

**ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI, KÍCH THƯỚC CỦA MỘT SỐ GIỐNG VI NẤM
PHÂN LẬP TỪ MỘT SỐ LOẠI THỰC PHẨM TẠI THÀNH PHỐ SƠN LA
ĐƯỢC SỬ DỤNG LÀM MẪU VẬT TRONG THỰC HÀNH VI SINH VẬT HỌC TẠI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC TÂY BẮC**

Đặng Xuân Hoàng , Phạm Thị Lan, Vũ Phương Liên, Hoàng Thanh Thương

Trường Đại học Tây Bắc - TBU

Tóm tắt: Trong giảng dạy học phần vi sinh vật học tại Trường Đại học Tây Bắc, hoạt động thực hành, thí nghiệm quan sát tế bào vi nấm là một phần rất quan trọng giúp củng cố được bài học và mức độ hiểu bài của sinh viên. Một trong những nhóm vi sinh vật được sử dụng nhiều trong các bài thực hành là vi nấm. Vi nấm là nhóm vi sinh vật nhân chuẩn có đặc điểm hình thái đa dạng. Đây là một trong những đặc điểm quan trọng trong bước đầu định danh vi nấm. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành phân lập và bảo quản được nấm men và các giống nấm mốc được sử dụng làm mẫu vật trong thực hành học phần vi sinh vật học. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã mô tả đặc điểm khuẩn lạc, đồng thời cũng đã xác định được kích thước tế bào nấm men và nấm mốc được phân lập. Trên môi trường dinh dưỡng thạch, trong điều kiện nuôi cấy ở 30°C, sau 5 ngày tế bào nấm men được phân lập có kích thước là $4,09 \pm 0,07 \mu\text{m} \times 6,01 \pm 0,86 \mu\text{m}$, trong khi đó các giống nấm mốc có đường kính sợi nấm khi sinh trưởng trên môi trường thạch Czapek Dox dao động từ $3,02 \pm 0,08 \mu\text{m}$ đến $15,03 \pm 0,25 \mu\text{m}$.

Từ khóa: Phân lập vi nấm, Nấm mốc, Nấm men, Thực hành vi sinh vật học.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong học phần vi sinh vật học, công tác thực hành thí nghiệm có vai trò rất quan trọng trong việc giúp sinh viên nắm bắt được kiến thức và trau dồi thêm được các kỹ năng liên quan.

Có 2 nhóm vi sinh vật thường được sử dụng trong các bài thực hành là: vi khuẩn và vi nấm. Thông thường, các nhóm vi sinh vật được chuẩn bị trong các bài thực hành không phải là giống thuần, thường bị tạp nhiễm, đặc biệt là vi nấm. Do đó thường gây khó khăn cho sinh viên trong

việc quan sát được chính xác hình dạng tế bào vi sinh vật.

Nấm mốc (hay nấm sợi) và nấm men (yeast) là nhóm vi sinh vật phân bố rộng trong môi trường tự nhiên. Ước tính có khoảng trên 1,5 triệu loài nấm khác nhau [3]. Tế bào nấm mốc có dạng sợi dài, đường kính vào khoảng 5 – 10 μm . Sợi nấm cũng có nhiều kiểu hình dạng khác nhau tùy thuộc vào từng loài. Sự hiện diện của các loài nấm mốc trên bề mặt các loại rau, củ, quả và một số loại thực phẩm khác là nguyên nhân chính dẫn đến thối, hỏng thực phẩm. Theo Huỳnh Ngọc

Thanh Tâm và cộng sự (2021), trên bề mặt các loại bưởi Năm Roi và Da Xanh thường tồn tại các chi nấm mốc như: *Aspergillus brunneoviolaceus*, *A. aculeatus*, *A. carbonarius*, *Neurospora intermedia* [1]. Ngoài các loài nấm kể trên, hiện nay trên một số loại thực phẩm còn có thể bị nhiễm một số giống nấm mốc khác như: *Mucor*, *Penicillium*, *Botrytis*, *Pythium* và *Trichoderma* [5].

Dựa trên một số đặc điểm về kích thước và hình thái có thể định danh sơ bộ các giống nấm mốc phân lập được từ môi trường tự nhiên [4]. Phương pháp nghiên cứu dựa trên đặc điểm hình thái của sợi nấm là một trong những phương pháp cổ điển thường được sử dụng trong định danh nấm mốc. Cùng với sự phát triển của kỹ thuật quan sát hiển vi, ngày nay việc định danh nấm mốc dựa trên đặc điểm hình thái đã có độ chính xác cao hơn đặc biệt là khi kết hợp giữa nghiên cứu đặc điểm hình thái và phân tích sinh học phân tử.

Trong phạm vi của nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân lập vi nấm từ môi trường và xác định đặc điểm hình thái, kích thước của chúng nhằm cung cấp các thông tin để xây dựng được bộ mẫu vi nấm phục vụ công tác giảng dạy thực hành học phần Vi sinh vật học.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Môi trường phân lập và nuôi cấy nấm

Môi trường phân lập và nuôi cấy nấm mốc là môi trường thạch Czapek Dox và môi trường thạch PDA được pha chế theo [2, 8].

Môi trường phân lập và nuôi cấy nấm men là môi trường bán tổng hợp có thành phần như sau:

*) Thành phần môi trường lỏng

Cao nấm men	1 g/L
Glucose	10 g/L
NH ₄ NO ₃	1 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g/L
K ₂ HPO ₄	4 g/L
KH ₂ PO ₄	2 g/L
NaCl	1 g/L

pH = 4,2 ± 0,1 ở 25°C.

*) Thành phần môi trường đặc: giống thành phần môi trường lỏng nhưng có bổ sung thêm thạch agar với tỉ lệ 20 g/L.

Nguồn mẫu phân lập vi nấm

Nguồn phân lập nấm men được sử dụng trong nghiên cứu này là bột nở bánh mì chứa tế bào nấm men *Saccharomyces cerevisiae*.

Nguồn phân lập nấm mốc là các loại củ, quả, thực phẩm có dấu hiệu bị nhiễm nấm mốc thu thập tại các địa điểm khác nhau trên địa bàn thành phố Sơn La.

Phương pháp phân lập nấm men

Phương pháp phân lập nấm men được tiến hành theo Mai Thị Hằng [7] và một số điều chỉnh bởi nhóm nghiên cứu để phù hợp với điều kiện phân lập. Phương pháp được tiến hành cụ thể như sau:

Cân 1 g bột nở bánh mì và cấy vào 100 mL môi trường lỏng nuôi cấy nấm men. Ủ lên men trên máy lắc ở điều kiện nhiệt độ phòng trong 48

giờ. Dịch lên men được bảo quản ở nhiệt độ 4°C để làm nguồn phân lập nấm men.

Chuyển 0,2 mL dung dịch lên men sang đĩa petri chứa môi trường thạch nuôi cấy nấm men, sử dụng bàn trang vô trùng trang đều trên bề mặt môi trường. Ủ đĩa petri ở nhiệt độ 30°C trong 48 giờ. Tiến hành phân lập nấm men từ khuẩn lạc riêng rẽ phát triển trên bề mặt môi trường thạch.

Phương pháp phân lập nấm mốc

Phương pháp phân lập nấm mốc cũng được tiến hành theo Mai Thị Hằng [7] và có một số điều chỉnh bởi nhóm nghiên cứu để phù hợp điều kiện phân lập. Phương pháp được tiến hành cụ thể như sau:

Tiến hành cắt các mẫu thực phẩm có dấu hiệu mốc thành những mảnh nhỏ, đặt trực tiếp trên bề mặt môi trường thạch PDA, tiến hành trong điều kiện vô trùng, ủ ở nhiệt độ 30°C. Từ ngày thứ hai đến ngày thứ ba, tiến hành phân lập các khuẩn lạc xuất hiện, quan sát màu và hình thái cơ bản để tách riêng từng nhóm. Cấy chuyển nhiều lần trên môi trường PDA để thu được các dòng nấm mốc thuần chủng. Mỗi khuẩn lạc trong đĩa Petri được xem là một dòng vi nấm và ghi ký hiệu để lưu trữ và sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo. Các giống nấm được lưu giữ trên môi trường đĩa thạch Czapek Dox.

Quan sát đặc điểm hình thái vi nấm

Nấm men được nuôi cấy trên môi trường thạch dinh dưỡng ở nhiệt độ 30°C trong 72 giờ sau đó đem quan sát đặc điểm hình thái khuẩn lạc

và quan sát tế bào dưới kính hiển vi quang học [7].

Thực hiện tương tự đối với nấm mốc nhưng nuôi cấy trên môi trường thạch Czapek Dox.

Thực hiện làm tiêu bản nhuộm xanh methylene tế bào nấm men và nhuộm đỏ Congo tế bào nấm mốc, quan sát và chụp ảnh sử dụng kính hiển vi quang học Olympus BX-51 có gắn máy ảnh với độ phóng đại của kính hiển vi là 200x và 400x.

Phương pháp đo kích thước tế bào nấm men và sợi nấm mốc

Tiến hành chụp ảnh trắc vi vật kính trên kính hiển vi quang học BX-51 với độ phóng đại lần lượt là 200x và 400x. Sử dụng phần mềm ImageJ tiến hành xác định khoảng cách giữa hai vạch trên trắc vi vật kính tương ứng với số điểm ảnh (pixel) [9]. Dựa vào giá trị điểm ảnh cho một đơn vị khoảng cách (μm) để tiến hành xác định kích thước của tế bào vi nấm.

Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu kết quả thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel và phần mềm IBM SPSS Statistics 28 với phân tích giá trị trung bình.

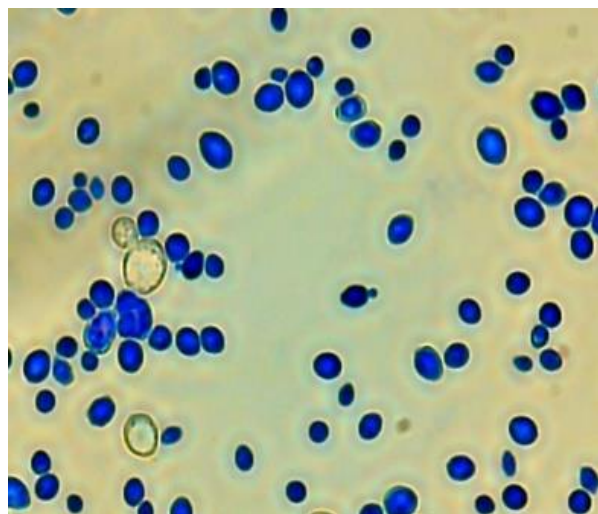
KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Kết quả phân lập nấm men từ bột nở bánh mì

Từ nguồn mẫu bột nở bánh mì đã phân lập được 01 giống nấm men với đặc điểm hình thái khuẩn lạc hình tròn, màu trắng, bề mặt láng khô, kích thước 2 – 3 mm. Các đặc điểm này tương

đồng với loài nấm men *Saccharomyces cerevisiae*.

Tế bào nấm men được phân lập có hình elip, nảy chồi ở một cực. Đặc điểm hình thái tế bào quan sát được dưới kính hiển vi của chủng nấm men phân lập được thể hiện trên Hình 1.



Hình 1. Hình dạng tế bào nấm men *Saccharomyces cerevisiae* phân lập được từ bột nở bánh mì (độ bội giác của kính hiển vi: 400×).

Kết quả phân lập nấm mốc

Từ 07 mẫu củ, quả, thực phẩm có dấu hiệu bị nhiễm nấm chúng tôi đã tiến hành phân lập được một số giống nấm mốc với các đặc điểm hình thái của khuẩn lạc được mô tả chi tiết trong Bảng 1. Đặc điểm hình thái tế bào sợi nấm của một số giống nấm phân lập được thể hiện trên Hình 2.

Kết quả quan sát được từ các khuẩn lạc của nấm mốc trên môi trường thạch Czapek Dox cho thấy rằng các giống nấm thu được từ các nguồn phân lập khác nhau có đặc điểm hình thái khác nhau, một số có khả năng tiết dịch trên bề mặt

khuẩn lạc như các giống phân lập được từ táo mèo, tỏi (giống ký hiệu TMT-1) và bưởi (giống B-1). Các giống nấm mốc phân lập từ các nguồn còn lại không tiết dịch trên bề mặt khuẩn lạc và có màu sắc khác nhau. Theo nghiên cứu của Phan Thị Thanh Diễm và cộng sự [6], từ các mẫu vỏ củ, quả như: cam, chanh, bưởi, quýt, chuối, xoài, táo, khoai tây, cà rốt, các tác giả đã phân lập được 113 chủng nấm mốc có hoạt tính pectinase. Trong số đó, có chủng ký hiệu M45 có đặc điểm hình thái khuẩn lạc tương đồng với chủng nấm mốc từ quả nho trong nghiên cứu này.

Khi quan sát dưới kính hiển vi (Hình 2) có thể thấy rõ các cấu trúc tế bào sợi nấm của một số giống nấm mốc phân lập được như: cấu trúc bào tử, cuống sinh bào tử và sợi nấm. Bào tử của các giống nấm B-1, TMT-1, MC-X có đặc điểm đặc trưng của bào tử đỉnh. Bào tử của giống nấm MBM-Tr có đặc điểm đặc trưng của bào tử chồi. Các giống nấm HT-1 và HT-2 có bào tử dạng bào tử túi. Dựa vào các đặc điểm hình thái như trên có thể kết luận giống nấm TMT-1 phân lập từ táo mèo và tỏi mốc có nhiều đặc điểm tương đồng với chi *Penicillium* sp. Giống nấm MC-X (phân lập từ cơm mốc) và B-1 (phân lập từ vỏ bưởi) có nhiều đặc điểm tương đồng với chi *Aspergillus* sp. Nấm mốc HT-1 (phân lập từ hành tây) và HT-2 (phân lập từ hành tía) có nhiều đặc điểm tương đồng với chi *Mucor* sp.

Bảng 1. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc của các giống nấm mốc phân lập được từ các mẫu thí nghiệm

STT	Nguồn phân lập	Ký hiệu	Đặc điểm khuẩn lạc
1	Quả nho	N-1	Khuẩn lạc hình tròn, màu trắng, bông xốp, không tiết dịch.
2	Hành tây	HT-1	Khuẩn lạc hình tròn, màu đen, hơi ngà vàng phần trung tâm, không tạo dịch, phần sợi cơ chất có màu trắng. Khuẩn lạc ăn sâu vào cơ chất, nhẵn nhéo.
3	Hành tía	HT-2	Khuẩn lạc hình tròn, màu đen, có phần sợi màu trắng, ăn sâu vào cơ chất, nhẵn nhéo.
4	Bánh mì	MBM-Tr	Khuẩn lạc hình tròn có phần trung tâm màu xanh lục, viền màu trắng, không tạo dịch, không nhẵn.
5	Bánh mì	MBM-V	Khuẩn lạc hình tròn có phần trung tâm màu nâu sáng, xung quanh là sợi trắng, không tạo dịch, khuẩn lạc không ăn sâu vào cơ chất, không nhẵn.
6	Cơm	MC-X	Khuẩn lạc màu trắng, có viền xanh lục bên ngoài, không nhẵn.
7	Táo mèo, Tỏi	TMT-1	Khuẩn lạc màu xanh lục, có tiết dịch, bề mặt cơ chất nhẵn nhéo.
8	Bưởi	B-1	Khuẩn lạc màu vàng, xung quanh có viền màu xanh lục. Có tiết dịch trên bề mặt.



Hình 2. Đặc điểm hình thái tế bào của một số loài nấm mốc phân lập từ môi trường: a) Nấm sợi phân lập từ vỏ bưởi (B-1); b) Nấm mốc phân lập từ hành tây (HT-1); c) Nấm mốc phân lập từ hành tía (HT-2); d-e) Nấm mốc phân lập từ bánh mì (MBM-Tr và MBM-V); f) Nấm mốc phân lập từ cơm mốc (MC-X); g) Nấm mốc phân lập từ táo mèo, tỏi (TMT-1).

Kết quả xác định kích thước của tế bào nấm men và tế bào nấm mốc

Sử dụng phương pháp đo kích thước bằng phần mềm ImageJ đã xác định được kích thước của tế bào nấm men trung bình sau 5 ngày nuôi cấy (với dung lượng mẫu là 119). Vì tế bào nấm men phân lập được có dạng hình elip, nên trong nghiên cứu sử dụng hai giá trị để mô tả kích thước của tế bào nấm men là: độ dài trục lớn và độ dài trục bé. Kết quả đo được về kích thước của tế bào nấm men phân lập được có giá trị tương đồng với kích thước của tế bào nấm men *Saccharomyces cerevisiae* trong nghiên cứu của Maksim Zakhartsev và Matthias Reuss [11], Pierre Tibayrenc và cộng sự [10] (Bảng 2).

Bảng 2. Kích thước tế bào nấm men được phân lập:

STT	Kích thước	Giá trị (μm)	Độ lệch tiêu chuẩn
1	Trục lớn	$6,01 \pm 0,86$	0,93
2	Trục bé	$4,09 \pm 0,07$	0,77

Theo Maksim Zakhartsev và Matthias Reuss [11], kích thước tế bào nấm men *Saccharomyces cerevisiae* khi nuôi cấy trong điều kiện nhiệt độ $18,5^{\circ}\text{C}$ có giá trị là $7,94 \mu\text{m}$. Trong khi đó theo nghiên cứu của Pierre Tibayrenc và cộng sự [10], kích thước tế bào nấm men *S. cerevisiae* có giá trị khoảng $4,4 \mu\text{m}$ (chiều rộng) và $5,1 \mu\text{m}$ (chiều dài). Việc xác định kích thước của tế bào nấm men có vai trò quan trọng trong việc đánh giá ảnh hưởng của điều kiện môi trường tới khả năng sinh trưởng và phát triển của tế bào nấm men.

Kết quả phân tích đường kính của tế bào sợi nấm được thể hiện trong Bảng 3.

Bảng 3. Đường kính của tế bào sợi nấm mốc

STT	Ký hiệu giống nấm	Đường kính sợi nấm (μm)	Độ lệch tiêu chuẩn
1	N-1	$3,02 \pm 0,08$	0,49
2	HT-1	$15,03 \pm 0,25$	1,57
3	HT-2	$14,48 \pm 0,19$	1,19
4	MBM-Tr	$3,54 \pm 0,08$	0,51
5	MBM-V	$12,49 \pm 0,12$	0,76
6	MC-X	$3,57 \pm 0,10$	0,61
7	TMT-1	$4,65 \pm 0,18$	1,15
8	B-1	$4,23 \pm 0,13$	0,82

Qua bảng số liệu trên, có thể thấy được sự khác nhau về đường kính sợi nấm của các giống nấm mốc được phân lập. Giống nấm phân lập được từ hành tây, hành tỏi và bánh mì có đường kính khá lớn, dao động từ $12,49 \pm 0,12$ đến $15,03 \pm 0,25 \mu\text{m}$.

Dựa vào kích thước sợi nấm cũng có thể đánh giá được ảnh hưởng của điều kiện môi trường tới khả năng sinh trưởng và phát triển của nấm mốc từ đó lựa chọn được những điều kiện phù hợp để bảo quản các giống nấm được phân lập trong thời gian dài mà vẫn giữ được khả năng sống sót của chúng.

KẾT LUẬN

Từ các mẫu củ, quả bị nhiễm nấm và men nở bánh mì đã phân lập được 01 giống nấm men có đặc điểm tương đồng với loài *Saccharomyces*

cerevisiae về đặc điểm khuẩn lạc, kích thước và hình dạng tế bào. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành phân lập được các giống nấm mốc trong đó có một số giống nấm mốc có nhiều đặc điểm tương đồng với các chi như *Penicillium*, *Aspergillus* và *Mucor*. Đồng thời, nghiên cứu cũng đã xác định được kích thước tế bào nấm men và nấm mốc được phân lập. Trên môi trường dinh dưỡng thạch, trong điều kiện nuôi cấy ở 30°C, sau 5 ngày tế bào nấm men được phân lập có kích thước là $4,09 \pm 0,07 \mu\text{m} \times 6,01 \pm 0,86 \mu\text{m}$, trong khi đó các giống nấm mốc có đường kính sợi nấm khi sinh trưởng trên môi trường thạch Czapek Dox dao động từ $3,02 \pm 0,08 \mu\text{m}$ đến $15,03 \pm 0,25 \mu\text{m}$. Các giá trị kích thước đo được thể hiện được khả năng sinh trưởng và phát triển tốt của các giống nấm được phân lập trong môi trường dinh dưỡng và có thể nuôi cấy, bảo quản các giống trên trong điều kiện phòng thí nghiệm. Các mẫu giống nấm men và nấm mốc được phân lập có thể được sử dụng làm mẫu vật quan sát trong các bài thực hành Vi sinh vật học tại Trường Đại học Tây Bắc.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin gửi lời cảm ơn tới Trung tâm Thực hành – Thí nghiệm, Trường Đại học Tây Bắc đã tạo điều kiện để hoàn thành nghiên cứu trong khuôn khổ thực hiện nhiệm vụ KH&CN cấp Cơ sở, mã số TB 2021 – 25.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Huỳnh Ngọc Thanh Tâm và các cộng sự, 2021. Phân lập và nhận diện các dòng nấm mốc hiện diện trên vỏ bưởi Da Xanh và bưởi Năm Roi được trồng ở Đồng bằng sông Cửu Long, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. 57(CĐ Công nghệ thực phẩm), tr. 108-117.
2. FDA, 2001. *BAM Media M127: Potato Dextrose Agar*, truy cập ngày 10/3/2022, tại trang web <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-media-m127-potato-dextrose-agar>.
3. Kevin D. Hyde và các cộng sự, 2007. Diversity of saprobic microfungi, *Biodiversity and Conservation*. 16(1), tr. 7-35.
4. I. C. Senanayake và các cộng sự, 2020. Morphological approaches in studying fungi: collection, examination, isolation, sporulation and preservation, *Mycosphere*. 11(1), tr. 2678-2754.
5. L. B. Bullerman, 2003. "SPOILAGE | Fungi in Food – An Overview", trong Benjamin Caballero, chủ biên, *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*, Academic Press, Oxford, tr. 5511-5522.
6. Phan Thị Thanh Diễm và các cộng sự, 2018. Phân lập và sàng lọc một số chủng nấm mốc phức vụ cho nghiên cứu tạo dòng và biểu hiện gen pectinase, *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Khoa học Tự nhiên* 127(1C).
7. Mai Thị Hằng, 2011. *Thực hành Vi sinh vật học*, NXB Đại học sư phạm.
8. Oxoid, 2010. *Dehydrated Culture Media - Czpek Dox Agar (Modified)*, truy cập ngày 04/03/2022,

- tại trang web measurements?, *Journal of biotechnology*. 149, tr. 74-80.
http://www.oxoid.com/uk/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0097.
9. Caroline A. Schneider và các cộng sự, 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis, *Nature Methods*. 9(7), tr. 671-675.
 10. Pierre Tibayrenc và các cộng sự, 2010. Assessing yeast viability from cell size
 11. Maksim Zakhartsev và Matthias Reuss, 2018. Cell size and morphological properties of yeast *Saccharomyces cerevisiae* in relation to growth temperature, *FEMS Yeast Research*. 18(6).

A STUDY ON THE MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS AND SIZE OF MICROFUNGI ISOLATED FROM FOOD IN SON LA CITY USED IN PRACTICAL MICROBIOLOGY TEACHING AT TAY BAC UNIVERSITY

Dang Xuan Hoang*, Pham Thi Lan, Vu Phuong Lien, Hoang Thanh Thuong
Tay Bac University

Abstract: *Laboratory activities and experiments such as observing fungal cells are commonly used in teaching to science students at Tay Bac University. Among microorganisms selected to introduce to students, fungi are the most common. In this study, some fungi organisms were isolated and used as specimens in the course Practical Microbiology taught at Tay Bac University. Specifically, morphological characteristics of some micro fungi and their sizes were described. On nutrient agar, under the condition of 30°C, after five days, fungi size reached $4.09 \pm 0.07 \mu\text{m} \times 6.01 \pm 0.86 \mu\text{m}$, whereas other fungi variety ranged from $3.02 \pm 0.08 \mu\text{m}$ to $15.03 \pm 0.25 \mu\text{m}$ when growing on Czapek Dox agar.*

Keywords: *morphological, fungi, practical Microbiology.*

Ngày nhận bài: 12/05/2022. Ngày nhận đăng: 29/06/2022.

Liên lạc Đặng Xuân Hoàng, e mail: dangxuanhoang@utb.edu.vn