

Vương Trọng Hòa,
Phạm Văn Ty,
Nguyễn Thành Đạt

NGHIÊN CỨU MỘT SỐ CHỦNG XẠ
KHUẨN (Streptomyces)
THUỘC NHÓM KHUẨN TY KHÍ SINH
MÀU HỒNG Ở VIỆT NAM

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Xạ khuẩn thuộc nhóm khuẩn ty khí sinh màu hồng chiếm vị trí quan trọng trong nhóm giống Streptomyces. Trong số 420 loài do Nonomura phân loại (1974) bao gồm cả các chủng do Chương trình xạ khuẩn quốc tế (ISP) mô tả, có đến 83 loài thuộc nhóm này. Nhiều chất kháng sinh có giá trị ứng dụng cao đã được chiết từ nhóm Hồng như neomixin, fradixin, colimixin, mixerin, streptotrixin, tyloxin... Ngoài ra còn có một số chất chống ung thư. Năm 1977, tại trường Đại học Dược Hà Nội Trương Công Quyền và cộng sự đã công bố phát hiện ra Dkmixin. Tuy nhiên, nhìn chung, ở Việt Nam hầu như chưa có công trình nào nghiên cứu một cách có hệ thống về các loài thuộc nhóm trên. Mục đích của bài này là giới thiệu sự phân bố, đặc điểm sinh học và khả năng sinh chất kháng sinh của nhóm xạ khuẩn màu hồng phân lập ở Việt Nam.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Xạ khuẩn được phân lập từ các mẫu đất trồng trọt ở độ sâu 10-15 cm thuộc các tỉnh và thành phố: Hà Nội, Hà Sơn Bình, Hải Hưng, Hà Nam Ninh, Thanh Hóa, Đà Nẵng, Cần Thơ và Thành phố Hồ Chí Minh. Xạ khuẩn được nuôi ở 28-30°C trong 14 ngày trên môi trường Czapek-Dox. Tất cả các chủng sau khi thuần khiết được sắp xếp thành từng nhóm theo các đặc điểm hình thái và nuôi cấy. Khi nghiên cứu các đặc điểm nuôi cấy và sinh thái thì cấy trên các môi trường Gause 1, Krassilnicov 1, môi trường thạch - thịt - pepton... Các đặc điểm này chủ yếu được xác định theo Shirling và Gottlieb (1966). Khi phân loại: chúng tôi chủ yếu dựa vào các bản mô tả của ISP (Shirling và Gottlieb, 1968, 1969, 1972). Ngoài ra còn so sánh với các khóa phân loại của Krassilnicov (1970), Gause (1957), Nonomura (1974), Szabó (1975), và Küster (1972). Kết cấu bề mặt bào tử được quan sát dưới kính hiển vi điện tử JEM-T8 với độ phóng đại 3000 - 21000x. Khả năng phân giải gelatin và làm đông tụ sữa được xác định trên môi trường Csaped - Dox - Glucosa nhưng thay NaNO₃ bằng gelatin và sữa với nồng độ 0,4% và hiện bằng HgCl₂. Môi trường này cũng đủ để thử khả năng phân giải tinh bột, xenluloza và khả năng khử nitrat. Nhưng trong hai trường hợp đầu thay đường bằng tinh bột và cacbonxymetyl xenluloza (CMC), đồng thời kết hợp với việc dùng giải giấy lọc trên môi trường dịch thể và thử bằng dung dịch lugol;

còn đối với khả năng khử nitrat thì thử bằng dung dịch diphenylamin. Khả năng hình thành HS được xác định theo Tresner và Danga (1958). Hoạt tính kháng sinh được thử theo phương pháp khuếch tán trên thạch (Egorov, 1969) trên môi trường Gauze-2 với các vi sinh vật kiểm định là *Penicillium* sp., *Aspergillus oryzae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis* L₂, *Escherichia coli* M 113.3 và *Pseudomonas aeruginosa* do viện Vệ sinh dịch tễ học cung cấp.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Từ hơn 600 chủng *Streptomyces* phân lập từ các mẫu đất khác nhau, chúng tôi đã sơ tuyển được gần 200 chủng có khuẩn ty khí sinh màu hồng rồi từ đó dựa vào các đặc điểm về hình thái và nuôi cấy lại lựa chọn ra 40 chủng điển hình để tiến hành nghiên cứu tỷ mỉ. Ngoài ra, để so sánh chúng tôi còn tiến hành nghiên cứu song song hai chủng nữa là *S. fradiae* F (ISP-5063) nhận được từ Pháp và *S. fradiae* DK5 sinh DKmixin nhận được từ phòng thí nghiệm kháng sinh Đại học Dược Hà Nội.

3.1. Các đặc điểm hình thái và nuôi cấy

Tất cả các chủng nghiên cứu đều sinh trưởng tốt trên môi trường Czapek-Dox, Gauze-1, Krassilnicov-1 và môi trường thạch - thịt - pepton (MPA). Trên các môi trường này hệ khuẩn ty khí sinh đều có màu hồng, tuy nhiên tùy thuộc vào thành phần môi trường mà sắc thái có thể thay đổi từ hồng nhạt đến hồng tím. Khuẩn ty cơ chất không có màu đặc trưng (thuộc nhóm màu vàng nâu Y - b) và không có sắc tố hòa tan tiết ra môi trường loại trừ hai chủng thuộc loài *Actinomyces roseofulvus* là có khuẩn ty cơ chất màu nâu (chúng thuộc nhóm màu Y-b ÷ red) và sắc tố tiết ra môi trường màu da cam. Đáng chú ý là ngay trên cùng một môi trường nhưng khi cấy truyền nhiều lần, màu sắc khuẩn ty khí sinh cũng thay đổi ít nhiều. Điều này một lần nữa khẳng định quan điểm cho rằng màu sắc khuẩn ty khí sinh và cơ chất không phải là đặc điểm ổn định và thật quan trọng để phân loại xạ khuẩn.

Khả năng hình thành sắc tố melanin chỉ thấy ở *S. katrae* (11 chủng) và *S. chromogenus* (1 chủng) sau hai ngày nuôi cấy trên môi trường khoai tây và môi trường ISP-7. Các loài còn lại hoàn toàn không có khả năng này.

Hình thái cuống sinh bào tử của các chủng nghiên cứu thay đổi tùy loài. Các loài *A. roseofulvus*, *S. roseosporus*, và *S. termitum* có hình dạng cuống sinh bào tử khá ổn định. Khi nuôi cấy trên các môi trường khác nhau chúng luôn có dạng thẳng (Rectiflexibiles - RF). Ngược lại, các chủng thuộc loài *A. roseolus* và *S. filamentosus* thường có cuống sinh bào tử thuộc dạng RF nhưng trên một số môi trường lại thấy xuất hiện các vòng xoắn thô sơ (Rectinaculiaperti - RA). Những chủng thuộc các loài *S. fradiae*, *S. katrae*, *S. roseus*, *A. roseolilaccinus* và *S. chromogenus* lại biểu hiện cả ba dạng cuống sinh bào tử thẳng (RF), xoắn thô sơ (RA) và xoắn điển hình (Spirales S) khi sinh trưởng trên các môi trường khác nhau. Trên các môi trường có nguồn nitơ vô cơ (Gauze-1, Krassilnicov-1, Czapek - Dox) cuống sinh bào tử có xu hướng xoắn nhiều hơn, ngược lại trên môi trường có nguồn nitơ hữu cơ (thạch - thịt - pepton; thạch - bột đậu - pepton); thạch - nước

chiết khoai tây - nước thịt - pepton) cuốn sinh bào tử lại có xu hướng thẳng, lượn sóng hoặc xoắn thớ. Kết quả này cho thấy, mặc dù hình thái cuống sinh bào tử luôn luôn được coi là một trong những đặc điểm quan trọng nhất trong định loại xạ khuẩn nhưng môi trường nuôi cấy phải là ổn định bởi vì khi thay đổi thành phần môi trường có thể làm thay đổi chút ít hình dạng cuống sinh bào tử và dẫn đến việc nhầm lẫn trong định loại. Trong tất cả các trường hợp, hình dạng bào tử và kết cấu bề mặt ngoài bào tử đều rất ổn định. Bào tử có hình ôvan hoặc viên tròn. Bề mặt bào tử trên mỗi chuỗi là 10-50. Vì vậy, rõ ràng kết cấu bề mặt bào tử luôn luôn là đặc điểm đáng yên tâm nhất trong định loại xạ khuẩn (bảng 1).

3.2. Các đặc điểm sinh lý, sinh hóa

Khả năng đồng hóa các hợp chất cacbon tùy thuộc từng loài. Hầu như 100% các chủng sử dụng được glucoza, tinh bột, sắt xitrat, cacboxymetyl xenluloza (CMC) làm nguồn cacbon duy nhất, trừ các chủng thuộc loài *S. fradiae* không sử dụng được CMC. Không chủng nào sử dụng được manitol, maltoza và chỉ các chủng thuộc loại *S. chromogenus* là sử dụng được I. inositol. 70% số chủng có khả năng khử nitrat, phân giải gelatin và làm đông sữa. Khả năng sinh enzym phân giải các chất nói trên đã xác định vai trò to lớn của nhóm xạ khuẩn này trong vòng tuần hoàn vật chất. Chúng phân giải các chất hữu cơ tự nhiên (khoáng hóa) và do đó góp phần nâng cao độ phì nhiêu cho đất.

3.3. Khả năng hình thành chất kháng sinh

Hoạt tính kháng sinh của các chủng xạ khuẩn thuộc nhóm Hồng do chúng tôi nghiên cứu biểu hiện khá cao (bảng 2) có tới 97,6% số chủng có khả năng ức chế sinh trưởng của các vi khuẩn kiểm định gram âm và gram dương (*Bacillus subtilis* L₂, *Escherichia coli* M 113.3, *Pseudomonas aeruginosa*) trong đó đáng chú ý nhất là hai loài *A. fradiae* var. *spiralis* và *S. katrae*. Có tới 74,4% số chủng thuộc các loài này có vòng kháng khuẩn từ 18 mm trở lên.

Hoạt tính kháng sinh chống nấm thể hiện yếu. Khoảng 20% số chủng có khả năng ức chế *Saccharomyces cerevisiae* và *Penicillium* sp. (bảng 2)

Điều thú vị là nhiều chủng vừa có khả năng sinh chất kháng sinh lại vừa có khả năng sinh các enzym amylaza và xenluloza. Điều này chẳng những thuận lợi cho việc chọn nguyên liệu làm môi trường lên men chất kháng sinh mà còn gợi ý cho thấy nếu nâng cao được hoạt tính enzym thì có thể sản xuất chúng bằng con đường bán vô trùng, bởi vì chất kháng sinh có hoạt phổ rộng sẽ ức chế được đa số các vi khuẩn lây nhiễm.

Chúng tôi đã lựa chủng *A. fradiae* var. *Spiralis* HA có hoạt tính kháng khuẩn mạnh nhất để tiến hành lên men thử trên môi trường bột đậu tương (warren, 1955). Sau khi tiến hành chiết rút (hấp phụ bằng IRC-50 (NH₄⁺) và phân hấp phụ bằng NH₄OH LN), xác định phổ sắc ký, phổ hấp phụ tử ngoại chất kháng sinh và sản phẩm phân hủy, chúng tôi đã xác định chất kháng sinh do *A. fradiae* var. *spiralis* HA sinh ra thuộc nhóm aminoglycosit, rất gần với neomycin và DK-myxin.

3.4. Đặc điểm phân bố và thành phần loài

Số lượng xạ khuẩn có khuẩn ty khí sinh màu hồng là khá cao. Trong số 40 chủng đại diện mà chúng tôi chọn để nghiên cứu đã được xếp vào 11 loài. Về cơ bản, các loài này có những đặc điểm phù hợp với mô tả của Krassilnicov (1970) Gause (1957), Shirlilng và Gottlieb (1968, 1969, 1972), Küster (1974) và Szabo (1975). Tuy nhiên cũng có những sai khác về chi tiết. Những sai

Bảng 1. Đặc điểm sinh học của các loài xạ khuẩn nhóm hồng phân lập được

Tên loài xạ khuẩn	3	4	5	6	7	8	9	Khả năng đồng hóa nguồn cacbon																	
								10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
<i>Streptomyces fradiae</i>	5063	R	O	O	O	RA	Sm	+	+	-	-	+	-	±	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
<i>Actinomyces fradiae</i> var. <i>spiralis</i>	5063	R	O	O	O	RA	Sm	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
<i>katrae</i>	5550	R	O	O	I	RA	Sm	+	+	-	-	+	-	±	±	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
<i>roseus</i>	5076	R	O	O	O	RF	Sm	-	+	-	-	±	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
<i>roseofulvus</i>	5172	R	I	I	O	RF	Sm	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-
<i>roseolilacinus</i>	5173	RY	O	O	O	SRA	Sm	+	-	-	-	±	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
<i>roseolus</i>	5174	R	O	O	O	RF	Sm	+	+	-	±	±	+	-	±	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
<i>rosoaporus</i>	5122	R	O	O	O	RF	Sm	+	+	-	-	±	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-
<i>filamentosus</i>	5022	R	O	O	O	RF	Sm	±	+	-	±	±	+	±	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
<i>chromogenus</i> sp. <i>termitum</i>	5384	R	O	V	I	SRA	Sm	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>termitum</i>	5329	R	O	O	O	RF	Sm	-	+	-	-	±	±	±	±	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-

Chú thích:

3: Đỏ; RY: Đỏ - vàng; Sm: nhẵn; 8: Xoắn; RA: Xoắn thô sơ; RF: Thẳng - lượn sóng; O: Không sắc tố; V: Có sắc tố; I: Tinh bột; +: Có đồng hóa; -: không đồng hóa; ±: Có hoặc không.

Chú thích:

1: Ký hiệu của ISP; 4: Màu hệ sợi khí sinh; 5: Màu hệ sợi cơ chất; 6: Sắc tố hòa tan; 7: Sắc tố melanin; 8: Cường sinh bào tử; 9: Bề mặt màng bào tử; 10: Anabinosa; 11: D - Xyloza; 12: I - inositol; 13: Mannit; 14: Fructose; 15: Rannosa; 16: Sacarosa; 17: Raffinosa; 18: Xenlulosa; 19: CMC; 20: Glyxerin; 21: Sắt; 22: Tinh bột; 23: AX. Malic; 24: Phân giải Gelatin; 25: Đồng hóa sữa; 26: khử nitrat; 27: Sinh H₂S

Bảng 2. Hoạt tính kháng sinh của các chủng xạ khuẩn nghiên cứu

Số thứ tự	Loài xạ khuẩn	Ký hiệu chung	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)					
			(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)
1	<i>S. fradiae</i>	6	0	0	0	20	18	12
2	- nt -	12	0	0	0	20	22	20
3	- nt -	65	7	0	0	14	10	V
4	- nt -	75	0	0	0	15	12	V
5	- nt -	81	0	0	0	14	10	V
6	- nt -	F	0	0	9	20	266	25
7	- nt -	DK	0	0	11	18	23	18
8	<i>A. fradiae</i> var. <i>spiralis</i>	4	0	0	10	16	18	0
9	- nt -	14	0	0	0	15	16	20
10	- nt -	37	0	0	0	16	12	10
11	- nt -	41	0	0	9	15	13	10
12	- nt -	50	0	0	7	14	13	10
13	- nt -	77	0	0	0	12	10	V
14	- nt -	84	0	0	9	15	12	V
15	- nt -	121	0	0	0	13	15	V
16	- nt -	130	0	0	0	12	14	V
17	- nt -	133	0	0	0	15	12	V
18	- nt -	157	12	9	9	12	10	V
19	- nt -	A	0	0	V	10	16	V
20	- nt -	HA	0	0	V	18	25	25
21	<i>S. ktrae</i>	7	0	0	0	15	16	0
22	- nt -	13	0	0	V	13	16	22
23	- nt -	15	0	0	V	18	18	24
24	- nt -	20	0	0	V	18	20	20
25	- nt -	22	0	0	V	12	15	18
26	- nt -	28	0	0	V	18	20	25
27	- nt -	53	0	0	0	17	15	12
28	- nt -	80	0	0	V	13	14	10
29	- nt -	93	V	V	9	12	14	10
30	- nt -	132	0	9	11	14	15	12
31	- nt -	145	0	0	V	15	15	12
32	<i>S. roseus</i>	3	0	0	0	15	0	0
33	- nt -	60	0	0	V	16	0	0
34	- nt -	128	0	0	9	16	0	0
35	<i>A. roseofulvus</i>	129	0	0	0	12	0	0
36	- nt -	142	0	0	V	16	0	0
37	<i>A. roseolus</i>	166	0	0	0	17	0	0
38	<i>A. roseolilacinus</i>	82	0	0	0	16	0	0
39	<i>S. roseosporus</i>	83	0	0	9	15	V	V
40	<i>S. filamentosus</i>	123	0	0	0	12	0	0
41	<i>S. chromogenus</i> sp.	120	0	0	V	13	0	0
42	<i>S. termitum</i>	98	0	0	0	0	0	0

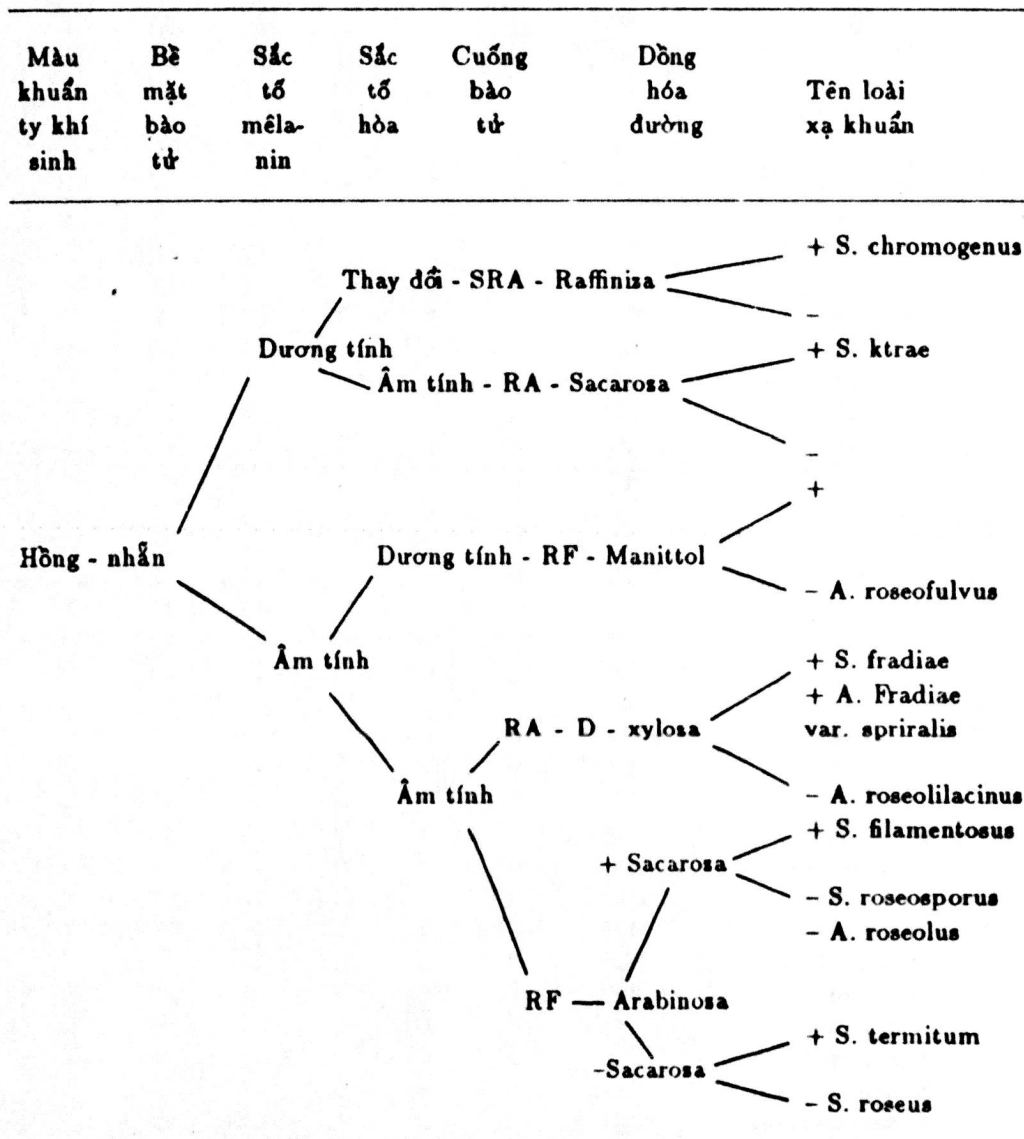
Ghi chú V : Vết

Các cột: (4) : *Penicillium* sp.; (5) : *A. oryzae*; (6) : *S. cerevisiae*; (7) : *B. subtilis* L₂; (8) : *E. coli* M. 133.3; (9) : *P. aeruginosa*.

khác này là do biến dị của xạ khuẩn ở các điều kiện sinh thái khác nhau. Khi tiến hành định loại các chủng phân lập đến mức loài, chúng tôi nhận thấy không chỉ dựa vào một khóa phân loại, mà phải kết hợp nhiều khóa, trong đó các bảng mô tả của ISP là quan trọng và thuận lợi nhất, bởi vì chúng có thể giúp kiểm tra nhanh chóng và chính xác đa số các chủng phân lập được.

Để tiện theo dõi, chúng tôi đưa ra sơ đồ phân loại nhanh các chủng do chúng tôi nghiên cứu (bảng 3).

Bảng 3. Sơ đồ phân loại nhanh các chủng xạ khuẩn nghiên cứu thuộc nhóm Hồng



Với số lượng mẫu đất chưa nhiều để khẳng định vị trí phân bố của nhóm Hồng, tuy nhiên các kết quả của chúng tôi cho thấy ba loài *S. fradiae*, *A. fradiae* var. *spiralis* và *S. Katrae* chiếm đa số (70%) và có mặt trong nhiều mẫu đất ở các tỉnh phía Bắc và phía nam (bảng 4) còn 8 loài còn lại, với số lượng ít hơn và thường gặp trong các mẫu đất thuộc các tỉnh phía Bắc.

Bảng 4. Phân bố của các chủng xạ khuẩn nghiên cứu thuộc nhóm hồng phân lập từ các địa điểm khác nhau

Số thứ tự	Vùng đất Loài xạ khuẩn	Hà	Hà	Hải	Hà	Thanh	Đà	TP. Hồ	Cần	Tổng số chủng xạ khuẩn	Tỷ lệ (%)
		Sơn Bình	Nội	Hưng	Nam Ninh	Hóa	Năng	Chí Minh	Thơ		
1	<i>S. fradiae</i>	1			3		1			5	12,5
2	<i>A. fradiae</i> var. <i>spiralis</i>	1	2	4	1			4	1	13	32,5
3	<i>S. katrae</i>	1		2	1			6	1	11	27,5
4	<i>S. roseus</i>	2	1							3	7,5
5	<i>A. roseofulvus</i>		1	1						2	5,0
6	<i>A. roseolilacinus</i>					1				1	2,5
7	<i>S. termitum</i>					1				1	2,5
8	<i>S. filamentosus</i>		1							1	2,5
9	<i>S. chromogenus</i> sp.		1							1	2,5
10	<i>S. roseolus</i>			1						1	2,5
11	<i>S. roseosporus</i>					1				1	2,5
Tổng số chủng:		5	6	8	5	3	1	10	2	40	
Tổng số loài:		4	5	4	3	3	1	2	2	11	

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Krassilnicov N., 1970. The Actinomycetales. The Jena International Symp on Taxonomy. Jena. P. 293-298.
2. Küster N., S. William, 1972. Int. J. Syst. Bacteriol, V. 22, No. 3, 139-148 Nonomura H., 1974. J. Ferment Technol, V. 52, No. 2, 78-92.
3. Trương Công Quyền et al., 1977. Biologica, Bratislava, 82, 217-222
4. Shirling E. B., D. Gottlieb, 1968. Int. J. Syst. Bacteriol V. 18, NO.4, 279-392.
5. Shirling E. B., D. Gottlieb, 1970. Int. J. Syst. Bacteriol. V. 19, No. 4, 351-512.
6. Shirling E. B., D. Gottlieb, 1972. Int. J. Syst. Bacteriol. No. 4, 265- 394.
7. Szabo I.M., 1975. Acta Botanica Acad. Sci. Hung. 21, 387-418.
8. Szabo I.M., Marton, 1976. Int. J. Syst. Bacteriol, V. 26, No. 2, 105-110.
9. Tresner H., E. Bakus, 1963. Appl. Microbiol, V. 11, NO. 4, 335-338.

Vuong Trong Hao et al.

STUDY ON STREPTOMYCETES BELONGING TO RED-GROUP ISOLATED IN VIET NAM

From above 500 strains of Streptomycetes isolated in Vietnam 200 strains of red aerial mycelium producing striptomycetes were selected and 40 representative strains of which were chosen for detailed investigation. These strains were identified as *S. fradiae*, *A. fradiae* var. *spiralis*, *S. katrae*, *S. roseus*, *A. roseofulvus*, *A. roseolus*, *A. roseolilacinus*, *S. termitum*, *S. filamentosus*, *S. chromogenus* and *S. roseosporus*. Three species: *S. fradiae*, *A. fradiae* var. *spiralis* and *S. katrae* were dominant in the soil samples and widely distributed from the North to the South of country. 90% of them expressed antimicrobial properties against grampositive and gramnegative bacteria (*B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*) and only some of them were against fungi and yeasts.

Strain of *A. fradiae* var. *spiralis* HA showed the most intensive antimicrobial action. Its antibiotic substance was identified as aminoglycoside and was in near resemblance with neomycin and Dikamycin.

Khoa Sinh học - ĐHTH Hà Nội