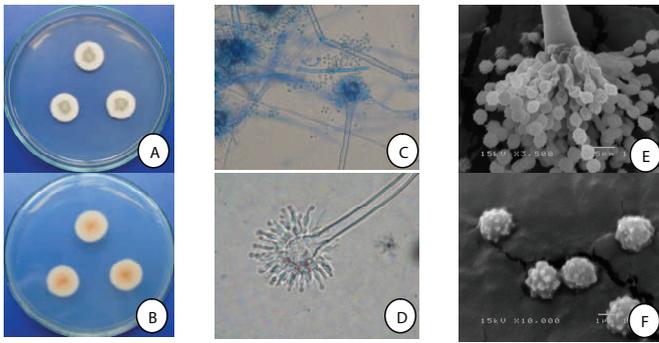
*Phương pháp xác định khả năng sinh tổng hợp và hoạt tính các enzyme vi nấm:*

Xác định hoạt tính các enzyme collagenase, gelatinase, cellulase theo phương pháp thạch đĩa: môi trường cơ chất collagen 0,1% (nutrient agar 20 g, collagen 1 g), cơ chất gelatin 0,4% (nutrient agar 20 g, gelatin 4 g), cơ chất cellulose 1% (CZA 48 g, carboxymethyl cellulose-CMC 10 g). Môi trường cơ chất pha trong 1000 ml nước cất, hấp vô trùng ở 121°C/15 phút, để nguội khoảng 45°C, phân phối vào các đĩa petri. Cây các chủng vi nấm lên đĩa môi trường thành 3 điểm, đặt trong tủ ẩm ở 25°C trong 5 ngày. Dùng thuốc thử HgCl<sub>2</sub> đổ lóng trên bề mặt đĩa thạch có cơ chất collagen hoặc gelatin, thuốc thử KI với đĩa thạch có CMC. Đo bán kính khuẩn lạc và bán kính vòng phân giải (vòng trong suốt xung quanh khuẩn lạc), xác định hệ số phân giải cơ chất (I) theo công thức:  $I = R_2^2/R_1^2$ . Trong đó:  $R_2$  là bán kính vòng phân giải,  $R_1$  là bán kính khuẩn lạc. Hệ số phân giải I càng lớn thì hoạt tính enzyme càng cao [4].

## Kết quả nghiên cứu

### Kết quả phân loại chủng vi nấm DTDL-032

Phân loại chủng DTDL-032 bằng phương pháp hình thái: hình ảnh khuẩn lạc và các hình ảnh vi thể, siêu vi thể của chủng được trình bày ở hình 1.



**Hình 1. Chủng ĐTDL-032.** (A-B) Khuẩn lạc và mặt trái khuẩn lạc (CZA), nuôi cấy 10 ngày, 25°C; (C-D) Cơ quan sinh bào tử và bào tử trần X 1000; (E) Cơ quan sinh bào tử trần (SEM) X 3500; (F) Bào tử trần (SEM) X 10000.

**Mô tả chủng:**

Đặc điểm khuẩn lạc: khuẩn lạc trên môi trường CZA phát triển khá chậm, đạt 2,5-3 cm trong 10 ngày ở nhiệt độ phòng, phân vùng, có khía đồng tâm tỏa ra xung quanh. Mặt khuẩn lạc dạng nhung, mịn, lúc đầu có màu trắng nhạt, sau chuyển sang màu vàng, vàng cam tới lục vàng; giọt tiết ít, không màu đến vàng nhạt; mặt trái màu vàng đến vàng da cam hoặc đỏ tía.

Đặc điểm vi thể, siêu vi thể: cuống sinh bào tử đa số ngắn (200-300 μm), nhưng có thể dài tới 500-700 μm, đường kính 5-10 μm, nhẵn, không màu đến nâu nhạt. Bọng hình clavate đến gần cầu, kích thước (KT) 13-18 μm. Thể bình 2 tầng; cuống thể bình KT 5,5-8,0 mm x 3,0 mm; thể bình KT 5,0-7,5 mm x 2,0-2,5 mm. Bào tử hình cầu, hầu hết KT 2,5-3,0 μm, có thể đến 3,5 μm, gai ráp.

**Kết luận tên loài:** *Aspergillus versicolor* (Vuill.) Tiraboschi [7].

**Phân loại chủng ĐTDL-032 dựa vào trình tự gen ITS rDNA:**

Giải trình tự gen với môi ITS1, có trình tự sau sửa lỗi bằng phần mềm Bioedit như sau:

>032\_ITS\_ITS1:

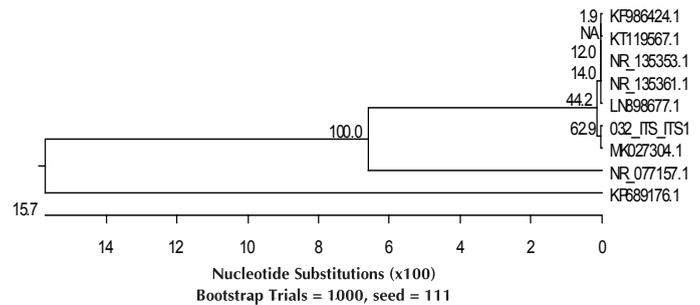
```
CCACCTCCCACCCGTGACTACCTAACACTGTTGCTTCGGCGGGGAGCCCTCTCGGGGGCGC
GCCCGCGGGACTACTGAACCTCATGCTGAGAGTGATGCAGTCTGAGTCTGAATATAAA
ATCAGTCAAAAATTTCAACAATGGATCTCTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGA
ACTGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACAT
TGCGCCCTGGCATTCCGGGGGCGATGCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCATCAAGCCC
GGCTTGTGTGTTGGGTGCTGCTCCCCCGGGGACGGGCCGAAAGGCAGCGGGCGGCAC
CGTGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCGAATTAGGGCCGGCGGGCG
CCAGCCGACGTCAACCATTTTCTCAGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTG
AACTAAGCATATCAATAAGCCGGAGAA
```

Sau khi Blast (Blast/NCBI) thu được kết quả tương đồng với các trình tự dữ liệu trên genbank thể hiện tóm tắt ở bảng 1.

**Bảng 1. Kết quả tóm tắt Blast search trình tự gen 032\_ITS\_ITS1.**

TT	Ký hiệu chủng	Tên loài trên genbank	Tỷ lệ tương đồng (%)
1	MK027304.1	<i>Aspergillus versicolor</i>	100
2	LC105689.1	<i>Aspergillus versicolor</i>	100
3	NR_135443.1	<i>Aspergillus austroafricanus</i>	99
4	KF986424.1	<i>Aspergillus carneus</i>	99
5	LN898677.1	<i>Aspergillus amoenus</i>	99
6	NR_135361.1	<i>Aspergillus tabacinus</i>	99
7	NR_135353.1	<i>Aspergillus protuberus</i>	99
8	KP689176.1	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	69
9	NR_077157.1	<i>Penicillium sclerotiorum</i>	72

Từ trình tự nghiên cứu và các trình tự tham khảo thu được, chúng tôi đã xây dựng cây phân loại và tính độ tương đồng di truyền bằng phần mềm DNASTAR, kết quả thu được ở hình 2 và hình 3.



**Hình 2. Cây phân loại trình tự gen 032\_ITS\_ITS1 với các trình tự tham khảo trên genbank.**

		Percent Identity										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9		
Divergence	1	█	100.0	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	87.8	74.9	1	032_ITS_ITS1
	2	0.0	█	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	88.0	75.0	2	MK027304.1
	3	0.2	0.2	█	100.0	100.0	100.0	100.0	87.8	75.1	3	KF986424.1
	4	0.2	0.2	0.0	█	100.0	100.0	100.0	88.0	75.2	4	LN898677.1
	5	0.2	0.2	0.0	0.0	█	100.0	100.0	88.0	75.2	5	NR_135361.1
	6	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	█	100.0	88.0	75.2	6	KT119567.1
	7	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	█	88.0	75.2	7	NR_135353.1
	8	13.3	13.1	13.3	13.1	13.1	13.1	13.1	█	73.7	8	NR_077157.1
	9	30.6	30.5	30.4	30.3	30.3	30.3	30.3	32.6	█	9	KP689176.1

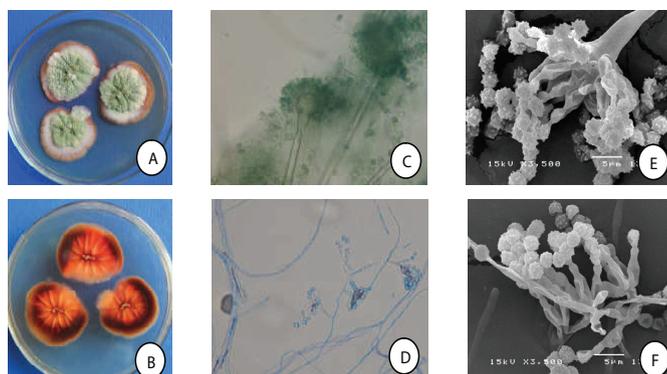
**Hình 3. Tương đồng di truyền trình tự gen 032\_ITS\_ITS1 với các trình tự tham khảo trên genbank.**

Qua bảng 1 và phân tích cây phân loại ở hình 2 cho thấy, chủng nghiên cứu có quan hệ gần gũi nhất với *Asp. versicolor*. Hình 3 cho thấy trình tự gen 032\_ITS\_ITS1 tương đồng trình tự 100% với 5 loài thuộc chi *Aspergillus*, khác biệt rõ ràng với hai chủng thuộc chi *Penicillium* và *Cladosporium*. Như vậy,

qua phân tích trình tự gen với mỗi ITS1, chủng ĐTĐL-032 có quan hệ gần gũi nhất với loài *Asp. versicolor*. Kết quả này là phù hợp và bổ sung cho phân loại dựa vào các đặc điểm hình thái.

**Kết quả phân loại chủng vi nấm ĐTĐL-207**

Phân loại chủng ĐTĐL-207 bằng phương pháp hình thái: hình ảnh khuẩn lạc và các hình ảnh vi thể, siêu vi thể của chủng được trình bày ở hình 4.



**Hình 4. Chủng ĐTĐL-207.** (A-B) Khuẩn lạc và mặt trái khuẩn lạc (CZA), nuôi cấy 10 ngày, 25°C; (C) Cơ quan sinh bào tử và bào tử trần X1000; (D) Đầu sinh bào tử nhỏ X1000, (E) Cơ quan sinh bào tử trần (SEM) X3500; (F) Đầu sinh bào tử nhỏ (SEM) X3500.

**Mô tả chủng:**

Đặc điểm khuẩn lạc: khuẩn lạc trên môi trường CZA đạt 3-3,5 cm trong 14 ngày ở nhiệt độ phòng, có khía phân vùng đồng tâm. Mặt khuẩn lạc dạng len, xốp nhẹ, tạo thành các đám bào tử vùng trung tâm, có màu lục nhạt, sau chuyển sang màu lục xám; giọt tiết thường nhiều, màu vàng rom đến đỏ cam; mặt trái màu đỏ san hô đến đỏ sẫm.

Đặc điểm vi thể, siêu vi thể: cuống sinh bào tử dài khoảng 500 μm, đường kính 5-8 μm, thành dày, nhẵn, không màu; bong hình gần cầu, KT 15-20 μm. Thể bình 2 tầng, bao phủ hầu khắp bề mặt bong; cuống thể bình thường KT 6,0-7,0 μm x 2,0-3,0 μm; thể bình KT 7,0-9,5 μm x 2,0-2,5 μm. Bào tử hình gần cầu đến cầu, hầu hết KT 2,5-3,0 μm, có thể đến 3,5 μm, gai ráp. Có các đầu sinh bào tử nhỏ được sinh ra từ các sợi nấm khí sinh, có KT nhỏ (dạng *Penicillium* - hình 4D, F), có thể có bong hoặc không.

**Kết luận tên loài:** *Aspergillus sydowi* (Bain. and Sart.) Thom and Church [7].

Phân loại chủng ĐTĐL-207 dựa vào trình tự gen ITS rDNA:

Giải trình tự gen với mỗi ITS1, có trình tự sau sửa lỗi bằng

phần mềm Bioedit như sau:

>207 ITS ITS1:

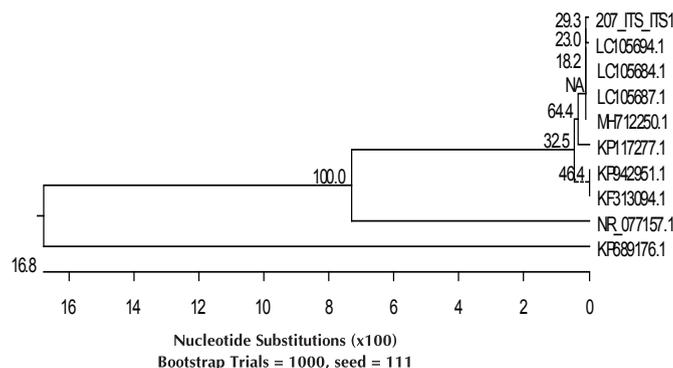
```
CCAACCTCCCACCCGTGAATACCTAACACTGTTGCTTCGG
CGGGGAACCCCTCGGGGGCGAGCCGCCGGGGACTACTGA
ACTTCATGCCTGAGAGTGATGCAGTCTGAGTCTGAATATAAA
ATCAGTCAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGGCAT
CGATGAAGAACGCAGCGAACTGCGATAAGTAATGTGAATTGC
AGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCC
CCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGC
CCATCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTGCTGTCCTCCCCCGGG
GGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGGCACCCTGTCCGGTCCCTCG
AGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCGACTAGGGCCGGCCGGG
CGCCAGCCGACGTCTCAACCATTTTCTTTCAGGTTGACCTCGGA
TCAGGTAGGGATAACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCCGGA
```

Kết quả Blast thu được tỷ lệ tương đồng với các trình tự dữ liệu trên genbank được thể hiện tóm tắt ở bảng 2.

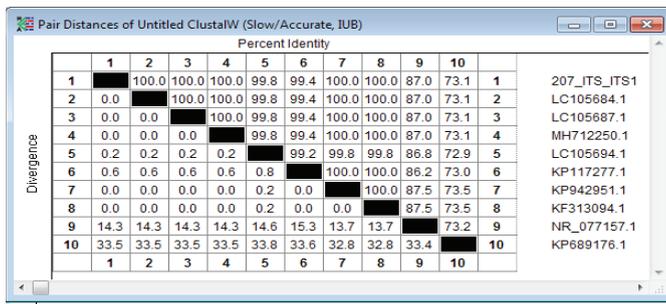
**Bảng 2. Kết quả tóm tắt Blast search trình tự gen 207 ITS ITS1.**

TT	Ký hiệu chủng	Tên loài trên genbank	Tỷ lệ tương đồng (%)
1	LC105687.1	<i>Aspergillus versicolor</i>	100
2	LC105684.1	<i>Aspergillus versicolor</i>	100
3	MH712250.1	<i>Aspergillus sydowi</i>	99
4	LC105694.1	<i>Aspergillus versicolor</i>	99
5	KP942951.1	<i>Aspergillus sydowi</i>	100
6	KF313094.1	<i>Aspergillus sydowi</i>	100
7	KP117277.1	<i>Aspergillus nidulan</i>	99
8	KP689176.1	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	87
9	NR_077157.1	<i>Penicillium sclerotiorum</i>	73

Từ trình tự nghiên cứu và các trình tự tham khảo thu được, chúng tôi đã xây dựng cây phân loại và tính độ tương đồng di truyền bằng phần mềm DNASTAR, kết quả thu được ở hình 5 và hình 6.



**Hình 5. Cây phân loại trình tự gen 032 ITS ITS1 với các trình tự tham khảo trên genbank phân tích bằng phần mềm DNASTAR V7.0.**



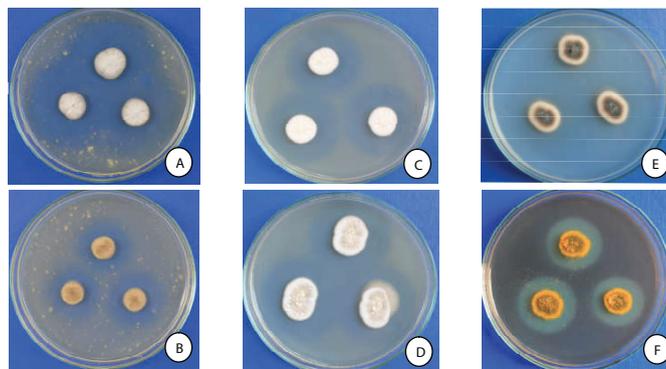
Hình 6. Tương đồng di truyền trình tự gen 207\_ITS\_ITS1 với các trình tự tham khảo trên genbank phân tích bằng phần mềm DNASIS V7.0.

**Kết quả xác định khả năng sinh tổng hợp và hoạt tính một số enzyme**

Xác định khả năng sinh tổng hợp và hoạt tính một số enzyme của 2 chủng vi nấm thông qua xác định hệ số phân giải cơ chất (I). Kết quả giá trị hệ số I thể hiện ở bảng 3; minh họa khả năng sinh tổng hợp và hoạt tính collagenase ở hình 7.

Bảng 3. Khả năng sinh tổng hợp và hoạt tính một số enzyme của 2 chủng nấm.

TT	Tên chủng	Hệ số phân giải cơ chất (I) trung bình (n=6)		
		Gelatin	Collagen	Cellulo
1	ĐTĐL-032	6,7 ± 0,5	11,4 ± 0,9	0,0
2	ĐTĐL-207	5,0 ± 0,9	4,6 ± 0,3	3,6 ± 0,2



Hình 7. Các chủng vi nấm phân hủy cơ chất. (A) Chủng ĐTĐL-032 phân giải collagen; (B) Chủng ĐTĐL-207 phân giải collagen; (C) Chủng ĐTĐL-032 phân giải gelatin; (D) Chủng ĐTĐL-207 phân giải gelatin; (E) Chủng ĐTĐL-032 không phân giải cellulo; (F) Chủng ĐTĐL-207 phân giải cellulo.

**Bàn luận**

Hai chủng vi nấm ĐTĐL-032 và ĐTĐL-207 khi nuôi cấy trên môi trường CZA ở nhiệt độ 25°C trong 10 ngày, thấy tốc độ phát triển khuẩn lạc của chủng ĐTĐL-032 (3 cm) kém hơn ĐTĐL-207 (3,5 cm) không đáng kể. Hình

thái khuẩn lạc giữa hai chủng trong vòng 3 ngày đầu khá giống nhau; sau 10 ngày có sự khác nhau nhiều hơn, chủng ĐTĐL-207 có màu lục sẫm hơn, mặt trái có màu đỏ tía rõ hơn, giọt tiết to và thẫm màu hơn. Quan sát đặc điểm vi thể, siêu vi thể thấy cơ quan sinh bào tử và bào tử trần của hai chủng có KT và hình dạng giống nhau. Điểm khác biệt là chủng ĐTĐL-207 có xuất hiện thêm cơ quan sinh bào tử dạng nhỏ từ các sợi nấm khí sinh (hình 4D, F). Các đầu sinh bào tử này có đặc điểm là KT nhỏ hơn cơ quan sinh bào tử bình thường, có thể có bông hoặc không; chúng được sinh ra từ các sợi nấm khí sinh và tồn tại song song cùng các cơ quan sinh bào tử bình thường (có đủ cuống, bông, cuống thể bình và thể bình). Các đặc điểm này có thể quan sát thấy trên cả kính hiển vi quang học và kính hiển vi điện tử quét. Đây là những đặc điểm khác nhau giúp phân biệt giữa *Asp. sydowi* (chủng ĐTĐL-207) và *Asp. vesicolor* (chủng ĐTĐL-032). Hai loài này đều thuộc *Aspergillus vesicolor* group trong chi *Aspergillus* [5, 7, 8].

Chủng ĐTĐL-032 trong phân loại bằng giải trình tự gen cho thấy có độ tương đồng 100% với các chủng thuộc loài *Asp. vesicolor* khi blast. Khi phân tích cây phân loại thấy chủng này có quan hệ gần gũi nhất với *Asp. vesicolor*; có độ tương đồng di truyền 100% với 5 trình tự tham khảo trong đó có *Asp. vesicolor*. Chủng ĐTĐL-207 trong phân loại bằng giải trình tự gen cho thấy có độ tương đồng 100% với các chủng thuộc loài *Asp. vesicolor* và cả *Asp. sydowi* khi blast. Khi phân tích cây phân loại thấy chủng này có quan hệ gần gũi nhất với *Asp. vesicolor*; có độ tương đồng di truyền 100% với 5 trình tự tham khảo, trong đó có cả *Asp. vesicolor* và *Asp. sydowi*. Như vậy, phân loại bằng trình tự gen đoạn ITS với cặp môi ITS1-ITS4 chưa thể phân loại xác định chủng ĐTĐL-207 thuộc về loài nào. Z. Jurjevic và cộng sự (2012) khi phân biệt 9 loài thuộc nhóm *Asp. vesicolor* ngoài trình tự gen vùng ITS, phải dùng tới nhiều vùng khác thuộc rDNA hoặc các gen chức năng như camodulin,  $\beta$ -tubulin... [8]. Trong phân loại vi nấm hiện nay, phương pháp hình thái vẫn là phương pháp chính để phân loại. Các phương pháp khác như sinh hóa, sinh học phân tử... giúp định loại bổ sung, làm rõ thêm cho phương pháp hình thái, bổ sung, làm rõ các mối quan hệ tiến hóa của các loài vi nấm [1, 8]. Như vậy, kết hợp 2 phương pháp phân loại, Viện 69 xác định chủng ĐTĐL-032 thuộc về loài *Asp. vesicolor*; chủng ĐTĐL-207 thuộc về loài *Asp. sydowi*.

Hai chủng vi nấm phân lập được tại Viện 69 thuộc các loài vi nấm ưa khô, không bắt buộc phải sống trong điều kiện độ ẩm khô (<85%), có thể thích nghi phát triển ở điều kiện độ ẩm không khí cao hơn [7]. Khi nghiên cứu đặc điểm sinh tổng hợp và hoạt tính 3 enzyme, thấy cả 2 chủng đều có khả năng phân giải collagen và gelatin, chủng ĐTĐL-032 không có khả năng phân giải cellulo. Đây là hai loài vi nấm có thể gây hư hỏng các tiêu bản đang bảo quản ở Viện 69.

Việc nghiên cứu khả năng phân hủy các cơ chất sinh học của vi nấm được nhiều tác giả quan tâm do có ý nghĩa trong nhiều ngành, nhiều lĩnh vực đời sống, công nghiệp, thương mại, khoa học như da giày, chế biến, bảo quản lương thực thực phẩm, bảo tồn bảo tàng... [3].

### KẾT LUẬN

Nghiên cứu về hai chủng vi nấm phân lập được ở Viện 69, chúng tôi rút ra những kết luận sau:

1. Hai chủng vi nấm thuộc về chi *Aspergillus*, chủng ĐTĐL-032 thuộc về loài *Asp. vesicolor*, chủng ĐTĐL-207 thuộc về loài *Asp. sydowi*.

Kết quả phân loại loài vi nấm dựa vào hình thái vi nấm có ý nghĩa quyết định, phân loại bằng giải trình tự đoạn gen ITS rDNA chỉ giúp bổ sung, làm rõ phân loại cho 1 trong 2 chủng nghiên cứu.

2. Chủng vi nấm ĐTĐL-032 có khả năng phân hủy 2 cơ chất (collagen và gelatin), chủng ĐTĐL-207 có khả năng phân hủy 3 cơ chất (collagen, gelatin, cellulose).

### LỜI CẢM ƠN

Nhóm thực hiện đề tài xin trân trọng cảm ơn các Thủ trưởng, đồng nghiệp ở Viện 69, Bộ Tư lệnh Bảo vệ Lăng Chủ tịch Hồ Chí Minh đã tạo điều kiện và cùng phối hợp thực hiện nghiên cứu. Nội dung nghiên cứu này thuộc

đề tài nghiên cứu khoa học độc lập cấp quốc gia mã số ĐTĐLCN.31/15, thực hiện trong giai đoạn 2015-2018.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] A.J. Chen, V. Hubka, et al. (2017), "Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Aspergillus* (formerly *Eurotium*), and its occurrence in indoor environments and food", *Studies in Mycolgy*, **88**, pp.37-135.

[2] A.R. Huzefa, et al. (2017), "Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community", *Journal of Natural Products*, **80**, pp.756-770.

[3] A.W. Maria Carolina, et al. (2017), "Collagenolytic enzymes produced by fungi: a systematic review", *Brazilian Journal of Microbiology*, **48**, pp.13-24.

[4] Nguyễn Lâm Dũng (1978), *Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học*, **3**, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, tr.25-45.

[5] K. Ando (2002), "Identification of Fungi imperfecti", *NITE*, Japan, pp.38-55.

[6] Nguyễn Kim Giao (2004), *Hiện vi điện tử trong khoa học sự sống*, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội, tr.43-58.

[7] B. Raper & D. Fennell (1965), *The genus Aspergillus*, Baltimo Wiliam & Wilkin, USA, pp.442-490.

[8] Z. Jurjevic, et al. (2012), "Aspergillus section *Versicolores*: nine new species and multilocus DNA sequence based phylogeny", *International Mycological Association Fungus*, **3(1)**, pp.59-79.