

ĐỊNH LOẠI CHỦNG XẠ KHUẨN *STREPTOMYCES* ĐN-05 SINH CHẤT KHÁNG SINH CÓ HOẠT PHỔ RỘNG ĐƯỢC PHÂN LẬP TỪ ĐẤT TỈNH QUẢNG NAM

ĐỖ THU HÀ

Trường đại học Sư phạm - Đại học Đà Nẵng

Qua quá trình nghiên cứu sự phân bố của khu hệ xạ khuẩn sinh chất kháng sinh ở khu vực Quảng Nam - Đà Nẵng, chúng tôi đã lựa chọn được chủng xạ khuẩn *Streptomyces* ĐN-05 sinh chất kháng sinh có hoạt phổ rộng, chống nấm và vi khuẩn gây bệnh thực vật mạnh, góp phần đảm bảo cho sự cân bằng hệ vi sinh vật và cây trồng trong đất. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày các đặc điểm hình thái, sinh lý, khả năng sinh chất kháng sinh và xác định đến loài chủng xạ khuẩn này.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu

a) Đối tượng

Chủng xạ khuẩn *Streptomyces* ĐN-05 được phân lập từ đất tỉnh Quảng Nam.

Các chủng vi khuẩn kiểm định gồm: *Bacillus subtilis* ATCC 6633; *Staphylococcus aureus* ATCC 1228; *Escherichia coli* ATCC 1283

Các chủng nấm kiểm định:

- Các chủng nấm mốc: *Fusarium oxysporum*; *Aspergillus niger*; *Pyricularia oryzae*

- Các chủng nấm men: *Candida albicans*; *Saccharomyces cerevisiae*

Tất cả các chủng vi sinh vật kiểm định do Phòng Vi sinh vật, Viện Kiểm nghiệm dược liệu và Trung tâm Vi sinh học ứng dụng, Trường đại học Khoa học tự nhiên Hà Nội cung cấp.

b) Hóa chất và dụng cụ

Các loại đường chuẩn: Glucoza; mannoza; fructoza; saccaroza; lactoza; xyloza, do Hãng Merck, CHLB Đức sản xuất.

Các dung môi: n-nutanol, metanol, axeton và benzen của hãng Reachim (Nga).

Giấy sắc ký Whatman No. 1 của Đức sản xuất.

Máy đo pH Mitsubishi của Nhật Bản.

Máy đo phổ tử ngoại UV-VIS 160 A Shimadzu của Nhật Bản sản xuất $\lambda = 200-1100$ nm.

Máy lắc Eroco-MaraLLI IP-55 của Italia.

2. Phương pháp

Lấy mẫu đất và phân lập xạ khuẩn theo phương pháp của Nguyễn Thành Đạt [1].

Phương pháp nghiên cứu đặc điểm sinh học và phân loại xạ khuẩn.

- Nghiên cứu đặc điểm hình thái, đặc điểm nuôi cấy, đặc tính sinh lý, sinh hóa trên 7 môi trường thông dụng [2].

- Xác định vị trí phân loại của các chủng xạ khuẩn nghiên cứu dựa theo khóa phân loại của Krasilnikov, Gauze và cộng sự [7,8].

Có sử dụng bảng màu của Tresner và Backus [10], bảng màu của Bondasev [5].

Phương pháp xác định hoạt tính kháng sinh. Nuôi cấy xạ khuẩn trên môi trường đặc và lỏng Gauze I, Gauze II, ISP4. Sau 5 - 7 ngày xác định hoạt tính kháng sinh bằng phương pháp thổi thạch của Egorov [6].

Xác định giá trị Rf của dịch kháng sinh thô của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* DN-5 trong một số hệ dung môi theo Ishida và cộng sự [3].

Xác định phổ hấp thụ tử ngoại của các chất kháng sinh do xạ khuẩn sinh ra, được tiến hành trên máy đo phổ tử ngoại UV-VIS 160A của Nhật Bản bước sóng $\lambda = 200-1100$ nm theo Ball et al. [4].

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Đặc điểm nuôi cấy và hình thái

Kết quả nghiên cứu đặc điểm nuôi cấy và đặc điểm hình thái của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* ĐN - 05 được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1

Đặc điểm nuôi cấy và đặc điểm hình thái của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* ĐN- 05

TT	Môi trường	Khả năng sinh trưởng	Màu KTKS	Màu KTCC	Sắc tố tan	Hình dạng cuống sinh bào tử	Hình dạng bề mặt bào tử
1	Gauze I	+++	xám trắng, xám	vàng nhạt, trắng	không màu	xoắn, thẳng dài hơi có móc	hình ovan
2	Gauze II	+++	xám, xám trắng	trắng, vàng nhạt	hơi vàng	thẳng dài ít xoắn	nt
3	Czapek nguyên gốc	++	xám	vàng nhạt	nt	nt	nt
4	MPA	++	nt	nt	nt	nt	nt
5	ISP4	+	xám nhạt	trắng, vàng nhạt	nt	nt	nt
6	ISP2	+	nt	nt	nt	nt	nt
7	Saccaroza	+	nt	nt	nt	nt	nt

Ghi chú: +++ mọc tốt
 ++ mọc vừa
 + mọc yếu

KTKS = khuẩn ty khí sinh
 KTCC = khuẩn ty cơ chất

Qua kết quả bảng 1 cho thấy:

+ Chủng *Streptomyces* ĐN - 05 sinh trưởng mạnh trên môi trường Gauze I, Gauze II, mọc vừa trên môi trường Czapek nguyên gốc, MPA và mọc yếu trên môi trường ISP4, ISP2, saccaroza.

+ Sự biến đổi màu sắc của KTKS và KTCC, qua các môi trường, như sau:

KTKS có màu xám, xám trắng trên 7 môi trường mô tả.

KTCC có màu trắng, vàng nhạt trên 7 môi trường mô tả.

- Sắc tố tan lúc đầu không có, sau 8 ngày môi trường ngả sang màu hơi vàng.

- Cuống sinh bào tử trên các môi trường mô tả, có dạng thẳng dài ít xoắn, đôi khi có móc. Bào tử có dạng hình ovan, bề mặt bào tử nhẵn.

2. Đặc điểm sinh lý, sinh hoá

Đặc điểm sinh lý, sinh hoá của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* ĐN-05 được trình bày trong bảng 2.

Qua kết quả bảng 2, chúng tôi nhận thấy:

- Nhiệt độ sinh trưởng tối ưu cho chủng xạ khuẩn *Streptomyces* ĐN-05 là 28° -30°C; pH thích hợp là 7.

- Axit amin đặc trưng của thành tế bào thuộc loại typ I có chứa LL-ADP.

Chủng *Streptomyces* ĐN-05 có hoạt tính enzym amylaza, proteaza, có khả năng khử nitrat, chịu muối tối đa (NaCl) là 5%; không có khả năng sinh sắc tố melanin.

- Khả năng đồng hóa các nguồn cacbon: trên môi trường ISP-9 với các nguồn cacbon của glucoza, mannoza, L arabinoza, fructoza, saccaroza, đều có khả năng đồng hoá. Còn đối với đường lactoza, manitol, đồng hoá yếu không rõ; đường xyloza không có khả năng.

Bảng 2

Đặc điểm sinh lý, sinh hóa của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* ĐN-05

Đặc điểm	Mức độ	Khả năng đồng hóa đường	Mt. độ
- Nhiệt độ sinh trưởng tối ưu (°C)	28 - 30	glucoza	+
- Tỷ lệ thành tế bào	LL - ADP	mannoza	
- pH thích hợp	6,8 - 7,2	larabinoza	+
- Thủy phân tinh bột	+++	fructoza	+
- Đông kết sữa	++	saccaroza	
- Pepton hóa sữa	+	xyloza	+
- Dịch hóa gelatin	+	lactoza	+
- Hình thành sắc tố melanin	-	manitol	-
- Khả năng khử nitrat	+		±
- Khả năng chịu muối tối đa (%NaCl)	5		±

3. Khả năng sinh chất kháng sinh

Khả năng sinh chất kháng sinh của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* ĐN-05 được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3

Hoạt tính kháng sinh của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* ĐN-05 trên một số môi trường cơ bản

Môi trường VSVKDD	Gauze I				Gauze II				ISP4			
	<i>Asp.niger</i>	<i>C. albicans</i>	<i>Bac.subtilis</i>	<i>E.codi</i>	<i>Asp.niger</i>	<i>C.albicans</i>	<i>Bac.subtilis</i>	<i>E.codi</i>	<i>Asp.niger</i>	<i>C.albicans</i>	<i>Bac.subtilis</i>	<i>E.codi</i>
Hoạt tính kháng sinh (D-d, mm)	22	6	17,5	5	23	7	18	6	18	4	16	4

Kết quả bảng 3 cho thấy: Chủng xạ khuẩn *Streptomyces* ĐN-05 có khả năng kháng nấm mốc *Asp. niger* và vi khuẩn Gram (+) rất mạnh, còn đối với nấm men và vi khuẩn Gram (-) có hoạt tính yếu hơn nhiều.

4. Xác định giá trị Rf và phổ hấp thụ tử ngoại của dịch kháng sinh thô của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* ĐN-05

Giá trị Rf của dịch kháng sinh thô của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* ĐN-05 trong một số hệ dung môi

Hệ dung môi	Rf
Butanol : axetic : H ₂ O	0,91
Butanol : bão hòa nước	0,78
Butanol : pyridin : H ₂ O	0,79
Butanol : metanol : H ₂ O	0,64
H ₂ O	0

Bảng 4 Kết quả hấp thụ phổ tử ngoại của dịch kháng sinh thô của chủng *Streptomyces* ĐN-05 là: 318 : 332 : 350.

Dựa vào trị số các điểm hấp thụ cực đại thì chất kháng sinh của chủng *Streptomyces* ĐN-05 thuộc loại kháng sinh pentaen, là một loại kháng sinh quý, có khả năng chống nấm và vi khuẩn gây bệnh thực vật mạnh.

5. Kết quả phân loại

Kết quả so sánh đặc điểm phân loại của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* ĐN-05 với loài xạ khuẩn chuẩn theo khóa phân loại của Krasilnikov [6], khóa phân loại của Gauze và cộng sự [5] và các mô tả của ISP4, được trình bày trong bảng 5.

Bảng 5

So sánh đặc điểm phân loại của chủng *Streptomyces* ĐN-05 và của loài chuẩn theo Krasilnikov 1941; Waksman 1983; Gauze 1983

Các đặc điểm phân loại	Nhóm xám	
	<i>Streptomyces</i> ĐN-05	<i>S. globosus</i>
Màu sắc KTKS	Xám, xám tro , xám trắng	Xám, xám trắng
Màu sắc KTCC	Trắng, hơi vàng nhạt	Trắng, hơi vàng nhạt
Hình dạng cuống sinh bào tử	Thẳng dài hơi lượn sóng, đôi khi có móc	Thẳng dài hơi lượn sóng, đôi khi có móc
Hình dạng và bề mặt bào tử	Hình ovan bề mặt nhẵn	Hình ovan bề mặt nhẵn
Sắc tố tan	Không có hoặc hơi vàng	Không có hoặc hơi vàng
Sự tạo thành melanin	-	-
Khả năng sử dụng đường:		
- D-glucoza	+	+
- Mannoza	+	+
- Fructoza	+	+
- Saccaroza	+	+
- Lactoza	±	+
- Xyloza	-	+
- Manitol	±	±
Hoạt tính kháng sinh	Chống nấm mốc, nấm men và vi khuẩn	Chống nấm mốc, nấm men và vi khuẩn

Ghi chú: + Có khả năng; - không có khả năng; ± có thể có hoặc không

III. KẾT LUẬN

Chủng xạ khuẩn *Streptomyces* ĐN-05 được phân lập từ đất xã Điện Hồng, huyện Điện Bàn, tỉnh Quảng Nam. Chất kháng sinh do chủng này sinh ra có hoạt phổ rộng, chống nấm và vi khuẩn gây bệnh thực vật mạnh. Căn cứ vào các đặc điểm nuôi cấy, hình thái, sinh lý, sinh hóa, chất kháng sinh, hoạt phổ kháng sinh của chúng, dựa theo khóa phân loại của Krasilnikov 1970, Gauze và cộng sự 1983, chúng tôi xác định chủng xạ khuẩn *Streptomyces* ĐN-05 thuộc loài *Streptomyces globosus*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. Nguyễn Thành Đạt và cs., 1974: Tạp chí VSV học, Viện Hàn lâm khoa học Liên Xô, 5: 13 (tiếng Nga)
2. Lê Gla Hy, 1994: "Nghiên cứu xạ khuẩn chi *Streptomyces* sinh chất kháng sinh chống nấm gây bệnh đạo ôn và thối cổ rễ phân lập ở Việt Nam". Luận án tiến sĩ: 3-7, 18-19, 52.
3. Bllnop N. O. A. S Khokhlov., 1970: Bnmanaia Khromatographia antililotilov: 183-190, Nauka M.
4. Ball, S. J. Bassell and A. Mortimer, 1957: J. Gen. Microrobiol, 17: 96-103.
5. Bondaev A. S., 1954: Scala svetor , M.
6. Egorov N. C., 1965: Tách chiết chất kháng sinh của vi sinh vật và phương pháp xác định chất kháng sinh của chúng, Nxb Cao đẳng M; tr. 211 (tiếng Nga)
7. G. F. Gauze et al., 1983: Opredelitelis actinomycetov: 34-45, Nauka, M.
8. Krasilnikov N. A., 1970: Lutchistuc griпки: 73-75, Nauka, M.
9. Shirling E. B, Gott Lieb D., 1966: Intern. J. Syst. Bact., 16(3): 313-340.
10. Tresner H. D et al., 1963: J. Bacteriol. 81: 703-709.

IDENTIFICATION OF THE STREPTOMYCES STRAIN DN-05 PRODUCING ANTIBIOTICS WITH WIDE ACTIVITY ISOLATED FROM THE SOIL OF THE QUANGNAM PROVINCE

DO THU HA

SUMMARY

The *Streptomyces* strain DN-05, isolated from the soil of the Quangnam province, produced antibiotics with wide activity against the fungi and bacteria causing grave diseases in plants.

Basing on the cultural and morphological characteristics, the physiological and biochemical properties and the antibiotic activity of the *Streptomyces* strain DN-05 and according to ISP, Krasilnikov N.A. 1970, Gauze G.F. 1983 classification keys, this strain was identified as *Streptomyces globosus*.

Ngày nhận bài: 26-11-2001