

**ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC ĐIỀU KIỆN LÊN MEN LÊN KHẢ NĂNG
SINH CHẤT KHÁNG SINH KHÁNG NẤM *FUSARIUM OXYSPORUM*
CỦA HAI CHỦNG XẠ KHUẨN *STREPTOMYCES CYANOGRICEUS* HD54
VÀ *STREPTOMYCES HYGROSCOPICUS* HD58**

LÊ THỊ THANH XUÂN

Viện Công nghệ sinh học

TẶNG THỊ CHÍNH

Viện Công nghệ môi trường

Ở Việt Nam, một nước nhiệt đới nóng ẩm, các bệnh do nấm gây ra gây thiệt hại nghiêm trọng cho mùa màng. Việc sử dụng thuốc hóa học để trừ nấm thường là độc, nếu thuốc còn tồn dư trong đất, nước và nông sản sẽ ảnh hưởng đến sức khỏe của con người, gây ô nhiễm môi trường sống và làm mất cân bằng sinh thái. Vì vậy, đấu tranh sinh học (Biocontrol) chống bệnh ở thực vật đã được Hội nghị tư vấn khu vực châu Á - Thái Bình Dương của FAO năm 1992 khẳng định là nền tảng của Chương trình quản lý thống nhất các bệnh dịch. Một trong các biện pháp đấu tranh sinh học là sử dụng một hay nhiều loại vi sinh vật để kiểm chế bệnh ở thực vật sinh ra từ đất [4, 5, 6].

Ở Việt Nam, đã có nhiều công trình khoa học nghiên cứu và ứng dụng các biện pháp đấu tranh sinh học trong bảo vệ thực vật [2]. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày các kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của một số điều kiện lên men đến sự sinh trưởng, phát triển và khả năng sinh chất kháng sinh kháng nấm *Fusarium oxysporum* gây bệnh thối cổ rễ ở thực vật của hai chủng xạ khuẩn *Streptomyces cyaneograceus* HD54 và *S. hygroscopicus* HD58 phân lập từ mẫu đất ở Việt Nam.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vi sinh vật

- Hai chủng xạ khuẩn *S. cyaneograceus* HD54 và *S. hygroscopicus* HD58 được phân lập từ mẫu đất ở tỉnh Hải Dương [1].

- Nấm *Fusarium oxysporum* Fo47, được nhận từ phòng Công nghệ lên men - Viện Công nghệ sinh học, là loài nấm gây bệnh thối cổ rễ ở thực vật.

2. Môi trường

Grauze 1, A-4, A-4H, A-9, A-12, Czapek, Czapek-Dox.

3. Phương pháp

- Xác định hoạt tính kháng sinh [2].
- Định lượng kháng sinh theo bảng xác định hoạt tính sinh học của các chất kháng sinh của Dmitrieva [3].

- Xác định chất kháng sinh nội bào, ngoại bào [2]: lấy 10 ml dịch nuôi cấy để ly tâm ở 3000 vòng/phút trong 20 phút; phần sinh khối ở dưới được chiết 2 lần (mỗi lần 5 ml) bằng dung môi a-xê-ton ở 45°C trong 30 phút. Sau đó, ly tâm để loại sinh khối và trộn 2 lần chiết thành 10 ml dung môi mỗi loại. Dịch lọc được bổ sung các loại dung môi không hoà tan như bu-ta-nol, clo-rô-phoóc với tỷ lệ 4: 6 và lắc định kỳ; sau 24 giờ dùng phễu chiết tách dung môi. Kiểm tra hoạt tính kháng sinh của dung môi chiết từ sinh khối, dung môi chiết từ dịch lọc và dịch đã chiết dung môi.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên sự sinh trưởng, phát triển và khả năng sinh tổng hợp chất kháng sinh của 2 chủng xạ khuẩn HD54 và HD58

Để nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ lên sự sinh trưởng, phát triển và khả năng sinh chất kháng sinh của 2 chủng HD54 và HD58, chúng tôi sử dụng các thang nhiệt độ như sau: 20°C, 30°C, 37°C và 45°C. Hai chủng xạ khuẩn được

nuôi trong môi trường Gauze1 lỏng trên máy lắc tròn 220 vòng/phút, ở 30°C kéo dài trong 120 giờ. Kết quả xác định sinh khối khô và hoạt tính kháng sinh bằng phương pháp giếng thạch được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1

Ảnh hưởng của nhiệt độ lên sự sinh trưởng, phát triển và khả năng sinh tổng hợp chất kháng sinh của hai chủng xạ khuẩn HD54 và HD58

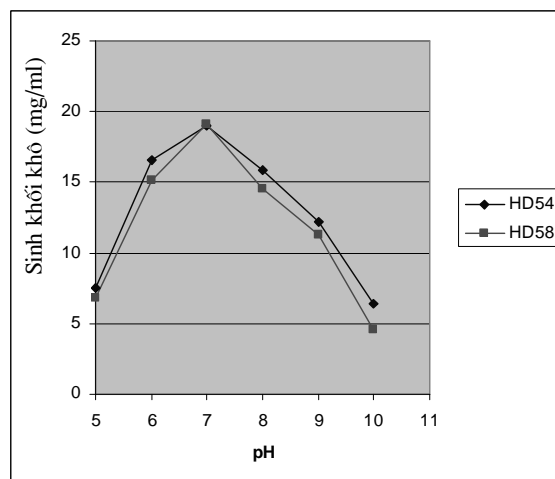
Nhiệt độ nuôi cấy	Sinh khối khô (mg/ml)		Đường kính của vòng ức chế <i>F. oxysporum</i> Fo.47 (D - d) mm	
	HD54	HD58	HD54	HD58
25°C	14,54	15,23	15	20
30°C	18,4	19,0	22	25
37°C	11,20	12,45	13	8
45°C	0	0	0	0

Kết quả ở bảng 1 cho thấy cả 2 chủng xạ khuẩn HD54 và HD 58 đều sinh trưởng và phát triển tốt nhất ở 30°C, còn ở 25°C và 37°C chúng phát triển yếu hơn và không có khả năng sinh trưởng ở 45°C. Điều đó cho thấy cả 2 chủng xạ khuẩn HD54 và HD 58 thuộc nhóm vi sinh vật ưa ấm. Hoạt tính kháng sinh của 2 chủng này cũng phụ thuộc vào nhiệt độ nuôi cấy, khi nuôi ở 30°C, cả 2 chủng xạ khuẩn sinh chất kháng sinh ức chế nấm *F. oxysporum* Fo.47 mạnh nhất. Như vậy, nhiệt độ 30°C là nhiệt độ thích hợp nhất cho sự sinh trưởng và khả năng sinh chất kháng sinh ức chế nấm *F. oxysporum* Fo.47 của 2 chủng xạ khuẩn này. Vì vậy, chúng tôi chọn nhiệt độ 30°C để nuôi cấy trong các nghiên cứu tiếp theo.

2. Ảnh hưởng của pH

Thang pH được lựa chọn để nghiên cứu từ pH5 đến pH10. Các chủng xạ khuẩn được nuôi trong môi trường Gauze1 lỏng trên máy lắc tròn 220 vòng/phút, ở nhiệt độ 30°C trong 120 giờ. Xác định các thông số lên men và khả năng sinh chất kháng sinh kháng nấm *F. oxysporum* Fo.47 bằng phương pháp giếng thạch. Kết quả được trình bày ở bảng 2 và hình 1.

Kết quả ở hình 1 và bảng 2 cho thấy 2 chủng xạ khuẩn HD54 và HD58 trưởng mạnh nhất ở pH = 7 và nếu giá trị của pH càng cao thì khả năng sinh trưởng của chúng càng yếu. Tuy nhiên, các chủng này có khả năng phát triển được trên môi trường kiềm (pH = 9).



Hình 1. Ảnh hưởng của pH tới sự sinh trưởng của 2 chủng HD 54 và HD 58

Kết quả ở bảng 2 cũng cho thấy khi nuôi 2 chủng xạ khuẩn trên các môi trường có pH khác nhau thì khả năng sinh chất kháng sinh kháng nấm *F. oxysporium* Fo.47 cũng rất khác nhau; trong môi trường pH = 7, chúng sinh chất kháng sinh ức chế nấm mạnh nhất và hoạt tính kháng nấm giảm dần khi pH tăng dần hoặc giảm dần. Đối với chủng HD54, khi tăng pH ban đầu của môi trường đến 9 thì hoạt tính kháng nấm không còn; còn đối với chủng HD58, hoạt tính kháng nấm tuy giảm, nhưng vẫn còn ở mức cao. Điều đó chứng tỏ rằng chủng HD58 có khả năng chịu kiềm tốt hơn chủng HD54. Từ các kết quả nghiên cứu trên, pH ban đầu của môi trường

nuôi cấy thích hợp nhất cho sự sinh trưởng, phát triển và khả năng sinh kháng sinh của 2 chủng

xạ khuẩn này là pH = 7. Vì vậy, chúng tôi chọn pH = 7 cho các nghiên cứu tiếp theo.

Bảng 2

Ảnh hưởng của pH lên sự sinh trưởng và khả năng sinh chất kháng sinh kháng *F. oxysporum* Fo.47 của 2 chủng xạ khuẩn HD54 và HD58

pH	Sinh khối khô (mg/ml)		Đường kính của vòng ức chế nấm <i>F. oxysporum</i> Fo.47 (D - d) mm	
	HD54	HD58	HD54	HD58
5	7,55	6,78	10	13
6	16,55	15,15	28	32
7	19,05	19,7	32	35
8	15,9	12,45	17	30
9	11,15	10,25	0	27
pH	6,45	4,57	0	0

3. Lựa chọn môi trường lên men thích hợp của 2 chủng xạ khuẩn HD54 và HD58

Theo kết quả nghiên cứu trong nhiều năm về xạ khuẩn sinh chất kháng sinh của Porter, ông đã lựa chọn 4 môi trường lên men cơ bản để nghiên cứu khả năng sinh tổng hợp chất kháng sinh của các chủng xạ khuẩn là: A-4, A-4H, A-9 và A-12 [3]. Từ các môi trường cơ sở này, có thể lựa chọn môi trường thích hợp cho 2 chủng xạ khuẩn HD54 và HD58. Dựa vào kết quả nghiên cứu pH và nhiệt độ của 2 chủng này, chúng tôi tiến hành lên men trên các môi trường cơ sở để

chọn môi trường lên men thích hợp.

Chủng xạ khuẩn được hoạt hoá trên môi trường thạch nghiêng và nhân giống trên môi trường Gause 1 dịch thể. Sau 48 giờ nuôi trên máy lắc tròn, giống phát triển tốt được cấy truyền 5% sang các môi trường lên men cơ bản: A-4, A-4H, A-9 và A-12. Tiếp theo đó, bình lên men được nuôi trên máy lắc tròn 220 vòng/phút kéo dài trong 120 giờ. Kết quả xác định pH, lượng sinh khối và hoạt tính kháng nấm *F. oxysporum* Fo.47 của 2 chủng xạ khuẩn HD54 và HD58 được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3

Khả năng sinh trưởng và hoạt tính kháng nấm của 2 chủng xạ khuẩn HD54 và HD58 khi lên men trên 4 môi trường cơ bản

Môi trường lên men	Sinh khối khô (mg/ml)		Đường kính của vòng ức chế nấm <i>F. oxysporum</i> Fo.47 (D - d) mm	
	HD54	HD58	HD54	HD58
A- 4	12,23	17,592	20	25
A- 4H	10,83	13,304	22	24
A- 9	7,35	8,43	10	10
A-12	15,56	20,32	28	30

Kết quả trình bày ở bảng 3 cho thấy 2 chủng xạ khuẩn HD54 và HD58 khi lên men trên môi trường A-12 đều phát triển tốt nhất và sinh chất kháng sinh kháng nấm *F. oxysporum* Fo.47 mạnh nhất. Vì vậy, chúng tôi lựa chọn môi trường A-12 để tiếp tục nghiên cứu thu nhận

chất kháng sinh.

4. Động thái lên men của 2 chủng xạ khuẩn HD54 và HD58 trên môi trường A-12

Từ những kết quả nghiên cứu trên, chúng tôi đã chọn môi trường A-12, pH = 7 để nuôi lắc

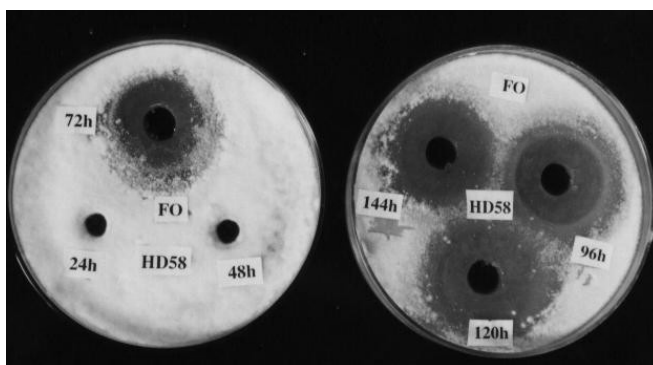
220 vòng/phút ở nhiệt độ 30°C để nghiên cứu động thái lên men sinh chất kháng sinh kháng

nấm *F. oxysporum* Fo.47 của 2 chủng HD54 và HD58. Kết quả được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4

Động thái lên men của 2 chủng xạ khuẩn HD54 và HD58 trên môi trường A-12

Chủng xạ khuẩn		Thời gian lên men (giờ)							
		0	24	48	72	96	120	144	168
HD54	pH của dịch nuôi cấy	7,0	6,23	6,18	6,54	6,51	6,59	6,77	5,56
	Hoạt tính kháng nấm Fo.47	-	-	-	15,6	27,5	34	30,8	26
	Sinh khối khô (mg/ml)	-	10,73	14,13	19,59	24,03	17,12	16,74	16,64
HD58	pH của dịch nuôi cấy	7,0	6,72	6,64	6,68	7,05	7,23	6,00	5,67
	Hoạt tính kháng nấm Fo.47	-	-	-	22,5	33	35,5	30,5	28
	Sinh khối khô (mg/ml)	-	13,27	18,33	24,32	32,93	30,77	27,1	23,36



Hình 2. Hoạt tính kháng nấm *F. oxysporum* Fo.47 của chủng HD58 trong quá trình lên men

Như chúng ta đã biết, sự sinh trưởng và phát triển của các chủng xạ khuẩn trong quá trình lên men mang đặc tính của từng chủng và có liên quan chặt chẽ đến khả năng sinh tổng hợp kháng sinh của chúng. Kết quả ở bảng 4 cho thấy sinh khối của 2 chủng xạ khuẩn HD54 và HD58 bắt đầu tăng nhanh từ giờ thứ 24 của quá trình lên men và đạt cực đại ở giờ thứ 96, sau đó giảm dần. Điều này liên quan chặt chẽ đến sự hình thành các axit hữu cơ trong môi trường và sự sinh trưởng của xạ khuẩn. Sự sinh trưởng của xạ khuẩn đạt cực đại ở giờ thứ 96 và giảm dần trong cả quá trình lên men tiếp theo, bởi sau 96 giờ lên men, khuẩn ty của xạ khuẩn bị phân đoạn và tự phân, dẫn đến lượng sinh khối giảm.

Hai chủng xạ khuẩn HD54 và HD58 bắt đầu

sinh tổng hợp chất kháng sinh kháng nấm *F. oxysporum* Fo.47 sau 48 giờ lên men và tăng nhanh từ 72 giờ đến 96 giờ, đạt cực đại ở giờ thứ 120, sau đó giảm dần nếu tiếp tục nuôi cấy. Như vậy, pha sinh chất kháng sinh xảy ra chậm hơn so với pha sinh trưởng của 2 chủng xạ khuẩn này.

Trong quá trình lên men, pH của dịch nuôi cấy giảm dần trong 48 giờ đầu và bắt đầu tăng dần từ 48 giờ đến 120 giờ, sau đó lại giảm dần cho đến khi kết thúc quá trình lên men.

5. Tính chất kháng sinh của 2 chủng xạ khuẩn HD54 và HD58

Hai chủng xạ khuẩn HD54 và HD58 được nuôi lactic ở 220 vòng/phút trong 120 giờ, sau đó

đem ly tâm để thu sinh khối và dịch ly tâm. Chúng tôi dùng bu-ta-nol để chiết rút chất kháng sinh từ dịch ly tâm và dùng a-xê-ton để chiết rút chất kháng sinh từ sinh khối của xạ

khuẩn. Kết quả xác định hoạt tính kháng nấm *F. oxysporum* Fo.47 của chất kháng sinh được chiết rút từ dịch nuôi cấy và từ sinh khối của 2 chủng xạ khuẩn được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5

Hoạt tính của chất kháng sinh kháng nấm *F. oxysporum* Fo.47 được tách chiết từ sinh khối và từ dịch nuôi cấy 2 chủng xạ khuẩn HD54 và HD58

Chủng xạ khuẩn	Đường kính của vòng ức chế nấm <i>F. oxysporum</i> Fo.47 (D - d) mm	
	Sinh khối	Dịch nuôi cấy
HD 54	33	0
HD 58	35,5	0

Kết quả ở bảng 5 cho thấy chất kháng sinh kháng nấm *F. oxysporum* Fo.47 của 2 chủng HD54 và HD58 chỉ có trong dịch tách chiết từ sinh khối của xạ khuẩn, không có trong dịch nuôi cấy xạ khuẩn. Như vậy, chất kháng sinh kháng nấm *F. oxysporum* Fo.47 chỉ nằm trong sinh khối của 2 chủng xạ khuẩn này.

từ 48 giờ đến 120 giờ lên men, sau đó lại giảm dần cho đến khi kết thúc quá trình lên men (144 giờ).

4. Chất kháng sinh kháng nấm *F. oxysporum* Fo.47 của 2 chủng xạ khuẩn *S. cyaneogriseus* HD54 và *S. hygroscopicus* HD58 chỉ nằm trong sinh khối của 2 chủng xạ khuẩn này.

III. KẾT LUẬN

1. Hai chủng xạ khuẩn *Streptomyces cyaneogriseus* HD54 và *S. hygroscopicus* HD58 được phân lập từ mẫu đất ở Việt Nam, thuộc nhóm vi sinh vật ưa ấm sinh trưởng và sinh tổng hợp chất kháng sinh kháng nấm *Fusarium oxysporum* Fo.47 ở nhiệt độ từ 25°C - 37°C. Nhiệt độ tốt nhất cho sự sinh trưởng và khả năng sinh tổng hợp chất kháng sinh của chúng là 30°C với pH ban đầu của môi trường là 7.

2. Môi trường lên men thích hợp cho sự sinh trưởng và khả năng sinh tổng hợp chất kháng sinh kháng nấm *F. oxysporum* Fo.47 của hai chủng xạ khuẩn *S. cyaneogriseus* HD54 và *S. hygroscopicus* HD58 là môi trường A-12. Trong quá trình lên men, sinh khối của hai chủng xạ khuẩn này bắt đầu tăng nhanh từ giờ thứ 24 và đạt cực đại ở giờ thứ 96, sau đó giảm dần. Chúng bắt đầu sinh tổng hợp chất kháng sinh kháng nấm *F. oxysporum* Fo.47 sau 48 giờ lên men và đạt cực đại ở giờ thứ 120. Như vậy, pha sinh chất kháng sinh xảy ra chậm hơn so với pha sinh trưởng của 2 chủng xạ khuẩn này.

3. Trong quá trình lên men, pH của dịch nuôi cấy giảm dần trong 48 giờ đầu và tăng dần

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Tăng Thị Chính và cs.**, 2005: Tạp chí Sinh học, 27(1): 39-43, Hà Nội.
2. **Lê Gia Hy**, 1994: Nghiên cứu xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces* sinh chất kháng sinh chống nấm gây bệnh đạo ôn và thối cổ rễ phân lập ở Việt Nam, Luận án Phó tiến sỹ.
3. **Porter N.**, 1975: Methods in Enzymology, XVIII: 3-23.
4. **Shen Y. Ch.**, 1992: Development and application of agricultural antibiotic jinggangmycin in China. FAO regional expert consultation on biological control of plant diseases, Hangzhou, China.
5. **Yuan-bod**, 1992: Development of biological control of plant diseases in Asia-pacific region. FAO regional expert consultation of plant diseases, Hangzhou, China.
6. **Zhang I. X.**, 1992: FAO regional Expert consultation of plant diseases, Hangzhou, China.

**INFLUENCES OF FERMENTATION CONDITIONS ON
THE BIOSYNTHESIS CAPACITE OF ANTIBIOTICS AGAINST *FUSARIUM
OXYSPORUM* OF TWO *STREPTOMYCES* STRAINS *STREPTOMYCES
CYANEOGRICEUS* HD54 AND *STREPTOMYCES HYGROSCOPICUS* HD58**

LE THI THANH XUAN, TANG THI CHINH

SUMMARY

Two strains *Streptomyces cyaneogriceus* HD54 and *S. hygroscopicus* HD58 were isolated from soil samples in Vietnam. They produced antibiotic against the fungus *F. oxysporum* Fo47. These strains were mesophilic microorganisms and their growth temperature were about 25°C-37°C. The optimum temperature for their growth and their antibiotic biosynthesis was 30°C in the media with pH = 7. The medium A-12 was suitable for their growth and their antibiotic biosynthesis, with incubation temperature at 30°C and shaker rate of 220 rpm/min. The A-12 medium contained soluble starch, soybean powder, molasses, K₂HPO₄, CaCO₃ and NaCl. These two strains HD54 and HD58 obtained maximum biomass at among 96h cultivation time. They started to biosynthesize antibiotic after 48h of incubation and obtained maximum antibiotic activity against fungus *F. oxysporum* Fo47 after among 120h of incubation. Their antibiotic activity was obtained only inner their mycelium and non-extracted in the liquid medium.

Ngày nhận bài: 4-7-2006