

NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CỦA CHỦNG XẠ KHUẨN XK5 SINH KHÁNG SINH CHỐNG NẤM GÂY BỆNH THÁN THƯ TRÊN CÂY ỚT (*CAPSICUM FRUTESCENS* L.)

A STUDY ON BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE STRAINS ACTINOMYCETE
XK5 ANTIBIOTICS AGAINST ANTHRACNOSE ON CHILLI (*CAPSICUM FRUTESCENS* L.)

Lê Thị Mai

Trường Đại học Sư phạm, Đại học Đà Nẵng; Email: mailedn610@gmail.com

Tóm tắt: Ngày nay, việc sử dụng chất kháng sinh trong bảo vệ thực vật được dùng phổ biến và rộng rãi trên thế giới như ở các nước: Nga, Nhật, Trung Quốc, Ấn Độ... Nhiều chủng xạ khuẩn tuyển chọn từ đất và nghiên cứu sản xuất chất kháng sinh phòng chống bệnh cây có hiệu quả cao như policin chống bệnh đạo ôn, jangamicin chống bệnh khô vằn. So với thuốc hóa học bảo vệ thực vật, các chất kháng sinh vừa có tác dụng nhanh, dễ phân hủy, có tính chọn lọc cao, độ độc thấp và không gây ô nhiễm môi trường. Bài báo này đã trình bày một số kết quả nghiên cứu về đặc điểm sinh học của chủng xạ khuẩn XK5 có khả năng sinh kháng sinh mạnh. Bước đầu đã xác định được chủng này sinh trưởng và tổng hợp chất kháng sinh cao nhất trong môi trường A-4H, pH-7, nhiệt độ 28°C, thời gian nuôi cấy 5 ngày. Kết quả nghiên cứu này là cơ sở để lựa chọn môi trường lên men và nhiệt độ, pH thích hợp cho quá trình sinh tổng hợp chất kháng sinh.

Từ khóa: kháng sinh; Streptomyces; phòng trừ sinh học; chống bệnh; thán thư.

Abstract: Nowadays, the use of antibiotics in plant protection is popular and applied worldwide in such countries as Russia, Japan, China, India... Many strains of actinomycetes were selected from soil research and production of antibiotics in effective cure and prevention of many diseases such as policin against rice blast, sheath blight resistant to jangamicin. Antibiotics are fast-acting, biodegradable, highly selective, with low toxicity and causes less pollution on the environment than chemical pesticides for plant protection. This paper presents some results of a research on the biology of actinomycetes strains XK5 capable of strong antibiotic. Initially, this strain has been identified as the one that grows and has the highest antibiotic synthesis in A-4H environment, pH-7, at 28°C temperature, with an incubation period of 5 days. The findings are the basis for selecting appropriate environment, temperature and pH for the fermentation process of biosynthesis of antibiotics.

Key words: antibiotic; Streptomyces; Biological control; against diseases; anthracnose.

1. Đặt vấn đề

Sự đối kháng giữa các vi sinh vật trong đất là cơ sở của biện pháp sinh học phòng chống bệnh cây. Do vậy, từ lâu các nhà khoa học ở nhiều nước đã nghiên cứu tuyển chọn các chủng xạ khuẩn có khả năng ức chế nấm gây bệnh thực vật. Sự có mặt của xạ khuẩn đối kháng trong đất làm giảm rõ rệt tỷ lệ mắc bệnh cây.

Với mục đích lựa chọn môi trường lên men và các điều kiện nhiệt độ, pH thích hợp cho quá trình sinh tổng hợp chất kháng sinh, nhằm góp phần giảm thiệt hại do nấm bệnh gây ra. Chúng tôi tiến hành nghiên cứu một số đặc điểm sinh học của chủng xạ khuẩn XK5 từ đó có cơ sở lựa chọn môi trường lên men thích hợp cho quá trình sinh tổng hợp chất kháng sinh.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

- Chủng nấm mốc *Colletotrichum* gây bệnh thán thư trên cây ớt (*Capsicum frutescens* L.) có kí hiệu NB1, NB2, NB3, NB4, lấy tại phòng thí nghiệm Khoa Sinh – Môi trường, trường Đại học Sư phạm Đà Nẵng.

- Chủng xạ khuẩn XK5 có hoạt tính kháng mạnh với các chủng nấm mốc gây bệnh thán thư trên ớt lấy tại phòng thí nghiệm Khoa Sinh – Môi trường, trường Đại học Sư phạm Đà Nẵng.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Xác định hoạt tính kháng sinh: sử dụng phương pháp khuếch tán trên thạch [1].

- Nghiên cứu các đặc điểm sinh học: đặc điểm nuôi

cấy và hình thái, đặc điểm sinh lý- sinh hóa môi trường, khả năng sinh chất kháng sinh [2], [3], [4].

- Phương pháp xác định hoạt tính enzym ngoại bào [1].

- Phương pháp xử lý số liệu thống kê bằng Excel.

3. Kết quả nghiên cứu và biện luận

3.1. Đặc điểm nuôi cấy và đặc điểm hình thái

Chủng XK5 được nuôi cấy trên 5 môi trường: Gauze I, Gauze II, ISP-4, Czapek tinh bột và A-4H. Nuôi cấy ở nhiệt độ 28-30°C, thời gian 5-7 ngày sau đó quan sát khả năng sinh trưởng, màu sắc hệ sợi khí sinh màu sắc hệ sợi cơ chất và sắc tố hòa tan. Quan sát hình dạng cuống sinh bào tử dưới kính hiển vi thường. Kết quả được trình bày ở Bảng 1, Hình 1 và Hình 2.

Bảng 1. Đặc điểm nuôi cấy và hình thái của chủng XK5

Môi trường	Khả năng sinh trưởng	Màu hệ sợi khí sinh	Màu hệ sợi cơ chất	Sắc tố tan	Hình dạng cuống sinh bào tử
ISP-4	++	Trắng	Nâu	Nâu	Dạng RF, thẳng ngắn đến lượn sóng
A-4H	+++++	Trắng	Nâu đậm	Nâu đậm	nt
Czapek tinh bột	+	Trắng	Nâu	Vàng nâu	nt
Gauze I	+++	Trắng	Nâu	Nâu tối	nt
Gauze II	++++	Trắng	Nâu	Nâu đậm	nt

Ghi chú: nt- như trên

Chú thích: *Sinh trưởng tốt*: +++++

Sinh trưởng khá: +++

Sinh trưởng trung bình: ++

Sinh trưởng yếu: +

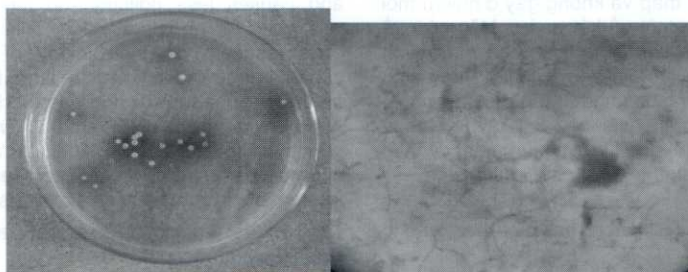
Qua Bảng 2 cho thấy chủng xạ khuẩn XK5 sinh trưởng mạnh nhất trên môi trường A-4H và Gauze II là những môi trường giàu đạm hữu cơ, sinh trưởng khá trên môi trường Gauze I, ISP-4 và mọc yếu nhất trên môi trường Czapek tinh bột.

Chủng XK5 có sự biến đổi màu sắc của hệ sợi khí sinh và hệ sợi cơ chất qua 5 môi trường mô tả như sau:

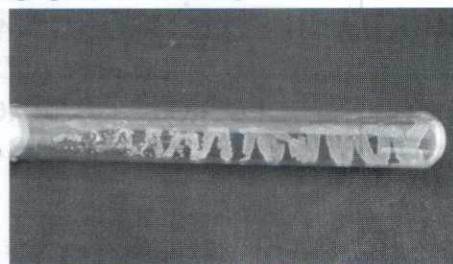
Hệ sợi khí sinh có màu trắng;

Hệ sợi cơ chất có màu nâu đến nâu đậm.

Chủng XK5 có khả năng sinh sắc tố tan từ màu nâu, nâu đậm.



Hình dạng cuống sinh bào tử của chủng XK5 là dạng RF, thẳng ngắn đến lượn sóng.



Hình 1. Hình ảnh ống giống của chủng xạ khuẩn XK 5 trên môi trường A4-H

Hình 2. Hình dạng khuẩn lạc và cuống sinh bào tử của chủng xạ khuẩn XK5

3.2. Đặc điểm sinh lý – sinh hóa

3.2.1. Xác định nhiệt độ và pH tối ưu

* Nhiệt độ:

Chủng xạ khuẩn XK5 được nuôi cấy trên môi trường pepton- cao nấm men- thạch, ở các nhiệt độ khác nhau: 20, 24, 28, 30, 35, 40°C.

Kết quả cho thấy chủng XK5 sinh trưởng phát triển tốt ở nhiệt độ 28- 30°C, tối ưu ở nhiệt độ 28°C.

* pH: Chủng XK 5 được nuôi cấy trên môi trường pepton- cao nấm men- thạch đã chỉnh pH= 5-8, ở nhiệt độ 28-30°C, thời gian 5-7 ngày. Sau đó lấy ra quan sát khả năng sinh trưởng của chủng XK5.

Kết quả cho thấy chủng XK 5 sinh trưởng được ở pH= 6,5- 8 nhưng pH tối ưu là pH = 7,0.

3.2.2. Sự hình thành sắc tố melanin

Chủng xạ khuẩn tuyển chọn được nuôi cấy trên môi trường ISP-4, pH= 7,0, ở nhiệt độ 28- 30°C, trong thời gian 15 ngày. Bắt đầu quan sát màu của môi trường sau một ngày đến 15 ngày. Nếu kết quả dương tính (+), màu của môi trường sẽ chuyển từ màu vàng nhạt sang vàng nâu tối đến màu đen. Kết quả cho thấy chủng xạ khuẩn XK5 sau 24 giờ có khả năng tiết sắc tố melanin ra môi trường làm cho môi trường chuyển từ màu vàng nhạt sang vàng nâu tối đến màu đen. Khi nuôi chủng XK5 trên các môi trường khác như Gauze I, Gauze II, A-4H cũng cho thấy sự hình thành sắc tố rất rõ.

3.2.3. Khả năng đồng hóa các nguồn cacbon của chủng xạ khuẩn XK5

Khả năng đồng hóa các nguồn cacbon của chủng xạ khuẩn XK5 được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. Khả năng đồng hóa các nguồn cacbon của chủng XK5

Nguồn cacbon	Chủng xạ khuẩn XK5
D- glucoza	+
D- Fructroza	+
Dextrin	+
Saccaroza	+
D- Manitol	+
L- Rhamnoza	-
Lactoza	+

Chú thích: Có khả năng : +

Không có khả năng –

Qua kết quả Bảng 2 cho thấy:

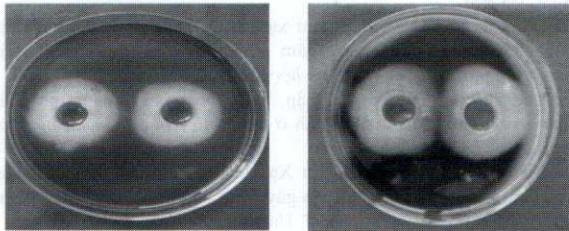
Chủng XK5 có khả năng sử dụng được các nguồn cacbon là D- glucoza, D- Fructroza, Dextrin, saccaroza, D- Manitol. Không sử dụng được nguồn cacbon là L- Rhamnoza.

3.2.4. Khả năng sinh amilaza, xenlulaza ngoại bào của chủng xạ khuẩn XK5

Sau khi sử dụng phương pháp khuếch tán trên thạch bằng cách đục lỗ, nhỏ dịch lên men rồi đo vòng phân giải (D-d,mm). Kết quả thu được trong Bảng 3 và Hình 3.

Bảng 3. Khả năng sinh amilaza, xenulaza ngoại bào của chủng xạ khuẩn XK5

Chủng xạ khuẩn	Hoạt tính enzym (D-d,mm)	
	Xenulaza	Amylaza
XK5	21±1,4	26±1,25

**Hình 3.** Khả năng sinh xenulaza, amylaza của chủng XK5

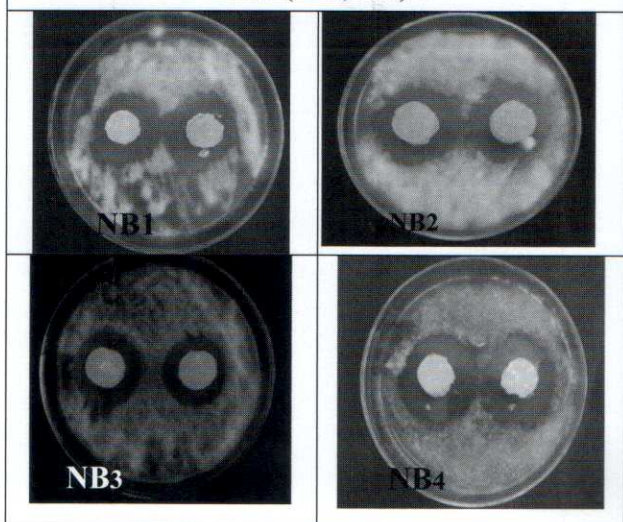
Qua kết quả Bảng 3 và Hình 3, chủng XK5 có khả năng sinh enzym xenulaza và amilaza rất mạnh. Vì vậy ngoài khả năng đối kháng với nấm bệnh, chủng còn có khả năng phân giải các chất hữu cơ cung cấp chất dinh dưỡng trong đất cho cây trồng.

3.3. Khả năng sinh tổng hợp chất kháng sinh của chủng xạ khuẩn XK 5

Hoạt tính kháng sinh của xạ khuẩn là một trong những chỉ tiêu quan trọng. Kiểm tra hoạt tính kháng sinh bằng phương pháp thời thạch cho thấy chủng XK5 có hoạt tính kháng sinh mạnh. Kết quả được trình bày ở Bảng 4, Hình 4.

Bảng 4. Hoạt tính kháng VSVKD của chủng XK 5

Chủng xạ khuẩn	Hoạt tính kháng <i>Colletotrichum</i> (Kích thước vòng vô khuẩn, D-d,mm)			
	NB1	NB2	NB3	NB4
XK5	21±1,1	20±1,7	19±1,53	25±0,82

Hoạt tính kháng Vi sinh vật kiểm định của chủng XK5 (D-d, mm)**Hình 4.** Vòng kháng nấm của chủng xạ khuẩn XK5 với nấm NB1, NB2, NB3, NB4 gây bệnh thán thư trên cây ớt

Kết quả ở Bảng 4, Hình 4 cho thấy chủng XK5 có hoạt tính kháng nấm mạnh và rộng với nhiều chủng nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư trên cây ớt.

3.4. Lựa chọn môi trường lên men

Việc lựa chọn môi trường lên men có ý nghĩa rất quan trọng trong công nghệ kháng sinh. Một môi trường tốt phải đảm bảo cho chủng xạ khuẩn sinh trưởng tốt và có khả năng sinh kháng sinh cao. Chúng tôi đã tiến hành lựa chọn môi trường lên men thích hợp cho chủng XK5 dựa trên 5 môi trường thường dùng để lên men sản xuất kháng sinh từ xạ khuẩn. Chủng XK5 được nuôi cấy trong bình 250 ml chứa 100 ml môi trường và nuôi cấy lắc 220 vòng/phút ở nhiệt độ 28°C, trong thời gian 5 ngày. Kết quả được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến khả năng sinh tổng hợp chất kháng sinh của các chủng XK5

Môi trường	Hoạt tính kháng nấm NB4 của chủng XK5 (D-d, mm)
Gauze I	21±2,62
ISP-4	17±2,16
A-4H	23±1,7
GauzeII	22±1,7
Czapek tinh bột	15±1,25

Kết quả Bảng 5 cho thấy, trong các môi trường thử nghiệm thì chủng XK5 có hoạt tính kháng sinh kháng nấm mạnh trên môi trường A-4H. Đây là môi trường giàu đạm hữu cơ thích hợp nhất cho xạ khuẩn sinh trưởng và phát triển. Ngoài ra, thành phần của môi trường A-4H khá đơn giản, sẽ thuận lợi cho việc tách chiết chất kháng sinh. Do vậy, môi trường này được chọn làm môi trường lên men thích hợp cho quá trình sinh tổng hợp chất kháng sinh.

3.5. Ảnh hưởng của thời gian

Để xác định ảnh hưởng của thời gian lên men đến khả năng tổng hợp chất kháng sinh, chúng tôi tiến hành nuôi cấy chủng XK5 trên môi trường A-4H trong thời gian 2- 7 ngày. Kết quả thể hiện ở Bảng 6.

Bảng 6. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến khả năng tổng hợp chất kháng sinh

Chủng xạ khuẩn	Thời gian lên men (ngày)				
	1	2	4	5	7
	Hoạt tính kháng sinh, kích thước vòng kháng nấm (D-d,mm)				
XK5	3,5±0,41	6±1	18±0,82	21±2,16	10±0,78

Qua kết quả Bảng 6 cho thấy:

Chủng xạ khuẩn XK5, chất kháng sinh được hình thành sau 1 ngày nuôi cấy, lượng kháng sinh đạt cực đại vào ngày thứ 5. Do chất kháng sinh là sản phẩm trao đổi thứ cấp được hình thành bắt đầu từ pha log (sau 24- 48 giờ nuôi cấy) và đạt cực đại sau 120 giờ nuôi cấy.

4. Kết luận

Đã nghiên cứu được một số đặc điểm sinh học của chủng XK5 như sau:

- Chủng xạ khuẩn XK5 sinh trưởng mạnh nhất trên môi trường A-4H, có khả năng sinh sắc tố tan từ màu nâu, nâu đậm. Hình dạng khuẩn sinh bào tử của chủng XK5 là dạng RF, thẳng ngắn đến lượn sóng.

- Chủng XK5 sinh trưởng phát triển tối ưu ở nhiệt độ 280C, pH= 7, sau 24 giờ có khả năng tiết sắc tố melanin, có khả năng sử dụng được hầu hết các các nguồn đường và có khả năng sinh enzym xenululaza, amilaza rất mạnh.

- Chủng XK5 có hoạt tính kháng nấm mạnh và rộng với nhiều chủng nấm Colletotrichum gây bệnh thán thư trên cây ớt.

(BBT nhận bài: 14/11/2013, phản biện xong: 19/12/2013)

- Đã lựa chọn được môi trường lên men A-4H, chọn được thời gian nuôi cấy trong 5 ngày chủng xạ khuẩn XK 5 cho lượng kháng sinh đạt cực đại.

Tài liệu tham khảo

- [1] Nguyễn Lân Dũng, Phạm Thị Trân Châu (1978), *Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học* - Tập III, NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
- [2] Bùi Thị Hà (2008), Nghiên cứu xạ khuẩn thuộc chi Streptomyces sinh chất kháng sinh chống nấm gây bệnh trên cây chè ở Thái Nguyên, *Luận văn Thạc sỹ Sinh học*, Thái Nguyên.
- [3] Lý Thu Hương (2001), Phân lập, tuyển chọn xạ khuẩn sinh chất kháng sinh chống nấm gây bệnh ở thực vật, *Khóa luận tốt nghiệp, trường ĐHTN, ĐHQG Hà Nội*.
- [4] Lê Gia Hy (1994), Nghiên cứu Xạ khuẩn thuộc 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*, Hà Nội.

Hoạt tính kháng nấm (Khuếch tán vòng và khuẩn D-d, mm)	Chủng xạ khuẩn
21 ± 2,5	XK5
17 ± 1	XK1
14 ± 1	A-4H
12 ± 1	Control
12 ± 1,2	Chủng xạ khuẩn

Để đánh giá hoạt tính kháng nấm của chủng xạ khuẩn XK5, người ta đã tiến hành thí nghiệm khuếch tán vòng và khuẩn trên môi trường A-4H. Kết quả cho thấy, chủng xạ khuẩn XK5 có hoạt tính kháng nấm mạnh hơn so với các chủng xạ khuẩn khác. Điều này được thể hiện qua việc chủng xạ khuẩn XK5 có vòng khuếch tán lớn hơn và khuẩn thể nhỏ hơn so với các chủng xạ khuẩn khác.

Để đánh giá hoạt tính kháng nấm của chủng xạ khuẩn XK5, người ta đã tiến hành thí nghiệm khuếch tán vòng và khuẩn trên môi trường A-4H. Kết quả cho thấy, chủng xạ khuẩn XK5 có hoạt tính kháng nấm mạnh hơn so với các chủng xạ khuẩn khác. Điều này được thể hiện qua việc chủng xạ khuẩn XK5 có vòng khuếch tán lớn hơn và khuẩn thể nhỏ hơn so với các chủng xạ khuẩn khác.

Thời gian lên men (ngày)	Chủng xạ khuẩn	Hoạt tính kháng nấm (Khuếch tán vòng và khuẩn D-d, mm)
1	XK5	12 ± 1,2
2	XK5	14 ± 1
3	XK5	17 ± 1
4	XK5	21 ± 2,5
5	XK5	21 ± 2,5

Để đánh giá hoạt tính kháng nấm của chủng xạ khuẩn XK5, người ta đã tiến hành thí nghiệm khuếch tán vòng và khuẩn trên môi trường A-4H. Kết quả cho thấy, chủng xạ khuẩn XK5 có hoạt tính kháng nấm mạnh hơn so với các chủng xạ khuẩn khác. Điều này được thể hiện qua việc chủng xạ khuẩn XK5 có vòng khuếch tán lớn hơn và khuẩn thể nhỏ hơn so với các chủng xạ khuẩn khác.

Chủng xạ khuẩn	Hoạt tính kháng nấm (Khuếch tán vòng và khuẩn D-d, mm)
XK5	21 ± 1,1
XK1	17 ± 1
A-4H	14 ± 1
Control	12 ± 1,2

Hình 4. Hoạt tính kháng nấm của chủng xạ khuẩn XK5 trên môi trường A-4H.

