KHẢO SÁT ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY ĐỂ NÂNG CAO KHẢ NĂNG KHÁNG KHUẨN CỦA CÁC CHỦNG *Streptomyces* sp.

Lê Thị Thu Hiền, Trần Thị Lệ Ngân, Trần Thị Kim Oanh, Trần Văn Trung, Nguyễn Thị Thúc, Nguyễn Thị Thủy Tiên*

Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế.

*Tác giả liên hệ: nguyenthithuytien84@huaf.edu.vn

Nhận bài: 21/08/2020 *Hoàn thành phản biện:* 23/09/2020 *Chấp nhận bài*: 03/10/2020

TÓM TẮT

Streptomyces là những vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp các chất kháng sinh. Nghiên cứu này nhằm sàng lọc và chọn chủng có khả năng kháng khuẩn cao nhất từ 59 chủng *Streptomyces* có nguồn gốc từ đất đã được cung cấp dựa trên phương pháp cấy vạch vuông góc đối với 5 vi khuẩn gây bệnh chỉ thị, bao gồm *Bacillus cereus, Escherichia coli, Salmonella typhi, Staphylococcus aureus* và *Pseudomonas aeruginosa*. Mười lăm chủng thể hiện hoạt tính kháng khuẩn ở các mức độ khác nhau, các chủng còn lại không thể hiện khả năng kháng. Chủng có khả năng kháng khuẩn cao nhất là HĐM3.2, kháng 4/5 vi khuẩn chỉ thị đã sử dụng, gồm *B. cerius, S. aureus, S. typhi* và *E. coli* với kích thước vùng kháng đạt 9,5, 10,5, 16,5 và 14,5 mm. Chủng HĐM3.2 được xác định là chủng *Streptomyces* sp. dựa trên cây phát sinh loài đã xây dựng của trình tự gene 16S rRNA. Điều kiện nuôi cấy để chủng HĐM3.2 thể hiện hoạt tính kháng khuẩn cao nhất đã được khảo sát dựa trên phương pháp khuếch tán qua giếng thạch. Môi trường International Streptomyces Project 2 có pH 8, nhiệt độ nuôi cấy 28^{o}C là điều kiện thích hợp để chủng *Streptomyces* sp. HĐM3.2 tạo ra vùng ức chế các loại vi khuẩn *B. cereus, E. coli, S. typhi, S. aureus* cao nhất.

Từ khóa: Điều kiện nuôi cấy, Kháng khuẩn, *Streptomyces*

INVESTIGATION OF CULTURE CONDITIONS TO ENHANCE ANTIBACTERIAL ABILITY OF *Streptomyces* sp.

Le Thi Thu Hien, Tran Thi Le Ngan, Tran Thi Kim Oanh, Tran Van Trung, Nguyen Thi Thuc, Nguyen Thi Thuy Tien*

University of Agriculture and Forestry, Hue University.

ABSTRACT

Streptomyces is the microorganism that has capable of producing antibiotics. The current study aimed to screen and to select a strain that had the highest antibacterial activity from 59 available soil-derived *Streptomyces* strains based on the perpendicular culture method on 5 indicator pathogenic bacteria, including *Bacillus cereus, Escherichia coli, Salmonella typhi, Staphylococcus aureus* và *Pseudomonas aeruginosa*. Fourteen strains exhibited their antibacterial activity at various levels, the remaining did not have that activity. The strain that had the highest antibacterial ability was HĐM3.2 against 4/5 indicator microorganisms, including *B. cerius, S. aureus, S. typhi* and *E. coli* with inhibitory areas were 9.5, 10.5, 16.5, and 14.5 mm respectively. Strain HĐM3.2 was identified as strain *Streptomyces* sp. based on a phylogenetic tree built on the 16S rRNA gene sequences. Suitable conditions that made the strain HĐM3.2 showed the highest antibacterial activity were investigated based on agar well diffusion assay. The medium of International Streptomyces Project 2 with pH 8, the ambient temperature at 28^{o}C were suitable conditions for *Streptomyces* sp. HĐM3.2 produced the highest inhibitory areas against *B. cereus, E. coli, S. typhi, S. aureus.*

Keywords: Antibacterial, Culture conditions, *Streptomyces*

1. MỞ ĐẦU

Việc tìm ra các loại kháng sinh mới có hiệu quả kháng lại các vi sinh vật gây bệnh từ những môi trường sống chưa được khám phá trên khắp thế giới đã và đang tiếp tục là lĩnh vực nghiên cứu quan trọng. Khoảng 17.000 loại kháng sinh từ các nguồn vi sinh vật khác nhau đã được phân lập là kết quả của quá trình sàng lọc rộng rãi, trong đó kháng sinh có nguồn gốc từ *Streptomyces* chiếm khoảng 70%. Trong hai thập kỷ qua, đã có sự suy giảm trong việc phát hiện ra các hợp chất mới từ xạ khuẩn có nguồn gốc từ đất. Do đó, việc khám phá các hệ sinh thái mới hơn để phân lập xạ khuẩn, tìm ra các loại kháng sinh có hiệu quả cao và khắc phục được vấn đề kháng kháng sinh là vấn đề có tính cấp thiết cao (Dezfully và cs., 2015).

Streptomyces là một chi thuộc họ *Streptomycetaceae* và là chi lớn nhất của ngành Actinobacteria. Có hơn 500 loài *Streptomyces* đã được mô tả. Giống như hầu hết các Actinobacteria khác, *Streptomyces* là vi khuẩn Gram dương, có bộ gen với tỉ lệ GC% cao. Vi khuẩn này được tìm thấy chủ yếu trong đất và thảm thực vật mục nát, là vi sinh vật phân hủy rất quan trọng (Bùi Thị Hà, 2008). Đặc điểm quan trọng nhất của *Streptomyces* là khả năng sản sinh các hợp chất thứ cấp như các chất kháng nấm, kháng virus, và chủ yếu là kháng vi khuẩn và dùng làm thuốc ức chế miễn dịch (Rudi và cs., 2012).

Streptomyces có tiềm năng rất lớn để sản xuất, ứng dụng dẫn xuất của chúng trong nhiều lĩnh vực như sản xuất các chất kháng sinh dùng trong y học, nông nghiệp và bảo quản thực phẩm. Tuy nhiên, tùy theo đặc điểm địa lý, thời tiết mà sự đa dạng của các chủng *Streptomyces* ở các nơi khác nhau là không giống nhau. Do đó, việc nghiên cứu tối ưu hóa các điều kiện nuôi cấy để chủng *Streptomyces* sinh tổng hợp chất kháng khuẩn cao là điều cần thiết và có tính khoa học cao.

Mục đích của nghiên cứu này nhằm đánh giá và sàng lọc khả năng kháng khuẩn của các chủng *Streptomyces* đã được phân lập từ đất ở một số địa phương ở Thừa Thiên Huế và Quảng Nam. Từ đó, khảo sát môi trường thích hợp để chủng được chọn sinh thể hiện khả năng kháng khuẩn cao nhất.

2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

59 chủng *Streptomyces* được cung cấp từ phòng thí nghiệm Vi sinh của Khoa Cơ khí và Công nghệ, trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế. Các chủng này đã được phân lập từ các mẫu đất có các đặc điểm khác nhau thuộc tỉnh Thừa Thiên Huế và tỉnh Quảng Nam.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Sàng lọc sơ bộ và tuyển chọn chủng có khả năng kháng khuẩn cao

Các chủng *Streptomyces* được hoạt hóa và sàng lọc sơ bộ khả năng kháng khuẩn bằng cách sử dụng kỹ thuật cấy vạch vuông góc. *Streptomyces* được cấy vệt ở tâm đĩa Petri (rộng khoảng 1,5 cm) có chứa môi trường Mueller Hinton Media (MHA). Các đĩa được ủ ở 28 - 30^{o}C trong 4 ngày. Để xác định hoạt tính kháng khuẩn, các vi khuẩn chỉ thị gồm các vi khuẩn Gram âm và Gram dương (*Bacillus cereus, Escherichia coli, Salmonella typhi, Staphylococcus aureus* và *Pseudomonas aeruginosa*), được cung cấp bởi Khoa Vi sinh, bệnh viện Trung ương Huế. Các vi khuẩn chỉ thị này được cấy vạch vuông góc với vạch khuẩn lạc *Streptomyces* đã phát triển trên đĩa, từ phía mép đĩa đến vạch xạ khuẩn. Ủ đĩa ở 37^{o}C, quan sát và xác định khả năng kháng khuẩn của các chủng *Streptomyces* sau 24

giờ dựa trên vùng ức chế tính từ khuẩn lạc của xạ khuẩn đến vị trí các vi sinh vật chỉ định có thể phát triển. Tuyển chọn chủng có khả năng kháng nhiều loại vi sinh vật gây bệnh nhất với khả năng kháng cao nhất để định danh và khảo sát các điều kiện nuôi cấy thích hợp nhằm nâng cao khả năng kháng khuẩn của chúng (Dezfully và cs., 2015).

2.2.2. Khuếch đại gen 16S rRNA bằng kỹ thuật PCR khuẩn lạc

Khuếch đại gen 16S rRNA của chủng *Streptomyces* đã chọn bằng phương pháp Polymerase Chain Reaction (PCR) khuẩn lạc. Từ khuẩn lạc *Streptomyces* thuần đã nuôi trên đĩa Petri, dùng đầu tip đã tiệt trùng lấy một ít khuẩn lạc cho vào ống PCR 0,2 ml có chứa 2 µl nước cất đã tiệt trùng. Cặp mồi (primers) đặc hiệu cho *Streptomyces* là StrepB/StrepF có trình tự mồi xuôi (forward primer) StrepB 5'-ACAAGCCCTGGAAACGGGGT-3' và mồi ngược (reverse primer) StrepF 5'-ACGTGTGCAGCCCAAGACA-3' được sử dụng để khuếch đại gen 16S rRNA của chủng *Streptomyces* đã chọn (Rintala và cs., 2001).

Bổ sung các thành phần trong phản ứng PCR bao gồm: 4 µl đệm phusion, 0,4 µl dNTPs (deoxynucleoside triphosphates) (10 mM), 1 µl mồi xuôi và mồi ngược (10 pmol/µl), 0,6 µl DMSO (dimethyl sulfoxide) và 0,2 µl phusion DNA polymerase vào ống PCR đã chuẩn bị ở trên, thêm nước cho đủ 20 µl. Tất cả các thành phần phản ứng được cung cấp bởi công ty Thermo Scientific. Chương trình PCR được thực hiện như sau: biến tính bước đầu ở 95^{o}C trong 10 phút, 30 chu kỳ ở các nhiệt độ biến tính 98^{o}C trong 20 giây, gắn mồi ở 58^{o}C trong 30 giây, kéo dài mồi ở 72^{o}C trong 2 phút và bước kéo dài cuối cùng ở 72^{o}C trong 10 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra kích thước của nó bằng phương pháp điện di trên gel agarose (1%) và quan sát sự xuất hiện của DNA tạo thành dưới đèn UV (Rintala và cs., 2001). Sản phẩm của phản ứng PCR được tinh sạch bằng ExoSAP-IT và được gửi đi giải trình tự tại Công ty TNHH MTV Sinh Hóa Phù Sa, Cần Thơ.

2.2.3. Xây dựng cây phát sinh loài và định danh loài

Kết quả giải trình tự của chủng đã chọn được so sánh với ngân hàng gene GenBank (hhttps://www.ncbi.nlm.nih.gov/) (Altschu và cs., 1990) và cơ sở dữ liệu gene EzTaxon (https://www.ezbiocloud.net) (Yoon và cs., 2017). Dựa trên mức độ tương đồng của chủng đã chọn với các chủng đã có sẵn trên ngân hàng gene, xây dựng cây phát sinh loài để định danh chủng. Cây phát sinh loài được tạo ra dựa trên phần mềm MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Kumar và cs., 2000), sử dụng phương pháp neighbor-joining (Saitou và Nei, 1987) với giá trị bootstrap 1,000 lần (Felsenstein, 1985), và xóa khoảng cách cặp (pairwise gap deletion) (Nei và Kumar, 2000).

2.2.4. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng kháng khuẩn của chủng đã định danh

Các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng kháng khuẩn của chủng đã chọn được khảo sát tuần tự thay đổi từng yếu tố, các yếu tố còn lại sẽ được cố định, bao gồm thành phần, nhiệt độ và pH môi trường nuôi cấy. Theo đó, môi trường nuôi cấy để khảo sát khả năng kháng khuẩn bao gồm: International Streptomyces Project (ISP) 2, Casein Starch (CS), ISP 3, Gause I và Yeast Starch (YS), nhiệt độ khảo sát được giữ ở các mức 28^{o}C, 35^{o}C và 40^{o}C và pH môi trường nuôi cấy điều chỉnh về các mức 4; 5; 6; 7; 8 và 9. Sử dụng dịch sau khi nuôi cấy không chứa tế bào để đánh giá ảnh hưởng của các điều kiện này đến khả năng kháng khuẩn của *Streptomyces* dựa trên đường

kính vòng kháng khuẩn trên đĩa Petri có chứa vi khuẩn chỉ thị. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Để thu được dịch nổi không chứa tế bào, thu tế bào từ khuẩn lạc *Streptomyces* đã nuôi ở 28 - 30^{o}C sau 8 - 10 ngày tuổi vào ống eppendorf có chứa sẵn nước muối sinh lý tiệt trùng. Hút 50 µl tế bào cho vào bình tam giác 100 ml có chứa 50 ml mỗi loại môi trường hay điều kiện khảo sát thích hợp đã mô tả ở trên. Nuôi lắc 200 vòng/phút trong 7 ngày ở nhiệt độ phòng, thu nhận dịch nổi bằng cách ly tâm ở 5000 vòng/phút trong 20 phút ở 4^{o}C. Dịch này được tiếp tục lọc qua màng lọc có kích thước 0,2 µm, sau đó đem xác định khả năng kháng khuẩn bằng phương pháp khuếch tán qua giếng thạch. Dựa trên kết quả khảo sát khả năng kháng khuẩn ở các điều kiện nuôi cấy khác nhau, chọn điều kiện mà tại đó vòng kháng khuẩn tạo ra là lớn nhất.

2.2.5. Xác định hoạt tính kháng khuẩn bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch

Các vi sinh vật chỉ thị được hoạt hóa và làm thuần trên môi trường Luria - Bertani. Dùng đục lỗ kiểu nút chai tạo các giếng thạch trên đĩa Petri có chứa 20 ml môi trường Mueller Hinton Agar đã được cấy trải 100 µl (10^5 CFU/L) mỗi loại vi khuẩn chỉ thị mà chủng đã chọn có thể hiện tính kháng. Hút 100 µl dịch nuôi cấy đã chuẩn bị ở trên cho vào các giếng thạch. Ủ đĩa ở 4^{o}C trong 2 - 4 giờ để các hoạt chất chuyển hóa kháng sinh của dịch nuôi cấy khuếch tán vào môi trường. Sau đó, tiếp tục ủ đĩa ở 37^{o}C, vòng kháng khuẩn được xác định sau 24 giờ. Mẫu đối chứng là mẫu nước cất tiệt trùng. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần (Nguyễn Thị Thủy Tiên và cs., 2016).

2.2.6. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được phân tích ANOVA, giá trị trung bình và độ lệch chuẩn bằng phần mềm SPSS 25, và phần mềm Excel 2013.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả sàng lọc sơ bộ và tuyển chọn chủng có khả năng kháng khuẩn cao

Kết quả đánh giá sơ bộ khả năng kháng khuẩn của 59 chủng *Streptomyces* được trình bày trong Bảng 1 cho thấy khả năng kháng các vi sinh vật gây bệnh của các loài *Streptomyces* là không giống nhau. Số chủng không có khả năng ngăn cản sự phát triển của cả 5 vi sinh vật chỉ thị là 44, chiếm 74,57%. Số còn lại, 15 chủng, chiếm 25,42%, đã thể hiện tính kháng ở các mức độ khác nhau. Kích thước vùng kháng tùy thuộc vào khả năng sinh các hợp chất kháng khuẩn mà các chủng đã tiết ra trên môi trường. Kích thước vùng kháng càng lớn thể hiện khả năng kháng càng mạnh và ngược lại. Trong số 14 chủng này, đa số có khả năng kháng ít nhất 1 loại vi sinh vật chỉ thị. Chủng N4L81 có hoạt độ yếu nhất, chỉ kháng vi khuẩn *B. cerius* với đường kính 4 mm. Chủng có khả năng kháng lớn nhất là HĐM3.2 với khả năng kháng 4 loại vi sinh vật chỉ thị, bao gồm 2 vi khuẩn Gram dương là *B. cerius*, *S. aureus* và 2 vi khuẩn Gram âm là *S. typhi* và *E. coli* với đường kính kháng khuẩn lần lượt là 9,5 mm, 10,5 mm, 16,5 mm và 14,5 mm. Các chủng còn lại tuy có khả năng cho vòng kháng nhỏ hơn so với HĐM3.2 nhưng một số chủng cũng cho vòng kháng khá lớn như chủng H.NT1.1 kháng duy nhất *S. typhi* với đường kính vòng kháng lên đến 15,5 mm; chủng HT1.29 có khả năng kháng 2 vi khuẩn gây bệnh *E. coli* và *S. aureus* với đường kính lần lượt là 11,0 mm và 9,0 mm. Cũng có chủng thể hiện đặc tính kháng với 3 - 4 loại vi sinh vật chỉ thị là NY.R5, HĐM03 và HC1.1.1. Tuy nhiên, chúng có kích thước vùng kháng nhỏ hơn so với HĐM3.2. Qua kết quả sàng lọc sơ bộ này, có thể thấy khả năng kháng vi sinh vật khá đa dạng của các loài xạ khuẩn.

Bảng 1. Kết quả đánh giá khả năng kháng khuẩn của các chủng *Streptomyces*

Xạ khuẩn	VKKĐ					Xạ khuẩn	VKKĐ				
	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5
NA.Đ2	-	-	-	-	-	PĐ1.14	-	3,0	-	-	-
NA.Y4	-	-	-	-	-	PĐ1.18	-	-	-	-	-
NA.R31	-	-	-	-	-	PĐ1.19	-	-	-	-	8,0
NY.R2	-	-	-	-	-	HT1.3	-	4,5	-	-	-
NY.R3	-	-	-	-	-	HC1.1.1	8,5	10,5	-	10,0	12,0
NY.R4	-	-	-	-	-	H.ĐM1.1	-	-	-	-	-
NY.R5	6,0	2,0	-	4,0	4,0	H.ĐM1.2	-	-	-	-	-
NY.Đ1	-	-	-	-	-	HT.Đ3.2	-	-	-	-	-
NY.Đ3	11,0	-	-	-	-	HT.Đ03	-	-	-	-	-
N2.L21	-	-	-	-	-	H.NT6.4	-	-	-	-	-
N2.Đ7	-	-	-	-	-	H.NT6.6	-	-	-	-	-
N2.R3	-	-	-	-	-	H.NT2.1	-	-	-	-	-
N2.V2	-	-	-	-	-	H.NT6.5	-	-	-	-	-
N4.V7	-	-	-	-	-	H.ĐM01	-	-	-	-	-
N4.L2	-	-	-	-	-	H.NT01	-	-	-	-	-
N4.L81	4,0	-	-	-	-	H.NT1.6	6,5	9,0	-	12,0	-
N4.L1	-	-	-	-	-	H.NT1.1	-	15,5	-	-	-
N4.L7	-	-	-	-	-	H.N1.1.1	-	-	-	-	-
N4.Đ4	-	-	-	-	-	H.N1.1.2	-	-	-	-	-
N4.R3.1	-	-	-	-	-	H.N1.2	-	-	-	-	-
N4.R4.1	-	-	-	-	-	H.N2.1.1	-	-	-	-	-
N4.R11	-	-	-	-	-	H.N2.1.2	-	-	-	-	-
N2.L3	-	-	-	-	-	H.C1.3.1	-	-	-	-	-
H.ĐM3.2	9,5	16,5	-	14,5	10,5	H.C2.1	-	-	-	-	-
H.ĐM03	2,5	3,5	-	5,5	3,5	H.C1.1.2	-	-	-	-	-
H.ĐM04	-	-	-	-	-	H1.2	-	6,0	-	-	-
HT1.11	-	-	-	-	-	H1.14	-	-	-	-	-
HT1.29	-	-	-	11,0	9,0	HT1.2	-	-	-	-	-
HT1.14	-	-	-	-	-	HT1.25	6,5	-	-	-	10,5
PĐ3.9	-	-	-	11,0	-						

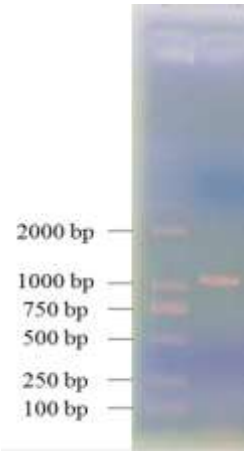
Vi khuẩn chỉ thị: (1). B. cerius; (2). S. typhi; (3). P. aeruginosa; (4). E. coli; (5). S. aureus; "- " không kháng; Đơn vị đo: mm

Hoạt tính kháng khuẩn của các chủng *Streptomyces* có được là nhờ vào sự hình thành các chất kháng sinh ức chế sự phát triển của vi khuẩn. Quá trình sinh tổng hợp các chất kháng khuẩn từ xạ khuẩn đặc biệt là xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces* được mô tả gồm 3 giai đoạn: Sinh trưởng (trophophase) - Khuẩn ty sơ cấp phát triển nhanh, Pha sinh tổng hợp (idiophase) - Sinh trưởng chậm đôi khi xuất hiện sự tự tan của khuẩn ty và sinh tổng hợp các chất kháng sinh mạnh. *Streptomyces* có khả năng kháng khuẩn vì trong quá trình sinh trưởng, chúng tạo ra các hợp chất mà trong các hợp chất này có các thành phần có khả năng tác động lên vách tế bào hoặc làm tổn thương màng nguyên sinh chất, kìm hãm sự tổng hợp protein, ức chế tổng hợp axit nucleic hay ức chế chuyển hóa axit folic (Trần Thị Thanh, 2011).

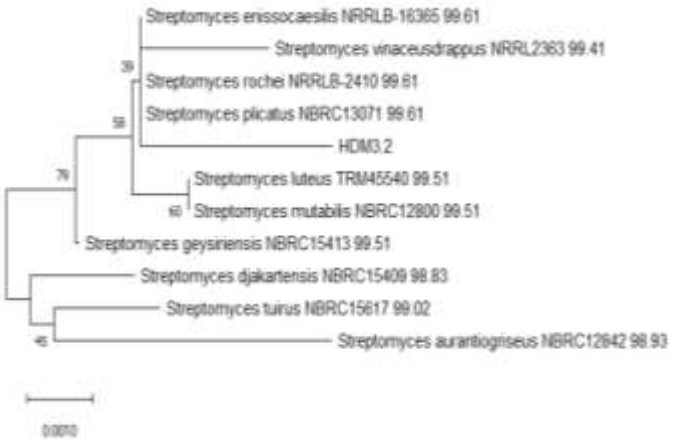
Chủng H.ĐM3.2 có phổ hoạt động khá rộng, thể hiện tính kháng đối với cả vi khuẩn Gram dương và Gram âm và tạo ra vùng kháng có kích thước lớn nhất trong 59 chủng đã khảo sát. Do đó, chủng H.ĐM3.2 được chọn để định danh và khảo sát ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến khả năng sinh tổng hợp các chất kháng sinh. 4 chủng vi khuẩn chỉ thị được sử dụng tiếp để khảo sát điều kiện nuôi cấy nhằm nâng cao khả năng kháng khuẩn của HĐM3.2 là *B. cerius, S. aureus, S. typhi* và *E. coli*.

3.3. Kết quả xây dựng cây phát sinh loài và định danh loài của chủng HĐM3.2

Kết quả phân tích hình ảnh sản phẩm PCR của chủng HĐM3.2 cho thấy kích thước phân tử của gene 16S rRNA của chủng này khoảng 1000 bp (Hình 1). Sau khi giải trình tự, kích thước của đoạn gene này là 1026 bp. Từ đó, tạo ra cây phát sinh loài để đánh giá mối quan hệ của chủng HĐM3.2 với các chủng *Streptomyces* đã được công bố trên ngân hàng gene (Hình 2).



Hình 1. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR của chủng HĐM3.2



Hình 2. Cây phát sinh loài dựa trên trình tự gene 16S rRNA của chủng HĐM3.2 và các chủng tham chiếu khác của được truy xuất từ cơ sở dữ liệu EzTaxon

Giá trị bootstrap được thể hiện ở gốc mỗi nhánh. Thanh tỷ lệ: 0.0010 thay thế cho mỗi vị trí nucleotide; Số cuối cùng thể hiện mức độ tương đồng của chủng HĐM3.2 với các chủng tham chiếu (%)

Kết quả so sánh chủng HĐM3.2 với các chủng *Streptomyces* khác cho thấy chủng này có mức độ tương đồng 99,61% với ba chủng *S. enissocaesilis* NRRLB-16365, *S. plicatus* NBRC 13071 và *S. rochei* NRRLB-2410, và tương đồng 99,41% với chủng *S. vinaceusdrappus* NRRL2363. Như vậy, không thể kết luận chủng HĐM3.2 có tên loài cùng với các loài đã được xác định tên đã tham chiếu, chúng tôi đặt tên cho chủng HĐM3.2 là *Streptomyces* sp. HĐM3.2

3.4. Kết quả khảo sát điều kiện nuôi cấy để nâng cao khả năng kháng khuẩn của chủng *Streptomyces* sp. HĐM3.2

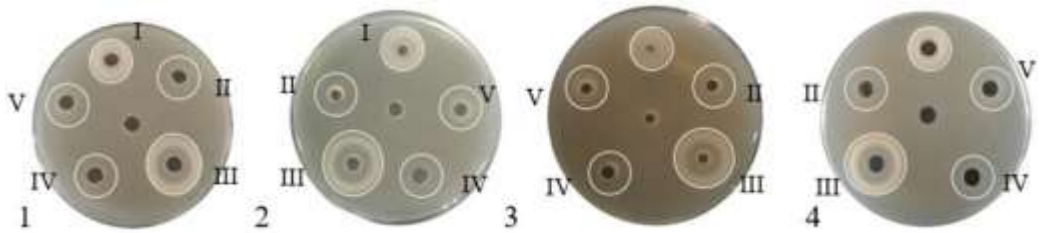
3.4.1. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy

Hoạt tính kháng khuẩn của chủng HĐM3.2 sau khi nuôi cấy trên 5 môi trường đã lựa chọn được thể hiện trên Bảng 2 và Hình 3. Số liệu phân tích cho thấy chủng HĐM3.2 có khả năng kháng tốt nhất khi nuôi cấy trên môi trường ISP 2, đường kính kháng khuẩn đối với *E. coli, B. cerius* và *S. aureus* lần lượt là 8,200, 7,600 và 10,066 mm và cho đường kính lớn nhất với *S. typhi* là 10,766 mm. Dịch nổi thu được của chủng này khi nuôi cấy trên các môi trường còn lại, hầu như không tạo ra vòng kháng khuẩn hoặc vòng kháng khuẩn rất bé. Trên môi trường YS, dịch nổi chỉ có khả năng kháng *S. aureus*, với đường kính vòng kháng là 0,416 mm. Còn trên môi trường ISP 3, dịch nuôi cấy chỉ kháng *B. cerius* và *S. aureus* với đường kính kháng khuẩn chỉ đạt 0,566 mm và 0,050 mm.

Bảng 2. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến khả năng kháng khuẩn của chủng HĐM3.2

Môi trường nuôi cấy	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)			
	E. coli	*B. cereus*	*S. typhi*	*S. aureus*
Gause I	1,900^{b}	1,966^{b}	1,166^{a}	3,766^{b}
CS	3,483^{c}	0,000^{a}	0,000^{a}	3,283^{b}
ISP 2	8,200^{d}	7,600^{c}	10,766^{b}	10,066^{c}
YS	0,000^{a}	0,000^{a}	0,000^{a}	0,416^{a}
ISP 3	0,000^{a}	0,566^{ab}	0,000^{a}	0,050^{a}

$^{a, b, c, d}$*: Các chữ cái khác nhau của cùng một cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa (p < 0,050)*



Hình 3. Ảnh hưởng của môi trường lên hoạt tính kháng khuẩn của chủng HĐM3.2

Các đĩa có chứa loại vi khuẩn chỉ thị tính từ trái qua phải: E.coli; S. typhi; B. cereus; S. aureus; Các giếng có chứa dịch nổi của môi trường nuôi cấy khảo sát: I. Gause I; II. Casein-Starch; III. ISP-2; IV. YS; V. ISP-3; Vị trí ở giữa là mẫu nước đối chứng

Kết quả này hoàn toàn phù hợp với kết quả xác định hoạt tính kháng khuẩn của chủng xạ khuẩn HLD3.16. Chủng này cũng cho hoạt tính kháng khuẩn tốt nhất trên môi trường ISP 2 (Nguyễn Văn Hiếu và cs., 2012). Tuy nhiên, một số nghiên cứu khác lại cho thấy khả năng kháng khuẩn của *Streptomyces* tốt nhất trên nhiều môi trường khác nhau, tùy thuộc vào chủng khảo sát. Điển hình như của Bùi Thị Hà và cs. (2008) khi nghiên cứu quá trình lên men tổng hợp kháng sinh của ba chủng xạ khuẩn DT7.1, HT28, K4 trên cây chè ở Thái Nguyên cho thấy khả năng sinh trưởng tốt nhất trên môi trường A4H. Theo nghiên cứu của Phan Thị Hồng Thảo và cs. (2016) với xạ khuẩn HNR3X4 trên cây bưởi cho thấy chủng này phát triển mạnh ở 37^{o}C trong môi trường Gause I (Phan Thị Hồng Thảo, 2016). Còn theo Nguyễn Thị Vân (2014) khi nghiên cứu đặc điểm sinh học của chủng *S. toxytricini* (VN08-A12) kháng bệnh bạc lá do *Xanthomonas oryzae* gây ra lại cho khả năng kháng tốt nhất trên môi trường SKS. Chủng *Streptomyces* sp. SCA 7 thể hiện hoạt tính kháng khuẩn cao nhất trên môi trường Modified Nutrient Glucose Agar (Saravana và cs., 2014). Như vậy, tùy theo từng chủng xạ khuẩn khác nhau, được lấy từ các vùng có vị trí và khí hậu khác nhau, môi trường nuôi cấy khác nhau sẽ cho khả năng kháng khuẩn khác nhau. Chủng HĐM3.2 thể hiện tính kháng khuẩn cao nhất khi sinh trưởng trong môi trường ISP 2, do đó, môi trường này được chọn để khảo sát cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.4.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Nhiệt độ là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến khả năng sản sinh các hợp chất kháng khuẩn của *Streptomyces* từ dịch nuôi cấy. Ở các nhiệt độ khác nhau, *Streptomyces* sp. HĐM3.2 cho đường kính vòng kháng khuẩn khác nhau đối với 4 loại vi sinh vật chỉ thị, chúng được thể hiện qua Bảng 3 và Hình 4. Kết quả từ Bảng 3 cho thấy khả năng sinh các chất kháng khuẩn của chủng HĐM3.2 cao nhất khi được nuôi trong khoảng 28-35^{o}C. Cả 4 loại vi sinh vật chỉ thị đều bị ức chế nhiều nhất ở 28^{o}C, tại đó *B. cereus* có đường kính vòng kháng lớn nhất là 12,466 mm. Tuy nhiên, số liệu cho thấy ở 35^{o}C chủng này vẫn cho đường kính vòng kháng tương đương với đường kính kháng khuẩn khảo sát ở 28^{o}C về mặt ý nghĩa thống kê. Còn đối với *E. coli* tại

28ºC, đường kính vòng kháng là 13,733 mm. Tại 40ºC, tuy đường kính vòng kháng là nhỏ nhất đối với *S. typhi* là 1,966 mm nhưng nó cho thấy chủng HĐM3.2 vẫn thể hiện hoạt tính kháng ở nhiệt độ này.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ môi trường nuôi cấy đến khả năng kháng khuẩn của *Streptomyces* sp. HĐM3.2

Nhiệt độ	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)			
	E. coli	*B. cereus*	*S. typhi*	*S. aureus*
28ºC	13,733[a]	12,400[a]	12,466[a]	13,233[a]
35ºC	7,833[b]	11,633[a]	10,766[a]	9,716[b]
40ºC	0,000[c]	0,000[b]	1,966[b]	0,936[c]

[a, b, c]: Các chữ cái khác nhau của cùng một cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa (p < 0,050)

Hình 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ môi trường lên hoạt tính kháng khuẩn của chủng HĐM3.2
Các đĩa có chứa loại vi khuẩn chỉ thị tính từ trái qua phải: E.coli; S. typhi; B. cereus; S. aureus; Vị trí ở giữa là mẫu nước đối chứng

Chủng *Streptomyces* sp. HĐM3.2 sinh trưởng tốt nhất ở 28 - 35ºC, thuộc nhóm ưa ấm. Kết quả này cho thấy chủng HĐM3.2 có đặc điểm sinh trưởng giống chủng ACTK2, chủng này tổng hợp các chất kháng khuẩn tốt nhất ở 28ºC (Defully và cs., 2015). Còn theo nghiên cứu của Phan Thị Hồng Thảo và cs. (2016) trên xạ khuẩn HNR3X4 trên cây bưởi, chủng này sản sinh hoạt tính kháng khuẩn tốt nhất ở 37ºC trên môi trường Gause I. Phạm Thu Trang và cs. (2014) công bố xạ khuẩn VD111 sinh trưởng tốt trên môi trường AH4 ở 37ºC và pH từ 7 - 8. Đa số các loài xạ khuẩn chi *Streptomyces* đều phát triển tốt ở nhiệt độ 28 - 30ºC (Nguyễn Lân Dũng và cs., 2010). Nhiệt độ ảnh hưởng tới tốc độ sinh trưởng, kiểu sinh sản, hình thái, quá trình trao đổi chất và nhu cầu dinh dưỡng của xạ khuẩn. Ở nhiệt độ thấp xạ khuẩn không sinh trưởng được, ở nhiệt độ cao xạ khuẩn bị biến tính protein, ARN hoặc có thể bị chết. Chủng *Streptomyces* sp. HĐM3.2 thể hiện khả năng kháng cao nhất ở 28ºC, do đó, nhiệt độ này được dùng để khảo sát ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy đến khả năng kháng các vi khuẩn chỉ thị.

3.4.3. Ảnh hưởng của pH

Kết quả nghiên cứu ở Bảng 4 cho thấy pH ảnh hưởng lớn đến hoạt tính kháng khuẩn của chủng HĐM3.2. Chủng này sản sinh hoạt chất kháng khuẩn tốt nhất trên môi trường ISP 2 ở pH 9 đối với vi sinh vật chỉ thị là *S. typhi* và pH 8 với *S. aureus*. Đường kính vòng kháng khuẩn tại 6 giá trị pH (4, 5, 6, 7, 8 và 9) đều có sai khác về mặt ý nghĩa thống kê, nhưng hoạt độ của chúng không có sự khác nhau giữa pH 7, 8 và 9 và giữa pH 4 và 5 ($p<0,05$). Nhìn chung đường kính vòng kháng tăng dần khi tăng pH, sau đó giảm khi chuyển dần về pH kiềm. pH nằm trong vùng hơi kiềm cho khả năng kháng khuẩn tốt nhất. pH axit và pH quá kiềm không phù hợp cho việc sinh các chất kháng khuẩn. Đối với 4 chủng vi khuẩn chọn là vi sinh vật chỉ thị, đa số cho đường kính vòng kháng khuẩn tại pH 8 là lớn nhất. Tại khoảng pH này đối với *E. coli* cho đường kính là 12,633 mm, *S. aureus* cho đường kính vòng kháng khuẩn là 13,533 mm. Tuy

nhiên, số liệu thu được cho thấy tại pH 8 và 9, đa số đường kính vòng kháng khuẩn tạo thành là giống nhau về mặt ý nghĩa thống kê ($p < 0,050$). Ở pH 4 đường kính vòng kháng tạo thành rất bé, đối với *B. cereus* và *S. aureus* lần lượt là 1,000 mm và 1,333 mm.

Bảng 4. Ảnh hưởng của pH đến khả năng kháng khuẩn của *Streptomyces* sp. HĐM3.2

Giá trị pH	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)			
	E. coli	*B. cereus*	*S. typhi*	*S. aureus*
4	5,333[a]	1,000[a]	1,166[a]	1,333[a]
5	9,666[b]	10,133[b]	9,166[b]	8,000[b]
6	12,000[c]	12,000[c]	10,166[b]	12,666[d]
7	7,833[a]	12,766[c]	13,333[c]	11,566[c]
8	12,633[c]	12,933[c]	13,333[c]	13,533[d]
9	11,000[b]	11,000[bc]	13,566[c]	12,766[d]

[a, b, c, d]: Các chữ cái khác nhau của cùng một cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa ($p < 0,050$)

Hình 5. Kết quả ảnh hưởng của pH môi trường lên hoạt tính kháng khuẩn

Các đĩa có chứa loại vi khuẩn chỉ thị tính từ trái qua phải: E. coli; B. cereus; S. typhi; S. aureus; Vị trí ở giữa là mẫu nước đối chứng

Dezfully và cs. (2015) khi nghiên cứu và đánh giá hoạt động kháng khuẩn của *Streptomyces flavogrieus* ACTK2 từ mẫu đất ở Kodagu, Karnataka, Ấn Độ, cho thấy chủng này hoạt động tối ưu ở pH 8. Theo Nguyễn Lân Dũng và cs. (2010) và nhiều nghiên cứu khác cũng cho thấy các chủng xạ khuẩn thường có pH tối thích nằm trong khoảng từ 6,5 - 8 (Nguyễn Lân Dũng và cs., 2010). Theo báo cáo của Nguyễn Văn Hiếu và cs. (2012) khoảng pH tối ưu cho chủng HDL3.16 hoạt động nằm trong khoảng pH trung tính. Chủng HNR3X4 phát triển trong dải nhiệt độ rộng từ 15°C - 45°C và pH từ 4 - 10, sinh trưởng tốt nhất ở 28°C và pH 7 (Phan Thị Hồng Thảo và cs., 2016). Sự khác nhau về khả năng kháng khuẩn của *Streptomyces* sp. ở các pH khác nhau có thể là do các chất kháng khuẩn có bản chất là protein. Do đó có thể bị biến tính ở pH quá cao hoặc quá thấp. Như vậy, sẽ làm giảm đường kính vòng kháng khuẩn của chúng. Đồng thời khi điều chỉnh pH về quá kiềm hoặc quá acid có thể làm giảm khả năng hòa tan và phân tán các chất kháng khuẩn trong môi trường làm giảm khả năng hoạt động của các chất này nên ảnh hưởng lớn đến tính kháng của dịch nuôi cấy (Nguyễn Lân Dũng và cs., 2010). Tuy đường kính vòng kháng khuẩn giảm dần nhưng chủng HĐM3.2 vẫn thể hiện hoạt tính kháng khuẩn ở phổ pH khá rộng. Điều này đặc biệt có ý nghĩa trong ứng dụng để kháng các loại vi khuẩn gây bệnh chịu kiềm và chịu acid.

4. KẾT LUẬN

Trong số 59 chủng được sử dụng để khảo sát khả năng kháng khuẩn, chủng HĐM3.2 thể hiện tính kháng cao nhất và đã được định danh là chủng *Streptomyces* sp. HĐM3.2. Điều kiện tối ưu để chủng này sinh tổng hợp các chất kháng khuẩn là nuôi cấy trên môi trường ISP 2, pH 8 ở nhiệt độ 28°C.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tài liệu tiếng Việt

Bùi Thị Hà. (2008). *Nghiên cứu xạ khuẩn thuộc chi Streptomyces sinh kháng sinh chống nấm gây bệnh trên cây chè ở Thái Nguyên.* Luận văn Thạc sĩ Sinh học, Đại học sư phạm, Đại học Thái Nguyên.

Nguyễn Lân Dũng, Phạm Đình Quyến, Phạm Văn Ty. (2010). *Vi sinh vật học*. Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam.

Nguyễn Văn Hiếu, Nguyễn Phương Nhuệ, Vũ Thi Hạnh Nguyên, Phan Thi Hồng Thảo, Phạm Thanh Huyền, Phí Quyết Tiên và Lê Gia Huy. (2012). Nghiên cứu chủng xạ khuẩn HDL 3.16 có hoạt tính kháng khuẩn phân lập từ vùng ven bờ biển Việt Nam. *Tạp chí Khoa học và công nghệ, 51*(1), 29 - 41.

Nguyễn Thị Thủy Tiên, Lê Thị Anh Thư, Nguyễn Hiền Trang. (2016). Khả năng ức chế E. Coli và Samonela của vi khuẩn lactic phân lập từ bã sắn và tré ở Thừa Thiên Huế. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, (13), 64 - 67.

Nguyễn Thị Vân. (2014). *Nghiên cứu đặc điểm sinh học của chủng Streptomyces toxytricini (VN08 - A12) kháng bệnh bạc lá do Xanthomonas oryzae.* Luận văn Thạc sĩ khoa học, Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.

Phan Thị Hồng Thảo, Nguyễn Vũ Mai Linh, Nguyễn Thị Hồng Liên, Nguyễn Kiều Băng Tâm và Nguyễn Văn Hiếu. (2016). Nghiên cứu xạ khuẩn nội sinh *Streptomyces parvlus* HNR3X4 trên cây bưởi Diễn Hà Nội và tiềm năng sinh tổng hợp chất kháng khuẩn. *Tạp chí Khoa học Đại học Quốc gia Hà Nội: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ*, *32*(1S), 327 - 333.

Phạm Thu Trang, Phạm Thanh Hiền, Lê Gia Huy, Phí Quyết Tiến và Hồ Tuyên. (2014). Nghiên cứu đặc điểm sinh học của chủng xạ khuẩn biển VD111 sinh chất kháng khuẩn. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, *12*(8), 1258 - 1265.

Trần Thị Thanh. (2011). *Công nghệ vi sinh*. Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam.

2. Tài liệu tiếng nước ngoài

Altschu, F. S., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. **(**1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology, 215*, 403 - 410. (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)

Dezfully, K. & Gottravalli, R. (2015*).* Isolation, identification and evaluation of antimicrobial activity of *Streptomyces flavogriseus*, strain ACTK2 from soil sample of Kodagu, Karnataka State (India). *Jundishapur Journal of Microbiology, 8*(2), e15107.

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution, 39*, 783-791.

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution, 35*, 1547 - 1549.

Nei, M. & Kumar, S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.

Rintala, N. H., Ronka, A. & Suutari, M. (2001). PCR primers targeting the 16S rRNA gene for the specific detection of Streptomycetes. *Molecular and cellular probes, 15*, 337 - 347.

Rudi, E. de L. P., Ingrid, R. da S., Mayra, K. M., João, L. de A., & Janete, M. de A. (2012). Antibiotics produced by Streptomyces. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases, 16*(5), 466 - 471.

Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor - joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution, 4*, 406 - 425.

Saravana, K. P., Duraipandiyan, V. & Ignacimuthu, S. (2014). Isolation, screening and partial purification of antimicrobial antibiotics from soil *Streptomyces* sp. SCA 7. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences, 30*(9), 435 - 446.

Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., & Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 67*, 1613 - 1617 (https://www.ezbiocloud.net)