

ĐỊNH DANH CHỦNG *Bacillus* sp.HN16 VÀ *Aspergillus* sp.HN18 PHÂN LẬP TỪ KHÔNG KHÍ MÔI TRƯỜNG LAO ĐỘNG

VŨ DUY THANH

Viện Nghiên cứu Khoa học kỹ thuật Bảo hộ lao động

NGUYỄN THẾ TRANG

Viện Công nghệ sinh học,

Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Trong không khí, ngoài bụi là thành phần chính, còn có các vi sinh vật như vi khuẩn, nấm mốc, các thành phần này có liên quan mật thiết với nhau như nồng độ bụi, bụi sinh học càng nhiều thì số lượng vi sinh vật càng nhiều. Vi sinh vật trong không khí gồm rất nhiều loại khác nhau như cầu khuẩn gây bệnh, trực khuẩn lao, trực khuẩn bạch hầu và các vi khuẩn khác. Quan trắc vi sinh vật trong không khí là một cách để dự phòng và định hướng những nguy cơ tiềm ẩn gây ra bởi ô nhiễm sinh học trong không khí [5; 6; 7]. Điều kiện ngoại cảnh và điều kiện thời tiết có ảnh hưởng rất nhiều tới tình trạng và số lượng vi sinh vật trong không khí. Việt Nam thuộc vùng khí hậu nhiệt đới ẩm và ẩm, nhưng khí hậu các vùng có khác nhau, miền Bắc thuộc vùng khí hậu nhiệt đới ẩm, ẩm, miền Trung thuộc vùng nhiệt đới gió mùa, vùng phía nam có khí hậu nhiệt đới Xavan (có mùa khô và mùa mưa rõ rệt). Sự đa dạng này tạo ra sự phân bố số lượng các vi sinh vật trong không khí khác nhau rất nhiều. Tùy theo từng mùa có sự phát triển nhanh của từng loại vi khuẩn hay vi nấm gây bệnh và gây ra bệnh dịch hàng loạt. Mùa hè ở khu vực miền Bắc là nắng nóng, kèm độ ẩm cao tạo ra môi trường thuận lợi cho các vi sinh vật gây bệnh phát triển, như viêm phổi, cảm cúm và nhiều bệnh khác nữa [1; 8]. Bài báo này trình bày định danh hai chủng vi khuẩn hiếu khí và nấm mốc trong số các chủng phân lập được từ không khí ở môi trường của công ty sản xuất thức ăn gia súc.

I. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Vật liệu nghiên cứu

+ Chủng vi khuẩn *Bacillus* sp.HN16 và chủng nấm mốc *Aspergillus* sp.HN18. Chủng này được phân lập từ mẫu không khí tại Công ty Sản xuất thức ăn chăn nuôi Proconco Hà Nội.

+ Cặp môi cho phân loại vi khuẩn: Pr16F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG; Pr16R: TACGGTTACCTTGTACCGACTT.

+ Cặp môi cho phân loại nấm mốc: NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3'; NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3').

2. Môi trường nuôi cấy

Môi trường MacConkey cơ bản (g/l): Pepton 20; lactoza 10; muối mật 1,5; NaCl 5; thạch 20; nước cất 1.000 ml; pH 6,8 ÷ 7,0, khử trùng 121 °C, 15 phút.

Môi trường TSA (g/l): Pepton 10; Soy 20; thạch 20; nước cất 1.000 ml; pH 6,8 ÷ 7,2 khử trùng 121 °C, 15 phút.

Môi trường Sabouraud (g/l): Pepton 10; glucoza 20; thạch 20; nước cất 1.000 ml; pH 5,4 ÷ 5,8 khử trùng 121 °C, 15 phút.

Môi trường Czapek (g/l): NaNO₃: 3,5; K₂HPO₄: 1,5; MgSO₄: 0,5; KCl: 0,5; FeSO₄: 0,1; glucoza: 80 g; thạch 20; pH 4,5 ÷ 5,5 khử trùng 121 °C, 15 phút.

3. Phương pháp nghiên cứu

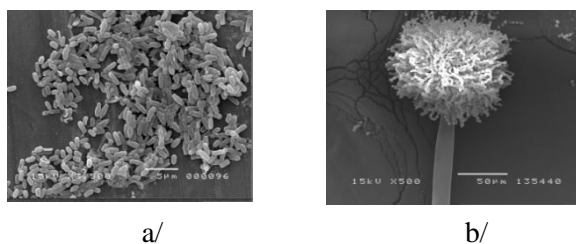
Xác định đặc điểm hình thái tế bào theo Nguyễn Lâm Dũng và cộng sự [3]; Phân loại sơ bộ theo Bergey [4; 8]; Hình thái khuẩn lạc chụp tại Viện 69 thuộc Bộ Tư lệnh Bảo vệ lăng Chủ tịch Hồ Chí Minh; định danh các chủng bằng kỹ thuật phân tử theo Lê Trần Bình và cộng sự [2].

Hai chủng *Bacillus* sp.HN16 và *Aspergillus* sp.HN18 (hình 1) phân lập từ không khí tại Công ty Sản xuất thức ăn gia súc Proconco Hà Nội được dùng làm vật liệu để giải trình tự gen. Phân tích trình tự 16S rARN của chủng *Bacillus* sp.HN16 và 28S rARN của chủng *Aspergillus* sp.HN18 đại diện cho nhóm *Aspergillus*.

Tách chiết ADN tổng số, nhân bản gen đích bằng kỹ thuật PCR, giải trình tự sản phẩm PCR sử dụng các bộ hóa chất, thiết bị theo các quy trình thông dụng.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Đặc điểm hình thái tế bào *Bacillus* sp.HN16 và *Aspergillus* sp.HN18



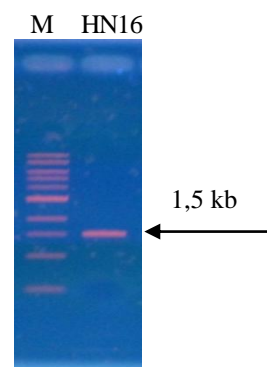
Hình 1: Hình thái tế bào *Bacillus* sp.HN16 (a) và *Aspergillus* sp.HN18 (b)

2. Xác định trình tự 16S rARN chủng *Bacillus* sp.HN16

Kết quả điện di đồ trên hình 2 cho thấy sản phẩm PCR thu được 1 băng rất đặc hiệu. Kích thước phân tử vào khoảng 1,5 kb tương đương với tính toán lý thuyết.

Truy cập ngân hàng gen để tìm những trình tự tương đồng đã đăng ký được thể hiện ở bảng 1.

Kết quả hình 3 và bảng 1 cho thấy chủng *Bacillus* sp.HN16 có độ tương đồng 100 % so với chủng *Bacillus subtilis*. Vì vậy, chủng vi khuẩn *Bacillus* sp.HN16 được đặt tên là *B. subtilis* HN16.



Hình 2: Điện di đồ sản phẩm PCR chủng *Bacillus* sp.HN16 (M: marker)

Bảng 1

Mức độ tương đồng gen 16S từ chủng *Bacillus* sp.HN16 với các trình tự tương đồng ở GenBank

Mã	Thông tin chủng	% tương đồng
AY775778.1	<i>Bacillus subtilis</i> BFAS	100
HQ236379.1	<i>Bacillus subtilis</i> SL9-9	100
EU257436.1	<i>Bacillus subtilis</i> C8-4	99
AB501113.1	<i>Bacillus subtilis</i> A97	99
FJ528074.1	<i>Bacillus</i> sp. BM2	99

Trình tự đoạn gen 16S rARN của chủng *Bacillus* sp.HN16 thể hiện ở hình 3.

```

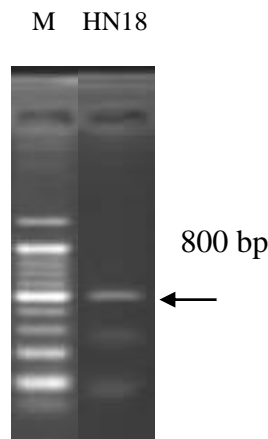
1  tgcgcaagct tagagtttga tctctggctca ggacgaacgc tggcgggcgtg cctaatacat
61  gcaagtcgag cggacagatg ggagcttgct ccctgatggt agcggcgagc ggggtgagtaa
121  cacgtgggta acctgcctgt aagactggga taactccggg aaaccggggc taataccgga
181  tggttgtttg aaccgcatgg ttcagacata aaaggtggct tccgctacca cttacagatg
241  gaccccgggc gcattagcta gttggtgagg taacggctca ccaaggcaac gatgcgtagc
301  cgacctgaga gggtgatcgg ccacactggg actgagacac ggcccagact cctacgggag
361  gcagcagtag ggaatccttc gcaatggacg aaagtctgac ggagcaacgc cgcgtgagtg
421  atgaaggttt tcggatcgtg aagctctggt gttaggggaa aacaagtgcc gttcaaatag
481  ggcggcacct tgacgggtacc taaccagaaa gccacggcta actacgtgcc agcagccgcg
541  gtaatacgtg ggtggcaagc gttgtccgga attattgggc gtaaagggct cgcaggcggt
601  ttcttaagtc tgatgtgaaa gccccggct caaccgggga gggtcattgg aaactgggga
661  acttgagtgc agaagaggag agtggaaattc cacgtgtagc ggtgaaatgc gtagagatgt
721  ggaggaacac cagtggcgaa ggcgactctc tggctctgta ctgacgctga ggagcgaag
781  cgtggggagc gaacaggatt agataccctg gtagtccacg ccgtaaacga tgagtctaa
841  gtgttagggg gtttccgccc cttagtgtcg cagctaacgc attaagcact ccgcctgggg
901  agtacggtcg caagactgaa actcaaagga attgacgggg gcccgcaaa gcgggtggagc
961  atgtggttta attcgaagca acgcaagaa ccttaccagg tcttgacatc ctctgacaat
1021  cctagagata ggacgtcccc ttcgggggca gagtgacagg tggtgcatgg ttgtcgtcag
1081  ctcgtgtcgt gagatgttgg gttaaagtccc gcaacgagcg caaccctga tcttagttgc
1141  cagcattcag ttgggcactc taaggtgact gccggtgaca aaccggagga aggtggggat
1201  gacgtcaaat catcatgcc cttatgacct gggctacaca cgtgctaaa tggacagAAC
1261  aaaggcagc gaaccgcga ggttaagcca atcccacaaa tctgttctca gttcggatcg
1321  cagtctgcaa ctcgactgcg tgaagctgga atcgctagta atcgcggtac agcatgccgc
1381  ggtgaatacg ttcccgggccc ttgtacacac cgcccgtcac accacgagag tttgtaaac
    
```

Hình 3: Trình tự nucleotit 16S rARN của chủng *Bacillus* sp.HN16

3. Xác định trình tự 28S rARN chủng *Aspergillus* sp.HN18

Hình 4 trình bày kết quả điện di sản phẩm PCR khi nhân bản gen 28S rARN của chủng *Aspergillus* sp.HN18.

Hình 4: Điện di đồ sản phẩm PCR chủng *Aspergillus* sp.HN18 (M: marker)



Bảng 2

Mức độ tương đồng gen 28S rARN từ chủng *Aspergillus* sp.HN18 với các trình tự tương đồng ở GenBank

Mã	Thông tin chủng	% tương đồng
PRJNA19263	<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88	100
AM270052.1	<i>Aspergillus niger</i> contig An03c0100	100
FJ345354.1	<i>Paecilomyces variotii</i> ATCC 10865	99
JN642222.1	<i>Penicillium solitum</i> 20-01	99

Trình tự gen 28S rARN của chủng *Aspergillus* sp.HN18 được thể hiện ở hình 5.

1	tgacctcgga	tcaggtaggg	ataccgctg	aacttaagca	tatcaataag	cggaggaaaa
61	gaaaccaacc	gggattgcct	cagtaacggc	gagtgaagcg	gcaagagctc	aaatttgaaa
121	gctggctcct	tcggagtcgg	cattgtaatt	tcagaggat	gctttgggtg	cggccccgct
181	ctaagtgcc	tggaacgggc	cgtcagagag	ggtgagaatc	ccgtcttggg	cggggtgtcc
241	gtgccgtgt	aaagtcctt	cgacgagtcg	agttgtttgg	gaatgcagct	ctaaatgggt
301	ggtaaatctt	atctaaagct	aaatactggc	cggagaccga	tagcgcacaa	gtagagtgat
361	cgaaagatga	aaagcacttt	gaaaagagag	ttaaacagca	cgtgaaattg	ttgaaaggga
421	agcgcttgcg	accagactcg	cccgcggggt	tcagccggca	ttcgtgcccg	tgtacttccc
481	cgtggcggg	ccagcgtcgg	tttgggcggc	cgggtcaaagg	ccctggaat	gtagtgcct
541	ccggggcacc	ttatagccag	gggtgcaatg	cggccagcct	ggaccgagga	acgcgcttcg
601	gcacggacgc	tggcataatg	gtcgtaaacg	acccgtcttg	aaacacggac	caaggagtct
661	aacatctacg	cgagtgttcg	ggtgtcaaac	ccgtgcgcgc	agtgaaagcg	aacggagggtg
721	ggagccccct	tgccggggcgc	accatcgacc	gatcctgatg	tcttcggatg	gatttgagta
781	agagcgtagc	tgtggggacc	cgaaagatgg	tgaactatgc	ctgaataggg	cgaaaccaga

Hình 5: Trình tự nucleotit 28S rARN của chủng *Aspergillus* sp.HN18

Kết quả so sánh trình tự gen ở hình 5 và bảng 2 cho thấy chủng *Aspergillus* sp.HN18 thể hiện mức độ tương đồng cao về trình tự nucleotit của đoạn gen 28S rARN so với trình tự tương đồng thuộc loài *A. niger* (100%). Nên chủng *Aspergillus* sp.HN18 được đặt tên loài là *A. niger* và ký hiệu *A. niger* HN18.

III. KẾT LUẬN

Đã giải được trình tự gen 16S rARN và 28S rARN của hai chủng vi khuẩn *Bacillus* sp.HN16 và vi nấm *Aspergillus* sp.HN18 phân lập được trong không khí môi trường lao động tại Công ty Sản xuất thức ăn chăn nuôi Proconco tại Hà Nội. So sánh mức độ tương đồng của hai trình tự này với các trình tự tương đồng trên Genbank cho thấy *Bacillus* sp.HN16 tương đồng 100% với một chủng *Bacillus subtilis*, nên được đặt tên là *B. subtilis* HN16. Tương tự, trình tự gen 28S rARN từ chủng nấm *Aspergillus* sp.HN18 tương đồng 100% với trình tự của một chủng nấm *A. Niger*, nên được đặt tên là *A. niger* HN18.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Abidin, A. S. Z., A. M. Leman, N. M. R. Noraini, M.D. A. Abdullah**, 2013. "Comparative Study on Airborne Microbe in Different Phases of Building Commissioning for Indoor Air Quality Improvement" ARPN Journal of Science and technology, 3 (6).
2. **Lê Trần Bình, Phan Văn Chi, Nông Văn Hải, Trương Nam Hải, Lê Quang Huân**, 2003. Áp dụng các kỹ thuật phân tử trong nghiên cứu sinh vật Việt Nam, Nxb. KHKT, Hà Nội.
3. **Nguyễn Lâm Dũng, Phạm Thị Trân Châu, Nguyễn Thanh Hiền, Lê Đình Lương, Đoàn Xuân Mượu**, 1978. Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học, Tập III, Nxb. KHKT, Hà Nội.
4. **Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley, S. T. Williams**, 1986. Bergey's manual of Systematic Bacteriology, 9th Edition, 2.
5. **Trịnh Quỳnh Mai, Nguyễn Thanh Thủy, Trần Quang Bình, Phan Trọng Lâm**, 2010. "So sánh kết quả phát hiện vi sinh vật trong không khí giữa phương pháp đặt đĩa thạch và sử dụng máy hút mẫu không khí", Tạp chí Y học dự phòng, XX, 5 (113): 106-110
6. **Nguyễn Đình Nga**, 2012. Khảo sát mức độ nhiễm nấm mốc và aflatoxin trong một số dược liệu bán ở Quận 5 - Thành phố Hồ Chí Minh. Nghiên cứu Y học - Y học TP Hồ Chí Minh, 16 (1): 93-96.

7. **Đào Thiện, Trần Thanh Hòa, Nguyễn Thị Bích Thủy, Trần Thị Lan Hương**, 2012. Mô hình hóa với các loại nấm mốc. Tạp chí Khoa học và Phát triển 10 (5): 792-797.
8. **WHO**, 2009. Who guidelines for indoor air quality: Dampness and mould, ISBN 978 92 890 4168 3.

**IDENTIFICATION *Bacillus* sp.HN16 AND *Aspergillus* sp.HN18 SPECIES
ISOLATE FORM IN THE AIR WORKING ENVIROMENT**

VU DUY THANH, NGUYEN THE TRANG

SUMMARY

Air pollution is increasing rapidly and cause severe consequences, infectious pathogens more than. Research microorganisms present in the air is very important, the workers exposed usually to air with high microbial density, increased risk of infection. Correctly identifying microorganisms in the air of hazardous strains, toxins are very important in the room, to avoid risk to workers. In the framework of this paper presents the content determine the genetic sequences of *Bacillus* sp.HN16 bacteria and *Aspergillus* sp.HN18 fungi isolated in Feed Company Proconco at Hanoi. Result after sequenced *Bacillus* sp.HN16 have 100 % the degree of similarity with *Bacillus subtilis* species, and *Aspergillus* sp. HN18 have 100 % the degree of similarity with *Aspergillus niger* species on GenBank.