

NGHIÊN CỨU SỰ ĐA DẠNG SINH HỌC CỦA XẠ KHUẨN TRONG ĐẤT Ở BÌNH TRỊ THIÊN

BIÊN VĂN MINH*, PHẠM QUANG CHINH**

Tóm tắt:

- Xạ khuẩn trong đất canh tác ở 3 tỉnh Quảng Bình, Quảng Trị và Thừa Thiên Thiên có độ đa dạng cao về serial màu khuẩn ti khí sinh: serial Griseus 46/145 chủng chiếm tỉ lệ $\approx 31,72\%$, sau đó là Albus - 34/145 $\approx 23,45\%$, Roseus-30/145 $\approx 20,69\%$, Azureus - 16/145 $\approx 11,03\%$ và Helvolo – Flavus : - 14/145 chiếm $\approx 9,66\%$, 5 chủng chưa xác định $\approx 3,45\%$. Tỉ lệ số chủng xạ khuẩn có sinh chất kháng sinh/số chủng phân lập được cỡ 42,76%,
- Trong đất canh tác ở Bình Trị Thiên, có độ pH 6,5 – 7,0 số lượng xạ khuẩn chiếm trung bình $380 - 520.10^3$ CFU/g đất khô; trong than bùn có độ ẩm cao (50 - 60%), số lượng giảm chỉ còn $20 - 40.10^3$ CFU/g than bùn khô.
- Hai chủng xạ khuẩn S6 và S58 được tuyển chọn sinh chất kháng sinh diệt vi khuẩn Gram dương, Gram âm và cả vi nấm *Fusarium oxysporum* - là tác nhân chính gây bệnh thối cổ rễ ở một số cây trồng.

I. MỞ ĐẦU

Lãnh thổ Việt Nam trải dài trên 1650 km theo hướng bắc – nam, nằm trong hệ tọa độ địa lý $8^{\circ}30'B - 23^{\circ}23'$ và $102^{\circ}10' - 109^{\circ}24'$ kinh Đông, vị trí địa lý như vậy đã tạo nên sự đa dạng của các chế độ khí hậu, thổ nhưỡng và địa hình cũng như tạo nên sự đa dạng của các hệ sinh thái. Cho đến nay, ở Việt Nam đã phát hiện được 13.000 loài thực vật và 12.000 loài động vật và được tổ chức WCMC (The World Conservation and Monitoring Center) công nhận (năm 1992) là một trong 16 nước có đa dạng sinh học cao nhất thế giới. Toàn bộ đất nước Việt Nam nằm trong điểm nóng Indô-Bơ Ma do tổ chức Bảo tồn quốc tế xác định, là một trong những vùng sinh học bị đe dọa nhất và giàu có nhất trên thế giới [6]. Đa dạng sinh học là một khía cạnh quan trọng trong tiến trình phát triển bền vững ở Việt Nam, tuy nhiên, sự hiểu biết về đa dạng trong giới vi sinh vật còn rất hạn chế. Để góp phần vào bức tranh chung về tính đa dạng trong vi sinh vật, chúng tôi tiến hành nghiên cứu sự đa dạng sinh học của xạ khuẩn chi *Streptomyces* sinh chất kháng sinh trong đất ở 3 tỉnh Quảng Bình, Quảng Trị và Thừa Thiên Huế.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu

- Sử dụng môi trường ISP4 để phân lập và môi trường Gause1 để nuôi xạ khuẩn; môi trường nước thịt-pepton-agar để nuôi vi khuẩn kiểm định; môi trường Czapek-Dox để nuôi vi nấm *Fusarium oxysporum*.

- Các chủng xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces* dùng trong nghiên cứu do chúng tôi phân lập từ các mẫu đất ở 3 tỉnh Quảng Bình, Quảng Trị và Thừa Thiên Huế.

- Các chủng vi sinh vật kiểm định đã sử dụng gồm: vi khuẩn gram dương *Staphylococcus aureus*; vi khuẩn gram âm *Escherichia coli* và vi nấm *Fusarium oxysporum*. Các chủng trên được Trung tâm Vi sinh vật ứng dụng, trường ĐHKHTN-ĐHQG Hà Nội cung cấp.

2. Phương pháp

Để nghiên cứu sự đa dạng của xạ khuẩn sinh kháng sinh thuộc chi *Streptomyces* trong đất ở 3 tỉnh Quảng Bình, Quảng Trị và Thừa Thiên Huế, chúng tôi tiến hành phân lập xạ khuẩn trên môi trường ISP4 có thành phần (g/l): tinh bột tan 10; K_2HPO_4 1,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,0; NaCl 1,0; $(NH_4)SO_4$ 2,0; $CaCO_3$ 2,0; dung dịch khoáng 1,0; thạch (agar) 20; pH 7,2 – 7,4; Thử hoạt tính kháng sinh dùng môi trường Gause1 có thành phần (g/l): tinh bột tan 20, NaCl 0,5; K_2HPO_4 0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5; $FeSO_4$ 0,001; KNO_3 1,0; thạch (agar) 20; pH 7,2 - 7,4 [3].

Môi trường được cho vào ống nghiệm (để điều chế môi trường thạch nghiêng) và cho vào bình tam giác, khử trùng ở 1 atm trong 30 phút. Sau khi khử trùng, môi trường từ bình tam giác được rót vào các hộp Petri trong điều kiện vô trùng.

Mẫu đất được lấy theo phương pháp của Nguyễn Lâm Dũng và cộng sự [1], với 5 loại đất: đất sét, đất cát pha, bùn cát, bùn sét, than bùn. Các mẫu đất được pha loãng thành dạng dịch huyền phù, sau đó cấy gọt trên môi trường ISP4, nuôi ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 7 ngày. Đánh giá kết quả theo hình dạng khuẩn lạc, màu sắc, sắc tố hệ sợi đặc trưng mà xác định và phân biệt các chủng xạ khuẩn với các loài vi sinh vật khác. Thuần khiết các chủng bằng cách phân lập lại trên môi trường ISP4, các khuẩn lạc mọc riêng biệt không bị nhiễm các vi sinh vật khác được cấy sang môi trường Gause1.

Xác định số lượng xạ khuẩn trong 1gam đất khô tuyệt đối theo công thức:

$$x = \frac{a.b.c.100}{d}$$

a: Số khuẩn lạc (CFU-Colony Forming Unit) trung bình ở mỗi hộp petri; b: Số giọt của mỗi ml (của pipet đã dùng)

c: Độ pha loãng; d: Số % chất khô trong một gam mẫu [5].

Để bảo quản các chủng xạ khuẩn cho những nghiên cứu tiếp theo, chúng tôi tiến hành cấy chuyển định kỳ mỗi tháng một lần trên môi trường Gause1 thạch nghiêng, ủ ấm 30°C từ 7 - 14 ngày, sau đó bảo quản ở nhiệt độ 4 - 6°C. Trước khi sử dụng cấy chuyển sang ống nghiệm chứa môi trường Gauze1.

Xác định màu sắc khuẩn ty khí sinh, khuẩn ty cơ chất và sắc tố tan theo bảng màu của Bondarser, Tresner Backus. Nghiên cứu các đặc điểm sinh học theo Williams, Wilkins [2,3].

Hoạt tính kháng sinh được xác định theo phương pháp khối thạch và đục lỗ với các vi sinh vật kiểm định khác nhau [5].

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

1. Phân lập xạ khuẩn

Từ 30 mẫu đất khác nhau của ba tỉnh Quảng Bình, Quảng Trị và Thừa Thiên Huế, chúng tôi đã phân lập được 145 chủng (được kí hiệu là S1 đến S145). Tất cả các chủng do chúng tôi phân lập có các đặc điểm chung như sau:

- Có khuẩn ti khí sinh phát triển tốt, không có vách ngang, trên môi trường đặc chúng tạo nên khuẩn lạc đặc, bề mặt khô, xù xì, dạng nhung tơ, bám chắc vào môi trường thạch, dùng đầu que cấy không di chuyển khuẩn lạc được.
- Khuẩn ti khí sinh có dạng cuống sinh bào tử dạng thẳng, uốn xoắn lại.
- Bào tử có hình bầu dục hay hình cầu, với mép tròn trĩnh hoặc sứt vẹo, bề mặt bào tử phẳng hoặc dạng gai.
- Chuỗi bào tử dạng xoắn, dạng có vòng, có móc, thẳng, lượn sóng.



Hình 1: Hình dạng cuống sinh bào tử dạng uốn xoắn (trái) dưới kính hiển vi quang học và bề mặt màng bào tử phẳng (giữa) dạng gai (phải) dưới kính hiển vi điện tử.

2. Độ đa dạng về serial màu khuẩn ti khí sinh của xạ khuẩn phân lập

Dựa vào các tài liệu phân loại của ISP được miêu tả bởi Shirling và Gottlieb, Gause và cộng sự 1983, căn cứ màu sắc khuẩn ti khí sinh, hình thái chuỗi bào tử của các chủng xạ khuẩn phân lập được, chúng tôi phân nhóm xạ khuẩn phân lập được với kết quả ở bảng sau:

Bảng 1: Phân nhóm xạ khuẩn dựa theo các đặc điểm của chuỗi bào tử

Serial màu	Các typ	Hình thái chuỗi bào tử	Số chủng nghiên cứu
Màu xám (Griseus) 46 chủng	1) S	- Xoắn	3
	2) SRA	- Xoắn, có móc, có vòng	2
	3) SRF	- Xoắn cong đến thẳng	5
	4) RA	- Có móc, có vòng	7
	5) RARF	- Có vòng, thẳng, lượn sóng	8
	6) RF	- Thẳng đến lượn sóng	21
Trắng (Albus) 34 chủng	1) S	- Xoắn	3
	2) SRA	- Xoắn, có móc, có vòng	2
	3) SRF	- Xoắn cong đến thẳng	2
	4) RA	- Có móc, có vòng	4
	5) RARF	- Có vòng, thẳng, lượn sóng	5
	6) RF	- Thẳng đến lượn sóng	18
Hồng (Roseus) 30 chủng	1) S	- Xoắn	10
	2) RARF	- Xoắn, có móc, có vòng	8
	3) RF	- Xoắn cong đến thẳng	12
Xanh da trời (Azureus) 16 chủng	1) S	- Xoắn	2
	2) SRA	- Xoắn, có móc, có vòng	2
	3) SRF	- Xoắn cong đến thẳng	4
	4) RARF	- Có móc, có vòng	3
	5) RF	- Có vòng, thẳng, lượn sóng	5
Vàng (Helvolo –Flavus) 14 chủng	1) S	- Xoắn	3
	2) SRA	- Xoắn, có móc, có vòng	2
	3) RARF	- Có vòng, thẳng, lượn sóng	4
	4) RF	- Thẳng đến lượn sóng	5
Chưa xác định 5 chủng	1) SRA	- Xoắn, có móc, có vòng	1
	2) RARF	- Có vòng, thẳng, lượn sóng	2
	3) RF	- Thẳng đến lượn sóng	2

Ghi chú: S: *Typ Spira*; SRA: *Typ Spira-Retinaculum-Apertum*

SRF: *Typ Spira-Rectus-Flexibilis*; RA: *Typ Retinaculum-Apertum*

RARF: *Typ Retinaculum-Apertum-Rectus-Flexibilis*; RF: *Typ Rectus-Flexibilis*.

Kết quả bảng 1 cho thấy các typ xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces* phân bố trong đất nghiên cứu rất đa dạng về màu sắc khuẩn ti khí sinh. Căn cứ vào màu sắc khuẩn ti khí sinh và hình thái chuỗi bào tử, chúng tôi xếp chúng vào 5 serial màu, trong đó màu xám (Griseus) có số lượng cao nhất: 46/145 chủng, chiếm tỉ lệ $\approx 31,72\%$, sau đó là serial màu trắng (Albus): 34/145, màu hồng (Roseus): 30/145, màu xanh da trời (Azureus): 16/145 và màu vàng

(Helvolo –Flavus): 14/145, chiếm $\approx 9,65\%$. Riêng các mẫu than bùn chỉ có serial màu trắng và màu xám, các serial khác ít gặp.

3. Số lượng xạ khuẩn trong các mẫu đất nghiên cứu

Kết quả điều tra về số lượng xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces* trong các mẫu nghiên cứu được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2: Sự phân bố của xạ khuẩn trong các mẫu đất nghiên cứu

Tính chất đất khi lấy mẫu			Thảm thực vật	Số mẫu đất	Số chủng phân lập		Số lượng CFU/g.10 ³
Loại đất	Độ ẩm (%)	pH			Số lượng	% sinh kháng sinh	
Đất cát pha	15-25	6,5 - 7,0	Rau, đậu	5	45	31,03	380 - 520
Đất sét	35-45	6,5 - 7,0	Lúa, cỏ	5	20	13,80	210 - 320
Bùn sét	40-50	5,5 - 6,0	Năn, cỏ	5	27	18,62	35 - 55
Bùn cát	50-55	5,5 - 6,0	cỏ	5	28	19,31	40 - 60
Than bùn	50-60	4,0 - 4,5	Năn, lác	10	25	17,24	20 - 40

Nhận xét: Từ kết quả bảng 2 cho thấy các mẫu đất lấy ở các địa điểm khác nhau có số lượng xạ khuẩn phân bố khác nhau, trong đó số lượng xạ khuẩn ở đất cát pha là cao hơn cả, số lượng đạt 380 - 520.10³CFU/g. Các mẫu than bùn có số lượng xạ khuẩn thấp nhất, trung bình đạt từ 20 - 40.10³CFU/g.

Nhìn chung, số lượng xạ khuẩn phân lập ở các mẫu đất khác nhau là khác nhau. Trên quan điểm sinh thái, chúng tôi nhận thấy sự phân bố của xạ khuẩn phụ thuộc nhiều nguyên nhân, trong đó có tính chất đất như độ phì nhiêu, hàm lượng chất dinh dưỡng, mức độ canh tác, kết cấu, độ ẩm, độ pH đất... Đất càng màu mỡ, giàu chất hữu cơ thì số lượng xạ khuẩn nhiều.

So với kết quả nghiên cứu của Lê Mai Hương (1993) tại đất canh tác Hà Nội và vùng phụ cận, số lượng xạ khuẩn trung bình 405 - 620.10⁵CFU/g, đất ven ao hồ chỉ có 20 - 40 10⁵CFU/g [2], số liệu của chúng tôi thu được từ các mẫu đất ở ba tỉnh Quảng Bình, Quảng Trị và Thừa Thiên Huế thấp hơn.

4. Tỷ lệ xạ khuẩn sinh chất kháng sinh

4.1. Tuyển chọn chủng xạ khuẩn có hoạt phổ kháng sinh rộng

Kết quả nghiên cứu về tỷ lệ số chủng phân lập được có khả năng sinh chất kháng sinh được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3: Kích thước vòng vô khuẩn của các chủng xạ khuẩn phân lập

(minh hoạ 15 chủng)

Loại đất nghiên cứu	Chủng xạ khuẩn	Kích thước vòng vô khuẩn (D-d)mm /vi khuẩn kiểm định		
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>F. oxysporum</i>
Đất cát pha	S2	—	15	7
	S6	18,5	20,5	22,5
	S10	5	16	15
Đất sét	S14	—	14	21
	S17	9	—	15
	S20	—	15	14
Bùn sét	S25	—	—	10
	S27	11	15	12
	S35	8	15	8
Bùn cát	S39	12	—	14
	S42	2	16	14
	S46	—	—	15

Than bùn	S53	–	14	–
	S58	18	19	21,5
	S60	–	6	–

Ghi chú: – : Không có vòng vô khuẩn

Từ kết quả ở bảng trên, chúng tôi chọn được 2 chủng S6 và chủng S58 có hoạt phổ kháng khuẩn rộng: ức chế sự sinh trưởng của *E.coli*, *S. aureus* và *F.oxysporum* và hoạt tính kháng sinh mạnh: hiệu số vòng vô khuẩn của chủng S6 đối với *E.coli* - 18,5mm, *S. aureus* - 20,5 và *F.oxysporum* là 22,5mm; chủng S58 đối với *E.coli* - 18,0; *S. aureus* - 19,0 và *F.oxysporum* là 21,5mm. Có thể dùng 2 chủng này làm đối tượng cho nghiên cứu ứng dụng tiếp theo.

4.2. Tỷ lệ xạ khuẩn sinh chất kháng sinh

145 chủng xạ khuẩn nuôi cấy trên môi trường Gause1 ở nhiệt độ 28-30°C, 7 ngày, sau đó tiến hành thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định theo phương pháp thổi thạch và phương pháp đục lỗ với 3 loại vi sinh vật kiểm định *E. coli*, *S. aureus* và *F. oxysporum*. Kết quả được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4: Tỷ lệ xạ khuẩn sinh chất kháng sinh in vitro

Số chủng phân lập	Số chủng có hoạt tính kháng vi sinh vật	Số chủng ức chế vi khuẩn		Số chủng ức chế vi nấm <i>F. oxysporum</i>
		<i>E. coli</i> Gram (-)	<i>S. aureus</i> Gram (+)	
145	62/145	47/145	49/145	26/145
Tỷ lệ %	42,758	32,413	33,793	17,931

Kết quả bảng trên cho thấy số chủng có hoạt tính kháng vi sinh vật là 62/145 chiếm tỷ lệ 42,76%, trong đó có 49/145 chủng xạ khuẩn kháng được vi khuẩn Gram (+) chiếm 33,80%, thấp nhất là số chủng ức chế vi nấm, chỉ 26/145 chủng, chiếm 17,90%. Đặc biệt, tỷ lệ các chủng xạ khuẩn kháng lại được vi khuẩn Gram (-) khá cao: 47/145 chủng, chiếm tới 32,4%. Tỷ lệ này cao hơn những nghiên cứu đã có ở các vùng khác [2].

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

* Kết luận

Từ các kết quả thu được, chúng tôi rút ra một số kết luận:

1. Độ đa dạng về màu khuẩn ti khí sinh của 145 chủng xạ khuẩn phân lập là khá cao, thuộc 5 serial màu, trong đó serial màu xám (Griseus) là chủ yếu: có 46/145 chủng, chiếm tỷ lệ $\approx 31,72\%$, sau đó là serial màu trắng (Albus) - 34/145, màu hồng (Roseus), chiếm 30/145, màu xanh da trời (Azureus) - 16/145 và màu vàng (Helvolo - Flavus) - 14/145, chiếm $\approx 9,66\%$. Riêng các mẫu than bùn chỉ có serial màu trắng và màu xám, các serial khác ít gặp.

2. Trong đất canh tác của 3 tỉnh Quảng Bình, Quảng Trị và Thừa Thiên Huế, đất cát pha độ pH 6,5 – 7,0 số lượng xạ khuẩn chiếm trung bình $380 - 520.10^3$ CFU/g đất khô; trong than bùn có độ ẩm cao (50 - 60%), số lượng xạ khuẩn giảm chỉ còn $20 - 40.10^3$ CFU/g than bùn khô; tỷ lệ số chủng có sinh chất kháng sinh khoảng 42,76%.

3. Đã tuyển chọn được 2 chủng S6 và S58 có hoạt phổ kháng khuẩn rộng và hoạt tính kháng sinh mạnh, có thể sử dụng để làm đối tượng nghiên cứu ứng dụng.

4. Hiệu quả diệt vi sinh vật kiểm định in vitro của các chủng xạ khuẩn tại vùng đất nghiên cứu rất khác nhau, có loài chỉ diệt được vi khuẩn Gram (+), có loài diệt được vi khuẩn Gram (-), chủng S6 và S58 có khả năng diệt cả vi khuẩn Gram (+), lẫn Gram (-) và cả vi nấm *Fusarium oxysporum* - là tác nhân chính gây bệnh thối cổ rễ ở một số cây trồng.

*Đề nghị

Chủng xạ khuẩn S6 có hoạt tính kháng nấm mạnh cần được nghiên cứu thêm về các đặc điểm lý - hoá, chất kháng sinh... do chúng tạo ra để sử dụng vào việc điều chế thuốc trừ bệnh thối cổ rễ cho một số cây trồng [4].

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Nguyễn Lâm Dũng và các tác giả (1972), *Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật*, NXBKHK&KT, Hà Nội.
- [2] Lê Mai Hương (1993), *Nghiên cứu xạ khuẩn sinh chất kháng sinh phân lập ở đất Hà Nội và vùng phụ cận*. Luận án PTS, Trường ĐHKHTN-ĐHQG Hà Nội.
- [3] Biền Văn Minh (2000), *Nghiên cứu khả năng sinh chất kháng sinh của một số chủng xạ khuẩn phân lập từ đất Bình - Trị - Thiên*. Luận án tiến sĩ sinh học, Trường ĐHSP Hà Nội.
- [4] 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 spS6*. Tạp chí Khoa học & Giáo dục, trường ĐHSP Huế, số 02(06), tr.10-14.
- [5] Egorov N.X.(1983), *Thực tập Vi sinh vật*, NXB Mir, Maxcova. Nguyễn Lâm Dũng dịch, 1983. NXB ĐH&THCN, Hà Nội.
- [6] http://203.162.12.202/thongtinmt/noidung/hnm_12_03_06.htm

Title: STUDY ON BIODIVERSITY OF SOIL ACTINOMYCES IN QUANG BINH, QUANG TRI AND THUA THIEN HUE PROVINCES

Bien Van Minh and Pham Quang Chinh

Abstract:

-The Actinomyces that were isolated from cultivated-soil in Quang Binh, Quang Tri and Thua Thien Hue provinces, had high serialal colour diversity of aerial hypha: serialal Griseus took 31,72% (46/145) of total isolated-strains, then Albus: 23.45% (34/145); Roseus: 20,69% (30/145); Azureus: 11.03% (16/145); Helvol - Flavus 9.66% (14/145) and un-identified strains took 3,45% (5/145). The percentage of strains had ability to make antibiotics was approximately 42,76% of total isolated-strains.
-In the cultivated-soil with the pH of 6,5 – 7,0, the average number of Actinomyces was 380 - 520.10³CFU per gram of dry soil. In the mud coal with the humidity of 50-60%, the average number of Actinomyces decreased to 20 - 40.10³CFU per gram of dry mud coal.
-Two Actinomyces strains, S6 and S58, were selected to make antibiotics to destroy gram-negative and gram-positive bacteria and microfungi, *Furarium oxysporum*, that causes collar rot in some cultivated-crops.

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 hoặc bienvanminh@dhsphue.edu.vn

**TS. PHẠM QUANG CHINH: Phó Trưởng khoa Sư phạm Kỹ thuật Nông lâm trường Đại học Sư phạm - ĐHHuế. ĐT:0983377159