

VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

NGUYỄN VĂN BẮC

**NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP, PHÂN LOẠI, BẢO QUẢN
MỘT SỐ CHỦNG NẤM SỢI CÓ HOẠT TÍNH GELATINAZA
VÀ XENLULAZA GẶP TRONG MÔI TRƯỜNG ĐẤT
KHU VỰC VƯỜN BÁCH THẢO - HÀ NỘI**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Chuyên ngành: Vi sinh vật học

Mã số: 60 42 40

Người hướng dẫn : TS. Lại Văn Hòa

Hà Nội - 2012

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi dưới sự hướng dẫn của TS. Lại Văn Hòa. Các số liệu và kết quả được trình bày trong luận văn này là trung thực có nguồn gốc rõ ràng.

Tác giả luận văn

Nguyễn Văn Bắc

MỤC LỤC

ẶT VẤN ĐỀ.....	1
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Vị trí của nấm trong sinh giới.....	3
1.2. Tính đa dạng của vi nấm.....	4
1.3. Vi nấm trong đất.....	5
1.4. Vai trò của vi nấm trong công nghiệp	7
1.5. Đặc tính đặc trưng của vi nấm.....	8
1.6. Hệ thống phân loại vi nấm.....	9
1.6.1. Hệ thống phân loại của Robert Shaffer (1969).....	9
1.6.2. Hệ thống của Ainsworth & Bisby (1995).....	10
1.7. Những vấn đề chung về cơ chế sinh hoá và sự phá huỷ sinh học do vi nấm gây nên.....	12
1.7.1. Đặc điểm phá huỷ sinh học do vi nấm	12
1.7.2. Các chất trao đổi chuyển hoá xâm thực của sợi nấm - các loại enzym và các axít hữu cơ	13
1.8. Các phương pháp bảo quản vi nấm.....	16
1.8.1. Nhóm phương pháp tiếp tục duy trì sự phát triển	19
1.8.2. Nhóm phương pháp làm khô	20
1.8.3. Nhóm phương pháp làm đình chỉ trao đổi chất	22
1.9. Lựa chọn các phương pháp bảo quản	25
1.10. Những nghiên cứu về phân loại và bảo quản vi nấm ở Việt Nam....	26
CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	28
2.1. Đối tượng nghiên cứu	28
2.2. Vật liệu nghiên cứu.....	28
2.2.1. Dụng cụ, thiết bị	28
2.2.2. Môi trường nuôi cấy	29
2.2.3. Hoá chất và các cơ chất sinh học.....	29
2.3. Phương pháp và kỹ thuật nghiên cứu.....	30
2.3.1. Phương pháp lấy mẫu	30
2.3.2. Phương pháp phân lập.....	30
2.3.3. Phương pháp phân loại vi nấm	30

2.3.4. Phương pháp nghiên cứu một số đặc điểm sinh học của vi nấm	33
2.3.5. Phương pháp bảo quản các chủng nấm sợi.....	34
2.3.6. Phương pháp phục hồi	35
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.....	36
3.1. Kết quả phân lập và phân loại các chủng vi nấm từ môi trường đất khu vực vườn Bách Thảo	36
3.1.1. Thành phần chủng loại vi nấm trong đất vườn Bách Thảo.....	36
3.1.2. Đặc điểm phân loại hình thái của các chi vi nấm phân lập được	40
3.2. Lựa chọn các chủng nấm sợi có hoạt tính enzym phân hủy cơ chất gelatin và xenluloza phân lập từ môi trường khu vực vườn Bách Thảo đưa vào bảo quản.....	57
3.3. Kết quả phục hồi của các chủng nấm sợi có hoạt tính enzym phân lập từ môi trường đất khu vực vườn Bách Thảo – Hà Nội sau khi bảo quản trong glyxerin 10%, -200C và trên silicagel.....	59
3.4. Khả năng sinh enzym phân hủy cơ chất sinh học của các chủng nấm sợi phân lập được từ môi trường đất vườn Bách Thảo sau bảo quản 18 tháng.....	66
CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN	73
4.1. Phân lập, phân loại các chủng vi nấm từ môi trường đất khu vực vườn Bách Thảo	73
4.2. Lựa chọn các chủng vi nấm có hoạt tính enzym phân hủy 2 cơ chất sinh học (xenluloza, gelatin) để đưa vào bảo quản.....	75
4.3. Bảo quản các chủng vi nấm có hoạt tính enzym đã được chọn bằng hai phương pháp: lạnh sâu (glyxerin 10% ở -200C) và trên silicagel.	76
4.4. Khả năng sinh enzym phân hủy các cơ chất sinh học của các chủng nấm sợi phục hồi sau bảo quản.....	77
CHƯƠNG 5: KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	79
TÀI LIỆU THAM KHẢO	81

CÁC CHỮ VIẾT TẮT

ATCC	American Type Culture Colletion
CCRC	Culture Collection Research Center
IMI	International Mycological Institute
LS	Lạnh sâu
SLC	Silicagel
TBQ	Trước bảo quản
SBQG	Sau bảo quản glyxerin
SBQS	Sau bảo quản Silicagel
DMSO	Dimethyl sulfoxide

ĐẶT VẤN ĐỀ

Nấm (Fungi) là một giới sinh vật phổ biến trong tự nhiên. Chúng có thể sinh trưởng và phát triển ở khắp mọi nơi, trên mọi loại cơ chất với tốc độ phát triển nhanh, mạnh. Đa phần các nấm đều không thể nhìn thấy được bằng mắt thường, chúng sống phần lớn ở trong đất, chất mùn, xác sinh vật chết, cộng sinh hoặc kí sinh trên cơ thể động thực vật và nấm khác. Một số loài nấm có thể nhận thấy được khi ở dạng thể quả, như nấm lớn và nấm mốc.

Người ta ước tính giới nấm có khoảng 1,5 triệu loài, khoảng 70.000 loài nấm đã được các nhà phân loại học phát hiện và miêu tả, tuy nhiên tính đa dạng của giới Nấm vẫn còn là điều bí ẩn [29]. Các loài nấm hoại sinh đóng vai trò quan trọng trong chu trình tuần hoàn vật chất và năng lượng trong tự nhiên. Nấm có thể phân giải các chất hữu cơ phức tạp thành các chất đơn giản, đặc biệt là các chất khó phân giải như xenluloza, lignin thành chất vô cơ. Do đó, nó là yếu tố quan trọng làm tăng độ phì nhiêu của đất. Nấm có ý nghĩa rất quan trọng trong đời sống của con người, chúng có vai trò thực tiễn trong kinh tế, khoa học và các chu trình vật chất, năng lượng trong tự nhiên [30]. Nhiều loài nấm được sử dụng trong công nghệ thực phẩm, sử dụng làm thức ăn hoặc các sản phẩm của quá trình lên men... Tuy nhiên, bên cạnh những lợi ích to lớn đó, nhiều loại nấm lại gây bệnh cho người, động thực vật [32]. Đã có nhiều công trình nghiên cứu về khu hệ vi nấm trong môi trường không khí tự nhiên, trên các sản phẩm công-nông nghiệp khác nhau, trong dược phẩm, trong đất,... nhưng với số lượng chưa nhiều.

Ở nước ta, khí hậu nhiệt đới ẩm rất thích hợp cho sự phát triển của nhiều loại vi nấm, chúng phong phú cả về số lượng và thành phần chủng loại. Để góp phần khảo sát sự đa dạng về thành phần chủng loại, đặc tính sinh học và tìm kiếm các chủng vi nấm mới chưa được phát hiện ở Việt Nam nói chung và ở môi trường đất nói riêng, trong luận văn này chúng tôi tiến hành “ ***Nghiên cứu phân lập, phân loại, bảo quản một số chủng nấm sợi có hoạt tính gelatinaza và xenlulaza gặp trong môi trường đất khu vực Vườn Bách thảo-Hà Nội***”.

Mục tiêu của chúng tôi đưa ra là:

1. Phân lập, phân loại một số chủng nấm sợi có hoạt tính gelatinaza và xenlulaza gặp trong môi trường đất khu vực Vườn Bách thảo-Hà Nội
2. Bảo quản các chủng vi nấm đã phân lập được bằng một số phương pháp bảo quản hiện nay
3. Góp phần xây dựng bộ sưu tập các chủng nấm sợi có hoạt tính enzym phục vụ cho các nghiên cứu và vào bộ sưu tập giống của Bảo tàng giống chuẩn Việt Nam.

NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

1. Phân lập các chủng nấm sợi từ môi trường đất khu vực vườn Bách Thảo
2. Phân loại xác định đến chi, loài các chủng nấm sợi đã phân lập được.
3. Xác định hoạt tính enzym phân huỷ một số cơ chất sinh học như gelatin, xenluloza của các chủng nấm sợi đã phân lập và phân loại.
4. Bảo quản các loài nấm sợi có hoạt tính enzym cao bằng phương pháp silicagel và bảo quản trong glyxerin 10% ở nhiệt độ -20°C .
5. Phục hồi các chủng vi nấm đã bảo quản sau 18 tháng, kiểm tra độ thuần khiết, độ sống sót, độ ổn định về hình thái và khả năng sinh enzym phân huỷ cơ chất sinh học của chúng.
6. Xây dựng bộ sưu tập các chủng nấm sợi có hoạt tính enzym phục vụ cho các nghiên cứu và góp phần vào bộ sưu tập giống của Bảo tàng giống chuẩn Việt Nam.

Chương 1

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. VỊ TRÍ CỦA NẤM TRONG SINH GIỚI

Trước đây, nấm được xếp vào một ngành (*Mycota*) của dưới giới thực vật bậc thấp. Hiện nay nấm không còn được xem là một ngành của dưới giới thực vật bậc thấp, mà nấm là một giới riêng biệt trong thế giới sinh vật. Theo Takhtajan (1973): “Không có cơ sở nào đáng kể để xếp nấm vào thực vật”. Vì nấm có hàng loạt các đặc điểm riêng biệt sau đây:

- Dinh dưỡng: Nấm không dinh dưỡng theo kiểu quang hợp như thực vật hoặc bằng kiểu nuốt thức ăn như động vật. Nấm dị dưỡng bằng cách hấp thụ hay thẩm thấu. Nấm hấp phụ các chất dinh dưỡng bằng cách tiết ra ngoài môi trường các enzym để phân giải các chất có cấu trúc phức tạp thành những chất có cấu trúc đơn giản sau đó hấp phụ qua màng.

- Cấu trúc tế bào: Các nấm thật (*Eumycota*) có thành phần hoá học của vách tế bào là kitin (thực vật có vách tế bào là xenluloza).

- Sinh hoá: Chất dự trữ của nấm là glycogen giống như ở động vật còn ở thực vật có chất dự trữ là tinh bột. Ngoài ra, nấm còn hình thành các sản phẩm giống với động vật như các axit amin.

- Phương thức sống: Nấm dị dưỡng bằng cách hấp thụ, động vật dị dưỡng bằng cách nuốt thức ăn, thực vật dị dưỡng bằng cách quang hợp.

- Cá thể phát sinh: Trong quá trình phát triển cá thể các nấm tiến hoá cao thì có giai đoạn song hạch (ở nấm túi và nấm đảm), giai đoạn song hạch không có ở các sinh vật khác.

- Cơ thể dinh dưỡng: Sợi phân nhánh tạo thành hệ sợi nấm, nhưng ở thực vật có cơ thể dinh dưỡng dạng cây có rễ, thân, lá.

- Sinh sản: Nấm sinh sản và phát tán bằng bào tử.

Nhờ những thành tựu nghiên cứu về cấu trúc nhân, màng tế bào, ty thể, cấu trúc phân tử ARN riboxom; thành phần sinh hoá; phương thức dinh dưỡng... thì ranh giới giữa động vật và thực vật bị mờ đi, mà rõ nét là ranh giới giữa sinh vật không nhân và sinh vật có nhân.

Hiện nay, có nhiều quan điểm khác nhau về việc xếp các ngành nấm vào các giới sinh vật. Theo hệ thống 5 giới của Whittaker (1978) thì các ngành nấm được xếp vào 2 giới khác nhau: Các ngành nấm nhầy tế bào (*Acrasiomycota*), nấm nhầy thật (*Myxomycota*), nấm trứng (*Oomycota*) và nấm cổ (*Chytridiomycota*) được xếp vào giới *Protoctista*; các ngành nấm tiếp hợp (*Zygomycota*), nấm túi (*Ascomycota*), nấm đảm (*Basidiomycota*), nấm bất toàn (*Deuteromycota*) và địa y (*Lichenomycota*) được xếp vào giới nấm. Theo Whittaker giới nấm chỉ gồm 2 ngành nấm tiếp hợp (*Zygomycota*) và ngành nấm thật (*Eumycota*), trong đó ngành nấm thật bao gồm 4 phân ngành: nấm túi (*Ascomycotina*), nấm đảm (*Basidiomycotina*), nấm bất toàn (*Deuteromycotina*) và địa y (*Lichenes*).

Ngoài ra còn có một số hệ thống khác như hệ thống 6 giới của Lucile Mc Cook (năm 2004), hệ thống 7 giới của Bryce Kendrick (2001).

1.2. TÍNH ĐA DẠNG CỦA VI NẤM

Vi nấm có khả năng phát triển ở hầu hết các dạng sinh thái, có thể sử dụng hầu hết các sản phẩm tự nhiên và các sản phẩm do con người làm ra. Chúng là sinh vật đầu tiên và lý tưởng sinh trưởng ở vùng hoang dã, vì chúng có khả năng thay đổi để thích nghi với điều kiện sống. Ví dụ, các loài của chi *Aureobasidium* có thể sinh trưởng ở nơi nhiệt độ thấp (vùng Antarctica) trên các hòn đá ở nhiệt độ từ -10° đến -20° , có thể chống chịu ở nhiệt độ thấp từ -70°C đến -80°C . Nhưng chi này cũng có những loài có thể sinh trưởng ở vùng nhiệt đới. Phần lớn các vi nấm là hiếu khí và sinh trưởng ở môi trường có hoạt độ nước cao. Nhưng người ta đã phát hiện được vi nấm kỵ khí ở dạ cỏ của cừu (Yarlett và CS, 1986) và cũng đã phát hiện được nhiều loài sinh trưởng được ở

các cơ chất có hoạt độ nước thấp ($a_w < 1$). Một nhóm loài nấm mốc đặc trưng, đáng chú ý là nhóm loài nấm mốc ưa khô, gồm các loài có khả năng tăng trưởng trên sản phẩm có hoạt độ nước thấp, chúng phát triển được trong các điều kiện môi trường khô lạnh, trên các sản phẩm sấy khô, cô đặc hoặc ướp muối, ướp đường. Nhóm loài nấm mốc đặc trưng này gồm một số loài thuộc các chi Nấm bất toàn (*Deuteromycotina*, *Fungi imperfecti*) như *Aspergillus*, *Chrysosporium*, *Cladosporium*,... và Nấm túi như *Eurotium*, *Eremascus*,... Các loài *A. Restrictus*, *E. Rubrum*, *E. Amstelodami*, *Wallemia sebi*,... gặp được ở các phòng bảo quản có nhiệt độ $16 \pm 1^{\circ}\text{C}$ và độ ẩm tương đối của không khí $70 \pm 2\%$ [1]. Năm 1991, Viện nấm quốc tế (IMI) đã đưa ra danh sách các vật chủ và cơ chất có thể phân lập nấm. Chúng ta có thể phân lập nấm sống ký sinh, cộng sinh hoặc gây bệnh cho tảo, rêu, thực vật và các loài nấm khác (bao gồm cả địa y), động vật chân đốt, các động vật không xương sống và có xương sống. Không khí, đất, nước, phân, thức ăn, các sản phẩm thực vật, dầu khí và một số dược phẩm cũng là nguồn phân lập được vi nấm.

1.3. VI NẤM TRONG ĐẤT

Vi nấm là thành phần nhiều nhất trong sinh khối của hệ vi sinh vật trong đất, mặc dù số lượng của chúng trong các đĩa môi trường pha loãng khi phân lập thấp hơn vi khuẩn. Nấm có ý nghĩa rất quan trọng trong đời sống của con người, chúng có vai trò thực tiễn trong nền kinh tế, khoa học và các chu trình vật chất, năng lượng trong tự nhiên. Vi nấm là vi sinh vật gây mục nát chính trong đất, đặc biệt là đất rừng, chúng phân giải các chất hữu cơ, các cành lá khô của thực vật thành chất mùn, chất khoáng. Nó tham gia phân huỷ xenluloza, kitin và licnin trong lớp đất bề mặt, do đó là yếu tố quan trọng làm tăng độ phì nhiêu của đất. Nấm đất bao gồm các loài thuộc lớp: *Zygomycetes*, *Ascomycetes*, *Deutermycetes*, *Basidiomycetes* và một vài loài thuộc họ *Pythiaceae* của lớp *Oomycetes*. Hầu hết chúng sống hoại sinh, một số sống ký