

MỘT SỐ TÍNH CHẤT LÝ HOÁ CỦA CHẤT KHÁNG SINH M115 TÁCH CHIẾT TỪ CHỦNG XẠ KHUẨN *Streptomyces* S5

BIÊN VĂN MINH

Tóm tắt: Các tính chất lý hoá của chất kháng sinh M115 được tách chiết từ chủng *Streptomyces* S5 phân lập từ mẫu đất trồng Kim Long, thành phố Huế, tỉnh Thừa Thiên Huế chứng tỏ thuộc nhóm polyen. Chất kháng sinh M115 có hoạt tính chống *Fusarium oxysporum* gây bệnh thối cổ rễ cây lạc (*Arachis hypogaea* L.) trong điều kiện *in vitro*.

1. Mở đầu

Chủng xạ khuẩn *Streptomyces* S5 do chúng tôi phân lập từ đất trồng lạc Kim Long, thành phố Huế, có phổ kháng sinh rộng, đồng thời kháng lại vi khuẩn Gram dương *Sarcina lutea* lẫn vi nấm *Fusarium oxysporum* gây bệnh thối cổ rễ cây lạc (*Arachis hypogaea* L.) trong điều kiện *in vitro*. Trong bài báo này, chúng tôi chỉ trình bày kết quả nghiên cứu về một số tính chất lý hoá của chất kháng sinh M115 được tách chiết từ chủng trên.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

- Chất kháng sinh tách chiết từ chủng *Streptomyces* S5
- *Fusarium oxysporum* gây bệnh thối cổ rễ cây lạc (*Arachis hypogaea* L.)
- Vi khuẩn kiểm định: *Sarcina lutea*

2.2. Phương pháp nghiên cứu

1. Thu dịch kháng sinh bằng phương pháp nuôi cấy lắc chủng xạ khuẩn *Streptomyces* S5 sau 96 giờ ở điều kiện nhiệt độ phòng, sử dụng môi trường có thành phần Gause1, sau đó chiết bằng n-butanol ở các mức pH thích hợp, tách chất kháng sinh bằng cách cho hấp phụ nhựa trao đổi ion đã hoạt hoá vào cột, phản hấp phụ bằng acetone 20%. Kết tủa kháng sinh bằng methanol (8/1), hoà tan chất kháng sinh vào dung dịch đệm pH 7,0 [4].

2. Xác định độ bền nhiệt của dịch kháng sinh theo Egorov và cộng sự, 1983 [5].

Dịch kháng sinh M115 được đun cách thủy ở nhiệt độ 40, 50, 60, 70 và 80°C, kéo dài trong khoảng thời gian 10, 30 phút rồi tiến hành thử hoạt tính bằng phương pháp đục lỗ.

3. Xác định độ bền pH theo Egorov và cộng sự, 1983 [1], [5].

4. Định loại chất kháng sinh M115 do chủng *Streptomyces* S5 tạo ra theo Blinov và Khokhlov; Amman và Gottlieb, với vi khuẩn kiểm định là *Sarcina lutea* và chủng vi nấm *Fusarium oxysporum* [3], [4].

Châm dịch chất kháng sinh lên giấy sắc ký loại Whatman N^o1, chạy chậm với kích thước 1 x 20 cm trên hệ dung môi n-butanol : acetic acid : nước (2:1:1); n-butanol : nước cất (84:16).

Các bước tiến hành:

- Nuôi cấy chủng xạ khuẩn *Streptomyces* S5 trên môi trường Gause-1 trong hộp petri. Sau 7 ngày đêm nuôi ở nhiệt độ 30°C cho mọc kín bề mặt hộp thạch các khuẩn

lạc, cắt nhỏ khối thạch trong hộp petri có chứa khuẩn lạc xạ khuẩn cho vào bình tam giác, bổ sung thêm 5ml dung dịch methanol. Ngâm thạch trên trong dung môi này trong khoảng thời gian 2-3 giờ để chất kháng sinh chiết rút ra hết. Lọc dịch có chứa kháng sinh này bằng phễu thủy tinh có giấy lọc (các dụng cụ này tuyệt đối sạch về mặt hoá học). Để trong phòng tối, thoáng gió cho dung môi bay hơi bớt.

Khi dung dịch kháng sinh này ở dạng đậm đặc, dùng micropipete hút dịch này chấm lên giấy sắc ký Whatman N^o1 với kích thước 1 x 20 cm. Dịch được chấm đi chấm lại nhiều lần dùng đèn cồn hơi nóng nhẹ giúp cho chóng khô vết chấm.

Dải giấy sắc ký trên được cắt thành từng mẫu nhỏ ghi kí hiệu mẫu, đặt lên bề mặt thạch đã trộn sẵn *Sarcina lutea* hoặc *Fusarium oxysporum*, đặt lạnh 2 - 4^oC trong 2 giờ cho chất kháng sinh khuếch tán ra trong khi *Sarcina lutea* hoặc *Fusarium oxysporum* bị ức chế không phát triển, rồi nuôi ở nhiệt độ 30^oC trong 72 giờ, quan sát và phát hiện vị trí có vòng vô khuẩn và vòng nấm [4].

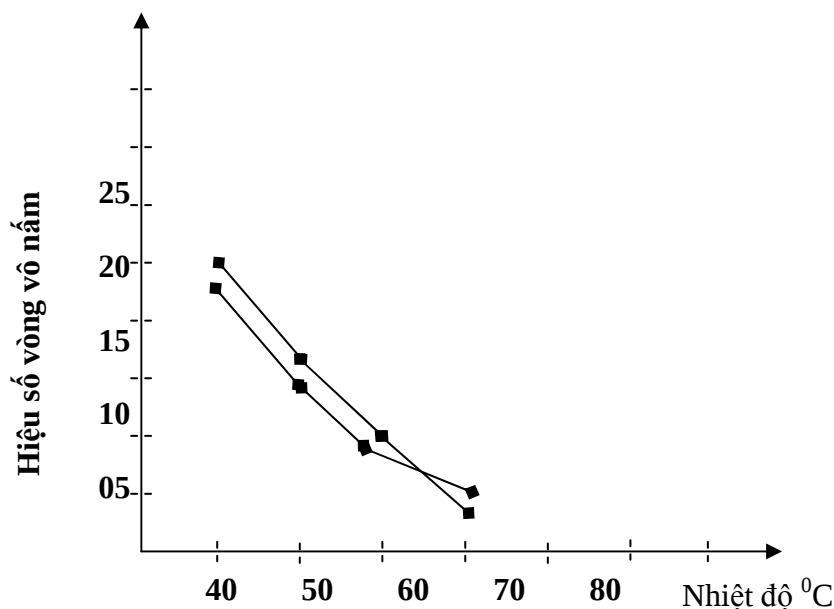
5. Xác định hoạt tính kháng sinh bằng phương pháp đục lỗ với *Fusarium oxysporum* [1].

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Một số tính chất lý hóa của chất kháng sinh M115

* Độ bền nhiệt của chất kháng sinh nghiên cứu

Để xác định độ bền nhiệt của chất kháng sinh M115 dưới ảnh hưởng của nhiệt độ, chúng tôi sử dụng môi trường Czapek. Dịch lọc chất kháng sinh thô được cho vào ống nghiệm, mỗi ống chứa 3ml, đun cách thủy ở các nhiệt độ 40^o, 50^o, 60^o, 70^o và 80^oC (nồi hấp) trong thời gian 15 phút và 30 phút. Sau đó tiến hành thử hoạt tính kháng nấm của chất kháng sinh M115 đã xử lý với *Fusarium oxysporum* bằng phương pháp đục lỗ. Kết quả được trình bày ở hình 1.



Hình 1: Độ bền nhiệt của chất kháng sinh nghiên cứu

Bảng 1: Độ bền nhiệt của chất kháng sinh M115

Chất kháng sinh	Nhiệt độ (°C)	Hiệu số vòng vô nấm (D - d) mm	
		15 phút	30 phút
M115	40	25,0	—
	50	16,0	—
	60	12,0	—
	70	6,0	—
	80	—	—
Đối chứng	30	22,5	22,5

Ghi chú: (—): không có vòng vô nấm (âm tính).

Kết quả ở bảng 1 cho thấy độ bền nhiệt của chất kháng sinh M115 chịu ảnh hưởng rất lớn của nhiệt độ, sau 15 phút ở ngưỡng nhiệt độ 50°C hoạt tính kháng sinh giảm. Khi nhiệt độ lớn hơn 80°C thì hoạt tính kháng sinh của chủng xạ khuẩn nghiên cứu hầu như không còn tác dụng với *Fusarium oxysporum* gây bệnh, sau 15 phút ở ngưỡng nhiệt độ 80°C hoạt tính kháng sinh M115 giảm hẳn (—) âm tính.

* Độ bền pH của chất kháng sinh M115

Bảng 2. Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính kháng nấm *Fusarium oxysporum*

Chất kháng sinh	Mức pH	Kích thước vòng vô nấm (D - d)mm
M115	5	12,0 ± 0,5
	6	16,0 ± 0,0
	7	20,5 ± 0,5
	8	16,5 ± 0,0
	9	10,0 ± 0,0

Kết quả thử nghiệm với *Fusarium oxysporum* trong khoảng pH từ 5 – 9 cho hoạt tính kháng sinh M115 bền ở mức pH từ 6 – 8, kém bền ở mức pH ≥ 8 hoặc ≤ 6.

3.2. Định loại chất kháng sinh M115

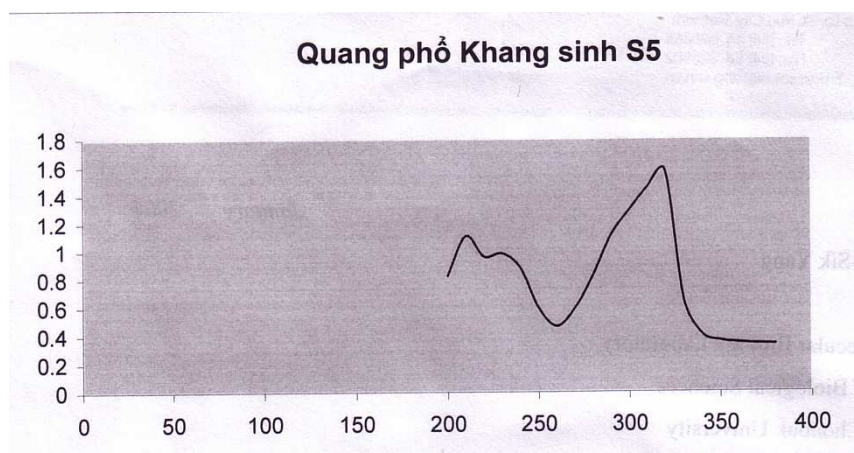
* Tách chiết chất kháng sinh

Dịch lên men của chủng *Streptomyces* S5 sau 96 giờ, được lọc qua giấy lọc.

+ Phần dịch lọc, được chiết bằng n-butanol ở pH= 7,0, cho vào ống chuẩn độ loại bỏ nước, thu lấy n-Butanol và chất kháng sinh. Sau đó cho vào đĩa petri, để cho bay hơi và thu lấy chất kháng sinh thô.

+ Chấm chất kháng sinh thô lên giấy sắc ký whatman N^o1 với kích thước 1 x 20 cm, sau đó hiện hình bằng phương pháp sinh học với vi khuẩn kiểm định là *Sarcina lutea* và chủng vi nấm *Fusarium oxysporum*.

+ Đo phổ tử ngoại chất kháng sinh tại Trung tâm phân tích Đại học Huế. Kết quả đo quang phổ tử ngoại của chất kháng sinh M115 như hình 1:



Hình 2: Quang phổ tử ngoại chất kháng sinh M115

Kết quả đo phổ tử ngoại chất kháng sinh M115 do chủng *Streptomyces* S5 có đỉnh hấp thụ thuộc nhóm *polyen*. Phổ tử ngoại có đỉnh hấp thụ cực đại ($\lambda = 337 - 344$ nm) thuộc nhóm *polyen*.

Bảng 3: Kết quả sắc ký giấy Whatman N^o 1 chất kháng sinh M115

Chủng	Hệ dung môi đã sử dụng	Rf	Chất kháng sinh
Chất kháng sinh M115	n-Butanol : acid acetic : nước cất (2:1:1)	0,80	U-20661
	n-Butanol : nước cất (84:16)	0,70	



Hình 3: Hiện hình sinh học đối với vi khuẩn *Sarcina lutea* khi chạy sắc ký trong dung môi n-butanol : acid acetic : nước cất (2:1:1)(trái) và n-butanol : nước cất (84:16) (phải)

Căn cứ vào trị Rf khi sắc ký và bước sóng hấp thụ cực đại, chúng tôi cho rằng chất kháng sinh do chủng *Streptomyces* S5 tổng hợp có trị Rf tương tự chất kháng sinh U-20661 (M.E.berg, F.Reussen, Experientia, 1967) cùng thuộc nhóm *polyen*.

4. Kết luận

1. Các tính chất hoá lý của chất kháng sinh M115 được tách chiết từ chủng *Streptomyces* S5 từ đất Kim Long, thành phố Huế, tỉnh Thừa Thiên Huế chứng tỏ thuộc nhóm *polyen*.

2. Chất kháng sinh M115 thuộc nhóm *polyen*, có hoạt tính chống được *Fusarium oxysporum* gây bệnh thối cổ rễ cây lạc *Arachis hypogea* L. trong điều kiện *in vitro*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Lâm Dũng và các tác giả (1972), *Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật*, NXBK&KT, Hà Nội.
2. Lê Gia Hy và các tác giả (1992), *Nghiên cứu khả năng sinh chất kháng sinh của một số chủng xạ khuẩn Streptomyces phân lập ở Việt Nam*, Tạp chí Sinh học số 14(4).
3. Biền Văn Minh, Nguyễn Văn Độ (2008), *Một số tính chất lý hóa của chất kháng sinh M105 tách chiết từ chủng xạ khuẩn Streptomyces sp.S6*, Tạp chí Khoa học & Giáo dục, trường ĐHSP Huế, số 02(06), tr.10-14.
4. Biền Văn Minh (2000), *Nghiên cứu xạ khuẩn kháng sinh của một số chủng xạ khuẩn phân lập từ đất Bình Trị Thiên*, Luận án Tiến sĩ sinh học, Hà Nội.
5. Egorov N.X.(1983), *Thực tập Vi sinh vật*, NXB Mir, Maxcova, Nguyễn Lâm Dũng dịch, NXB ĐH&THCN, Hà Nội.

Title: THE PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF ANTIBIOTIC FROM
ACTINOMYCETES STRAIN *Streptomyces* S5

Bien Van Minh - Hue's College of Education

Abstract:

1. The physicochemical properties of M115 antibiotic that was isolated from *Streptomyces* S5 at Kim Long's land samples, in Hue City, Thua Thien Hue Province belong to *polyen* group.

2. The M115 antibiotic againsts to *Fusarium oxysporum* that causes collar rot in peanut plant (*Arachis hypogea* L.) *in vitro*.

Thông tin về tác giả

*PGS.TS. BIÊN VĂN MINH: Trưởng khoa Sư phạm Kỹ thuật Nông lâm trường Đại học Sư phạm - ĐHHuế. ĐT: 0913439685. Email: minhs56@gmail.com