



ĐA DẠNG THÀNH PHẦN LOÀI VI KHUẨN LAM TIỀM NĂNG SINH HOẠT CHẤT KHÁNG KHUẨN, KHÁNG NẤM TỪ ĐẤT RUỘNG LÚA HUYỆN PHÚ VANG THỪA THIÊN HUẾ

Nguyễn Thị Thu Liên*, Lê Thị Tuyết Nhân, Nguyễn Hồng Sơn,
Nguyễn Thị Huệ, Phạm Thị Diễm Thi

Viện công nghệ sinh học, Tinh Lộ 10, Phú Vang, Thừa Thiên Huế, Việt Nam

Tóm tắt: Với mục đích tìm kiếm các loài vi khuẩn lam có tiềm năng sản sinh các hợp chất hoạt tính sinh học, chúng tôi trình bày kết quả phân lập, xác định thành phần loài vi khuẩn lam (VKL) từ đất ruộng lúa huyện Phú Vang – Thừa Thiên Huế và thăm dò khả năng kháng khuẩn, kháng nấm của chúng. Đã thu thập được 22 loài vi khuẩn lam thuộc 2 bộ (Nostocales và Oscillatoriales), 3 họ (Nostocaceae, Rivulariaceae và Oscillatoriaceae) và 6 chi (*Anabaena*, *Cylindrospermum*, *Nostoc*, *Calothrix*, *Oscillatoria* và *Phormidium*). 20 chủng VKL được phân lập và duy trì ổn định trong môi trường nhân tạo. 12 chủng được làm sạch khuẩn và xác định hoạt tính kháng vi sinh vật của dịch chiết của chúng đối với *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* và *Candida albicans*, trong số đó 9 chủng kháng *Bacillus subtilis*, 9 chủng kháng *Staphylococcus aureus*, 5 chủng kháng *Escherichia coli*, 5 chủng kháng nấm *Candida albicans*. Chủng có hoạt tính cao nhất và cũng là chủng kháng được cả 3 loại VSV kiểm định là chủng HN42 của loài *Nostoc muscorum* với đường kính vòng kháng từ 4,5 đến 9,0 mm.

Từ khóa: vi khuẩn lam, đa dạng, kháng khuẩn, kháng nấm, dịch chiết

1 Đặt vấn đề

Vi khuẩn lam (VKL) là những sinh vật tiền nhân quang tự dưỡng, có khả năng thích ứng với hầu hết các điều kiện môi trường nên chúng có mặt ở mọi nơi: trên mặt đất, ao hồ, sông suối và ven biển. Chúng đóng vai trò quan trọng trong hệ sinh thái thủy vực và đất, là sinh vật sơ cấp trong môi trường nước, cung cấp năng lượng sơ cấp cho những sinh vật bậc cao, đóng vai trò quan trọng trong việc duy trì và làm gia tăng độ phì nhiêu của đất nhờ khả năng cố định đạm, đặc biệt trong các ruộng lúa [7]. Ruộng lúa là một trong những hệ sinh thái đáp ứng đầy đủ các yêu cầu về dinh dưỡng, ánh sáng, nhiệt độ và nước thuận lợi cho sự sinh trưởng và phát triển của VKL [17]. Ngược lại, VKL lại cung cấp một lượng lớn ni tơ và phốt pho cần thiết cho sự phát triển của lúa [14]. Một số vi khuẩn lam có khả năng cố định ni tơ phân tử góp phần tạo nên độ phì nhiêu cho đất trồng. Ngoài việc cố định đạm cung cấp ni tơ dễ tiêu cho cây trồng, VKL ở ruộng lúa còn có vai trò làm tăng hàm lượng oxi hoà tan, do đó giảm được sự tích lũy và khử độc

* Liên hệ: nttliencnsh@hueuni.edu.vn

cho lúa; chúng tiết vào môi trường các chất có hoạt tính sinh học kích thích sự sinh trưởng của cây trồng như các hormon tăng trưởng thực vật (auxin, gibberellin), vitamin, acid amin [11]. Ngoài ra, VKL còn là một nguồn tài nguyên gần như chưa khai thác liên quan tới các hợp chất có hoạt tính kháng khuẩn, kháng virus, chống oxy hóa và chống viêm [15, 10], các hợp chất kháng khuẩn do chúng tạo ra không những các tác nhân phòng vệ (chống lại mầm bệnh) mà còn các hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học [6].

Với mục đích tìm kiếm các loài vi khuẩn lam tiềm năng sinh hoạt chất kháng khuẩn, kháng nấm để nghiên cứu về hoạt chất sinh học của chúng, trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu đa dạng thành phần loài VKL tiềm năng từ một số ruộng lúa huyện Phú Vang – Thừa Thiên Huế, phân lập và bước đầu thăm dò khả năng kháng khuẩn, kháng nấm của chúng. Kết quả của nghiên cứu này là cơ sở góp phần cho những nghiên cứu tiếp theo về tìm kiếm các chủng vi khuẩn lam có khả năng sinh ra các hợp chất quý có khả năng ứng dụng cao.

2 Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1 Địa điểm thu mẫu

Mẫu đất được thu từ các địa điểm khác nhau trên loại hình đất trồng lúa ở 6 xã thuộc huyện Phú Vang, tỉnh Thừa Thiên Huế, bao gồm Phú Thượng, Phú An, Phú Mậu, Phú Dương, Phú Hồ và Phú Xuân. Thời gian nghiên cứu từ tháng 1 năm 2015 đến tháng 12 năm 2016. Mẫu thu ngẫu nhiên, trước, giữa và sau vụ mùa.

2.2 Lấy mẫu và xử lý mẫu VKL trong đất

Mẫu đất được thu từ lớp bề mặt, cho vào túi nilon có ghi nhãn về thời gian và địa điểm. Tại phòng thí nghiệm, mỗi mẫu đất được đặt vào các đĩa petri có lót giấy lọc đã tiệt trùng. Các mẫu đất được giữ ẩm bằng môi trường Z8 [9], pha loãng 1/10 lần. Tất cả mẫu được đặt dưới ánh sáng đèn neon có cường độ 1000–1200 lux tạo điều kiện cho VKL phát triển. Sau khoảng 2 tuần, trên bề mặt lớp đất mọc lên các đám tảo lam màu xanh làm nguyên liệu để tiến hành phân lập hay phân loại [2].

2.3 Phân loại

Việc xác định thành phần loài được thực hiện bằng phương pháp so sánh hình thái theo Desikachary [5], Dương Đức Tiến [3], và Komarek và Anagnostidis [8].

2.4 Xác định hoạt tính kháng khuẩn kháng nấm

Tạo nuôi cấy sạch khuẩn: Các nuôi cấy sau khi đã được phân lập, duy trì ổn định trong môi trường nuôi thích hợp được tiếp tục làm sạch khuẩn trước khi tiến hành tách chiết xác định hoạt tính. Việc tinh chế khuẩn được thực hiện bằng 2 cách: chiếu tia UV và sử dụng kháng sinh,

riêng rẽ hay phối hợp. Thời gian chiếu tia UV là 7–10 phút. Các loại kháng sinh được sử dụng là ampicillin, nystatin và amoxillin với hàm lượng thăm dò 5–20 µg/mL. Theo dõi các khoảng thời gian chiếu tia UV khác nhau, thành phần hay hàm lượng kháng sinh khác nhau. Các nuôi cấy được làm sạch thành công sau khi đã được kiểm tra độ sạch khuẩn bằng phương pháp cấy ria trên đĩa thạch.

Tách chiết: Các nuôi cấy sạch được nhân sinh khối trong các bình 500 mL chứa 300 mL môi trường dinh dưỡng, ở nhiệt độ 20–26 °C và được chiếu bằng đèn huỳnh quang (2000–3000 lux) 12 giờ sáng: 12 giờ tối, điều kiện vô trùng. 1 g mẫu khô được chiết trong methanol và ethyl acetate, dịch chiết của các chủng vi khuẩn lam được thử hoạt tính với các vi sinh vật kiểm định.

Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm: Hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán qua đĩa thạch [4]. Các vi sinh vật kiểm định bao gồm *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* được cung cấp từ Trung tâm kiểm nghiệm thuốc – mỹ phẩm – thực phẩm Thừa Thiên Huế. Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy qua đêm trong môi trường PCA (Plate count agar) đối với vi khuẩn và môi trường SA (Sabouraud agar) đối với vi nấm ở 37 °C. Các dịch chiết được hòa tan trong dung môi và hấp phụ lên đĩa giấy có đường kính 6 mm. Sau 2–3 giờ, dung môi trong mẫu thử đã bay hơi hoàn toàn, các đĩa giấy này được đặt lên bề mặt các đĩa thạch chứa vi khuẩn, hoặc nấm. Các hợp chất tự nhiên khuếch tán từ đĩa giấy vào môi trường thạch ở điều 4 °C trong 3 giờ. Sau đó, chuyển các đĩa thạch chứa vi khuẩn và mẫu thử sang tủ 37 °C để tạo điều kiện cho vi khuẩn phát triển. Kết quả được đọc sau 24 giờ. Vùng ức chế có thể quan sát với màu trong suốt của thạch bao quanh đĩa giấy.

Xử lý số liệu: Các thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên và được lặp lại 3 lần. Số liệu thí nghiệm thu được xử lý thống kê bằng phần mềm Excel 2007.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Đa dạng thành phần loài vi khuẩn lam

Từ 53 mẫu đất thu được tại các xã đã chọn, chúng tôi đã tiến hành phân tích hình thái và sơ bộ định danh. Danh mục thành phần loài và sự hiện diện của chúng trong các điểm thu mẫu được trình bày ở Bảng 1. Kết quả cho thấy có 22 loài vi khuẩn lam được xác định, thuộc 2 bộ (Nostocales và Oscillatoriales), 3 họ (Nostocaceae, Rivulariaceae và Oscillatoriaceae) và 6 chi (*Anabaena*, *Cylindrospermum*, *Nostoc*, *Calothrix*, *Oscillatoria* và *Phormidium*). Trong đó, bộ Nostocales có 17 loài chiếm 77,3 % trên tổng số loài và bộ Oscilltoriales có 5 loài chiếm 22,7 %. Địa điểm thu được nhiều loài nhất là xã Phú Thượng với 15 loài, và địa điểm ít nhất là xã Phú An với 7 loài. Chi *Calothrix* chỉ

có 1 loài; các chi có số lượng loài khá cao là *Anabaena* (6 loài), *Nostoc* (5 loài) và *Cylindrospermum* (5 loài).

Bên cạnh việc phân tích hình thái các chủng ngoài tự nhiên, chúng tôi còn theo dõi tần suất xuất hiện của các loài trong các mẫu thu được và nhận thấy rằng *Nostoc calcicola* là loài gặp nhiều nhất tại tất cả các địa điểm nghiên cứu. Tiếp đó là *Nostoc piscinale* xuất hiện ở 5 địa điểm. Một số loài chỉ xuất hiện 1 lần như loài *Anabaena khannae*, *Cylindrospermum catenatum*, *Calothrix braunii* chỉ xuất hiện trong một mẫu ở một địa điểm.

Phân tích kết quả thu được, chúng tôi nhận thấy trong đất ruộng ở các xã nghiên cứu vi khuẩn lam thuộc bộ Nostocales chiếm ưu thế. Chúng thuộc nhóm có tế bào dị hình và được biết là có khả năng cố định ni to phân tử. Kết quả phân tích thành phần loài VKL trên đất ruộng ở huyện Hoài Đức, Hà Tây cho thấy 20 loài VKL có khả năng cố định ni to phân tử thuộc 8 chi với tế bào dị hình, và ở Thái Thụy, Thái Bình với 20 loài VKL có khả năng cố định ni to phân tử thuộc 12 chi có tế bào dị hình [1]. Một số kết quả nghiên cứu thành phần loài VKL trên đất ruộng lúa ở Ấn Độ và Iran cũng cho kết quả tương tự: đất ruộng lúa các vùng nghiên cứu đều có các loài VKL với tế bào dị hình [12, 13].

Bảng 1. Danh mục thành phần loài vi khuẩn lam từ đất ruộng lúa ở một số xã thuộc huyện Phú Vang, tỉnh Thừa Thiên Huế

Phân loại hình thái	Địa điểm thu mẫu					
	PT	PA	PM	PD	PH	PX
Bộ Nostocales, Họ Nostocaceae, Chi <i>Anabaena</i>						
<i>Anabaena isocystoides</i> H. Welsh	X		X		X	
<i>Anabaena khannae</i> Skuja					X	
<i>Anabaena oryzae</i> Fritsch					X	X
<i>Anabaena oscillarioides</i> Bory ex Born. et Flah.	X		X		X	
<i>Anabaena portoricensis</i> N.L.Gardner		X		X		X
<i>Anabaena variabilis</i> Kützing ex Bornet et Flah.	X			X		X
Chi <i>Cylindrospermum</i>						
<i>Cylindrospermum alatosporum</i> Fritsch		X	X			
<i>Cylindrospermum catenatum</i> Ralfs ex Born. et Flah.	X					
<i>Cylindrospermum muscicola</i> Kützing ex Born. et Flah.	X		X		X	X
<i>Cylindrospermum punctatum</i> Woronichin	X	X				X
<i>Cylindrospermum trichospermum</i> Frémy	X	X	X			
Chi <i>Nostoc</i>						
<i>Nostoc calcicola</i> Brébisson ex Born. et Flah.	X	X	X	X	X	X

Phân loại hình thái	Địa điểm thu mẫu					
	PT	PA	PM	PD	PH	PX
<i>Nostoc commune</i> Vaucher ex Born. et Flah.				X	X	X
<i>Nostoc linckia</i> (Roth) Bornet ex Born. et Flah.	X		X	X		
<i>Nostoc muscorum</i> Ag. Ex Born. et Flah.	X			X	X	X
<i>Nostoc piscinale</i> Kützing ex Born. et Flah.	X	X	X	X		X
Họ Rivulariaceae, Chi Calothrix						
<i>Calothrix brauni</i> (A.Br.) Bornet et Flah.						X
Bộ Oscillatoriales, Họ Oscillatoriaceae, Chi Oscillatoria						
<i>Oscillatoria rubescens</i> (Schmidle) Elenkin		X	X			X
<i>Oscillatoria princeps</i> Vaucher ex Gomont	X					
<i>Oscillatoria amphibia</i> C.Agardh ex Gomont	X		X			X
Chi Phormidium						
<i>Phormidium breve</i> (Kützing ex Gomont) Anagnostidis & Komárek	X		X	X		
<i>Phormidium terebriforme</i> (C. Agardh ex Gomont) Anagnostidis & Komárek	X		X	X	X	
Tổng số	15	7	12	9	9	12

Ký hiệu địa điểm thu mẫu: PT: Phú Thượng; PA: Phú An; PM: Phú Mậu; PD: Phú Dương; PH: Phú Hồ; PX: Phú Xuân

3.2 Phân lập và tinh sạch để tạo các nuôi cấy sạch khuẩn

Từ các mẫu đất thu thập được tại địa bàn nghiên cứu, chúng tôi đã phân lập và duy trì được 30 chủng vi khuẩn lam thuộc 5 chi gồm *Anabaena*, *Cylindrospermum*, *Nostoc*, *Calothrix* và *Phormidium*. Trong đó có 25 chủng nằm trong bộ Nostocales với tế bào dị hình và 5 chủng thuộc bộ Oscillatoriales. Trong 30 chủng VKL phân lập được có 12 chủng từ xã Phú Thượng, 4 chủng từ xã Phú Hồ, 4 chủng từ xã Phú Xuân, 4 chủng từ xã Phú An, 3 chủng từ xã Phú Mậu và 3 chủng từ xã Phú Dương. Danh mục thành phần loài, ký hiệu chủng và nguồn gốc phân lập được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. Danh sách các chủng vi khuẩn lam phân lập được từ địa bàn nghiên cứu

STT	Phân loại hình thái	Ký hiệu chủng	Địa điểm phân lập
1	<i>Anabaena isocystoides</i>	HA1	Phú Thượng
2	<i>Anabaena khannae</i>	HA2	Phú Hồ
3	<i>Anabaena oryzae</i>	HA3	Phú Xuân
4	<i>Anabaena oscillarioides</i>	HA4	Phú Thượng

STT	Phân loại hình thái	Ký hiệu chủng	Địa điểm phân lập
5	<i>Anabaena portoricensis</i>	HA5	Phú An
6	<i>Anabaena variabilis</i>	HA6	Phú Thượng
7	<i>Cylindrospermum alatosporum</i>	HC1	Phú Mậu
8	<i>Cylindrospermum catenatum</i>	HC2	Phú Thượng
9	<i>Cylindrospermum muscicola</i>	HC3	Phú Thượng
10	<i>Cylindrospermum punctatum</i>	HC4	Phú Thượng
11	<i>Cylindrospermum trichospermum</i>	HC5	Phú Thượng
12		HN11	Phú Thượng
13	<i>Nostoc calcicola</i>	HN12	Phú An
14		HN13	Phú Dương
15		HN14	Phú Mậu
16		<i>Nostoc commune</i>	HN2
17	<i>Nostoc linckia</i>	HN3	Phú Thượng
18		HN41	Phú Xuân
19	<i>Nostoc muscorum</i>	HN42	Phú Dương
20		HN42	Phú Hồ
21		HN51	Phú Thượng
22	<i>Nostoc piscinale</i>	HN52	Phú An
23		HN53	Phú Mậu
24		HN54	Phú Hồ
25	<i>Calothrix brauni</i>	HCL1	Phú Xuân
26	<i>Oscillatoria rubescens</i>	HO1	Phú An
27	<i>Oscillatoria princeps</i>	HO2	Phú Thượng
28	<i>Oscillatoria amphibia</i>	HO3	Phú Thượng
29	<i>Phormidium breve</i>	HP1	Phú Dương
30	<i>Phormidium terebriforme</i>	HP2	Phú Hồ

Tiến hành làm sạch các chủng VKL phân lập được bằng cả 3 cách: (1) chiếu tia cực tím (UV) 10 phút/3 lần lặp lại; (2) dùng kháng sinh nystatin 15 µg/mL và amoxicillin 10 µg/mL, (3) phối hợp chiếu tia cực tím (UV - 10 phút) và kháng sinh gồm nystatin 15 µg/mL và amoxicillin 10 µg/mL. Các loại kháng sinh sử dụng là ampicillin, nystatin và amoxillin, trong đó chỉ có nystatin và amoxillin làm chết vi khuẩn mà không làm chết vi khuẩn lam. 12 chủng đã được phân lập và làm sạch (Bảng 3).

Như vậy, đối với các chủng VKL khác nhau thì có quy trình làm sạch khuẩn khác nhau. Có thể làm sạch khuẩn các chủng VKL nuôi cấy bằng cách chiếu đèn UV, sử dụng một số loại kháng sinh hoặc kết hợp cả hai cách. Tuy nhiên, đối với từng chủng VKL thì cần thử nghiệm thêm với nhiều loại kháng sinh kết hợp tỉ lệ khác nhau để biết nồng độ kháng sinh tốt nhất cho các chủng sạch khuẩn.

Bảng 3. Tinh chế khuẩn đối với các chủng tảo nghiên cứu

STT	Tên loài	Ký hiệu chủng	Phương pháp		
			UV	Kháng sinh	Phối hợp UV và kháng sinh
1	<i>Anabaena oryzae</i>	HA3	X		
2	<i>Anabaena isocystoides</i>	HA1	X		
3	<i>Anabaena variabilis</i>	HA6	X		
4	<i>Anabaena portoricensis</i>	HA5	X		
5	<i>Phormidium terebriforme</i>	HP2	X		
6		HN51		X	
7	<i>Nostoc piscinale</i>	HN52		X	
8		HN53		X	
9		HN11	X		
10	<i>Nostoc calcicola</i>	HN12	X		
11		HN41			X
12	<i>Nostoc muscorum</i>	HN42			X

3.3 Xác định hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm của một số chủng vi khuẩn lam

Các chủng VKL đã được làm sạch khuẩn được tiếp tục đưa vào nhân sinh khối để đạt tối thiểu 1 gam tảo tươi trước khi tách chiết. Tiến hành đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của các dịch chiết bằng phương pháp khuếch tán qua thạch sử dụng đĩa giấy với các vi sinh vật kiểm định là *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* và một chủng nấm *Candida albicans* sử dụng môi trường PCA. Đo đường kính vòng kháng của dịch chiết sinh khối tế bào của các chủng VKL nghiên cứu đối với 4 chủng VSV kiểm định (Bảng 4).

Số liệu cho thấy có 9 chủng VKL có hoạt tính kháng *Bacillus subtilis*. Dịch chiết methanol chứa 9 chủng có hoạt tính gồm HA1, HA6, HA5, HP2, HN52, HN53, HN11, HN12 và HN42. Trong khi đó dịch chiết ethyl acetate chỉ có 3 chủng có hoạt tính gồm HA6, HP2 và HN42. 9 chủng VKL có hoạt tính kháng *Staphylococcus aureus*: dịch chiết methanol chứa 9 chủng có hoạt tính gồm HA1, HA6, HA5, HN52, HN53, HN11, HN12, HN41 và HN42, và dịch chiết ethyl acetate chỉ chứa 2 chủng có hoạt tính gồm HA6, HP2 và HN42. Chỉ có 5 chủng VKL có hoạt tính kháng *Escherichia coli* và tất cả đều nằm trong dịch chiết methanol gồm *Nostoc piscinale* (chủng HN51, HN52, HN53) và *Nostoc calcicola* (chủng HN11, HN12). Chỉ có 5 chủng có hoạt tính

kháng nấm *Candida albicans*: dịch chiết methanol cho hoạt tính ở cả 5 chủng trong khi dịch chiết ethyl acetate chỉ có 2 chủng của loài *Nostoc muscorum*.

Như vậy, có 11/12 chủng có hoạt tính kháng đối với 4 loại vi sinh vật thăm dò trừ chủng HA3 thuộc loài *Anabaena oryzae*. Chủng có hoạt tính cao nhất và cũng là chủng kháng 3 loại VSV kiểm định là HN42 của loài *Nostoc muscorum* với đường kính vòng kháng là 4,5–9,0 mm. Cùng một loài, nhưng các chủng khác nhau cũng cho hoạt tính khác nhau. Các chủng khác nhau thì thích hợp với các dung môi khác nhau. Nhìn chung, dịch chiết methanol cho kết quả kháng khuẩn tốt hơn và đối với nhiều chủng hơn.

So sánh với kết quả của một số nghiên cứu khác với các chủng VKL khác thì thấy rằng hoạt tính của dịch chiết các loài VKL nghiên cứu này còn chưa cao. Vijayakumar và cs. [16] cho biết VKL phân lập từ hồ nước ngọt kháng 3 loại khuẩn: *Bacillus subtilis* với vòng kháng khuẩn là 2,2 cm và 1,0 cm; *Staphylococcus aureus* vòng kháng khuẩn là 1,5 cm và 2,5 cm; và *Escherichia coli* vòng kháng khuẩn là 4,0 cm và 2,0 cm.

Bảng 4. Hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết của các chủng VKL phân lập từ đất ruộng thuộc địa bàn nghiên cứu

STT	Chủng	Đường kính vòng kháng / vô khuẩn (mm)							
		<i>Bacillus subtilis</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Candida albicans</i>	
		EtAc	Met	EtAc	Met	EtAc	Met	EtAc	Met
1	HA3	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0	0 ^a	0 ^a	0 ^a
2	HA1	0 ^a	3,5 ^c ± 0,1	0 ^a	3,5 ^c ± 0,2	0	0 ^a	0 ^a	0 ^a
3	HA6	4,2 ^b ± 0,2	7,8 ^f ± 0,2	4,3 ^b ± 0,3	8,5 ^g ± 0,4	0	0 ^a	0 ^a	0 ^a
4	HA5	0	6,2 ^e ± 0,2	0 ^a	7,0 ^f ± 0,3	0	0 ^a	0 ^a	0 ^a
5	HP2	7,5 ^d ± 0,4	7,5 ^f ± 0,5	0 ^a	0 ^a	0	0 ^a	0 ^a	0 ^a
6	HN51	0 ^a	–	0 ^a	0 ^a	0	5,0 ^d ± 0,3	0 ^a	7,0 ^d ± 0,2
7	HN52	0 ^a	5,0 ^d ± 0,4	0 ^a	4,5 ^d ± 0,2	0	4,5 ^d ± 0,3	0 ^a	0 ^a
8	HN53	0 ^a	2,0 ^b ± 0,3	0 ^a	2,0 ^b ± 0,3	0	2,0 ^b ± 0,2	0 ^a	0 ^a
9	HN11	0 ^a	7,3 ^f ± 0,3	0 ^a	5,6 ^e ± 0,2	0	2,0 ^b ± 0,1	0 ^a	2,0 ^b ± 0,1
10	HN12	0 ^a	6,3 ^e ± 0,3	0 ^a	3,0 ^c ± 0,3	0	3,0 ^c ± 0,4	0 ^a	3,0 ^c ± 0,2
11	HN41	0 ^a	0 ^a	0 ^a	7,0 ^f ± 0,4	0	0 ^a	7,0 ^c ± 0,4	7,0 ^d ± 0,4
12	HN42	6,5 ^c ± 0,3	6,3 ^e ± 0,3	4,5 ^b ± 0,2	7,0 ^f ± 0,5	0	0 ^a	4,5 ^b ± 0,2	9,0 ^e ± 0,5

Chú thích: Kí hiệu: 0 – không có hoạt tính; Các chữ cái a, b, c, d, e, f, g trong cùng một cột chỉ ra sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với $p < 0,05$. Các giá trị trên bảng là trung bình của 3 lần lặp lại.

4 Kết luận

Trong các mẫu đất ruộng thu được từ các xã Phú Thượng, Phú An, Phú Mậu, Phú Dương, Phú Hồ và Phú Xuân thuộc huyện Phú Vang, tỉnh Thừa Thiên Huế, chúng tôi đã xác định có 22 loài vi khuẩn lam, phần lớn có tế bào dị hình, có khả năng cố định ni tơ, thuộc bộ Nostocales. Đã phân lập được 20 chủng VKL, nhưng chỉ 12 chủng có hoạt tính kháng vi sinh vật: 9 chủng kháng *Bacillus subtilis*, 9 chủng kháng *Staphylococcus aureus*, 5 chủng kháng *Escherichia coli*, và 5 chủng kháng nấm *Candida albicans*. Chủng có hoạt tính cao nhất và cũng là chủng kháng 3 loại VSV kiểm định là HN42 của loài *Nostoc muscorum* với đường kính vòng kháng là 4,5–9,0 mm. Dịch chiết methanol cho kết quả kháng khuẩn tốt hơn và đối với nhiều chủng hơn.

Lời cảm ơn

Các tác giả xin cảm ơn Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế đã hỗ trợ kinh phí để thực hiện công trình này (đề tài cấp Viện: Nghiên cứu đa dạng thành phần loài của vi khuẩn lam phân lập từ đất ruộng ở Phú Vang, Thừa Thiên Huế bằng kỹ thuật sinh học phân tử, mã số: VCNSH2016–03).

Tài liệu tham khảo

1. Đoàn Đức Lân, Nguyễn Đình Quyển, Dương Đức Tiến, Nguyễn Kim Vũ (1994), Kết quả nghiên cứu VKL cố định ni tơ ở lúa vùng đất mặn huyện Thái Thụy, *Tạp chí khoa học – Công nghệ và quản lý kinh tế*, 6, 217–218.
2. Dương Đức Tiến (1994), *Vi khuẩn lam cố định ni tơ trong ruộng lúa*, Nxb. Nông nghiệp, Hà Nội.
3. Dương Đức Tiến (1996), *Phân loại vi khuẩn lam ở Việt Nam*, Nxb. Nông Nghiệp, Hà Nội.
4. Bauer A. W., Kirby W. M., Sherris J. C., Turck M. (1996), Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method, *American Journal Clinical Pathology*, (45), 493–496.
5. Desikachary T. V. (1959), *Cyanophyta*, Indian council of agricultural research, New Delhi.
6. Digamber Rao (2015), Antibacterial activity of fresh water Cyanobacteria, *Journal of Algal biomass Utilization*, 6(3), 60–64.
7. Hazarika D., Duarah I., Barukial J. (2012), An ecological assessment of algal growth with particular reference to blue-green algae from upper Brahmaputra valley of Assam, *Indian Journal of fundamental and applied life science*, 2(3), 29–35.
8. Komárek J. and Anagnostidis K. (1999), Cyanoprokaryota 1. Teil: Chroococcales, *Gustav Fischer Verlag Jena*, 548.

9. Kotai J. (1972), Instructions for preparation of modified nutrient solution Z8 for algae, *Norwegian Institute for Water Research, Oslo B-11 (69)*, 1–5.
10. Patra J. K., Rath S. K., Jena K., Rathod V. K., Thatoi H. N. (2008), Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of seaweed (*Sargassum* sp.) extract: A study on inhibition of Glutathione - S-transferase activity, *Turkish Journal of Biology*, 32, 119–125.
11. Rodriguez A. A., Stella A. A., Storni M. M., Zulpa G., Zaccaro M. C. (2006), *Effects of cyanobacterial extracellular products and gibberellic acid on salinity tolerance in Oryza sativa L*, *Saline Systems*, 2–7.
12. Selvi K. V., Sivakumar T. (2012), Isolation and characterization of silver nanoparticles from *Fusarium oxysporum*, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 1, 56–62.
13. Shariatmadari Z. and Riahi H. (2013), A taxonomic study on soil taxa of apoheterocytic cyanoprokaryota from Nostocaceae family in Iran, *The Iranian Journal of Botany*, 19(2), 143–152.
14. Singh S. S., Kunui K., Minj R. A., Singh P. (2014), Diversity and distribution pattern analysis of cyanobacteria isolated from paddy fields of Chhattisgarh, *Indian Journal of Asia-Pacific Biodiversity*, 7, 462–470.
15. Tuney I., Cadirci B. H., Unal Dand, Sukatar A. (2006), Antimicrobial activities of the extracts of marine algae from the coast of Urla (Izmir, Turkey), *Turkish Journal of Biology*, 30, 171–175.
16. Vijayakumar S., Deepa P., Jeyachandran S., Manoharan C., Madhumathi V. (2011), Antimicrobial Activity of Cyanobacteria Isolated from Freshwater Lake, *International Journal of Microbiological Research*, 2(3), 213–216.
17. Whitton B.A., Potts M. (2000), *The ecology of cyanobacteria*, Kluwer Dordrecht, the Netherlands, 233–255.

DIVERSITY OF CYANOBACTERIA PRODUCING ANTIMICROBIAL COMPOUNDS FROM RICE FIELDS IN PHU VANG DISTRICT, THUA THIEN HUE PROVINCE

Nguyen Thi Thu Lien*, Le Thi Tuyet Nhan, Nguyen Hong Son,
Nguyen Thi Hue, Pham Thi Diem Thi

HU – Institute of Biotechnology, Tinh Lo 10 St., Phu Vang, Thua Thien Hue, Vietnam

Abstract: With the purpose of finding potential cyanobacterial species for the production of bioactive compounds, we present the results of collecting, isolating and determining the composition of cyanobacterial species and exploring their antibacterial and antifungal properties. 22 species from rice fields in Phu Vang District, Thua Thien Hue Province were recorded. They belonged to two Orders (Nostocales and Oscillatoriales), 3 families (Nostocaceae, Rivulariaceae and Oscillatoriaceae) and 6 genera (*Anabaena*, *Cylindrospermum*, *Nostoc*, *Calothrix*, *Oscillatoria* and *Phormidium*). 20 cyanobacterial strains were isolated and they were stable in the artificial medium. Among them, 12 strains were purified to obtain axenic cultures and to determine the antimicrobial activity of their extracts. Methanol and ethyl acetate extracts of 12 cyanobacterial strains were tested *in vitro* for their antimicrobial activities against *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* with the agar well diffusion method. The results showed that 9 strains were active against *Bacillus subtilis*, 9 against *Staphylococcus aureus*, 5 against *Escherichia coli*, and 5 against *Candida albicans*. Strain HN42 of *Nostoc muscorum* exhibited the maximum antibacterial activity against 3 test organisms with the diameter of the inhibition zones from 4.5 to 9.0 mm.

Keywords: cyanobacteria, diversity, antibacterial, antifungal, extract