

NGHIÊN CỨU HOẠT TÍNH KHÁNG SINH CỦA XẠ KHUẨN CHI STREPTOMYCES TRONG ĐẤT Ở KHU VỰC CÓ HOẠT ĐỘNG KHAI THÁC KHOÁNG SẢN TẠI TỈNH THÁI NGUYÊN

• Th.S Đỗ Thị Tuyền (*) - CN. Đào Thị Hằng (*) - TS. Vi Thị Đoàn Chính (*)

Tóm tắt

Từ 19 mẫu đất thu được tại khu vực đang chịu ảnh hưởng của hoạt động khai thác khoáng sản của tỉnh Thái Nguyên, chúng tôi đã phân lập được 92 chủng xạ khuẩn chi *Streptomyces*. Các chủng xạ khuẩn phân lập được có độ đa dạng cao về màu sắc khuẩn ty khí sinh, xuất hiện cả 7 nhóm màu: xám, trắng, hồng, nâu, tím, xanh, vàng. Qua kiểm tra hoạt tính kháng sinh của các chủng xạ khuẩn phân lập được, có 39 chủng (chiếm 42,4%) có hoạt tính kháng các vi sinh vật kiểm định. Trong đó, số chủng có hoạt tính kháng nấm là cao nhất (chiếm 79,49%), số chủng có hoạt tính kháng vi khuẩn Gram (+) là 76, 29% và thấp nhất là số chủng có hoạt tính kháng vi khuẩn Gram (-) chỉ có 64,10%. Với mục đích tuyển chọn được các chủng có hoạt tính kháng nấm, chúng tôi đã lựa chọn ra 3 chủng có hoạt tính mạnh nhất để tiếp tục nghiên cứu là TC13.1, TC13.2 và TC12.1.

Từ khóa: chất kháng sinh, khuẩn ty, hoạt tính kháng sinh, hoạt tính kháng nấm, xạ khuẩn.

1. Đặt vấn đề

Chất kháng sinh (CKS) ngày nay đã và đang được sử dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực khác nhau. Ngoài mục đích y học, CKS còn được sử dụng trong chăn nuôi, thú y và đặc biệt là trong công tác bảo vệ thực vật để giảm dần việc sử dụng các loại thuốc hóa học [1], [6], [8]. Tuy nhiên, việc sử dụng các CKS không hợp lý đã dẫn đến sự xuất hiện ngày càng nhiều các vi sinh vật gây bệnh có khả năng kháng lại các thuốc kháng sinh hiện có, đặc biệt là nhiều loài vi sinh vật (VSV) có khả năng kháng chéo nhiều CKS có cấu trúc tương tự nhau. Do đó việc tìm ra những CKS mới, nhất là các CKS có cấu trúc hóa học tự nhiên do chính VSV tiết ra cần được quan tâm nhiều hơn. Trong số các VSV có khả năng sinh CKS thì xạ khuẩn chi *Streptomyces* được nhiều người chú ý.

Thái Nguyên là một tỉnh rất giàu tiềm năng về nông, lâm nghiệp nên có khu hệ VSV khá phong phú. Đồng thời, Thái Nguyên cũng nằm trong vùng sinh khoáng, có nhiều loại hình khoáng sản phân bố tập trung [4]. Các hoạt động khai thác khoáng sản đã có những tác động đáng kể đến môi trường đất, nước và qua đó, rất có thể sẽ ảnh hưởng đến hệ VSV đất

(*) Trường Đại học Khoa học – Đại học Thái Nguyên.

ở những khu vực này mà hiện vẫn chưa được nghiên cứu. Xuất phát từ những yêu cầu thực tế trên, từ xu hướng nghiên cứu trên thế giới hiện nay và cũng như để góp phần khai thác nguồn VSV vô cùng phong phú của Thái Nguyên, chúng tôi tiến hành nghiên cứu sự đa dạng sinh học của xạ khuẩn chi *Streptomyces* sinh chất kháng sinh trong đất ở khu vực Mỏ sắt Trại Cau thuộc huyện Đồng Hỷ, tỉnh Thái Nguyên. Đây là khu vực đã và đang diễn ra các hoạt động khai thác khoáng sản mạnh mẽ của tỉnh Thái Nguyên.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

- 19 mẫu đất được lấy từ các địa điểm khác nhau ở khu vực Mỏ sắt Trại Cau thuộc huyện Đồng Hỷ, tỉnh Thái Nguyên.

- 7 chủng VSV kiểm định: *Escherichia coli* VTCC-B-883, *Pseudomonas aeruginosa* VTCC-B-481, *Bacillus subtilis* VTCC-B-888, *Fusarium oxysporum* VTCCF-1301, *Aspergillus niger* VTCCF-001, *Fusarium solani* VTCCF-1302 do Viện Bảo tàng Giống chuẩn Vi sinh vật Việt Nam cung cấp; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 do Viện Kiểm nghiệm – Bộ Y tế cung cấp.

- Các môi trường: Gause I để phân lập và nuôi cấy xạ khuẩn; môi trường MPA và PDA để nuôi các chủng VSV kiểm định.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Thu mẫu đất và phân lập xạ khuẩn [1], [2].

- Xác định pH của đất [4].

- Xác định màu sắc của hệ khuẩn ty [6], [8].

- Xác định hoạt tính kháng sinh (HTKS) theo phương pháp thổi thạch để sơ tuyển xạ khuẩn và phương pháp đục lỗ để sàng lọc xạ khuẩn [3], [6].

- Xạ khuẩn được lên men trên máy lắc tròn 220 vòng/ phút, thời gian lên men 120 giờ ở 28°C [1].

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Phân lập xạ khuẩn chi *Streptomyces*

Từ 19 mẫu đất (trồng chè, trồng keo, trồng màu...) thu được từ các địa điểm khác nhau tại các khu vực Mỏ sắt Trại Cau thuộc huyện Đồng Hỷ, tỉnh Thái Nguyên, chúng tôi đã phân lập và thuần khiết được 92 chủng xạ khuẩn chi *Streptomyces*. Số lượng và sự phân bố của xạ khuẩn được trình bày trên bảng 1.

Bảng 1. Số lượng và sự phân bố xạ khuẩn chi Streptomyces trong đất

Loại đất lấy mẫu	Số lượng mẫu	pH của đất	Số lượng XK/g (CFU/g)	Số chủng XK phân lập
Đất trồng chè	3	4.15	2×10^6	6
Đất trồng keo	6	4.88	$6,83 \times 10^6$	22
Đất trồng màu	4	6.83	17×10^6	36
Đất trồng lúa	2	5.64	$7,5 \times 10^6$	10
Đất vườn	2	6.53	12×10^6	15
Đất đồi trọc	2	4.06	$1,5 \times 10^6$	3
Tổng cộng	19			92

Ghi chú: XK: xạ khuẩn

Kết quả bảng 1 cho thấy số lượng xạ khuẩn chi Streptomyces trong các mẫu đất là khá phong phú và phụ thuộc nhiều vào đặc điểm, tính chất của từng loại đất. Số lượng xạ khuẩn gặp nhiều ở các loại đất trồng màu (17×10^6 CFU/g) và đất vườn (12×10^6 CFU/g) là loại đất thường xuyên được cuốc xới, bổ sung nguồn phân bón hữu cơ và vô cơ, có pH gần trung tính (6,53 – 6,83), đó là các điều kiện thuận lợi cho sự phát triển của xạ khuẩn. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với đặc điểm sinh học của xạ khuẩn và đặc điểm canh tác đất tại những khu vực lấy mẫu. Ngược lại, những loại đất nghèo dinh dưỡng và đặc biệt là có pH quá cao hay quá thấp, xạ khuẩn phân bố rất ít. Theo kết quả nghiên cứu, đất chịu ảnh hưởng của các hoạt động khai thác thiếc ở khu vực khai thác quặng sắt Trại Cau đều thuộc loại đất chua, vì vậy không thích hợp cho xạ khuẩn phát triển [4]. Tuy nhiên, những nơi có hoạt động sản xuất của con người, pH có thể được cải thiện.

So với kết quả nghiên cứu của Lê Mai Hương (1993) về số lượng xạ khuẩn tại đất canh tác thuộc khu vực Hà Nội và vùng phụ cận thì số lượng xạ khuẩn của chúng tôi thu được từ các mẫu đất tại khu vực nhiễm quặng sắt Thái Nguyên thấp hơn [7].

3.2. Độ đa dạng về hình thái và HTKS của xạ khuẩn chi Streptomyces phân lập

Dựa vào các tài liệu phân loại của ISP được miêu tả bởi Shirling và Gottlieb, Gause và cộng sự (1983) [5], [8], căn cứ màu sắc khuẩn ty khí sinh và hoạt tính kháng 7 chủng VSV kiểm định của các chủng xạ khuẩn phân lập được, chúng tôi tiến hành phân nhóm với kết quả thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Số lượng và tỷ lệ các chủng xạ khuẩn chi Streptomyces có HTKS phân theo nhóm màu

TT	XK phân theo nhóm màu	XK phân lập được		XK có HTKS		Tỷ lệ XK có HTKS so với tổng số chủng phân lập được (%)
		Số lượng	Tỷ lệ (%)	Số lượng	Tỷ lệ (%)	
1	Xám	54	58,7%	22	56,4%	23,9%
2	Trắng	16	17,4%	4	10,2%	4,3%
3	Hồng	7	7,6%	6	15,4%	6,5%
4	Nâu	7	7,6%	1	2,6%	1,1%
5	Tím	4	4,3%	3	7,7%	3,3%
6	Xanh	3	3,3%	2	5,1%	2,2%
7	Vàng	1	1,1%	1	2,6%	1,1%
	Tổng	92	100%	39	100%	42,4%

Kết quả bảng 2 cho thấy các chủng xạ khuẩn phân lập được rất đa dạng về màu sắc khuẩn ty khí sinh, chúng tôi xếp chúng vào 7 nhóm màu, trong đó nhóm màu xám có số lượng nhiều nhất: 54/92 chủng, chiếm tỷ lệ 58,7%, tiếp theo là nhóm trắng chiếm 17,4%, các nhóm màu còn lại chiếm tỷ lệ rất thấp.

Tỷ lệ các chủng xạ khuẩn có HTKS tương đối cao, có 39 trong tổng số 92 chủng được kiểm tra, chiếm 42,4%. So sánh với các kết quả đã công bố, đây là một tỷ lệ khá cao. Điều này đã chứng tỏ số lượng xạ khuẩn có khả năng sinh CKS ở đất Thái Nguyên là rất lớn, đặc biệt là đất ở khu vực Trại Cau lại có tỷ lệ xạ khuẩn sinh CKS cao hơn so với đất ở một số khu vực khác của Thái Nguyên [1], [2], [6], [10].

Kết quả trên bảng 2 còn cho thấy tỷ lệ xạ khuẩn có HTKS cũng rất khác nhau giữa các nhóm màu. Nhóm màu xám có số lượng chủng nhiều nhất đồng thời cũng có tỷ lệ chủng có HTKS cao nhất, chiếm 56,41%. Tuy nhiên, nếu xét riêng từng nhóm màu, các nhóm màu tím, xanh và vàng mặc dù số lượng chủng phân lập được ít nhưng tỷ lệ chủng có HTKS lại tương đối cao. Đây là kết quả đáng lưu ý.

3.3. Phổ kháng sinh của các chủng xạ khuẩn phân lập

Chúng tôi tiến hành kiểm tra khả năng ức chế các nhóm VSV kiểm định, kết quả cho thấy tính đối kháng của các chủng xạ khuẩn với các VSV kiểm định rất khác nhau. Đặc biệt, số chủng có khả năng kháng nấm chiếm tỷ lệ khá cao, chiếm 79,49%, số chủng kháng vi khuẩn Gram (+) chiếm tỷ lệ 76,92%, số chủng xạ khuẩn kháng vi khuẩn Gram (-) chiếm tỷ lệ 64,10%. Đáng chú ý là trong số đó có 22 chủng, chiếm 56,41% có khả năng kháng được cả 2 nhóm vi

khuẩn Gram (+) và Gram (-), có 17 chủng, chiếm 43,60% có khả năng kháng được cả 3 nhóm VSV kiểm định. Tỷ lệ này cao hơn những nghiên cứu đã có ở các vùng khác [1, 2, 6, 10].

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

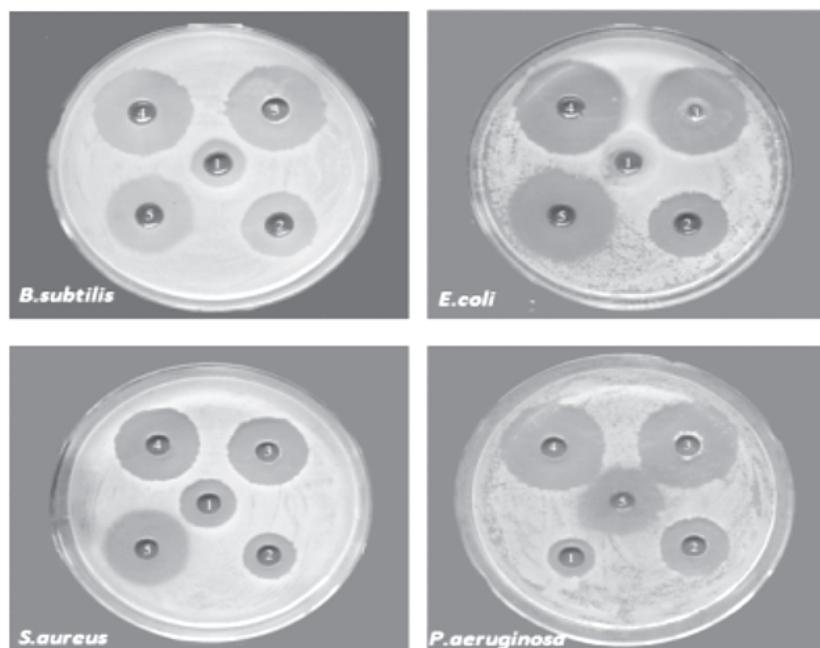
Căn cứ từ các kết quả kiểm tra sơ bộ về HTKS ở trên, chúng tôi chọn ra 5 chủng có hoạt tính cao, hoạt phổ rộng để tiếp tục sàng lọc. Các chủng này được nuôi lắc trong môi trường Gause I dịch thể và kiểm tra HTKS của dịch lên men bằng phương pháp đục lỗ. Kết quả được thể hiện ở bảng 3 và hình 1.

Kết quả trên cho thấy phần lớn các chủng lựa chọn đều vẫn giữ được hoạt tính khi chuyển từ môi trường thạch sang môi trường dịch thể. Hoạt tính của các chủng tương đối ổn định. Tuy nhiên tất cả các chủng đều không có hoạt tính với nấm *Aspergillus niger* VTCCF-001. Đặc biệt, trong số đó có 3 chủng TC13.1, TC13.2 và TC12.1 là có hoạt phổ rộng, kháng mạnh với 2 chủng nấm mốc, *Fusarium oxysporum* và *Fusarium solani*, là tác nhân gây bệnh thối cổ rễ ở một số cây trồng.

Bảng 3. Hoạt tính kháng sinh của 5 chủng xạ khuẩn tuyển chọn

Vi sinh vật kiểm định		Hoạt tính kháng sinh (D-d, mm)				
		TC13.1	TC13.2	TC15.9	TC12.1	TC16.12
VK Gram (+)	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	22,6±0,29	24,5±0,29	11,2±0,17	27,1±0,23	13,1±0,23
	<i>B. subtilis</i> VTCC-B-888	23,5±0,29	24,2±0,17	15,7±0,29	20,7±0,17	10,8±0,17
VK Gram (-)	<i>E.coli</i> VTCC- B-883	24,5±0,29	26,4±0,29	27,2±0,17	26,3±0,35	10,8±0,17
	<i>P. aeruginosa</i> VTCC-B-481	28,3±0,28	29,8±0,28	27,3±0,23	20,7±0,21	8,9±0,28
	<i>F. oxysporum</i> VTCCF-1301	26,4±0,50	24,8±0,21	18,9±0,28	25,1±0,23	15,4±0,35
Nấm mốc	<i>F. solani</i> VTCCF-1302	25,9±0,21	26,0±0,29	12,1±0,23	24,6±0,50	16,5±0,35
	<i>A. niger</i> VTCCF-001	-	-	-	-	-

Với hướng nghiên cứu tuyển chọn ra các chủng có HTKS cao, có hoạt phổ rộng và đặc biệt là có hoạt tính kháng nấm gây bệnh thực vật, 3 chủng trên được lựa chọn sử dụng cho các nghiên cứu ứng dụng tiếp theo.



Hình 1. Khả năng ức chế vi sinh vật kiểm định của một số chủng xạ khuẩn

Ghi chú: 1: TC16.12; 2: TC15.9; 3: TC13.1; 4: TC13.2; 5: TC12.1.

4. Kết luận

Số lượng xạ khuẩn chi *Streptomyces* phân bố ở các mẫu đất tại khu vực Mỏ sắt Trại Cau thuộc huyện Đồng Hỷ, tỉnh Thái Nguyên dao động trong khoảng từ $1,5 \times 10^6$ CFU/g đất đến 17×10^6 CFU/g đất.

Độ đa dạng về màu sắc khuẩn ty khí sinh của 92 chủng xạ khuẩn chi *Streptomyces* phân lập là khá cao, thuộc 7 nhóm màu, trong đó nhóm màu xám là chủ yếu, chiếm tỷ lệ 58,7%, tiếp theo là nhóm trắng chiếm 17,4%, các nhóm màu còn lại chiếm tỷ lệ rất thấp.

Trong số 92 chủng phân lập có 39 chủng có HTKS (chiếm 42,4%), 30 chủng kháng vi khuẩn Gram (+) (chiếm 76,92%), 31 chủng kháng nấm mốc (chiếm 79,49%), 25 chủng kháng vi khuẩn Gram (-) (chiếm 64,10%), 22 chủng kháng cả 2 nhóm vi khuẩn kiểm định Gram (+) và Gram (-) (chiếm 56,41%), 17 chủng kháng cả vi khuẩn Gram (+), vi khuẩn Gram (-) và nấm mốc (chiếm 43,60%).

Đã tuyển chọn ra 3 chủng xạ khuẩn TC12.1, TC13.1 và TC13.2 thuộc chi *Streptomyces* có hoạt phổ rộng và hoạt tính kháng nấm mạnh, có thể sử dụng cho các nghiên cứu ứng dụng tiếp theo./.

Tài liệu tham khảo

[1]. Vi Thị Đoan Chính (2011), *Tuyển chọn và nghiên cứu xạ khuẩn có khả năng đối kháng với một số chủng vi khuẩn gây nhiễm trùng bệnh viện*, Báo cáo tổng kết đề tài khoa học và công nghệ cấp Bộ, Mã số: B2009-TN07-02.

[2]. Vi Thị Đoan Chính, Trịnh Ngọc Hoàng, Trịnh Đình Khá, Vũ Thị Lan (2007), *Nghiên cứu sự phân bố của xạ khuẩn sinh chất kháng sinh phân lập từ đất Thái Nguyên*, Báo cáo khoa học Hội nghị toàn quốc NCCB trong khoa học sự sống, tr. 433–437.

[3]. Nguyễn Lâm Dũng, Phạm Thị Trân Châu, Nguyễn Thanh Hiền, Lê Đình Lương, Đoàn Xuân Mượu, Phạm Văn Ty (1978), *Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học*, Tập III, NXB KH&CN, Hà Nội.

[4]. Lê Đức, Nguyễn Quốc Việt (2007), *Tác động của hoạt động khai thác khoáng sản tại Đại Từ, Đồng Hỷ, Thái Nguyên đến môi trường khu vực*, Hội thảo KH Quốc gia “Những vấn đề môi trường và phát triển bền vững vùng đông bắc”, tr. 153–159.

[5]. Gause G. F., Terekhova L. P., Preobrazhenskaya T. P., Sveshnikova M. A., Maximova T. S. (1983), *A guide for the determination of actinomycetes*, Genera Streptomyces, Streptoverticillium, and Chaina, USA.

[6]. Bùi Thị Việt Hà (2006), *Nghiên cứu xạ khuẩn thuộc chi Streptomyces sinh chất kháng sinh chống nấm gây bệnh thực vật ở Việt Nam*, Luận án tiến sĩ Sinh học, Hà Nội.

[7]. Lê Mai Hương (1993), *Nghiên cứu xạ khuẩn sinh chất kháng sinh phân lập ở đất Hà Nội và vùng phụ cận*, Luận án phó tiến sĩ, Trường ĐHKHTN - ĐHQG Hà Nội.

[8]. Nguyễn Huỳnh Minh Quyên (2011), *Điều tra nghiên cứu một số hoạt chất có khả năng kháng vi sinh vật và kháng dòng tế bào ung thư từ tế bào xạ khuẩn*, Báo cáo tổng kết đề tài KH&CN cấp ĐH Quốc gia, Mã số 09.48, Hà Nội.

[9]. Shirling E. B., Gottlieb D. (1996), “Methods for characterization of *streptomyces* species”, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 16 (3).

[10]. Đỗ Thị Tuyền, Lương Thị Hương Giang, Đào Thị Hằng, Nguyễn Thị Hương Liên, Vi Thị Đoan Chính (2011), “Hoạt tính kháng sinh của xạ khuẩn trong đất tại các khu vực có hoạt động khai thác khoáng sản”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ - ĐH Thái Nguyên*, Số 86 (10), tr. 153–158.

Summary

A total of 92 actinomycete strains of genus *Streptomyces* were isolated and purified from 19 soil samples collected from the areas of the mining operations in Thai Nguyen province. These isolates had a high serialal colour diversity of aerial hypha with 7 colors of grey, white, pink, brown, violet, blue, yellow. They were then examined antibiotic activities by agar streak method against Gram-positive, Gram-negative bacteria and fungi. Results indicated that 92 isolates exhibited antibiotic activity (42.2%). Among them, 30 strains (76.92%) possessed antibiotic activity against Gram positive bacteria, 25 strains (64.10%) – against Gram negative bacteria, and 31 strains (79.49%) – against fungi. To select the anti-fungi, we obtained three strongest ones for further study of TC13.1, TC13.2 and TC12.1.

Key words: antibiotic, mycelium, antibiotic activity, anti-fungi activity, actinomycetes.

Ngày nhận bài: 02/02/2013, ngày nhận đăng: 28/10/2013.