

Nghiên cứu đa dạng nấm men phân lập ở vùng ô nhiễm chất độc hóa học dioxin thuộc khu bảo tồn Mã Đà - Đồng Nai

Trần Thị Lệ Quyên*, Đào Thị Lương, Hà Thị Hằng, Dương Văn Hợp

Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc Gia Hà Nội,
144 Xuân Thủy Str., Cầu Giấy Dist., Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 16 tháng 10 năm 2012

Chỉnh sửa ngày 31 tháng 10 năm 2012; chấp nhận đăng ngày 06 tháng 3 năm 2013

Tóm tắt. 91 chủng nấm men được phân lập từ 44 mẫu lá, rác và đất thu thập ở khu bảo tồn Mã Đà. Số lượng nấm men phân lập được nhiều nhất ở các mẫu lá tươi, trung bình 3,4 chủng/mẫu. Trong khi ở mẫu đất và rác thực vật, nấm men phân lập được thấp hơn nhiều với tỉ lệ lần lượt là 1,4 và 1,9 chủng/mẫu. Có 59,3% số chủng phân lập sinh cellulase phân giải CMC; 28,6% số chủng có khả năng sinh enzyme lipase phân giải tributyrin; 28,6% số chủng sinh amylase phân giải tinh bột và 23% số chủng sinh protease phân giải casein. Không có chủng nào được tìm thấy có khả năng sinh kháng sinh kháng lại các vi sinh vật kiểm định. Phân loại 91 chủng nấm men dựa vào hình thái khuẩn lạc, tế bào và phân tích trình tự ADNr 26S đoạn D1/D2, chúng thuộc về 19 chi, 39 loài, có 19 chủng nghi ngờ thuộc 13 loài mới. Có 25 chủng thuộc nấm túi với chi *Candida* (11 chủng), chi *Hyphopichia* (7 chủng), chi *Metschnikowia* (3 chủng), *Debaryomyces*, *Galactomyces*, *Hanseniaspora* và *Yamadazyma* (1 chủng); có 66 chủng thuộc nấm đảm, trong đó số chủng thuộc chi *Pseudozyma* chiếm số lượng nhiều nhất (17 chủng), tiếp đến là các chi *Cryptococcus* và chi *Sporobolomyces* (14 chủng), *Tilletiopsis* và *Sporidiobolus* (5 chủng), *Hannaella* (3 chủng), chi *Mingxidea* và *Rhodospiridium* (2 chủng), còn lại thuộc các chi *Papiliotrema*, *Rhodotorula*, *Sakaguchia*, *Sporisorium* (1 chủng). Có 21 chủng sinh bào tử bản phân lập được từ 15 mẫu lá thuộc 4 chi (*Mingxidea*, *Hannaella*, *Sporobolomyces*, *Tilletiopsis*) và 6 loài.

Từ khóa: Mã Đà, nấm men, đa dạng sinh học, 26S rDNA.

1. Mở đầu

Nấm men lần đầu tiên được Antonie Van Leeuwenhoek mô tả vào năm 1680 nhưng vào thời điểm đó nấm men chưa được coi là một cơ thể sống. Cho đến những năm 1857-1863 Pasteur đã xác nhận nấm men là một cơ thể sống và phát hiện ra nấm men chính là nguồn

gốc của quá trình lên men rượu. Kể từ đó tới nay, với vai trò và ý nghĩa to lớn của mình, nấm men không ngừng được các nhà khoa học phân lập, nghiên cứu độ đa dạng và xác định hình thái, các đặc điểm sinh lý và khả năng đồng hóa đường cùng hàng loạt các đặc điểm khác [1].

Ở các quốc gia châu Á nhiệt đới, nấm men chỉ mới được nghiên cứu phổ biến nhất ở Thái Lan. Tuy nhiên, nghiên cứu về nấm men phân bố trong môi trường tự nhiên chỉ mới được bắt

* Tác giả liên hệ. ĐT: 84-975512621.
E-mail: quyenttl@gmail.com

đầu. Nấm men là nhóm các vi sinh vật cần đòi hỏi nghiên cứu sâu hơn. Hiện nay, có khoảng 150 loài nấm men tìm thấy ở Thái Lan từ các sản phẩm lên men và các cơ chất trong các môi trường tự nhiên. Nói chung, nấm men trong các thực phẩm lên men và các cơ chất liên quan không đa dạng. Nấm men túi chiếm ưu thế trong các cơ chất này và thành phần loài là giống nhau ở các nước khác nhau. Ngược lại với các thực phẩm lên men và các cơ chất liên quan, nấm men được tìm thấy trong môi trường tự nhiên rất đa dạng và nhiều loài chưa được mô tả [1].

Ở Việt Nam, Luong và cs (1999) đã phân lập được 151 chủng nấm men từ 20 mẫu thực vật thu thập từ rừng mưa nhiệt đới Cúc Phương, Ninh Bình, sử dụng phương pháp rai bào tử. Một trăm hai một chủng trong số này sinh bào tử bán. Tác giả đã tiến hành các nghiên cứu phân loại 85 chủng và xếp chúng vào chi *Bullera* (39 chủng), *Kockovaella* (5 chủng), *Sporobolomyces* (39 chủng) và *Tilletiopsis* (2 chủng). Cả 5 chủng thuộc chi *Kockovaella* chưa được mô tả và chúng được xem là 4 loài mới, *K. calophylli*, *K. cucphuongensis* (2 chủng), *K. litseae* và *K. vietnamensis* (Luong và cs, 2000). Hai loài mới thuộc chi *Bullera* là *B. hoabinhensis* và *B. ninhbinhensis* cũng được công bố (Luong và cs, 2002; 2005). Tác giả nhận định sẽ còn nhiều loài chưa được mô tả phân bố trong những vùng sinh thái như vậy [1].

Ngoài những vùng sinh thái nguyên sinh tự nhiên, đa dạng nấm men còn được nghiên cứu ở những vùng sinh thái đặc biệt như vùng ô nhiễm dioxin. Theo công bố của tác giả Luong và cs., (2008) về đa dạng nấm men ở vùng ô nhiễm dioxin sân bay quân sự Đà Nẵng, có 71 chủng nấm men được phân lập từ 17 mẫu lá, với 50 chủng được phân loại bằng phương pháp phân tích trình tự gen rRNA 26S đoạn D1/D2 cho thấy chúng thuộc 9 chi và 23 loài, trong đó

9 chủng nghi ngờ loài mới. Có 29/50 chủng thuộc hai chi *Cryptococcus* và *Pseudozyma*, 15 chủng thuộc các chi *Rhodotorula*, *Ustilago* và *Rhodosporidium*, các chủng còn lại thuộc 4 chi *Jamaniae*, *Sporisorium*, *Candida* và *Trichosporon* [2].

Khu bảo tồn Mã Đà là căn cứ đầu tiên của Trung ương cục miền Nam, là căn cứ Khu uỷ miền Đông Nam Bộ trong suốt thời kỳ từ 1960 đến tháng 5 năm 1975. Khu vực này đã phải hứng chịu bom đạn và đặc biệt là chất độc hoá học vô cùng nặng nề, đây là một trong số 5 khu vực bị rải chất độc hoá học nặng nhất, không những có ảnh hưởng tức thời, mang tính huỷ diệt mà còn để lại hậu quả lâu dài đối với thiên nhiên, môi trường sinh thái và con người. Sau hơn 30 năm, nhiều cánh rừng ở Mã Đà vẫn chưa phục hồi trở lại [3]. Kết quả phân tích các mẫu đất ở khu bảo tồn Mã Đà (khu vực trước kia bị rải chất độc hóa học) và vườn Quốc gia Cát Tiên (khu vực đối chứng, là nơi có điều kiện sinh thái tương tự Mã Đà nhưng ít bị tác động của chiến tranh hoá học) cho thấy hàm lượng của dioxin trong đất vào thời điểm hiện tại là không cao (nằm dưới ngưỡng cho phép của châu Âu và Mỹ là 1ppt). Tuy nhiên, hậu quả để lại của dioxin đến hệ sinh thái là không thể phủ nhận, cụ thể, đa dạng sinh học ở khu vực đối chứng cao gấp hai lần so với khu đã từng bị nhiễm dioxin. Sự khác biệt về cấu trúc ADN của 6 loài cây được nghiên cứu tại hai khu Mã Đà và vườn Quốc gia Cát Tiên cũng là tương đối lớn [4]. Báo cáo của Nguyễn Xuân Quỳnh (2008) cho thấy tại hồ Biên Hùng, cấu trúc các nhóm loài là không đa dạng, không cân đối và thiếu vắng nhiều loài cá, đặc biệt là các loài lưỡng cư, bò sát, tôm, cua [3].

Hiện nay, ở khu bảo tồn Mã Đà đã có nghiên cứu về ảnh hưởng của dioxin đến đa dạng sinh học của hệ động thực vật [4, 5]. Tuy nhiên, chưa có tác giả nào quan tâm sâu đến đa dạng vi sinh vật ở mức độ loài của khu vực này.

Báo cáo “Nghiên cứu đa dạng nấm men phân lập tại khu bảo tồn Mã Đà - Đồng Nai” đã được thực hiện với mục đích: đánh giá mức độ đa dạng các loài nấm men ở khu vực bị rải chất độc dioxin và so sánh với các vùng sinh thái khác.

2. Nguyên liệu và phương pháp

2.1. Nguyên liệu

- Mẫu phân lập: 44 mẫu gồm 11 mẫu đất, 12 mẫu rác và 21 mẫu lá được thu thập tại Khu bảo tồn Mã Đà, Đồng Nai vào tháng 11 năm 2011.

- Vi khuẩn kiểm định: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Fusarium oxysporum* được lưu giữ tại Bảo tàng giống chuẩn Vi sinh vật, Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học-ĐHQGHN

Môi trường

- Môi trường YM (g/l): glucose-10; cao malt-3; cao men-3; peptone-5; agar - 16; pH 6.0

- Môi trường xác định hoạt tính enzyme ngoại bào (g/l): cơ chất (carboxymethyl cellulose - CMC, tinh bột, trybutyrin, casein) - 1; agar - 16; đệm citrate - Na, pH 7.0

- Môi trường thạch canh thang (g/l): pepton - 5; cao thịt - 3; NaCl - 3; agar - 16, pH 7.0

Phương pháp phân lập nấm men

- Mẫu lá tươi và rác thực vật được phân lập theo Lanhell và cs., 2006 [6].

- Mẫu đất phân lập theo phương pháp pha loãng giới hạn [7].

Xác định khả năng sinh enzyme ngoại bào và chất kháng sinh

- Khả năng sinh enzyme ngoại bào được xác định bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch cơ chất: CMC, tinh bột, trybutyrin, casein [7].

- Khả năng sinh chất kháng sinh được xác định dựa vào đường kính vòng kháng vi sinh vật kiểm định [7].

Phân loại

- Quan sát hình thái khuẩn lạc và tế bào nấm men theo phương pháp của Yarrow (1998) [8].

- Phân loại nấm men bằng sinh học phân tử: DNA tổng số của các chủng nấm men được tách chiết theo Manitis và cs., (1982) [9]. Trình tự rDNA 26S đoạn D1/D2 được xác định theo phương pháp của Kurtman và Robnett (1998) [10] sử dụng máy đọc trình tự 3100 – Avant Genetic Analyzer và hóa chất của hãng AB Apply Biosystem. So sánh và xử lý số liệu dùng chương trình máy tính CLUSTAL X. của Thompson và cs., (1997). Các trình tự tham khảo dùng trong nghiên cứu cây phát sinh chủng loại được lấy từ dữ liệu của GenBank. Cây phát sinh được xây dựng theo Kimura (1980) [11], sử dụng phương pháp của Saitou và Nei (1987) [12]; phân tích bootstrap được thực hiện từ 1000 lần lặp lại ngẫu nhiên.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Phân lập

Từ 44 mẫu lá tươi, rác và đất đã phân lập được 91 chủng nấm men. Trong số đó có 7/11 mẫu đất, 7/12 mẫu rác, 20/21 mẫu lá tươi phân lập được nấm men.

Bảng 1. Số lượng nấm men phân lập

Nguồn phân lập	Số lượng mẫu phân lập	Số lượng mẫu có nấm men	Số lượng chủng	Trung bình số chủng/mẫu
Đất	11	7	10	1,4
Rác	12	7	13	1,9
Lá tươi	21	20	68	3,4
Tổng số	44	33	91	3

Từ kết quả thu được ở bảng 1 cho thấy số lượng chủng nấm men phân lập được nhiều nhất ở các mẫu lá tươi, trung bình 3,4 chủng/mẫu, trong khi đó mẫu đất và rác thực vật có số lượng nấm men phân lập được thấp hơn nhiều với tỉ lệ lần lượt là 1,4 và 1,9 chủng/mẫu. Nghiên cứu trước đây trên mẫu lá cây thu thập tại vùng ô nhiễm dioxin sân bay quân sự Đà Nẵng có kết quả tương tự, số lượng nấm men phân lập được trung bình là 4,4 chủng/mẫu; trong khi đó số chủng nấm men phân lập được từ mẫu lá ở các Vườn Quốc gia Cúc Phương; Phong Nha-Kẻ Bàng hay Cát Tiên lần lượt là 7; 7,5 và 6,9 chủng/mẫu [2, 13-15]. Các mẫu rác và mẫu đất ở Vườn Quốc gia Cát Tiên cũng cho kết quả cao hơn so với khu vực Mã Đà, cụ thể là 2,5 chủng/mẫu rác và 2,9 chủng/mẫu đất [15]. Như vậy, có thể thấy rằng chất độc hóa học dioxin tuy là tồn dư còn ít nhưng vẫn còn ảnh hưởng lâu dài và sâu rộng không chỉ đối với vi sinh vật đất mà còn ảnh hưởng đến hệ vi sinh vật sống trên lá cây của vùng ô nhiễm.

3.2. Hoạt tính sinh học

Hoạt tính enzyme: 91 chủng nấm men được nuôi cấy trên môi trường đĩa thạch YM và xác định khả năng sinh enzyme amylase, cellulose, protease và lipase phân giải các cơ chất tinh bột, CMC, casein và tributyrin. Có 59,3% số chủng phân giải CMC, 28,6% số chủng có khả năng sinh enzyme lipase phân giải tributyrin, 28,6% số chủng phân giải tinh bột và 23% số

chủng phân giải casein. Nhìn chung, tất cả 91 chủng nấm men đều sinh ít nhất một loại enzyme phân giải cơ chất. Chiếm nhiều nhất là các chủng sinh cellulase, nhưng khả năng phân giải cơ chất không mạnh, đường kính vòng phân giải cơ chất dưới 20 mm.

Hoạt tính kháng khuẩn: Không có chủng nào được tìm thấy có khả năng sinh kháng sinh kháng lại các vi sinh vật kiểm định được kiểm tra.

Theo Lương và cs., (2008), kết quả kiểm tra khả năng sinh các enzyme ngoại bào và khả năng sinh chất kháng sinh của các chủng nấm men phân lập tại sân bay quân sự Đà Nẵng cũng tương tự, số chủng sinh enzyme phân giải CMC chiếm đa số và mạnh nhất. Tuy nhiên, số chủng sinh enzyme phân giải mạnh các cơ chất (>20 mm) chiếm 28% và khả năng kháng các vi sinh vật kiểm định chiếm 19,7% nấm men phân lập tại vùng này [2]. Trong khi đó, chỉ có một số chủng trong số 57 chủng nấm men phân lập tại vườn Quốc gia Phong Nha-Kẻ Bàng sinh enzyme phân giải các cơ chất trên nhưng hoạt tính không đáng kể và cũng chỉ có 3/57 chủng có hoạt tính kháng sinh [14]; còn nấm men phân lập tại vườn Quốc gia Cát Tiên có từ 8-38% số chủng sinh enzyme phân giải một trong các cơ chất nghiên cứu và hoạt tính rất thấp (<10 mm), đồng thời không có chủng nào sinh chất kháng sinh [15]. Như vậy, so sánh bốn khu vực lấy mẫu và phân lập nấm men (sân bay quân sự Đà Nẵng, vườn Quốc gia Phong Nha-Kẻ Bàng, Cát Tiên và Mã Đà) cho thấy, các

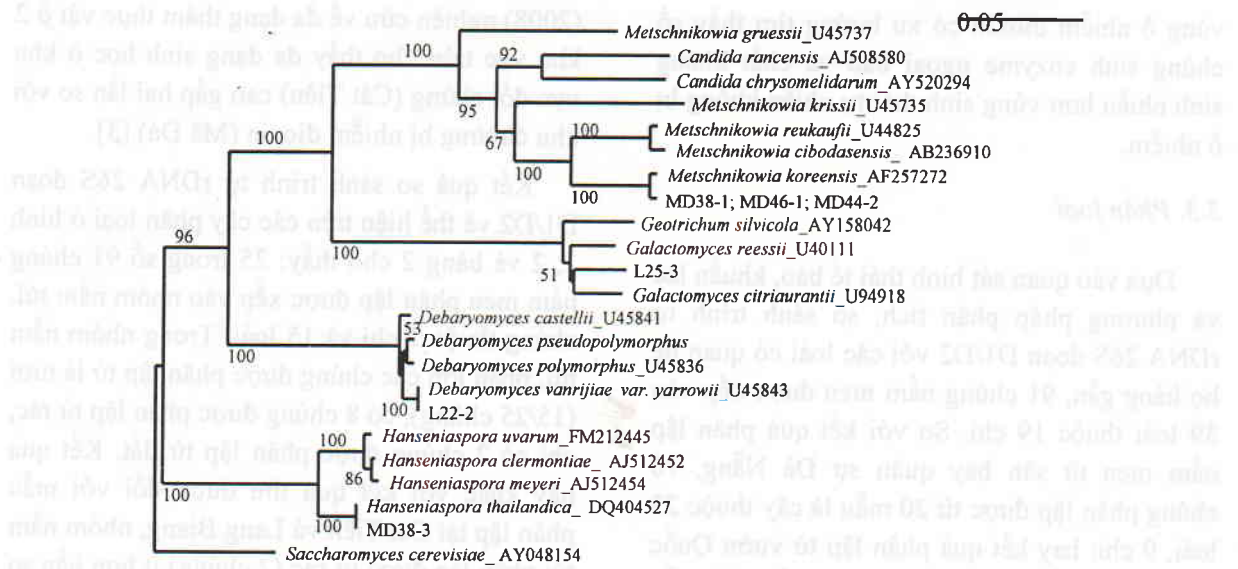
vùng ô nhiễm dioxin có xu hướng tìm thấy số chủng sinh enzyme ngoại bào và chất kháng sinh nhiều hơn vùng sinh thái tự nhiên không bị ô nhiễm.

3.3. Phân loại

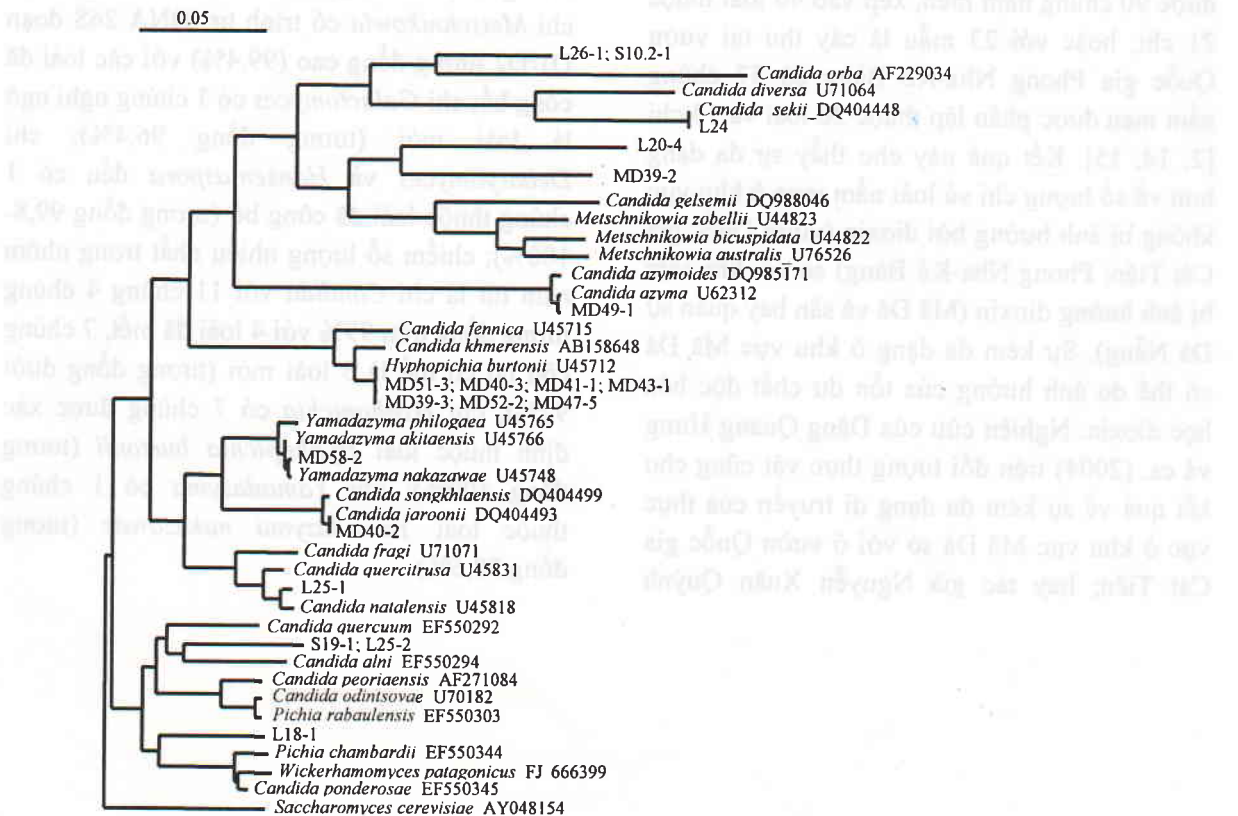
Dựa vào quan sát hình thái tế bào, khuẩn lạc và phương pháp phân tích, so sánh trình tự rDNA 26S đoạn D1/D2 với các loài có quan hệ họ hàng gần, 91 chủng nấm men được xếp vào 39 loài thuộc 19 chi. So với kết quả phân lập nấm men từ sân bay quân sự Đà Nẵng, 70 chủng phân lập được từ 20 mẫu lá cây thuộc 23 loài, 9 chi; hay kết quả phân lập từ vườn Quốc gia Cát Tiên năm 2010, với 31 mẫu (12 mẫu đất, 12 mẫu lá mục, 7 mẫu lá tươi) phân lập được 90 chủng nấm men, xếp vào 40 loài thuộc 21 chi; hoặc với 23 mẫu lá cây thu tại vườn Quốc gia Phong Nha-Kẻ Bàng có 57 chủng nấm men được phân lập thuộc 26 loài và 13 chi [2, 14, 15]. Kết quả này cho thấy sự đa dạng hơn về số lượng chi và loài nấm men ở khu vực không bị ảnh hưởng bởi dioxin (vườn Quốc gia Cát Tiên; Phong Nha-Kẻ Bàng) so với khu vực bị ảnh hưởng dioxin (Mã Đà và sân bay quân sự Đà Nẵng). Sự kém đa dạng ở khu vực Mã Đà có thể do ảnh hưởng của tồn dư chất độc hóa học dioxin. Nghiên cứu của Đặng Quang Hưng và cs. (2004) trên đối tượng thực vật cũng cho kết quả về sự kém đa dạng di truyền của thực vật ở khu vực Mã Đà so với ở vườn Quốc gia Cát Tiên; hay tác giả Nguyễn Xuân Quỳnh

(2008) nghiên cứu về đa dạng thảm thực vật ở 2 khu vực trên cho thấy đa dạng sinh học ở khu vực đối chứng (Cát Tiên) cao gấp hai lần so với khu đã từng bị nhiễm dioxin (Mã Đà) [3].

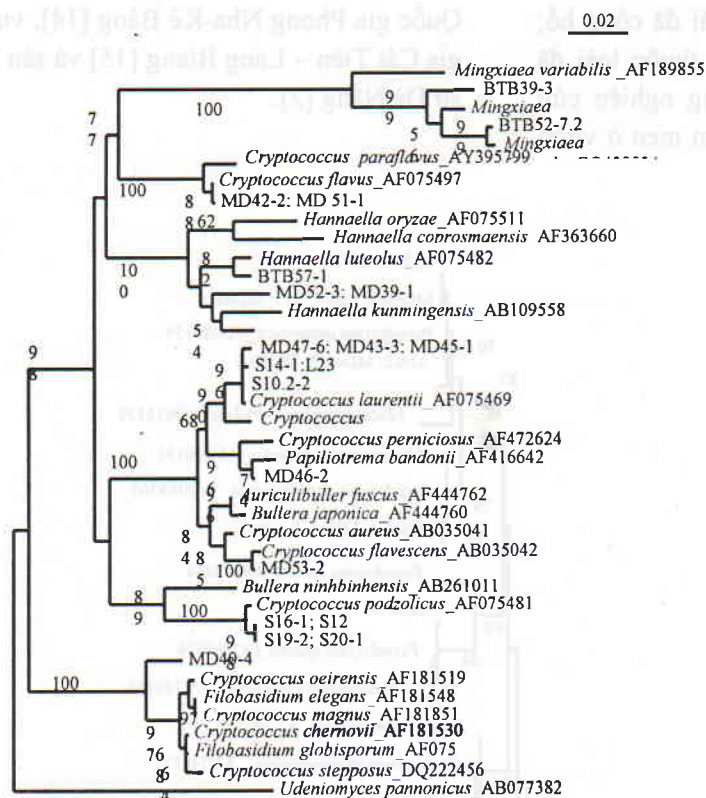
Kết quả so sánh trình tự rDNA 26S đoạn D1/D2 và thể hiện trên các cây phân loại ở hình 1, 2 và bảng 2 cho thấy: 25 trong số 91 chủng nấm men phân lập được xếp vào nhóm nấm túi, chúng thuộc 7 chi và 15 loài. Trong nhóm nấm túi, phần lớn các chủng được phân lập từ lá tươi (15/25 chủng), có 8 chủng được phân lập từ rác, chỉ có 2 chủng được phân lập từ đất. Kết quả này khác với kết quả thu được đối với mẫu phân lập tại Cát Tiên và Lang Biang, nhóm nấm túi phân lập được từ rác (2 chủng) ít hơn hẳn so với nhóm được phân lập từ đất (8 chủng). Trong số 25 chủng nấm túi có 3 chủng thuộc chi *Metschnikowia* có trình tự rDNA 26S đoạn D1/D2 tương đồng cao (99,4%) với các loài đã công bố; chi *Galactomyces* có 1 chủng nghi ngờ là loài mới (tương đồng 96,4%); chi *Debaryomyces* và *Hanseniaspora* đều có 1 chủng thuộc loài đã công bố (tương đồng 99,8-100%); chiếm số lượng nhiều nhất trong nhóm nấm túi là chi *Candida* với 11 chủng 4 chủng tương đồng trên 99% với 4 loài đã biết, 7 chủng còn lại có thể là 5 loài mới (tương đồng dưới 97%); chi *Hyphopichia* có 7 chủng được xác định thuộc loài *Hyphopichia burtonii* (tương đồng 100%); chi *Yamadazyma* có 1 chủng thuộc loài *Yamadazyma nakazawae* (tương đồng 99,6%).



Hình 1. Vị trí phân loại của các chủng nấm men túi thuộc các chi *Debaryomyces*, *Metschnikowia*, *Galactomyces*, *Hanseniaspora* và các loài có quan hệ họ hàng gần.



Hình 2. Vị trí phân loại của 19 chủng nấm men túi thuộc các chi *Candida*, *Yamadazyma*, *Hyphopichia* và các loài có quan hệ họ hàng gần.



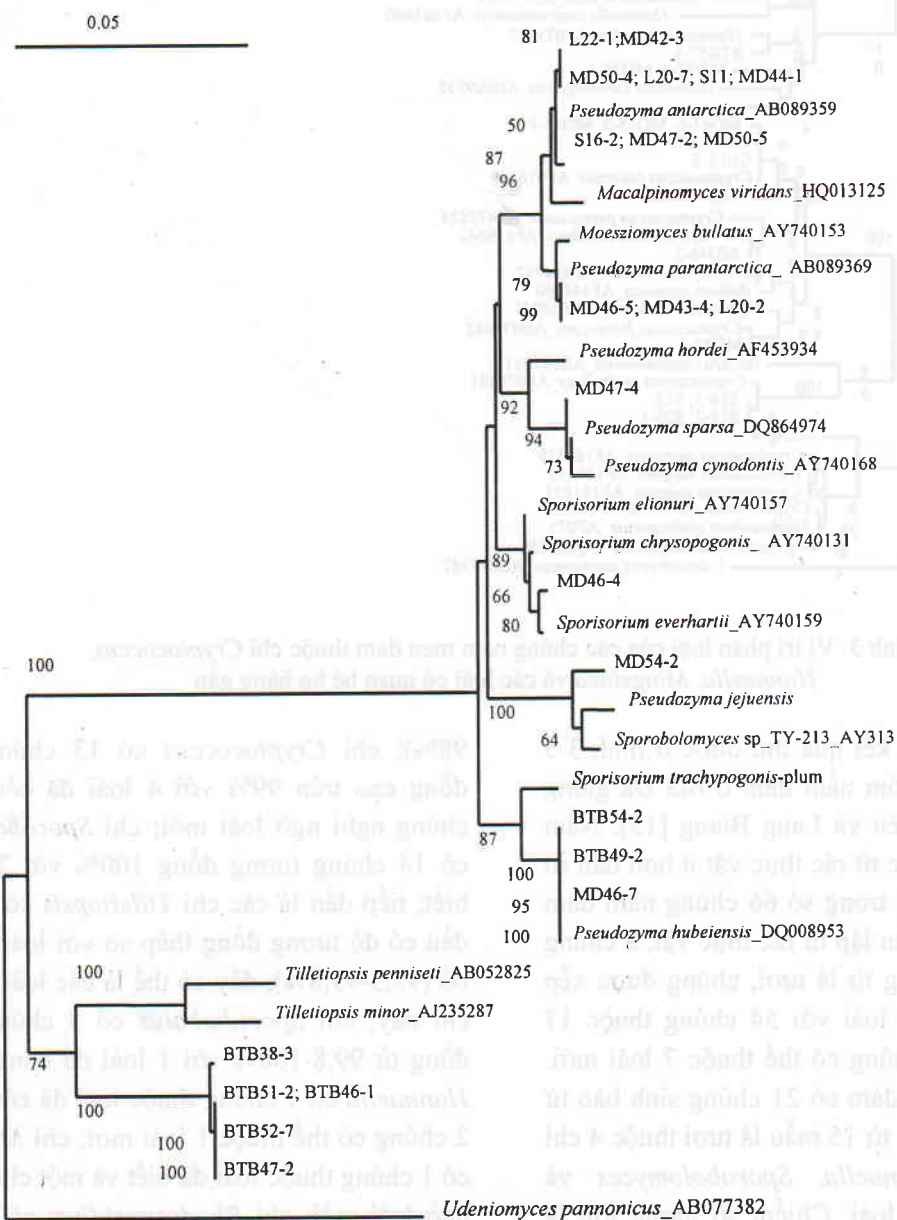
Hình 3. Vị trí phân loại của các chủng nấm men đảm thuộc chi *Cryptococcus*, *Hannaella*, *Mingxiaea* và các loài có quan hệ họ hàng gần

Trong khi đó, kết quả thu được ở hình 3-5 và bảng 2 của nhóm nấm đảm ở Mã Đà giống với tỉ lệ ở Cát Tiên và Lang Biang [15]. Nấm đảm phân lập được từ rác thực vật ít hơn hẳn so với từ đất, cụ thể, trong số 66 chủng nấm đảm thì có 5 chủng phân lập từ rác thực vật, 8 chủng từ đất và 53 chủng từ lá tươi, chúng được xếp vào 12 chi và 24 loài với 54 chủng thuộc 17 loài đã biết, 12 chủng có thể thuộc 7 loài mới. Trong nhóm nấm đảm có 21 chủng sinh bào tử bán phân lập được từ 15 mẫu lá tươi thuộc 4 chi (*Mingxiaea*, *Hannaella*, *Sporobolomyces* và *Tilletiopsis*) và 6 loài. Chiếm số lượng lớn là các chủng thuộc chi *Pseudozyma* có 17 chủng trong đó 16 chủng thuộc 4 loài đã công bố (tương đồng 99,6-100%) và 1 chủng có thể là loài mới của chi này (độ tương đồng dưới

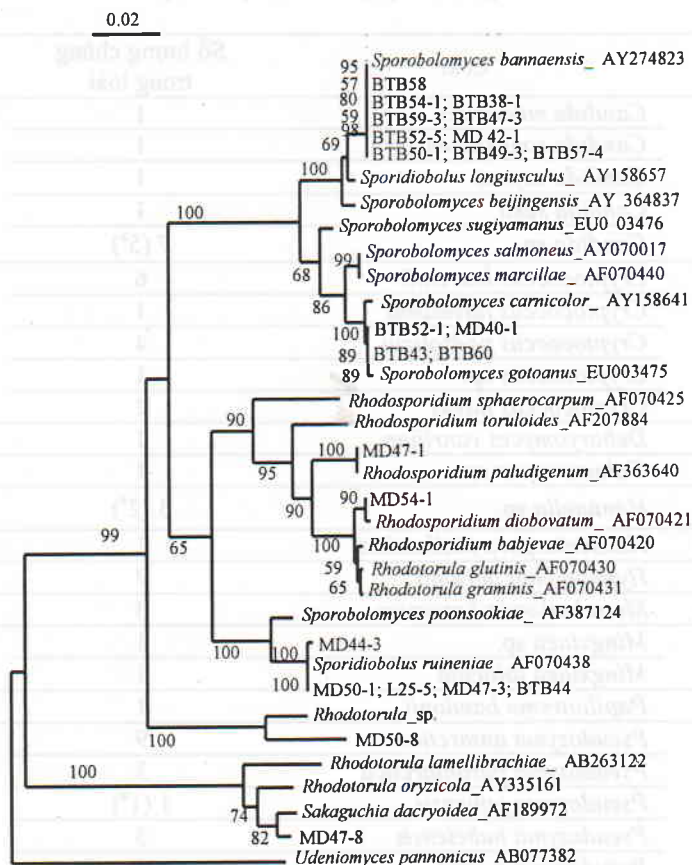
98%); chi *Cryptococcus* có 13 chủng tương đồng cao trên 99% với 4 loài đã công bố, 1 chủng nghi ngờ loài mới; chi *Sporobolomyces* có 14 chủng tương đồng 100% với 2 loài đã biết; tiếp đến là các chi *Tilletiopsis* có 5 chủng đều có độ tương đồng thấp so với loài đã công bố (93,3-93,8%), đây có thể là các loài mới của chi này; chi *Sporidiobolus* có 5 chủng tương đồng từ 99,8-100% với 1 loài đã công bố; chi *Hannaella* có 1 chủng thuộc loài đã công bố và 2 chủng có thể thuộc 1 loài mới; chi *Mingxiaea* có 1 chủng thuộc loài đã biết và một chủng nghi ngờ loài mới; chi *Rhodospiridium* có 2 chủng có độ tương đồng cao (99,6-100%) với 2 loài đã công bố; chi *Papiliotrema* có 1 chủng thuộc loài đã công bố, chi *Rhodotorula* có 1 chủng nghi ngờ loài mới (tương đồng 96%); chi

Sakaguchia có 1 chủng thuộc loài đã công bố; có 1 chủng của chi *Sporisorium* thuộc loài đã công bố. Kết quả thu được trong nghiên cứu này tương tự kết quả đa dạng nấm men ở vườn

Quốc gia Phong Nha-Kẻ Bàng [14], vườn Quốc gia Cát Tiên – Lang Biang [15] và sân bay quân sự Đà Nẵng [2].



Hình 4. Vị trí phân loại của nhóm các chủng nấm men thuộc các chi *Sporisorium*, *Pseudozyma*, *Tilletioopsis* và các loài có quan hệ họ hàng gần.



Hình 5. Vị trí phân loại của nhóm các chủng nấm men thuộc các chi *Sporobolomyces*, *Rhodosporidium*, *Sporidiobolus*, *Rhodotorula*, *Sakaguchia* và các loài có quan hệ họ hàng gần.

Mức độ đa dạng loài trên từng loại mẫu trong 44 mẫu thu thập thể hiện như sau:

- 11 mẫu đất: có 7/11 mẫu đất tìm thấy nấm men, gồm 10 chủng thuộc 3 chi: *Cryptococcus* (6 chủng), *Pseudozyma* (2 chủng), *Candida* (2 chủng).

- 12 mẫu rác: có 7/12 mẫu phân lập được nấm men với số lượng 13 chủng, gồm 6 chi: *Candida* (6 chủng), *Pseudozyma* (3 chủng), *Cryptococcus* (1 chủng), *Debaryomyces* (1 chủng), *Sporidiobolus* (1 chủng) và *Galactomyces* (1 chủng).

- Có 20/21 mẫu lá tươi phân lập được nấm men, với 68 chủng thuộc 16 chi: *Sporobolomyces* (14 chủng), *Pseudozyma* (12 chủng), *Cryptococcus* (7 chủng), *Tilletiopsis* (8 chủng), *Hyphopichia* (7 chủng), *Sporidiobolus* (4 chủng), chi *Candida* và *Metschnikowia* (3 chủng), chi *Mingxiaea* và *Rhodosporidium* (2 chủng). Các chi còn lại (*Hanseniaspora*, *Papiliotrema*, *Sakaguchia*, *Sporisorium*, *Rhodotorula* và *Yamadazyma*) đều có 1 chủng.

Bảng 2. Đa dạng nấm men phân lập

STT	Chi	Loài	Số lượng chủng trong loài	Số lượng chủng trong chi
1	<i>Candida</i>	<i>Candida natalensis</i>	1	11 (9 ^b)
		<i>Candida songkhlaensis</i>	1	
		<i>Candida azyma</i>	1	
		<i>Candida sekii</i>	1	
		<i>Candida</i> sp.	7 (5 ^a)	
2	<i>Cryptococcus</i>	<i>Cryptococcus laurentii</i>	6	14 (5 ^b)
		<i>Cryptococcus flavescens</i>	1	
		<i>Cryptococcus podzolicus</i>	4	
		<i>Cryptococcus</i> sp.	1	
		<i>Cryptococcus flavus</i>	2	
3	<i>Debaryomyces</i>	<i>Debaryomyces vanriijiae</i>	1	1 (1 ^b)
4	<i>Galactomyces</i>	<i>Galactomyces</i> sp.	1	1 (1 ^b)
5	<i>Hannaella</i>	<i>Hannaella</i> sp.	3 (2 ^a)	3 (2 ^b)
6	<i>Hanseniaspora</i>	<i>Hanseniaspora thailandica</i>	1	1 (1 ^b)
7	<i>Hyphopichia</i>	<i>Hyphopichia burtonii</i>	7	7 (1 ^b)
8	<i>Metschnikowia</i>	<i>Metschnikowia koreensis</i>	3	3 (1 ^b)
9	<i>Mingxiaea</i>	<i>Mingxiaea</i> sp.	1	2 (2 ^b)
		<i>Mingxiaea foliicola</i>	1	
10	<i>Papiliotrema</i>	<i>Papiliotrema bandonii</i>	1	1 (1 ^b)
11	<i>Pseudozyma</i>	<i>Pseudozyma antarctica</i>	9	17 (5 ^b)
		<i>Pseudozyma parantarctica</i>	3	
		<i>Pseudozyma jejuensis</i>	1 (1 ^a)	
		<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	3	
		<i>Pseudozyma sparsa</i>	1	
12	<i>Rhodospidium</i>	<i>Rhodospidium diobovatum</i>	1	2 (2 ^b)
		<i>Rhodospidium paludigenum</i>	1	
13	<i>Rhodotorula</i>	<i>Rhodotorula</i> sp.	1	1 (1 ^b)
14	<i>Sakaguchia</i>	<i>Sakaguchia dacryoidea</i>	1	1 (1 ^b)
15	<i>Sporidiobolus</i>	<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	5	5 (1 ^b)
16	<i>Sporisorium</i>	<i>Sporisorium everhartii</i>	1	1 (1 ^b)
17	<i>Sporobolomyces</i>	<i>Sporobolomyces bannaensis</i>	10	14 (2 ^b)
		<i>Sporobolomyces gotoanus</i>	4	
18	<i>Tilletiopsis</i>	<i>Tilletiopsis minor</i>	5 (1 ^a)	5 (1 ^b)
19	<i>Yamadazyma</i>	<i>Yamadazyma nakazawae</i>	1	1 (1 ^b)
Tổng cộng			91 (13 ^a)	91 (39 ^b)

^a Số loài nghi ngờ là loài mới (tương đồng < 98% trình tự rADN 26S đoạn D1/D2 so với loài gần nhất trong ngân hàng gen).

^b Số lượng loài

4. Kết luận

1. Phân lập được 91 chủng nấm men từ 44 mẫu (11 mẫu đất, 12 mẫu rác thực vật và 21 mẫu lá tươi) thu thập từ Khu bảo tồn Mã Đà. Số lượng chủng nấm men phân lập được nhiều

nhất ở các mẫu lá tươi, trung bình 3,4 chủng/mẫu, trong khi đó mẫu đất và rác thực vật có số lượng nấm men phân lập được thấp hơn nhiều với tỉ lệ lần lượt là 1,4 và 1,9 chủng/mẫu.

2. Có 59,3% số chủng sinh enzyme phân giải CMC, 28,6% số chủng sinh enzyme phân giải tributyrin, 28,6% số chủng phân giải tinh bột và 23% số chủng phân giải casein. Khả năng sinh chất kháng sinh kháng vi sinh vật kiểm định không tìm thấy ở các chủng phân lập.

3. Phân loại 91 chủng nấm men dựa vào hình thái khuẩn lạc, tế bào và phân tích trình tự DNAr 26S đoạn D1/D2, chúng thuộc về 19 chi, 39 loài, có 19 chủng nghi ngờ thuộc 13 loài mới. Có 25 chủng thuộc nấm túi với chi *Candida* (11 chủng), chi *Hyphopichia* (7 chủng), chi *Metschnikowia* (3 chủng), *Debaryomyces*, *Galactomyces*, *Hanseniaspora* và *Yamadazyma* (1 chủng); có 66 chủng thuộc nấm đằm, trong đó số chủng thuộc chi *Pseudozyma* chiếm số lượng nhiều nhất (17/91), tiếp đến là các chi *Cryptococcus* và chi *Sporobolomyces* (14 chủng), *Tilletiopsis* và *Sporidiobolus* (5 chủng), *Hannaella* (3 chủng), chi *Mingxiaea* và *Rhodospiridium* (2 chủng), còn lại thuộc các chi *Papiliotrema*, *Rhodotorula*, *Sakaguchia*, *Sporisorium* (1 chủng). Có 21 chủng sinh bào tử bản phân lập được từ 15 mẫu lá tươi thuộc 4 chi (*Mingxiaea*, *Hannaella*, *Sporobolomyces*, *Tilletiopsis*) và 6 loài.

4. Trong số 44 mẫu thu thập, mẫu đất có số lượng chủng nấm men phân lập và chi thấp nhất (10 chủng thuộc 3 chi trên 11 mẫu), tiếp theo là mẫu rác thực vật có 13 chủng thuộc 6 chi được phân lập trên 12 mẫu; nhiều nhất trên mẫu lá tươi, có 68 chủng phân lập thuộc 16 chi ở 21 mẫu.

Lời cảm ơn

Công trình được sự hỗ trợ kinh phí từ nhiệm vụ: “Bảo tồn và lưu giữ nguồn gen vi sinh vật” thuộc chương trình Quỹ Gen-Bộ Khoa học và Công nghệ.

Tài liệu tham khảo

- [1] Rosa C., Péter G., Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 2006.
- [2] Đào Thị Lương, Trần Thị Lệ Quyên, Dương Văn Hợp. Nghiên cứu đa dạng sinh học của nấm men phân lập từ lá cây ở vùng ô nhiễm dioxin sân bay quân sự Đà Nẵng. Tạp chí Di truyền và Ứng dụng. Chuyên san Công nghệ Sinh học 4 (2008) 1-8.
- [3] <http://www.office33.gov.vn/frontend/index.php?type>
- [4] Hà Thị Phúc, Đặng Quang Hưng, Phạm Bảo Yên, Nguyễn Quang Huy, Nguyễn Vũ Minh Hạnh, Phan Tuấn Nghĩa. Nghiên cứu sự đa hình di truyền của một số loài thực vật thu thập từ Mã Đà và Cát Tiên (tỉnh Đồng Nai), Tạp chí Di truyền và Ứng dụng, 5 (2000) 11-17
- [5] Đặng Quang Hưng, Nguyễn Quang Huy, Phan Tuấn Nghĩa. So sánh hoạt độ của một số enzyme bảo vệ tổn thương oxy hoá và phổ băng ADN của ốc *Bradybaena similaris* thu thập từ Mã Đà và Cát Tiên, Tỉnh Đồng Nai, Tạp chí Di truyền và Ứng dụng, 2 (2004) 32-38.
- [6] M. F. Landell, J. N. Mautone, P. Valente, Biodiversity of yeasts associated to bromeliads in Itapua Park, Viamao/RS, Microbiologia, 14(2) (2006) 144-149.
- [7] Nguyễn Lân Dũng, Đoàn Xuân Mười, Nguyễn Phùng Tiến, Đặng Đức Trạch, Phạm Văn Ty, Một số phương pháp nghiên cứu Vi sinh vật học, Tập 2, NXB Khoa học kỹ thuật, Hà Nội, 1972.
- [8] D. Yarrow, “Methods for isolation, maintenance and identification of yeasts”, In The Yeasts, a Taxonomic Study, 4th ed. ed. by Kurtzman C. P. and Fell J. W., Elsevier Science Publ., Amsterdam, 1998, 77-100.
- [9] T. Manitis, E. F. Fritsch, J. Sambrook, “Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor laboratory: Cold Spring Harbor”, New York U.S.A., (1982) 187-209.
- [10] C. P. Kurtzman, C. J. Robnnet, “Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences”, Antonie van Leeuwenhoek, 67 (1998) 151-171.
- [11] M. Kimura, A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequence, J. Mol. Evol., 16 (1980) 111-120.

- [12] N. Saitou and M. Nei, "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees", *Mol. Biol. Evol.*, 4 (1987) 406-425.
- [13] D. T. Luong, M. Takasima, P. V. Ty, N. L. Dung, T. Nakase, Ballistoconidiogenous yeasts living in the phyllosphere in Vietnam, In International conference on Asian Network on Microbial Research, Chiang Mai, Nov., (1999) 854-861.
- [14] D.T. Luong, P.T.T. Mai, T.T.L. Quyên, D.V. Hop, Study on biodiversity of yeasts isolated in samples, collected in Phongnha-Kebang National Park, 6th ACM meeting-Hanoi, (2009) 63-70.
- [15] Trần Thị Lệ Quyên, Đào Thị Lương, Hà Thị Hằng, Dương Văn Hợp. Nghiên cứu đa dạng nấm men phân lập tại vườn quốc gia Cát Tiên và núi Lang-Biang-Lâm Đồng. Hội nghị khoa học toàn quốc về sinh thái và tài nguyên Vi sinh vật lần thứ 4; Hà Nội 21/10/2011, NXB Nông Nghiệp, 2011, trang 841-851.

Study on yeast diversity isolated from Ma Da conservation area (Dong Nai)

Trần Thị Lệ Quyên, Đào Thị Lương, Hà Thị Hằng, Dương Văn Hợp

*Institute of Microbiology and Biotechnology, Vietnam National University, Hanoi,
144 Xuân Thủy Str., Cầu Giấy Dist., Hanoi, Vietnam*

91 yeast strains were isolated from 44 samples (11 soil samples, 12 litter samples and 21 leaf samples) collected in Ma Da conservation area. The majority of isolated yeasts was in leaf samples, averaging 3.4 strains / sample. In soil and litter samples, the numbers of isolated yeast strains were much lower, 1.4 and 1.9 strains/sample, respectively.

Extracellular enzymes and antibiotics production abilities of the 91 isolated yeast strains were tested. There were 59.3%, 28.6%, 28.6% and 23% isolates producing CMCCase, lipase, amylase and protease, respectively. In general, all 91 isolated yeast strains degrade at least one of the tested substrates, but the activities were not strong (diameters of the clearing zones were less than 20 mm). There was no strain producing antibiotic against tested microorganisms (*Bacillus subtilis*, *Candida albican*, *Escherichia coli* and *Fusarium oxysporum*).

Phylogenetic trees constructed using sequences of D1/D2 domain of 26S rDNA demonstrated 91 strains belong to 19 genera, 39 species, of which 13 were suspected as new species. 25 strains are Ascomycetous yeasts belonging to genera *Candida* (11 strains), *Hyphopichia* (7 strains), *Metschnikowia* (3 strains), *Debaryomyces*, *Galactomyces*, *Hanseniaspora* and *Yamadazyma* (1 strain), 66 strains belong to Basidiomycetous yeasts, in which the genus *Pseudozyma* is major (17 strains), followed by the genera *Cryptococcus*, *Sporobolomyces* (14 strains), and *Sporidiobolus Tilletiopsis* (5 strains), *Hannaella* (3 strains), *Mingxiaea* and *Rhodospordium* (2 strains), the others belong to the genera *Papiliotrema*, *Rhodotorula*, *Sakaguchia*, *Sporisorium* (1 strain). Of 91 strains, 21 ballistoconidia producing strains isolated from 15 leaf samples belong to 4 genera (*Mingxiaea*, *Hannaella*, *Sporobolomyces*, *Tilletiopsis*) and 6 species.

Keywords: Ma Da, yeast, diversity, 26S rDNA.