

PHÂN LẬP VÀ ĐỊNH DANH SƠ BỘ MỘT SỐ LOÀI ASPERGILLUS TRÊN HẠT ĐẬU PHỘNG Ở CHỢ XUÂN KHÁNH-TP CẦN THƠ

Nguyễn Thu Mai, Nguyễn Bảo Lộc và Lâm Thị Việt Hà¹

ABSTRACT

Peanut which is one kind of cereals has highly nutritional value. It is nowadays considered as an important export item in Vietnam with a significant foreign currency income. However Vietnam, a tropical country, has advantages in environmental conditions for mold development. In the case of peanut, Aspergillus is not only used to penetrate and to spoil the peanuts but also release toxic which causes cancer disease. The presence of Aspergillus on the peanuts depends upon geographical location and kind of appropriate food. The experiment was conducted to isolate and to name some Aspergillus species in the peanuts at Xuan Khanh market – Can Tho city.

The research has found 4 Aspergillus species, namely, A. niger, A. oryzae, A. flavus, A. ficuum.

Keywords: Peanut, Aspergillus, isolating and naming mold

Title: Isolating and naming some of Aspergillus species in peanuts at Xuan Khanh market – Can Tho city

TÓM TẮT

Đậu phộng là một trong những loại hạt có giá trị dinh dưỡng cao và nó là mặt hàng xuất khẩu quan trọng ở nước ta, đem lại nguồn thu ngoại tệ khá lớn. Tuy nhiên do nước ta có điều kiện khí hậu nhiệt đới nóng ẩm nên rất thuận lợi cho các loài nấm mốc phát triển và gây hại. Đặc biệt trên đậu phộng thường có loài Aspergillus xâm nhập và gây hư hỏng, chẳng những thế chúng còn tiết ra độc tố gây ung thư cho người khi ăn phải. Sự có mặt của các loài này phụ thuộc vào vùng địa lý cũng như loại thực phẩm thích hợp cho sự sinh trưởng của chúng. Phân nghiên cứu này được tiến hành với mục đích “Phân lập và định danh một số Aspergillus trên hạt đậu phộng ở chợ Xuân Khánh - thành phố Cần Thơ”.

Sau khi phân lập và tiến hành định danh, bốn loài Aspergillus được nhận diện: Aspergillus flavus, Aspergillus oryzae, Aspergillus niger, Aspergillus ficuum.

Từ khóa: Hạt đậu phộng, Aspergillus, phân lập - định danh nấm mốc

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Hạt đậu phộng có giá trị dinh dưỡng cao, chứa nhiều protein và lipid với hàm lượng khá cao, nó cũng là nguồn cung cấp vitamin E, K, B rất quan trọng và cả nguồn thiamine và niacine là những vitamin có rất ít trong các loại ngũ cốc khác.

Tuy nhiên, ở nước ta do điều kiện khí hậu nhiệt đới nóng ẩm cộng với điều kiện bảo quản không đảm bảo nên hạt đậu phộng rất dễ bị nấm mốc tấn công, gây hư

¹ Khoa Nông nghiệp & Sinh học Ứng dụng

hông và không thể sử dụng được nữa. Phần lớn nấm mốc trên đậu phộng thuộc giống *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* và trong số chúng lại sản sinh ra độc tố.

Sự hiện diện của nấm mốc nhất là *Aspergillus* sản sinh độc tố gây ra những vụ ngộ độc, gây chết người và gia súc,... Đặc biệt, chúng còn dẫn đến gây ung thư gan.

Việc biết được sự có mặt của các loài *Aspergillus* trong đậu phộng có ý nghĩa rất quan trọng, để từ đó có hướng ứng dụng thực tế (vài loài được sử dụng để sản xuất enzyme, sản phẩm lên men,...), biết được sự phân bố của giống đa dạng, đồng thời phòng chống sự xâm nhập của chúng vào hạt đậu phộng nói riêng và các loại thực phẩm khô nói chung.

2 MỤC TIÊU NGHIÊN CỨU

- Phân lập và làm thuần chủng các loài *Aspergillus* hiện diện trên đậu phộng trong quá trình tồn trữ và sự xâm nhiễm trong quá trình vận chuyển hạt.
- Xác định tên gọi từng loài dựa trên các đặc điểm về hình thái và các đặc điểm loài của chúng.

3 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1 Vật liệu thí nghiệm

Đề tài được tiến hành tại phòng thí nghiệm thuộc Bộ môn Công nghệ Thực phẩm, Bộ môn Bảo vệ thực vật - Khoa Nông nghiệp & Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ.

- Nguyên liệu: Hạt đậu phộng (*Arachis hypogaeae*) được thu mua tại các sạp hàng khác nhau ở chợ Xuân Khánh - Tp Cần Thơ.

3.2 Phương pháp nghiên cứu (Đặng Vũ Hồng Miên, 2004)

- Nuôi cấy mẫu trên môi trường PGA
- Quan sát khuẩn lạc nấm mốc phát triển trên môi trường nuôi cấy, tách rông loài nấm mốc nghi ngờ là *Aspergillus* bằng phương pháp cấy chuyền liên tục
- Tiến hành phân lập trên môi trường Czapek
- Thực hiện tiêu bản nấm mốc quan sát dưới kính hiển vi.

3.3 Phương pháp thí nghiệm

Phân lập nấm mốc *Aspergillus* (Bùi Xuân Đồng, 2004)

Nhằm xác định các loài *Aspergillus* hiện diện trên đậu phộng, tách riêng các loài nấm mốc từ quần thể ban đầu và đưa về dạng thuần chủng, tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình quan sát hình thái sợi nấm, nhờ đó việc định tên sẽ chính xác hơn.

a. Chuẩn bị môi trường nuôi cấy

Môi trường PGA và Czapek được chuẩn bị, thanh trùng đổ vào các đĩa petri để đặc tự nhiên trên mặt phẳng ngang.

b. Chuẩn bị mẫu

Thí nghiệm được thực hiện với hai mẫu hạt khác nhau:

- Mẫu 1: Hạt đậu phộng được rửa sạch bằng nước cất vô trùng để xác định những loài nấm mốc có trong bản thân hạt.
- Mẫu 2: Hạt đậu phộng không được rửa, dùng xác định những loài nấm mốc bám lên hạt trong quá trình vận chuyển.

c. Phân lập nấm mốc

- Cho một vài hạt đậu phộng còn nguyên vào đĩa petri chứa sẵn môi trường PGA
- Cho đĩa vào tủ ủ ở nhiệt độ phòng
- Tiến hành quan sát sự phát triển của nấm mốc hàng ngày. Sau khoảng thời gian nuôi cấy từ 5-7 ngày, dùng que cấy vớt lấy một ít bào tử nấm mốc nghi ngờ là *Aspergillus* (dựa trên hình thái và màu sắc bào tử nấm mốc) cấy lên môi trường PGA trong đĩa petri
- Tiến hành ủ ở nhiệt độ phòng, và quan sát sự phát triển của nấm mốc hàng ngày
- Thao tác cấy truyền được thực hiện nhiều lần cho đến khi mẫu hoàn toàn thuần chủng, không có lẫn sợi nấm lạ.

d. Định danh

Tiến hành nhận xét đại thể và vi thể nấm mốc

- Đại thể: quan sát đặc điểm hình thái sợi nấm bằng mắt thường
- Vi thể: thực hiện tiêu bản nấm mốc, quan sát ở vật kính 40X cấu tạo khuẩn ty và bào tử của nó.

Dựa trên kết quả thu nhận được tra khóa phân loại, xác định tên loài nấm mốc tương ứng

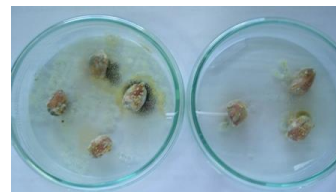
4 KẾT QUẢ

Sau quá trình tiến hành thí nghiệm, chúng tôi quan sát thấy trên hạt đậu phộng xuất hiện thường xuyên một số loài nấm mốc (được phân biệt chủ yếu dựa trên màu sắc) như sau:

- Nấm có hệ sợi bao phủ như mạng lưới, phát triển nhanh, bao trùm lên khắp đĩa với đầu là những chấm màu đen
- Nấm có màu trắng, bề mặt li ti như bụi, không có hệ sợi khí sinh
- Nấm có màu vàng nâu, màu đen, màu nâu
- Nấm có màu xanh xám, màu vàng tươi, bề mặt li ti như bụi, không có hệ sợi khí sinh



a) Mẫu hạt không rửa



b) Mẫu hạt được rửa

Hình 1: Mẫu hạt đậu phộng có nấm mốc phát triển trên môi trường nuôi cấy PGA sau 3 - 5 ngày, nhiệt độ 27 – 32°C

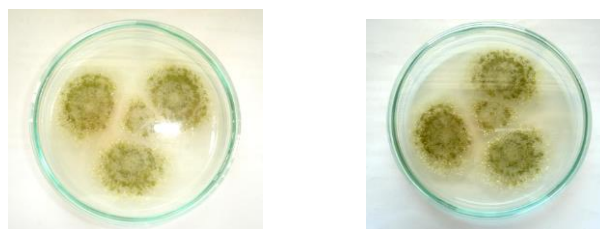
Sau quá trình phân lập và định danh, chúng tôi xác định được bốn loài *Aspergillus* sau:

- *Aspergillus flavus*
- *Aspergillus oryzae*
- *Aspergillus niger*
- *Aspergillus ficuum*

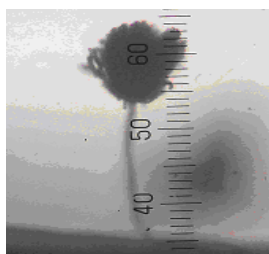
Aspergillus flavus (K.B. Raper et D.I. Fennell, 1965)

TÊN: *Aspergillus flavus*

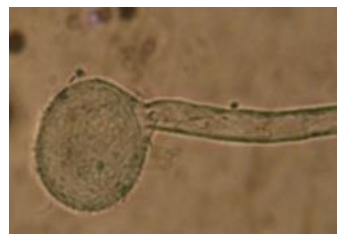
Xuất xứ: Hạt đậu phộng chợ Xuân Khánh		Nhiệt độ:	27- 32 ^o C	Ánh sáng: thường
Môi trường : Czapek				
Tuổi nấm khi phân loại:	7 ngày			
<i>Khuẩn lạc:</i>				
<u>Tốc độ mọc:</u> Trung bình		Kích thước: 5,0 – 5,5 cm		
<u>Dạng khuẩn lạc:</u> Dạng bột rời				
<u>Giọt tiết:</u>	Xung quanh rìa khuẩn lạc có giọt tiết màu trắng đục và màu đen, trong. Chúng được tiết ra sau 4 - 5 ngày nuôi cấy, bề trái các giọt tiết có màu đen			
<u>Màu sắc:</u> Mặt phải: Ban đầu khuẩn lạc có màu vàng nhạt sau chuyển sang màu xanh lục				
Mặt trái: Không màu				
<u>Sắc tố ra môi trường:</u> Không				
<i>Giai đoạn vô tính:</i>				
<u>Đầu:</u>	Cách sắp xếp:	Mọc từ môi trường		
	Hình dạng:	Hình cầu, toả tia khi non và tạo thành các cột với những chuỗi bào tử rất dài khi già		
	Kích thước:	(50 – 200) μm		
<u>Cuống:</u>	Hình dạng:	Bề mặt cuống ráp, có nhiều gai mịn, đều.		
	Kích thước:	(380 - 800) x (12 - 18) μm		
	Màu sắc:	Không màu.		
<u>Bong:</u>	Hình dạng:	Hình cầu đến gần cầu		
	Kích thước:	(35 – 50) μm		
	Vùng sinh sản:	Khắp mặt bong		
<u>Thế bình:</u>	Cách sắp xếp:	Thế bình hai tầng và một tầng. Có cả hai loại thế bình trên cùng một bong		
	Lớp 1: Hình dạng:	Hình trụ		
	Kích thước:	(10 - 20) x (3,75 - 5) μm		
	Lớp 2: Hình dạng:	Hình chai		
	Kích thước:	(5 - 7,5) x (3,75 - 5) μm		
<u>Bào tử:</u>	Hình dạng:	Hình cầu, bề mặt có vẻ trơn nhẵn		
	Kích thước:	(3 - 5) μm		



Hình 2: *Aspergillus flavus* với những giọt tiết có màu trắng đục xung quanh rìa khuẩn lạc sau 4 – 5 ngày nuôi cấy trên môi trường Czapek



Hình 3: *Aspergillus flavus* có bông hình cột với những chuỗi bào tử rất dài

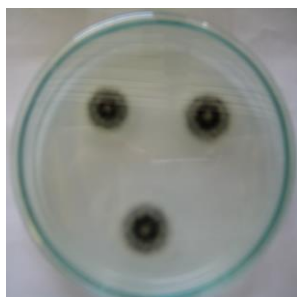


Hình 5: Cấu tạo một bông có hình gần cầu

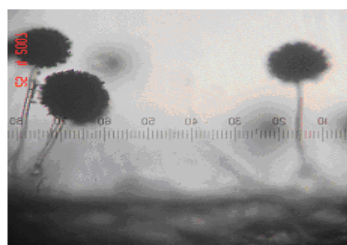
Aspergillus niger (K.B. Raper et D.I. Fennell, 1965)

TÊN: *Aspergillus niger*

Xuất xứ: Hạt đậu phộng chợ Xuân Khánh		Nhiệt độ:	27 - 32 ⁰ C	Á.sáng: thường
Môi trường : Czapek				
Tuổi nấm khi phân loại:	7 ngày			
<i>Khuẩn lạc:</i>				
<u>Tốc độ mọc:</u>	Trung bình	Kích thước: 4,4 - 5,8 cm		
<u>Dạng khuẩn lạc:</u>	Dạng bột rời lấm tẩm, tâm khuẩn lạc lõi, rìa là lớp tơ trắng			
<u>Giot tiết:</u>	Không			
<u>Màu sắc:</u>	Mặt phải: Khuẩn lạc có màu đen như than			
	Mặt trái: Không màu			
<u>Sắc tố ra môi trường:</u>	Không			
<i>Giai đoạn vô tính:</i>				
<u>Đầu:</u>	Cách sắp xếp:	Mọc từ môi trường		
	Hình dạng:	Hình cầu, toả tia khi non và xé rách tạo dạng cột khi già		
	Kích thước:	(100 - 200) μm		
<u>Cuống:</u>	Hình dạng:	Bề mặt cuống nhẵn, không màu, có màu nâu gần bông		
	Kích thước:	(400 - 800) x (15 - 18) μm		
	Màu sắc:	Không màu		
<u>Bong:</u>	Hình dạng:	Hình cầu		
	Kích thước:	(45 - 72) μm		
	Vùng sinh sản:	Khắp mặt bông		
<u>Thế bình:</u>	Cách sắp xếp:	Thế bình hai tầng với đặc trưng là lớp thứ nhất dài gấp đôi lớp thứ hai		
	Lớp 1: Hình dạng:	Hình trụ dài		
	Kích thước:	(17,5 - 25) x (5 - 7,5) μm		
	Lớp 2: Hình dạng:	Hình chai		
	Kích thước:	(5 - 8) x (3 - 3,75) μm		
<u>Bào tử:</u>	Hình dạng:	Hình cầu, bề mặt có gai xù xì		
	Kích thước:	(3,75 - 5) μm		



Hình 9: *Aspergillus niger* sau 3 ngày và sau 5 ngày nuôi cấy trên môi trường Czapek, nhiệt độ 27 - 32°C



Hình 10: Cấu tạo sợi nấm *A. niger* mang chức năng sinh sản có bông hình cầu tỏa tia



Hình 11: Bông với thể bình hai tầng và bông hình cầu

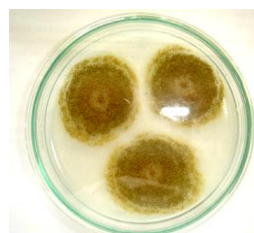
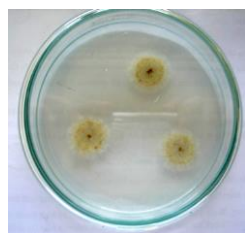


Hình 12: Cấu tạo hiển vi một thể bình hai tầng, Lớp thứ nhất có hình trụ, lớp thứ hai có hình chai

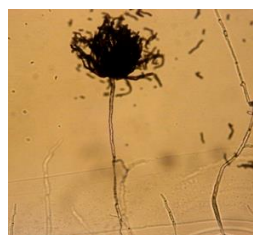
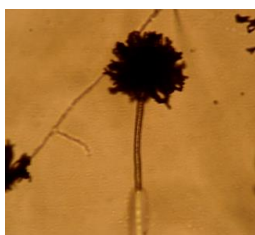
Aspergillus oryzae

TÊN: *Aspergillus oryzae*

Xuất xứ: Hạt đậu phộng chợ Xuân Khánh		Nhiệt độ:	27 - 32°C	Ánh sáng: thường
Môi trường : Czapek				
Tuổi nấm khi phân loại:		7 ngày		
<i>Khuẩn lạc:</i>				
<u>Tốc độ mọc:</u> Trung bình		Kích thước: 5 - 6 cm		
<u>Dạng khuẩn lạc:</u> Dạng bột rời lấm tấm, khuẩn lạc tâm lõi, rìa thấp dần, ngoài là lớp tơ trắng				
<u>Giọt tiết:</u>		Không		
<u>Màu sắc:</u> Mặt phải: Khuẩn lạc ban đầu có màu vàng lục sau chuyển thành màu vàng lục nâu				
		Mặt trái: Không màu		
<u>Sắc tố ra môi trường:</u>		Không		
<i>Giai đoạn vô tính:</i>				
<u>Đầu:</u>	Cách sắp xếp:	Mọc từ môi trường		
	Hình dạng:	Hình cầu, toả tia khi non và xé rách thành những dây tua rua với những chuỗi bào tử rất dài khi già		
	Kích thước:	(140 - 170) µm.		
<u>Cuống:</u>	Hình dạng:	Bề mặt cuống có gai mịn		
	Kích thước:	(400 - 550) x (6,5 - 10) µm		
	Màu sắc:	Không màu		
<u>Bong:</u>	Hình dạng:	Hình cầu đến gần cầu		
	Kích thước:	(16,25 - 25) µm.		
	Vùng sinh sản:	Khắp mặt bong		
<u>Thể bình:</u>	Cách sắp xếp:	Thể bình một tầng là chủ yếu. Đặc biệt bông lớn hai thể bình, bông nhỏ một thể bình. Đôi khi có cả hai thể bình trên cùng một bông		
<u>Thể bình một tầng</u>	Hình dạng:	Hình chai		
	Kích thước:	(7 - 8.75) x (3,75 - 5) µm		
<u>Thể bình hai tầng:</u>	Lớp 1: Hình dạng:	Hình trụ dài		
	Kích thước:	(7,5 - 11) x (3,75 - 7,5) µm		
	Lớp 2: Hình dạng:	Hình chai		
	Kích thước:	12,5 x (7 - 7,5) µm		
<u>Bào tử:</u>	Hình dạng:	Hình cầu, bề mặt có gai mịn, có kích thước lớn, màu vàng nâu. Khi già gai trở nên xù xì, vách dày		
	Kích thước:	(5 - 7) µm		



Hình 13. *Aspergillus oryzae* có màu vàng lục khi non và màu vàng lục nâu khi già



Hình 14: *Aspergillus oryzae* có bông hình cầu khi non và xé rách tạo hình trụ hay những chuỗi tua rua khi già

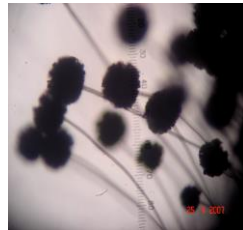
Aspergillus ficuum (K.B. Raper et D.I. Fennell, 1965)

TÊN: *Aspergillus ficuum*

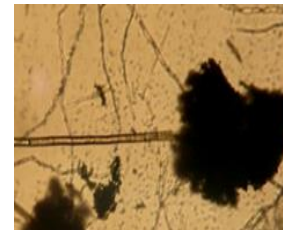
Xuất xứ:	Hạt đậu phộng chợ Xuân Khánh	Nhiệt độ:	27 - 32 ⁰ C	Á.sáng:	thường
Môi trường :	Czapek				
Tuổi nấm khi phân loại:	7 ngày				
Khuẩn lạc:					
Tốc độ mọc:	Nhanh.	Kích thước: 7 cm			
Dạng khuẩn lạc:	Dạng mặt răng cưa, khuẩn lạc là những vòng tròn đồng tâm thấp dần từ trong ra ngoài, rìa là lớp tơ trắng				
Giot tiết:	Không				
Màu sắc:	Mặt phải: Khuẩn lạc có màu nâu nhạt đến nâu				
Sắc tố ra môi trường:	Không				
Giai đoạn vô tính:					
<u>Đầu:</u>	Cách sắp xếp:	Mọc từ môi trường			
	Hình dạng:	Hình cầu, toả tia rất đều khi non và xé rách tạo dạng cột khi già			
	Kích thước:	(150 - 200) μm			
<u>Cuống:</u>	Hình dạng:	Bề mặt cuống nhẵn, không màu, có màu nâu gần sát bông. Cuống có đặc trưng dài vượt trội so với những loài trên			
	Kích thước:	(1200 - 1950) x (11 - 12,5) μm			
	Màu sắc:	Không màu, có màu nâu gần sát bông			
<u>Bong:</u>	Hình dạng:	Hình cầu đến gần cầu, có kích thước lớn			
	Kích thước:	(52 - 62) μm			
	Vùng sinh sản:	Khắp mặt bông			
<u>Thể bình:</u>	Cách sắp xếp:	Thể bình một tầng với đặc trưng là kích thước rất ngắn			
	Lớp 1: Hình dạng:	Hình trụ ngắn			
	Kích thước:	(8,75 - 10) x (3,75 - 5) μm			
<u>Bào tử:</u>	Hình dạng:	Hình cầu đến gần cầu, bề mặt có gai mịn. Màu nâu			
	Kích thước:	(3,75 - 4,5) μm			



Hình 17: *Aspergillus ficuum* có màu nâu trên môi trường Czapek sau 7 ngày tuổi



Hình 18: *Aspergillus ficuum* có bông hình cầu tỏa tia rất đều và đặc biệt cuống khá dài



Hình 19: Khi già, bông xé rách tạo dạng cột

5 KẾT LUẬN

Các loài nấm mốc có mặt trên hạt đậu phộng ở các sạp hàng khác nhau tương đối giống nhau. Điều này cho thấy hệ nấm mốc tồn tại trên hạt đậu phộng tương đối ổn định trong khu vực chợ Xuân Khánh, Thành Phố Cần Thơ. Bước đầu định danh được những loài sau: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ficuum*. Bốn loài này xuất hiện trên hạt đậu phộng với tần số rất cao, trong quá trình phân lập bao giờ cũng bắt gặp sự hiện diện của chúng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bùi Xuân Đồng, 2004. Nguyên lý phòng chống nấm mốc và mycotoxin. NXB Khoa Học và Kỹ Thuật. pp 141-146
- Đặng Vũ Hồng Miên, 2000. Phân lập và định danh nấm mốc. Trường ĐH Khoa Học Tự Nhiên. pp 123-152
- Nguyễn Đức Lượng và Nguyễn Ánh Tuyết, 2003. Thí nghiệm công nghệ sinh học- tập 2- Thí nghiệm vi sinh vật học. NXB ĐHQG Tp HCM. pp 353-372
- K.B. Raper et D.I. Fennell, 1965. The genus *Aspergillus*. Baltimore Williams and Wilkins Co. pp 256-279
- Thực hành Vi Sinh nhỏ. Khoa Sinh học -Trường ĐH Khoa Học Tự Nhiên – Đại học Quốc Gia TP.HCM. pp 73-88
- Thomas J. Montville & Karl R. Matthew, 2005. Food Microbiology an Introduction. Asm Press. pp 272-276