

## XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP PHÂN LẬP, ĐỊNH DANH NẤM *ASPERGILLUS FLAVUS* VÀ *ASPERGILLUS PARASITICUS* TỪ LẠC

Đến tòa soạn 28-3-2017

Nguyễn Thành Trung, Phạm Như Trọng,

Lê Thị Hồng Hảo, Lê Thị Phương Thảo

Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia

### SUMMARY

#### DEVELOPMENT OF A METHOD FOR ISOLATION AND SEQUENCING OF *ASPERGILLUS FLAVUS* AND *ASPERGILLUS* *PARASITICUS* FROM GROUNDNUT

*Aflatoxins is mycotoxin commonly contaminating in agricultural commodities, especially in maize and groundnut. Aflatoxins can cause liver cancer, cell carcinoma, reduce immune system and increase stunting in child. Aflatoxins are toxic metabolites primarily produced by molds, mainly: Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus. Those species of fungi are similar in morphology causing difficulties in defining and classifying. This study combined two techniques including isolation based on morphology and sequence ITS region. Whole 30 strains identified from peanut by morphology technique, including two groups Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus. From 30 obtained strains we conducted sequence based on Sanger technique and practised scanning electron microscopy to confirmed 03 strains of Aspergillus flavus and 01 strain of Aspergillus parasiticus.*

#### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nấm mốc là nguyên nhân hàng đầu gây nên sự giảm chất lượng và phá hủy nông sản sau thu hoạch, hơn thế nữa nhiều chủng nấm còn sinh độc tố nấm (mycotoxin) nhiễm vào thực phẩm ảnh hưởng nghiêm trọng tới sức khỏe con người khi không may ăn phải, phổ biến nhất là chi *Aspergillus* (*A. flavus*; *A. parasiticus*;...) có khả năng sinh độc tố aflatoxin, các chủng nấm thuộc chi này

có phổ sinh trưởng rất rộng vì vậy có khả năng lây nhiễm trên nhiều loại nông sản như ngô, lạc, bông, đậu tương. Các loại hạt có dầu (đặc biệt như lạc) rất thích hợp cho sự phát triển của nấm *Aspergillus* cũng như sự hình thành độc tố aflatoxin, đây là một loại độc tố không bị phân hủy trong điều kiện đun nấu thông thường, có khả năng gây ung thư đối với người sử dụng lâu dài [1].

Bên cạnh các chủng sinh độc tố còn một số chủng nấm thuộc chi này như *Aspergillus ogyzae* là chủng nấm có lợi, được sử dụng phổ biến trong lên men nước tương, một món ăn chuyên thống có giá trị dinh dưỡng của Việt Nam và nhiều nước Châu Á. Do đó việc phân biệt các chủng nấm trong chi này có ý nghĩa cả về mặt khoa học lẫn dịch tễ học [5].

Do sự giống nhau về hình thái học, nên việc phân biệt và định danh đến loài của chi *Aspergillus* là rất khó khăn, hiện nay chưa có tiêu chuẩn Việt Nam chính thức thông cho việc định danh *A. flavus* và *A. parasiticus*, do đó xây dựng phương pháp định danh hai chủng nấm *A. flavus* và *A. parasiticus* dựa vào sự kết hợp của hình thái học để sàng lọc và định danh đến loài bằng kỹ thuật giải trình tự đoạn ITS là rất cần thiết.

## 2. THỰC NGHIỆM

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

Mẫu lạc nhân được thu thập từ các chợ thuộc 3 địa điểm của Hà Nội gồm: 30 mẫu Thị trấn Trâu Quỳ, Gia Lâm; 30 mẫu, Phố Huế, Hai Bà Trưng; 30 mẫu, Phạm Đình Hổ, Hai Bà Trưng.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp phân lập nấm mốc dựa trên TCVN 8275-2: 2010 [2] gồm các bước: cấy mẫu và làm thuần.

- Phương pháp định danh nấm mốc dựa vào hình thái và cấu tạo vi thể dựa theo 52 TCN - TQTP 0009 : 2004 và [3] và 52 TCN - TQTP 0001: 2003[3], dựa vào hai đặc điểm chính là đặc điểm về khuẩn lạc và đặc điểm về cấu trúc hiển vi

- Phương pháp định danh nấm mốc dựa vào trình tự đoạn ITS bao gồm các bước: khuếch đại đoạn ITS bằng phản ứng PCR, giải trình tự và xử lý số liệu bằng phần mềm FinchTV, định danh bằng công cụ BLAST tại ncbi.nlm.nih.gov (The National Center for Biotechnology Information) [3]

- Phương pháp định danh dựa trên hình ảnh hiển vi quét của bào tử

### 2.3. Hóa chất thuốc thử

Chủng chuẩn nấm : *Aspergillus flavus* ATCC 204304 được cung cấp từ Thư viện chủng quốc gia Mỹ.

## 3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

### 3.1. Kết quả phân lập nấm mốc *A. flavus* và *A. parasiticus* dựa trên hình thái học

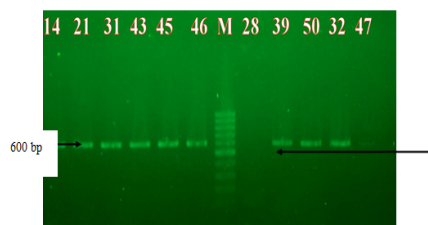
Mẫu lạc được đồng nhất và nuôi cấy trên môi trường thạch Sabouraud. Khuẩn lạc nấm được quan sát hình thể: màu sắc, sự thay đổi màu qua thời gian nuôi cấy, đường kính khuẩn lạc và quan sát các đặc điểm vi thể: hình dạng bông, cách sắp xếp, hình dạng bào tử, cuống bào tử.

Kết quả thu được là: 18 khuẩn lạc là *Aspergillus flavus* và 12 khuẩn lạc là *Aspergillus parasiticus*.

### 3.2. Kết quả khuếch đại đoạn ITS, giải trình tự và định danh

#### 3.2.1 Kết quả khuếch đại đoạn ITS

Các khuẩn lạc ở trên được nuôi lắc trên môi trường lỏng Yeast Extract-Peptone-Dextrose ở 25°C trong 16h, huyền phù thu được tách chiết ADN và tinh sạch sản phẩm. Chạy phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu đoạn trình tự ITS. Sản phẩm PCR được chạy điện di trên gel agarose 1,2% thu được kết quả.



Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR đoạn ITS các chủng nấm phân lập  
Giếng M: thang chuẩn 100bp-1000bp; Giếng 14, 21, 31, 43, 46, 39, 50, 32 cho kết quả đoạn có độ dài khoảng 600bp; giếng 28 và 47 không có sản phẩm PCR

Các sản phẩm PCR có độ dài trùng với độ dài lý thuyết của đoạn trình tự ITS phù hợp cho phản ứng giải trình tự Sanger.

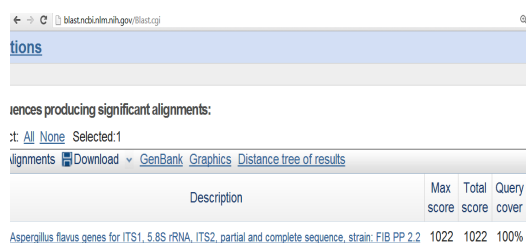
### 3.2.2. Kết quả giải trình tự và định danh

Sản phẩm PCR được tinh sạch và gửi đi giải trình tự tại Hàn Quốc thu được kết quả.

**Bảng 1. Trình tự đoạn ITS một chủng**

|     |            |            |            |            |
|-----|------------|------------|------------|------------|
| 1   | AANNANNCTT | TCAGTCTATG | CAGCGTCGTG | CGAGCGCGTT |
| 41  | CCTCGGTCCA | GGCTGGCCGC | ATTGCACTCC | CGGCTATAAG |
| 81  | GTGCCCGGGA | GGGCACTACA | TTCGGGAGC  | CTTTGACCGG |
| 121 | CGGCCAAAC  | CGACGCTGGC | CGGCCCCAG  | GGAAGTACAC |
| 161 | CGGCACGAAT | GCCGGCTGAA | CCCTGGAGGC | GAGTCTGGTC |
| 201 | GCAAGCGCTT | CCCTTTCAAC | AATTTACAGT | GCTTTTAAAC |
| 241 | TCTCTTTTCA | AAAGTCTTTT | CATCTTTTCA | TCACCTACT  |
| 281 | TGTGCGCTAT | CGGTCTCCGG | CCAGTATTTA | GCTTTAGATG |
| 321 | AAATTTACCA | CCCATTAGTA | GCTGCATTCC | CAACCACTC  |
| 361 | GACTCGTCGA | AGGAGCTTCA | CACGGGCGCG | GACACCCCAT |
| 401 | CCCAGACGGG | ATTCTCACCC | TCTCTGACGG | CCCGTTCCAG |
| 441 | GGCACTTAGA | CAGGGGCGCG | ACCCGAAGCA | TCCTCTGCAA |
| 481 | ATTACAATGC | GGACCCCGAA | GGAGCCAGCT | TTCAAATTG  |
| 521 | AGCTCTTGCC | GCTTCACTCG | CCGTACTGTA | GGCAATCCCG |
| 561 | GTTGGTTTCT | TTTCTCCGCG | TTATTGATAT | GCAAAA     |

Sau khi thu được trình tự ADN đoạn ITS sử dụng công cụ BLAST và thu được kết quả như trong hình 2

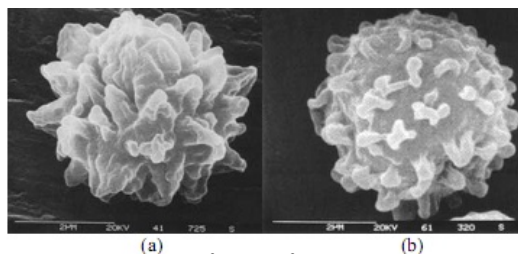


**Hình 2. Kết quả so sánh dựa vào đoạn ITS của chủng phân lập**

Kết quả thu được 3 chủng là *A. flavus* và 01 chủng là *A. parasiticus*.

### 3.2.3. Khảo định dựa vào kỹ thuật chụp ảnh hiển vi điện tử quét bào tử

Lấy các chủng đã được xác định ở trên nuôi cấy trên môi trường thạch Malt và chụp ảnh hiển vi điện tử quét tại Viện Dịch tễ trung ương thu được kết quả.



**Hình 3. Ảnh hiển vi điện tử quét *A. parasiticus* (a) và *A. flavus* (b) và a theo Rodrigues [5]**



**Hình 4. Ảnh hiển vi điện tử quét bào tử của chủng phân lập**

Kết quả hiển vi điện tử quét cho thấy kết quả định danh dựa vào hình thái học và giải trình tự chính xác.

### 3.3. Bàn luận

Việc định danh nấm là khó khăn đòi hỏi nhiều kinh nghiệm về hình thái học cũng như cần áp dụng những kỹ thuật hiện đại khác. Một số chủng có những đặc trưng hình thái học khuẩn lạc là *Aspergillus parasiticus*, tuy nhiên tiến hành định danh thì khuẩn lạc là *Aspergillus flavus*.

Về mặt hình thái các chủng nấm có thể thay đổi theo điều kiện môi trường sinh trưởng, đặc biệt các loài thuộc chi *Aspergillus* thường có đặc điểm hình thái dưới kính hiển vi quang học là khó phân biệt với nhau, trong trường hợp khó phân biệt cần kết hợp với các kỹ thuật khác trong đó có kỹ thuật chụp ảnh hiển vi điện tử quét bào tử, vì hình dạng bào tử ít thay đổi theo điều kiện môi trường.

#### 4. KẾT LUẬN

Phương pháp định danh nấm mốc *Aspergillus flavus* và *Aspergillus parasiticus* cần được tiến hành theo 2 bước: Phân lập và sàng lọc dựa trên hình thái và giải trình tự đoạn ITS. Nghiên cứu đã phân lập được các chủng *Aspergillus flavus* và *Aspergillus parasiticus* sinh độc tố trên lạc tại Việt Nam.

Kiến nghị cần phát triển phương pháp định danh đối với các chủng nấm khác thuộc chi *Aspergillus* để có thể định danh nhanh và chính xác. Phương pháp định danh nấm mốc phải kết hợp cả hình thái học cũng như các đặc điểm về trình tự ADN, hình dạng bào tử, sợi nấm, vách ngăn để có được kết quả chính xác.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Hồng Miên (1980) *Nấm mốc độc trong thực phẩm*, Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật Hà Nội.

2. TCVN 8275-2 (2010) *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi - Phương pháp định lượng nấm men nấm mốc - Phần 2: Kỹ thuật đếm khuẩn lạc trong các sản phẩm có hoạt độ nước nhỏ hơn hoặc bằng 0.95*.

3. TCN - TQTP 0009 (2004) *Thường quy kỹ thuật định danh nấm mốc Aspergillus Parasiticus*

4. 52 TCN - TQTP 0001 (2003) *Thường quy kỹ thuật định danh nấm mốc Aspergillus Flavus*

5. Rodrigues P., Soares C., Kozakiewicz Z., Paterson R.R.M., Lima N. & Venancio N. (2007) *Identification and characterization of Aspergillus flavus and aflatoxins*, Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology.

---

#### TÁCH LOẠI Pb(II), Zn(II), Cu(II) TRONG NƯỚC .....(tiếp theo tr. 136)

4. M. U. Khobragade and A. Pal (2016), *Fixed – bed column study on removal of Mn(II), Ni(II) and Cu(II) from aqueous solution by surfactant bilayer supported alumina*, Separation Science and Technology (Philadelphia), Vol. 51, No. 8, pp. 1287 – 1298.

5. M. MacHida, B. Fotoohi, Y. Amamo and L. Mercier (2012), *Cadmium(II) and lead(II) adsorption onto hetero – atom functional mesoporous Silica and*

*activated carbon*, Applied Surface Science, Vol. 258, No. 19, pp. 7389 – 7394.

6. M. K. Sahu, S. Mandal, S. S. Dash, P. Badhai and R. K. Patel (2013), *Removal of Pb(II) from aqueous solution by acid activated red mud*, Journal of Environmental Chemical Engineering, Vol. 1, No. 4, pp. 1315 – 1324.