

NGHIÊN CỨU SỰ PHÂN BỐ CỦA XẠ KHUẨN SINH CHẤT KHÁNG SINH CHỐNG NẤM THUỘC CHI *STREPTOMYCES* PHÂN LẬP TỪ ĐẤT NÔNG NGHIỆP THÀNH PHỐ HỘI AN - QUẢNG NAM

A STUDY ON THE DISTRIBUTION OF THE ACTINOMYCETE PRODUCING ANTIFUNGAL ANTIBIOTICS OF THE GENUS *STREPTOMYCES* ISOLATED FROM AGRICUTURAL LAND IN HOIAN - QUANGNAM

Huỳnh Thị Phụng, Đỗ Thu Hà

Trường Đại học Sư phạm, Đại học Đà Nẵng

Email: dothuha09@yahoo.com

TÓM TẮT

Trong đất nông nghiệp thường tồn tại nhiều nhóm vi sinh vật chúng ích đã góp phần đáng kể trong việc cải tạo và nâng cao độ phì nhiêu cho đất, đặc biệt là xạ khuẩn. Tuy nhiên, thành phần và số lượng xạ khuẩn trong đất diễn biến rất phức tạp, phụ thuộc vào nhiều yếu tố sinh thái khác nhau. Trong bài viết này, đã đề cập đến sự phân bố của xạ khuẩn theo loại đất tại thành phố Hội An – Quảng Nam. Kết quả nghiên cứu từ 102 mẫu đất các loại ở 8 phường, xã tại địa phương này đã phân lập được 152 chủng xạ khuẩn. Từ đó chọn ra 2 chủng xạ khuẩn có khả năng sinh chất kháng sinh mạnh nhất để nghiên cứu ứng dụng khả năng diệt nấm gây bệnh ở thực vật.

Từ khóa: Actinomycete streptomycetes; phytophthora; Fusarium; Aspergillus; khả năng sinh chất kháng sinh.

ABSTRACT

In agricultural soil, there are many varieties of useful microorganisms. They play an important role in improving and increasing fertility of soil, especially actinomycete. However, the species composition and quantity develop complicatedly, depending on different ecological factors. This article deals with the distribution of actinomycete in agricultural land in Hoi An Town, Quang Nam Province in terms of soil structure. The research results of 102 different soil samples in 8 communes of this area show that the soil in this locality contains 152 varieties of actinomycete. Accordingly, the 2 best varieties which can reproduce the most powerful antibiotics are selected for an application study on eliminating fungal pathogens in plants.

Key words: Actinomycete streptomycetes; phytophthora; Fusarium; Aspergillus; capacity of producing antibiotics.

1. Đặt vấn đề

Xạ khuẩn là một trong những tác nhân sinh học thường được sử dụng để ức chế các vi sinh vật gây bệnh, là nhóm có nhiều tiềm năng nhất vì tỷ lệ loài có khả năng sinh chất kháng sinh cao, trong đó có nhiều chất kháng sinh có khả năng chống nấm mạnh. Chúng phân bố rộng rãi nhất và phong phú nhất. Đất là nơi xạ khuẩn cư trú nhiều nhất đặc biệt là đất nông nghiệp vì trong đất này cung cấp một khối lượng lớn chất hữu cơ là nguồn thức ăn chính cho hệ vi sinh vật đất nói chung và xạ khuẩn nói riêng [6].

Những nghiên cứu về sự phân bố của xạ khuẩn ở miền Trung còn hạn chế. Nghiên cứu sự phân bố, động thái của hệ xạ khuẩn và tìm kiếm những chủng mạnh, có hoạt tính cao, phù hợp với

điều kiện sinh thái của địa phương, đề xuất những biện pháp nghiên cứu sử dụng và cải tạo đất có hiệu quả là một trong những hướng đi đúng đắn nhằm thực hiện định hướng phát triển của nền nông nghiệp bền vững. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi góp phần thêm vào cơ sở dữ liệu và tính đa dạng của hệ vi sinh vật đất ở vùng nghiên cứu và làm cơ sở khoa học cho việc đề xuất các biện pháp ứng dụng vào thực tiễn sản xuất ở địa phương.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu

2.1.1. Đối tượng

- Các chủng xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces*.
- Các vi sinh vật kiểm định: *Fusarium*, *phytophthora*, *Aspergillus*.

2.1.2. Phạm vi nghiên cứu

- Thời gian nghiên cứu: 11/2011 – 06/2012.

- Địa điểm: 8 phường, xã: Cẩm Hà, Sơn Phong, Cẩm Châu, Cẩm Thanh, Cẩm Kim, Thanh Hà, Cẩm Nam, Cẩm An.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp lấy mẫu theo loại đất, thời gian và độ ẩm (Egorov, 1983)

- Phương pháp phân lập và xác định số lượng tế bào vi sinh vật (Nguyễn Lâm Dũng và cộng sự; 1972, 1978).

- Phương pháp sơ tuyển và tuyển chọn các chủng xạ khuẩn sinh chất kháng sinh (Nguyễn Lâm Dũng và cộng sự; 1972, 1978).

- Phương pháp xác định loại đất và độ ẩm đất theo tiêu chuẩn AOAC 2000.

- Phương pháp xác định độ pH và nhiệt độ đất.

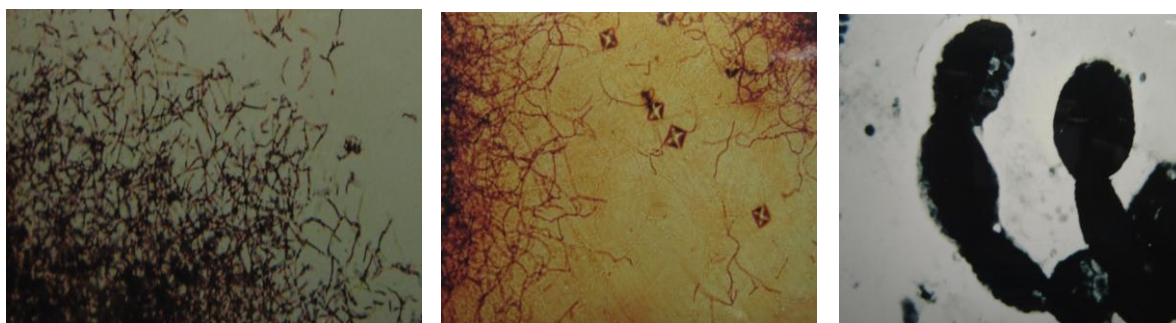
- Phương pháp xử lý số liệu bằng phần mềm SPSS.

3. Kết quả nghiên cứu và biện luận

3.1. Phân lập xạ khuẩn

Sau khi tiến hành phân lập 102 mẫu đất nông nghiệp khác nhau tại 8 phường, xã Cẩm Hà, Sơn Phong, Cẩm Châu, Cẩm Thanh, Cẩm Kim, Thanh Hà, Cẩm Nam, Cẩm An của thành phố Hội An, Quảng Nam, trên môi trường Gauze I, đã thu được 152 chủng xạ khuẩn. Dựa vào đặc điểm hình thái khi quan sát khuẩn lạc, hệ sợi khí sinh, cuống sinh bào tử, bào tử dưới kính hiển vi, theo khóa phân loại của Gauze và CS[3], Bergey [1], Krasilnikov [4]. Chúng tôi đã xác định 152 chủng xạ khuẩn đều thuộc chi *Streptomyces* (được kí hiệu là XK 1- XK 152).

Các chủng xạ khuẩn này đều có đặc điểm chung như sau: có hệ sợi khí sinh phát triển mạnh, khuẩn ty không có vách ngăn. Trên môi trường thạch, thường tạo nên những khuẩn lạc rắn chắc có dạng da, dạng nhung tơ, bề mặt xù xì hoặc nhẵn. Khuẩn lạc bám vào cơ chất nhờ HSCC. Phần cuối của HSKS hình thành cuống sinh bào tử có thể thẳng, lượn sóng, xoắn hay có móc... bào tử có hình cầu, ovan, hình que.



Hình 1: Hình dạng cuống sinh bào tử (trái, giữa) và bề mặt bào tử (phải) dưới kính hiển vi điện tử

3.2. Sự phân bố của xạ khuẩn theo loại đất tại thành phố Hội An - Quảng Nam

Kết quả điều tra về số lượng xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces* được trình bày ở Bảng 1

Bảng 1. Số lượng các chủng xạ khuẩn chi *Streptomyces* trong đất tại một số vùng của thành phố Hội An – Quảng Nam (tháng 3/2012)

Địa điểm lấy mẫu	Loại đất	Thảm thực vật	Độ ẩm (%)	pH	Nhiệt độ (°C)	Số lượng ($\times 10^4$ CFU/g)	Số lượng chủng
Sơn Phong	Cát pha	Rau muống	25	6,9	24,0	11	02
	Thịt nặng	Lúa	63	4,6	21,0	17	01
Thanh Hà	Thịt nhẹ	Khoai lang	50	6,5	21,6	32	03

	Thịt trung bình	Bắp	63	5,5	21,0	57	03
Cắm An	Cát pha	Rau dền	27	6,6	23,0	8	02
	Thịt nhẹ	Rau quế	53	6,5	21,0	15	02
Cắm Hà	Cát pha	Xà lách	28	6,3	23,7	22	02
	Cát pha	Rau quế	28	6,2	23,6	24	03
Cắm Thanh	Cát pha	Sả	23	6,0	23,8	16	02
	Thịt nhẹ	Bắp, cải con	53	5,9	22,4	25	02
Cắm Nam	Thịt nhẹ	Bắp	50	6,7	21,2	35	03
	Thịt trung bình	Đậu xanh	63	5,7	23,2	22	04
Cắm Châu	Thịt nhẹ	Khoai lang	51	6,9	22,3	47	03
	Thịt nặng	Lúa	64	4,8	24	14	01
Cắm Kim	Thịt nhẹ	Bắp	53	6,5	21,5	40	02
	Thịt trung bình	Đậu xanh	60	6,9	22,2	59	03

Nhận xét: Dựa vào số liệu ở Bảng 1, chúng tôi nhận thấy:

Xét về sự phân bố xạ khuẩn theo loại đất, đất nông nghiệp ở thành phố Hội An tập trung chủ yếu là các loại đất như đất cát pha, đất thịt nặng, đất thịt nhẹ, đất thịt trung bình. Trong đó:

+ Đất thịt trung bình có xạ khuẩn phân bố nhiều nhất với số lượng XKTS trung bình $(22 - 59) \times 10^4$ CFU/g, tập trung chủ yếu ở phường Thanh Hà, Cắm Nam và xã Cắm Kim, loại đất này màu mỡ, độ phì nhiêu cao, nhiều chất dinh dưỡng, có độ ẩm (60 – 63%), nhiệt độ (21,0 – 23,2°C), pH (5,5 – 6,9) thích hợp.

+ Đất thịt nhẹ có xạ khuẩn phân bố ít hơn so với đất thịt trung bình với số lượng XKTS trung bình $(15 - 47) \times 10^4$ CFU/g, tập trung ở các phường Thanh Hà, Cắm An, Cắm Nam, Cắm Châu và xã Cắm Thanh, Cắm Kim, là loại đất có kết cấu đất tơi xốp, thoáng khí, độ ẩm (50 – 53%), nhiệt độ (21,0 – 22,4°C), pH (5,9 – 6,9) thích hợp cho xạ khuẩn phát triển.

+ Đất cát pha có hàm lượng cát trong đất cao, kết cấu đất rời rạc, đồng thời độ ẩm thấp,

đất nghèo dinh dưỡng, độ ẩm thấp (23 - 28%), nhiệt độ (21,2 – 24,0°C), pH (6,0 - 6,9) nên số lượng XKTS thấp $(8 - 35) \times 10^4$ CFU/g, phân bố ở phường Sơn Phong, Cắm An và xã Cắm Hà, Cắm Thanh.

+ Đất thịt nặng trồng lúa ở phường Sơn Phong và Cắm Châu có độ ẩm cao (63 – 64%), nhiệt độ (21 – 24), pH thấp (4,6 – 4,8), kết cấu đất chặt bí, kém thoáng khí, độ phì nhiêu và hàm lượng chất dinh dưỡng kém. Có số lượng xạ khuẩn trong một gam đất là thấp nhất, trung bình XKTS $(7 - 14) \times 10^4$ CFU/g.

Ngoài ra, số lượng xạ khuẩn còn phụ thuộc vào cơ cấu cây trồng: Số lượng xạ khuẩn ở những vùng trồng cây đậu xanh $(22-59) \times 10^4$ CFU/g, trồng bắp $(17-35) \times 10^4$ CFU/g là cao nhất, các vùng đất trồng lúa trên nền đất thịt nặng đạt số lượng thấp có XKTS $(7-17) \times 10^4$ CFU/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 như độ phì nhiêu, hàm lượng chất dinh dưỡng, mức độ canh tác, kết cấu đất, độ ẩm, pH đất... đất càng màu mỡ, giàu chất hữu cơ thì số lượng xạ khuẩn nhiều.

Tóm lại, việc nghiên cứu sự phân bố của XK theo loại đất tại thành phố Hội An – Quảng Nam nhằm tìm kiếm những chủng XK mạnh, vừa có hoạt tính sinh học cao vừa phù hợp với điều kiện sinh thái của từng địa phương từ đó làm cơ sở đề xuất các biện pháp sử dụng và cải tạo đất có hiệu quả.

3.3. Sơ tuyển các chủng xạ khuẩn có hoạt tính kháng sinh

Sau khi tiến hành nuôi cấy 152 chủng xạ khuẩn trên môi trường Gauze I, Gauze II ở nhiệt độ 28 - 30°C, thời gian 5 - 7 ngày cho hệ sợi phát triển mạnh, các CKS hình thành rồi thử hoạt tính kháng sinh bằng phương pháp khối thạch. Kết quả thu được 87 chủng có hoạt tính kháng sinh, chiếm tỷ lệ 57,24%. Tỷ lệ các chủng phân theo nhóm màu thể hiện qua bảng sau:

Bảng 2. Tỷ lệ các chủng kháng sinh phân theo nhóm màu

TT	Nhóm xạ khuẩn	Các chủng thuộc các nhóm		Các chủng có hoạt tính kháng sinh		Tỷ lệ các chủng có hoạt tính so với tổng số (%)
		SL	%	SL	%	
1	Trắng (Albus, Gauze et on, 1983)	62	40,78	39	44,83	25,66
2	Xám (Aureus, Gauze et on, 1983)	55	36,18	27	31,03	17,76
3	Nâu (Chromogenes, Gauze et on, 1983)	17	11,18	13	14,94	8,6
4	Hồng (Roseus, Gauze et on, 1983)	9	5,92	4	4,59	2,63
5	Lục (Coeruelsceus, Gauze et on, 1983)	7	4,60	1	1,15	0,66
6	Vàng (Helvolus, Gauze et on, 1983)	2	1,34	3	3,91	1,93
	Tổng số	152	100	87	100	57,24

Nhận xét: Qua bảng 2 nhận thấy:

Trong số 152 chủng phân lập được có 87 chủng có hoạt tính kháng sinh với ít nhất một VSVKD chiếm 57,24%.

Nghiên cứu khả năng đối kháng của xạ khuẩn thuộc các nhóm nhìn chung, tỷ lệ sinh chất kháng sinh của các nhóm là không đều. Cao nhất là nhóm xạ khuẩn nhóm Trắng (Albus) 40,78%, sau đó đến nhóm Xám (Aureus) chiếm 36,18%.

Nhóm Nâu (Chromogenes) có tỷ lệ chủng kháng sinh trung bình 11,18%. Xạ khuẩn nhóm Hồng (Roseus), nhóm Lục (Coeruelsceus), Vàng (Helvolus) có tỷ lệ các chủng xạ khuẩn thấp.



Hình 2. Một số chủng xạ khuẩn có hoạt tính kháng sinh chống nấm

3.4. Tuyển chọn các chủng xạ khuẩn có hoạt tính kháng sinh mạnh

Đã tuyển chọn được 2/87 chủng xạ khuẩn có hoạt tính kháng sinh mạnh nhất thuộc nhóm polyen bằng phương pháp khối thạch và phương pháp đục lỗ trên 2 môi trường Gauze I và Gauze II. Kết quả được trình bày ở bảng sau:

Bảng 3. Kích thước vòng vô khuẩn của 2 chủng XK 58 và XK 81 với VSVKĐ

Chủng xạ khuẩn	Hoạt tính kháng sinh (D-d,mm)		
	<i>Fusarium</i>	<i>Phytophthora</i>	<i>Aspergillus</i>
XK 58	20 ± 0,16	24 ± 0,22	21 ± 0,05
XK 81	25 ± 0,01	25 ± 0,04	27 ± 0,06

Chú thích:



Hình 3. Hoạt tính kháng nấm của chủng xạ khuẩn XK 81 với nấm *Aspergillus* trên môi trường đặc và môi trường dịch thể Gauze I



Hình 4. Hoạt tính kháng nấm của chủng xạ khuẩn XK 58 với nấm *Phytophthora* và *Fusarium* trên môi trường Gauze II

4. Kết luận

Qua các kết quả nghiên cứu trên, chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

4.1 Từ 102 mẫu đất nông nghiệp lấy từ 8 phường, xã Cẩm Hà, Sơn Phong, Cẩm Châu, Cẩm Thanh, Cẩm Kim, Thanh Hà, Cẩm Nam, Cẩm An tại thành phố Hội An -Quảng Nam, đã phân lập được 152 chủng xạ khuẩn đều thuộc chi

D : đường kính vòng vô khuẩn;

d : đường kính khối thạch;

D – d: hiệu số vòng vô khuẩn.

Qua kết quả ở bảng 3 cho thấy 02 chủng xạ khuẩn XK 58 và XK 81 đều có khả năng kháng mạnh ở cả 3 VSVKĐ *Aspergillus*, *Phytophthora*, *Fusarium*. Tuy nhiên, mức độ kháng đối với các VSVKĐ có sự khác nhau. XK 81 kháng mạnh nhất đối với nấm *Aspergillus*, XK 58 kháng mạnh nhất đối với nấm *Phytophthora*.

Nếu so sánh đường kính vòng vô khuẩn của chủng XK 81 với chủng KBN 9 kháng VSVKĐ nấm [D - d, mm từ 11 - 22] của Đặng Thị Nguyệt Sương [5] phân lập tại đất ở khu BTTN Bà Nà - Núi Chúa thì thấy rằng chủng XK 81 có khả năng kháng nấm mạnh hơn.

Streptomyces.

4.2 Sự phân bố của hệ xạ khuẩn theo loại đất đã cho thấy số lượng XKTS trong 1 gam đất ở các loại đất khác nhau là khác nhau, cụ thể:

- Đất thịt trung bình có số lượng XKTS cao nhất, trung bình $(22 - 59) \times 10^4$ CFU/g.

- Đất thịt nhẹ có số lượng XKTS trung bình $(15 - 47) \times 10^4$ CFU/g thấp hơn so với đất

thịt trung bình.

- Đất cát pha có số lượng XKTS thấp hơn 2 loại đất trên, có trung bình: (8 – 35) x10⁴CFU/g.

- Đất thịt nặng có trung bình XKTS thấp nhất (7 – 14) x10⁴CFU/g.

- Xạ khuẩn phân lập được thay đổi theo cơ cấu cây trồng: cao ở đất trồng đậu xanh và lúa, thấp ở các vùng trồng lúa.

4.3. Đã sơ tuyển được 87/152 chủng có hoạt tính kháng sinh chiếm 57,24%. Từ 87

chủng xạ khuẩn chọn ra 2 chủng có hoạt tính kháng sinh mạnh nhất. Hai chủng này có hoạt tính kháng sinh mạnh đặc biệt có khả năng sinh kháng sinh hiếm thuộc nhóm polyen. Kết quả đã góp phần thêm vào cơ sở dữ liệu và tính đa dạng của hệ vi sinh vật đất ở thành phố Hội An – Quảng Nam và làm cơ sở khoa học cho việc đề xuất các biện pháp ứng dụng vào thực tiễn sản xuất ở địa phương.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol.4 (1989).*
- [2] Êgôrôv, N. X. 1983. *Thực tập vi sinh vật học* (Nguyễn Lâm Dũng dịch), Nhà Xuất bản Đại học và trung học chuyên nghiệp, Hà Nội, p.72-73.
- [3] G. F Gauze T.P Prebrazenskai M.A Sresnicora P. P Terekhova (1983), 158.
- [4] Krasilnirov's (1958) *Marwal of systematic Bacteriology and Streptomycetes - (1957).*
- [5] Đặng Thị Nguyệt Suong(2009), *Sơ bộ nghiên cứu sự phân bố, động thái của một số chủng xạ khuẩn, nấm men trong đất tại khu bảo tồn thiên nhiên Bà Nà Núi Chúa – thành phố Đà Nẵng*, Luận văn thạc sĩ sinh học, Đại học Đà Nẵng.
- [6] Nguyễn Xuân Thành (chủ biên), Nguyễn Đường, Hoàng Hải, Vũ Thị Hoàn (2007), *Giáo trình sinh học đất*, NXB Giáo dục.
- [7] Đỗ Thu Hà (2009), *Nghiên cứu sự đa dạng của khu hệ vi sinh vật đất và ứng dụng tại thành phố Đà Nẵng*, Báo cáo tổng kết đề tài khoa học cấp bộ, Đại học Đà Nẵng.