

ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CỦA CHỦNG XẠ KHUẨN BIỂN VD111 SINH CHẤT KHÁNG KHUẨN

Phạm Thu Trang², Phạm Thanh Huyền¹, Lê Gia Hy¹, Phí Quyết Tiến¹,
Hồ Tuyên¹, Nguyễn Văn Giang², Nguyễn Phương Nhuệ^{1*}

¹*Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

²*Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

Email*: npnhue@ibt.ac.vn

Ngày gửi bài: 12.06.2014

Ngày chấp nhận: 20.09.2014

TÓM TẮT

Ngày nay, việc sử dụng chất kháng sinh không hợp lý đã làm cho hiện tượng kháng thuốc phát triển và ngày càng lan rộng. Do đó, việc tìm ra những chất kháng sinh mới có nguồn gốc từ vi sinh vật biển đang thu hút sự quan tâm của các nhà khoa học. Bài báo này trình bày một số kết quả về đặc điểm sinh học và hoạt tính kháng khuẩn của chủng xạ khuẩn biển VD111. Theo khóa phân loại Bergey (1989) và phương pháp của Chương trình xạ khuẩn Quốc tế (ISP), chủng VD111 có các đặc điểm giống với chủng chuẩn *Streptomyces albogriseolus* ISP 5003. Điều kiện sinh trưởng tốt nhất của chủng là ở 37°C, pH = 7-8, nồng độ NaCl từ 7-10%. Môi trường thích hợp để chủng VD111 sinh chất kháng khuẩn là A4H (g/l): Glucoza 15; bột đậu tương 15; NaCl 5; CaCO₃ 1; pH=7; với tỷ lệ tiếp giống 5% và tuổi giống 48 giờ, thời điểm thích hợp để thu hồi chất kháng khuẩn là sau 60 giờ lên men, sinh khối đạt 10,6 mg/ml, đường kính vòng kháng khuẩn kháng *Bacillus subtilis* ATCC6633 đạt 30,2mm. Chất kháng khuẩn của chủng VD111 có khả năng ức chế vi khuẩn Gram dương, Gram âm (trong đó có *Staphylococcus aureus* kháng methicillin) và kháng nấm men gây bệnh *Candida albicans* ATCC 10231.

Từ khóa: Chất kháng sinh, đặc điểm sinh học, hoạt tính kháng khuẩn, xạ khuẩn biển, *Streptomyces albogriseolus* VD111.

Biological Characteristics of Race VD111 of *Streptomyces albogriseolus*

ABSTRACT

The inappropriate use of antibiotics might cause the development and wide spread of drug-resistance. Therefore, finding new antibiotics from marine microorganisms has been receiving attention by the scientists. This article presents the taxonomical characterization and antimicrobial activity of marine actinomycet strain VD111 isolated from Vietnam's seawater. Based on Bergey's classification and method of International *Streptomyces* Project (ISP), the strain VD111 was classified as *Streptomyces albogriseolus* since it had biological characteristics similar to the standard strain *Streptomyces albogriseolus* ISP 5003. The favourable conditions for the growth of the strain VD111 were established; temperature of 37°C, pH of 7-8 and NaCl of 7-10%. The suitable medium and fermentation conditions for producing antimicrobial substances by the strain VD111 were A4H medium with the following substances expressed in g/l: 15g glucose, 15g soybean powder, 5g NaCl, and 1g CaCO₃ and, pH=7. The preculture supplement was of 5.0% (v/v) and inoculum age of 48 hours. Maximal antibacterial compound yield (diameter of inhibition zone against *Bacillus subtilis* ATCC 6633: 30,2 mm) and biomass (10,6 mg/ml) were achieved after 60 hours of fermentation. Especially, the bioactive compound from strain *Streptomyces albogriseolus* VD111 exhibited antimicrobial activity against gram-positive, gram-negative bacteria and yeast (*Candida albicans* ATCC 10231).

Keywords: Antimicrobial activity, antibiotic, biological characteristics, marine actinomycet, *Streptomyces albogriseolus* VD111.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Kháng sinh là nhóm thuốc thiết yếu trong y học hiện đại, tác dụng trực tiếp lên vi khuẩn để tiêu diệt hoặc làm chậm sự phát triển của chúng, giúp cho hệ miễn dịch của con người chống lại quá trình nhiễm khuẩn (Kohanski et al., 2010). Ngoài ra, chất kháng sinh còn đóng vai trò rất quan trọng trong một số lĩnh vực khác như chăn nuôi, bảo quản thực phẩm, bảo vệ thực vật... (Ceylan et al., 2008). Tuy nhiên, có một vấn đề làm đau đầu các nhà nghiên cứu, đó là sự xuất hiện của các vi sinh vật kháng kháng sinh. Chúng là nguyên nhân trực tiếp và gián tiếp của hàng loạt các bệnh nhiễm khuẩn: thương hàn, nhiễm trùng tiết niệu, nhiễm trùng huyết, nhiễm khuẩn vết mổ... (Barrett, 2003). Sự xuất hiện ngày càng nhiều các vi khuẩn đa kháng thuốc và sự thiếu hụt các kháng sinh mới làm cho con người đang phải đối mặt với “thời kì hậu kháng sinh”. Chính vì thế nhiệm vụ đặt ra cho ngành công nghiệp sản xuất chất kháng sinh là: một mặt cải biến các chất kháng sinh cũ để tránh tình trạng kháng thuốc, mặt khác phải thúc đẩy nghiên cứu để tìm ra các chất kháng sinh mới (Alanis, 2005).

Trong số các vi sinh vật có khả năng sinh chất kháng sinh thì xạ khuẩn đóng vai trò quan trọng hàng đầu, khoảng 80% các chất kháng sinh được phát hiện có nguồn gốc từ xạ khuẩn, đặc biệt là các loài thuộc chi *Streptomyces* (Aslan, 1999). Trong những năm gần đây việc tìm ra kháng sinh mới từ *Streptomyces* phân lập từ đất ngày càng trở nên hiếm và khó khăn, do vậy, việc phân lập các loài xạ khuẩn từ các nguồn đặc biệt khác để tìm kiếm kháng sinh mới là rất cần thiết (Sirisha et al., 2013). Trong xu hướng này, các loài xạ khuẩn hiếm phân lập từ biển được quan tâm nhiều hơn do khả năng sản sinh các hợp chất thứ cấp có nhiều hoạt tính sinh học có giá trị như kháng sinh, hợp chất kháng ung thư, kháng khối u, bảo vệ thực vật, nhưng chưa được nghiên cứu rộng rãi (Ashadevi, 2005). Tại Việt Nam, những nghiên cứu về hướng vi sinh vật biển trong những năm gần đây mới tập trung vào việc sử dụng các chế phẩm vi sinh (chủ yếu nhập ngoại) và một số chủng vi khuẩn biển trong nuôi trồng thủy sản

nhằm hạn chế vi sinh vật gây hại, làm sạch môi trường nuôi và mang lại hiệu quả kinh tế rõ rệt. Một số nghiên cứu khác chỉ tập trung vào vấn đề đa dạng sinh học biển, việc nghiên cứu các nhóm vi sinh vật như xạ khuẩn, nhóm vi khuẩn lam, nấm mốc có khả năng sinh chất kháng sinh từ môi trường biển còn hạn chế. Một vài nhóm nghiên cứu thuộc Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đang có đề tài nghiên cứu về các vi sinh vật biển có khả năng sinh các chất kháng khuẩn, kháng nấm, kháng ung thư và virus... hướng tới ứng dụng trong y dược.

Trong mục tiêu chung nhằm phát hiện và phát triển các sản phẩm có hoạt tính sinh học ứng dụng trong lĩnh vực bảo vệ sức khỏe con người, nghiên cứu này được thực hiện để khảo sát đặc điểm sinh học và một số điều kiện thích hợp cho lên men sinh tổng hợp chất kháng khuẩn từ chủng xạ khuẩn VD111 được phân lập từ vùng biển Vân Đồn, Quảng Ninh.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Chủng giống vi sinh vật

Đối tượng trong nghiên cứu này chủng xạ khuẩn biển VD111 mới được phân lập.

2.2. Nghiên cứu đặc điểm sinh học của chủng xạ khuẩn VD111

Đặc điểm hình thái của chủng xạ khuẩn VD111 được xác định dựa trên các đặc điểm nuôi cấy bao gồm: màu sắc của khuẩn ty khí sinh; màu sắc của khuẩn ty cơ chất; khả năng sinh sắc tố tan (Tresner and Backus, 1963) và sự hình thành sắc tố melanin. Chuỗi bào tử và bề mặt bào tử được quan sát dưới kính hiển vi điện tử sau thời gian nuôi là 7 ngày và 14 ngày (Shirling and Gottlieb, 1966; Stanley and Holt, 1989).

Đặc điểm sinh lý, sinh hóa: Quan sát khả năng đồng hoá nguồn cacbon và nguồn nitơ của chủng xạ khuẩn lần lượt trên các môi trường ISP9 và ISP8 có bổ sung 1% các nguồn đường và 0,1% nguồn nitơ tương ứng (Shirling and Gottlieb, 1966; Stanley and Holt, 1989).

Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến khả năng sinh trưởng của xạ khuẩn VD111 gồm các yếu tố: nhiệt độ (4, 10, 30, 37, 45 °C), pH ban đầu (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11) và các nồng độ NaCl (1, 2, 5, 7, 10, 13, 15%) trên môi trường ISP2 (Stanley and Holt, 1989).

Các môi trường khác sử dụng trong nghiên cứu: Môi trường A4H (g/l): Glucoza 15; bột đậu tương 15; NaCl 5; CaCO₃ 1; nước biển: 500ml; nước cất: 500ml; pH 7. Môi trường SCA (g/l): Tinh bột 10,0; casein 10; KH₂PO₄ 0,5; MgSO₄ 0,5; NaCl 3; nước biển 500 ml; nước cất 500ml; pH 7,0. Môi trường M1ASW (g/l): Tinh bột 15; glucose 5; pepton 5; nước biển: 500ml; nước cất: 500ml; pH 7.

2.3. Phân loại dựa vào phân tích trình tự gen 16S rDNA

Tách DNA tổng số: chủng VD111 sau khi nuôi trên môi trường SCA ở 28°C trong 2 ngày, xử lý tế bào bằng sốc nhiệt 37°C trong 5 phút, làm lạnh nhanh tại -70°C trong 10 phút. Dịch tế bào sau sốc nhiệt được ly tâm 7.500 vòng/ 3 phút, định nổi được bảo quản ở 4°C (Sambrook *et al.*, 1989). Sử dụng cặp mồi FC27 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và RC1492 (5'TACGGCTACCTTGTACGACTT-3') (Genset) để nhân gen mã hóa 16S rDNA. Phản ứng được thực hiện theo chu trình nhiệt sau: 94°C: 5 phút; 30 chu kỳ (94°C: 1,5 phút; 51°C: 1,5 phút; 72°C: 2 phút); 72°C: 10 phút. Sản phẩm của phản ứng PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%. Kích thước của các đoạn DNA thu được sau phản ứng PCR được so sánh với thang DNA chuẩn (Fermentas). Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ kit PureLink™-DNA Purification (Invitrogen) và giải trình tự trên máy đọc trình tự tự động ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. So sánh trình tự gen tương ứng trên cơ sở dữ liệu GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov).

2.4. Xác định hoạt tính kháng sinh

Nuôi chủng xạ khuẩn VD111 trên máy lắc với tốc độ 200 vòng/ phút ở 30°C trong 48 giờ và

thu dịch lên men, dùng dụng cụ đục thạch để đục lỗ trên bề mặt thạch trong đĩa petri đã cấy vi sinh vật kiểm định. Nhổ dịch lên men, đặt các đĩa vào tủ lạnh 40C trong vòng 4-5 giờ để chất kháng sinh khuếch tán vào môi trường thạch rồi nuôi ở 28-30°C, đo đường kính vòng kháng khuẩn sau 12 giờ (Nguyễn Lâm Dũng (dịch), 1983; Nguyễn Văn Cách và Lê Văn Nhung, 2009).

Các chủng vi sinh vật kiểm định gồm: *Bacillus subtilis* ATCC 6633; *Bacillus cereus* ATCC 11778; *S. typhimurium* ATCC 14028; *Escherichia coli* ATCC 11105; *Candida albicans* ATCC 10231; *Staphylococcus aureus* ATCC 2592 (MRSA) nhận từ bộ sưu tập giống của phòng Công nghệ lên men, Viện Công nghệ sinh học

2.5. Nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men

Môi trường lên men: chủng xạ khuẩn được nuôi lắc trong các môi trường A4H, SCA, M1ASW trên máy lắc với tốc độ 200 vòng/ phút. Sau 2-5 ngày tiến hành xác định hoạt tính kháng sinh, môi trường cho hoạt tính cao sẽ được lựa chọn.

Tỷ lệ tiếp giống: chủng được nuôi trên máy lắc, tốc độ 200 vòng/ phút với các tỷ lệ tiếp giống: 2, 3, 4, 5, 6 (%). Sau 2-5 ngày thử hoạt tính kháng sinh bằng phương pháp đục lỗ thạch.

Thời gian nhân giống: thí nghiệm được tiến hành với việc bổ sung giống tương ứng với các độ tuổi: 36, 48, 60 và 72 giờ nuôi. Sau khi lên men 48 giờ, tiến hành thử hoạt tính kháng sinh (Nguyễn Văn Cách, 2004).

Động thái lên men: Tiến hành nuôi xạ khuẩn trên môi trường và các thông số điều kiện lên men đã lựa chọn được để xác định động thái lên men. Các thông số được nghiên cứu bao gồm pH, sinh khối, hoạt tính kháng sinh, từ đó xác định thời điểm thích hợp để thu hồi chất kháng sinh (Nguyễn Văn Cách, 2004).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đặc điểm sinh học của chủng xạ khuẩn VD111

3.1.1. Hoạt tính kháng khuẩn của chủng VD111

Bảng 1. Khả năng ức chế vi sinh vật kiểm định của chủng xạ khuẩn VD111

Vi sinh vật kiểm định	Gram	Vòng kháng khuẩn (D-d, mm)
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	+	18,5 ± 0,1
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	+	17,2 ± 0,1
<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	-	17,6 ± 0,1
<i>E. coli</i> ATCC 11105	-	17,7 ± 0,1
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	Nấm men	16,8 ± 0,1
<i>S. aureus</i> ATCC 25923 (MRSA)	+	19,5 ± 0,1

Môi trường biển là nguồn tài nguyên dồi dào cung cấp các hoạt chất sinh học, đặc biệt xạ khuẩn từ các vùng sinh thái ngập mặn có khả năng sản sinh ra nhiều hợp chất mới với những đặc tính quý có khả năng ứng dụng trong y dược (Li et al., 2010). Chủng VD111 biểu hiện tính kháng tốt với các chủng vi sinh vật kiểm định đại diện cho nhóm vi khuẩn Gram dương, Gram âm và nấm men (Bảng 1). Đây là kết quả rất đáng chú ý, mở ra tiềm năng ứng dụng trong y dược của hoạt chất thu được từ vi sinh vật biển nói chung và chủng xạ khuẩn VD111 nói riêng. Từ đây cần có những nghiên cứu sâu hơn nhằm cải tạo chủng giống, nâng cao hoạt tính, nghiên cứu tối ưu các điều kiện lên men thu nhận chất kháng khuẩn.

3.1.2. Đặc điểm hình thái

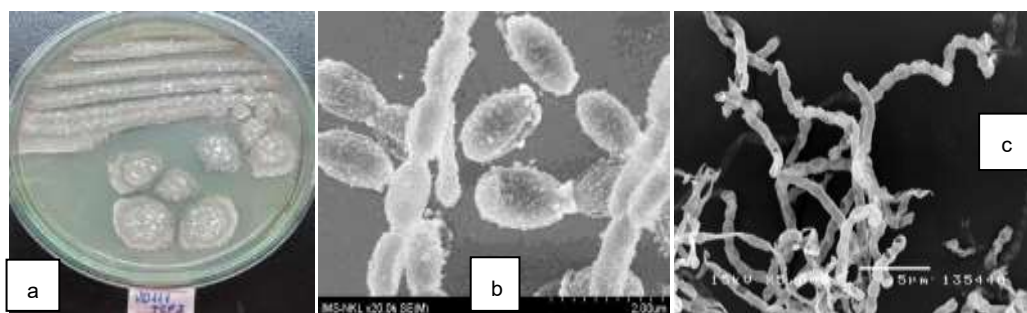
Màu sắc khuẩn lạc của một chủng xạ khuẩn khi nuôi trên các môi trường từ ISP1 đến ISP7 thường khác nhau, đây là yếu tố đầu tiên để phân loại xạ khuẩn theo khóa định tên loài xạ khuẩn ISP (1974) và khóa phân loại Bergey (1963). Khuẩn ty khí sinh và khuẩn ty cơ chất

của chủng VD111 được so với bảng màu của Tresner và Backus (Tresner, 1963). Theo đó thì xạ khuẩn được phân thành 7 nhóm theo màu sắc của khuẩn ty khí sinh và 5 nhóm theo màu của khuẩn ty cơ chất. Cùng với màu sắc của khuẩn lạc thì khả năng sinh sắc tố tan và sự hình thành melanin cũng là một trong những tiêu chuẩn cơ bản để phân biệt các chủng xạ khuẩn. Chủng xạ khuẩn VD111 được nuôi cấy trên các môi trường ISP khác nhau để theo dõi sự biểu hiện các đặc tính của chủng. Khuẩn ty khí sinh của chủng xạ khuẩn VD111 trên các môi trường ISP4, ISP5 và ISP7 có màu vàng, màu xám trên các môi trường ISP1, ISP2, ISP3, khi nuôi trên môi trường ISP6, khuẩn ty khí sinh của VD111 có màu trắng. Khuẩn ty cơ chất của chủng VD111 trên các môi trường nuôi cấy đều có màu vàng, trừ trên môi trường ISP2 - màu xám. Màu sắc môi trường nuôi cấy không thay đổi, chứng tỏ chủng xạ khuẩn VD111 không sinh sắc tố tan, melanin (Bảng 2). Như vậy, chủng VD111 mang đầy đủ các đặc điểm chung của xạ khuẩn theo khóa phân loại của Bergey (1963).

Bảng 2. Đặc điểm nuôi cấy của chủng xạ khuẩn VD111 trên các môi trường ISP

Môi trường	Khuẩn ty		Sắc tố	
	KTKS	KTCC	Sắc tố tan	Melanin
ISP1	Xám	Vàng	-	-
ISP2	Xám	Xám	-	-
ISP3	Xám	Vàng	-	-
ISP4	Vàng	Vàng	-	-
ISP5	Vàng	Vàng	-	-
ISP6	Trắng	Vàng	-	-
ISP7	Vàng	Vàng	-	-

Ghi chú: KTKS: khuẩn ty khí sinh; KTCC: khuẩn ty cơ chất; - : không có



Hình 1. a/Hình thái khuẩn lạc; b/Bề mặt bào tử; c/Cuống sinh bào tử của chủng VD111

Đối với xạ khuẩn, đặc điểm của cuống sinh bào tử và bề mặt bào tử là đặc điểm phân loại quan trọng nhất. Các đặc điểm này được sử dụng để phân loại xạ khuẩn theo phương pháp truyền thống dựa vào khóa định tên loài xạ khuẩn ISP (1974) và khóa phân loại Bergey (1963). Bề mặt bào tử của chủng VD111 xù xì, cuống sinh bào tử dạng xoắn ốc, số lượng bào tử khoảng 30 - 50 bào tử/chuỗi (Hình 1).

3.1.3. Đặc điểm sinh lý, sinh hóa

Một trong các đặc điểm sinh lý, sinh hóa của xạ khuẩn là khả năng đồng hóa các nguồn carbon và nitơ khác nhau, đây là chỉ tiêu quan trọng để phân loại xạ khuẩn theo Nomomura trong ISP (1974). Do đó, chúng tôi đã nuôi chủng VD111 trên môi trường ISP9, ISP8 có bổ sung các nguồn đường, nguồn nitơ khác nhau. Kết quả thí nghiệm (Bảng 3) cho thấy khuẩn ty của chủng VD111 phát triển tốt trên các môi trường có các nguồn đường kiểm tra, trừ trên môi trường có raffinose và đối chứng âm chủng hầu như không phát triển. Bên cạnh đó, chủng VD111 chỉ có khả năng sử dụng được một số ít các nguồn nitơ bao gồm: Methionine, Isoleucine, L-Cysteine, trong đó chủng phát triển tốt nhất trên môi trường có bổ sung 2 amino 2 hydroxy-methyl 1,3 promo hoặc L-Asparagine monohydrate (đối chứng dương).

Các hoạt động trao đổi chất của vi sinh vật là kết quả của các phản ứng hóa học. Vì vậy, nhiệt độ và pH môi trường là hai yếu tố có tác động lớn đến quá trình sống của tế bào. Để tiến hành nghiên cứu, chủng VD111 được cấy trên

môi trường ISP2 và nuôi ở các điều kiện nhiệt độ, pH, nồng độ NaCl khác nhau. Kết quả cho thấy VD111 thuộc nhóm ưa ấm, sinh trưởng tốt ở nhiệt độ 30 - 37°C, ưa môi trường hơi kiềm và ưa mặn, phát triển tốt nhất ở pH=7-8 và nồng độ NaCl 7-10% (Bảng 3). Kết quả này phù hợp với công bố của Sirisha và cộng sự (2013) đa số các chủng xạ khuẩn chỉ phát triển được ở nồng độ NaCl dưới 9%.

3.1.4. Phân loại chủng xạ khuẩn VD111

Đối chiếu các đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa của chủng VD111 với khóa phân loại ISP (1974), Gause (1983) và Bergey (1989), chúng tôi thấy chủng VD111 có đặc điểm gần giống với chủng chuẩn *Streptomyces albogriseolus* ISP 5003, do Benedict và cộng sự mô tả năm 1954, thuộc nhóm A - 2 (Bảng 3).

Gen mã hóa 16S rRNA của chủng xạ khuẩn VD111 đã được giải trình tự, kết quả so sánh với các trình tự gen tương ứng đã đăng ký trên ngân hàng dữ liệu cơ sở GenBank bằng công cụ BLAST trên NCBI được thể hiện ở bảng 4.

Kết quả từ bảng 4 cho thấy gene 16S rDNA của chủng VD111 có độ tương đồng đạt 99% so với gene tương ứng của các chủng xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces*. Kết hợp với kết quả so sánh các đặc điểm hình thái, sinh lý, hóa sinh, theo khóa phân loại Bergey (1989) và ISP, chủng xạ khuẩn này được đặt tên là *Streptomyces albogriseolus* VD111. Theo các tài liệu công bố, nhiều chủng xạ khuẩn được phân lập từ các hệ sinh thái ngập mặn hoặc từ biển, thuộc loài *Streptomyces albogriseolus* có khả

Bảng 3. So sánh đặc điểm phân loại của chủng xạ khuẩn VD111 với chủng chuẩn *Streptomyces albogriseolus* ISP 5003

Các đặc điểm	Chủng VD111	<i>Streptomyces albogriseolus</i> ISP 5003
Cuống sinh bào tử	Thẳng, xoắn ở đầu (S)	Xoắn ốc hoặc xoắn móc câu (S)
Bề mặt bào tử	Xù xì	Xù xì hoặc trơn
Số bào tử/chuỗi	30 - 50	10 - 50
Màu khuẩn ty khí sinh	Xám	Xám
Màu khuẩn ty cơ chất	Xám	Xám
Sắc tố tan	Không	Không
Sắc tố melanin	Không	Không
Nhiệt độ		30 - 37°C
pH		7-8
Nồng độ NaCl		7 - 10%
Sử dụng nguồn đường:		
D-Glucose	+	+
Sucrose	+	+
D-Xylose	+	+
Myo-Inositol	+	+
D-Mannitol	+	+
D-Fructose	+	+
Rhamnose	+	+
Raffinose	-	-

Ghi chú: (-): Không sinh trưởng; (+): Có sinh trưởng

Bảng 4. So sánh trình tự gene 16S rDNA của chủng VD111 với gene tương ứng của các chủng xạ khuẩn được đăng kí trên GenBank

Trình tự gene 16S rDNA của chủng xạ khuẩn được so sánh	Acc. No.	Độ tương đồng (%)
<i>Streptomyces nodosus</i> ATCC 14899	NR_041730.1	99
<i>Streptomyces anthocyanicus</i> NBRC 14892	NR_041168.1	99
<i>Streptomyces indiaensis</i> NBRC 13964	NR_041155.1	99
<i>Streptomyces albogriseolus</i> DSM 40003	NR_042760.1	99
<i>Streptomyces bellus</i> ISP 5185	NR_114828.1	99

năng sinh nhiều hoạt chất sinh học với đặc tính quý như kháng u, kháng ung thư, kháng nấm, điều hòa sinh trưởng ở thực vật.... Chủng *Streptomyces albogriseolus* MGR072 được phân lập từ hệ sinh thái ngập mặn tại Fujian, Trung Quốc sinh ra benzonaphthyridine alkaloid có hoạt tính sinh học đa dạng hứa hẹn ứng dụng trong y dược (Li et al., 2010). Chủng *S. albogriseolus* A1 phân lập từ biển Đỏ có khả năng ức chế nhiều loại vi sinh vật do sản sinh ra 7 hoạt chất sinh học khác nhau (Shaaban et al.,

2013). Chủng *S. albogriseolus* HA10002 phân lập từ hệ sinh thái ngập mặn tại Hải Nam, Trung Quốc, sinh ra fungichromin B có phổ kháng nấm rộng và có khả năng diệt giun tròn ký sinh ở rễ cây gây hại mùa màng (Zeng et al., 2013).

Chủng VD111 biểu hiện tính kháng tốt với các chủng vi sinh vật thuộc nhóm vi khuẩn Gram dương, Gram âm và nấm men. Vì vậy, cần nghiên cứu các điều kiện lên men thu nhận hoạt chất từ chủng xạ khuẩn này, phục vụ cho nghiên cứu ứng dụng trong thực tế.

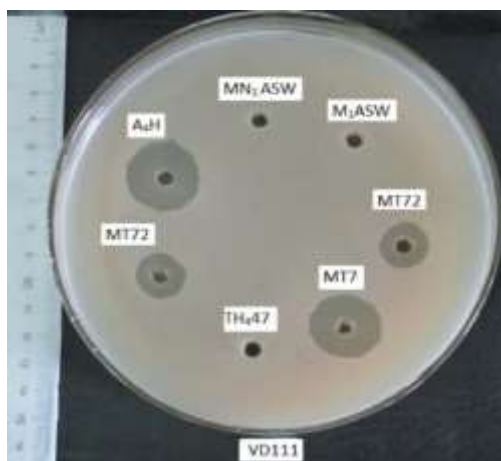
3.2. Yếu tố ảnh hưởng đến quá trình sinh trưởng và sinh chất kháng khuẩn của chủng xạ khuẩn *Streptomyces albogriseolus* VD111

3.2.1. Lựa chọn môi trường lên men

Chủng xạ khuẩn VD111 được nuôi lắc trong bình có chứa các môi trường lên men khác nhau. Sau 4 ngày nuôi, thử hoạt tính kháng khuẩn bằng phương pháp đục lỗ thạch, vi sinh vật kiểm định *B.subtilis* ATCC 6633, kết quả thể hiện ở hình 2 cho thấy chủng VD111 có hoạt tính kháng khuẩn cao nhất khi nuôi cấy trên môi trường A4H với đường kính vòng kháng khuẩn đạt 17,5mm, môi trường này sẽ được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.2.2. Ảnh hưởng của tỷ lệ tiếp giống và thời gian nhân giống

Trong quá trình lên men chủng xạ khuẩn VD111, hoạt tính kháng khuẩn thu được cao nhất khi lượng giống tiếp vào là 5%, tương ứng với vòng vô khuẩn thu được đối với chủng *B. subtilis* ATCC 6633 là 24,3mm. Bên cạnh xác định tỷ lệ giống thích hợp, thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian nhân giống cũng được tiến hành. Kết quả cho thấy thời gian nhân giống thích hợp là 48 giờ. Giống thu tại thời điểm này tiếp vào bình lên men cho tích lũy sinh khối và chất kháng khuẩn cao nhất (24mm).



Hình 2. Hoạt tính kháng khuẩn của chủng VD111 trên các môi trường lên men

3.2.3. Xác định động thái quá trình lên men

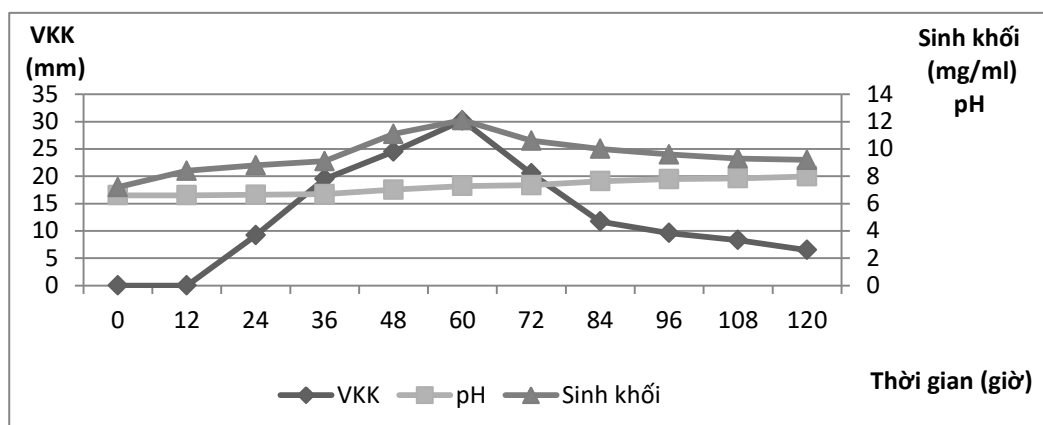
Trên cơ sở môi trường và một số điều kiện đã lựa chọn, quá trình lên men sinh tổng hợp chất kháng khuẩn của chủng VD111 được tiến hành nhằm theo dõi biến động của pH, sinh khối, hoạt tính kháng khuẩn, đồng thời xác định thời điểm kết thúc lên men thu hồi chất kháng khuẩn. Kết quả cho thấy chủng VD111 sinh trưởng mạnh và sinh chất kháng khuẩn từ giờ thứ 24. Tại thời điểm sau 60 giờ lên men, chủng sinh chất kháng khuẩn mạnh nhất tương ứng với vòng kháng khuẩn ức chế chủng *B. subtilis* ATCC 6633 là 30,2mm. Do vậy, có thể dừng lên men để thu hồi chất kháng khuẩn sau 60 giờ nuôi (Hình 3). Gulve và Deshmukh (2012) khi nghiên cứu về hoạt tính kháng sinh của các chủng xạ khuẩn biển đã khẳng định đối với đa số các chủng xạ khuẩn, thời gian thu chất kháng sinh là 4-5 ngày lên men. Như vậy, thời điểm kết thúc lên men để thu hồi chất kháng khuẩn đối với chủng xạ khuẩn VD111 khá sớm.

4. KẾT LUẬN

Dựa trên cơ sở phân loại theo các đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa, kết hợp với kết quả giải trình tự gen 16S rDNA, chủng xạ khuẩn VD111 được định danh là *Streptomyces albogriseolus* VD111.

Chủng xạ khuẩn *Streptomyces albogriseolus* VD111 có phổ kháng vi sinh vật gây bệnh khá rộng, ức chế được vi khuẩn Gram âm, Gram dương và nấm men *Candida albicans* ATCC 10231.

Môi trường lên men thích hợp để chủng xạ khuẩn *Streptomyces albogriseolus* VD111 sinh chất kháng khuẩn là A4H có thành phần (g/l): Glucoza 15; bột đậu tương 15; NaCl 5; CaCO₃ 1; pH 7, với điều kiện lên men lựa chọn được là: lượng giống tiếp vào 5%, thời gian nhân giống 48 giờ. Thời điểm thu hồi chất kháng khuẩn là sau 60 giờ lên men.



Hình 3. Động thái quá trình lên men sinh tổng hợp chất kháng khuẩn của chủng VD111

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alanis A. J., (2005). Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? Archives of Medical Research, 36: 697-705.
- Ashadevi N.K., (2005). Isolation and identification of marine actinomycetes and their potential in antimicrobial activity. Pakistan J. Biological Sciences, 9(3): 470-472.
- Aslan B., (1999). Studies on isolation, characterization and antibiotic production of *Streptomyces* species. PhD thesis, Cukurova University, Institute of Science, Adana.
- Barrett C.T., Barrett J.F., (2003). Antibacterials: are the new entries enough to deal with the emerging resistance problems? Current Opinion in Biotechnology, 14: 621-626.
- Nguyễn Văn Cách (2004). Công nghệ lên men các chất kháng sinh, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
- Nguyễn Văn Cách, Lê Văn Nhung (2009). Cơ sở công nghệ sinh học, tập 4 - công nghệ vi sinh, Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam
- Ceylan O., G. Okmen, A. Ugur (2008). Isolation of soil *Streptomyces* as source antibiotics active against antibiotic-resistant bacteria. EurAsia Journal of BioSciences, 2: 73-82.
- Nguyễn Lâm Dũng (dịch, 1983). Thực tập vi sinh vật học, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, tr. 73-81.
- Gulve R.M., A.M. Deshmukh (2012). Antimicrobial activity of the marine actinomycetes. International Multidisciplinary Research Journal, 2(3):16-22.
- Li X.L., Xu M.J., Zhao Y.L., Xu J. (2013). A novel benzo[f][1,7] naphthyridine produced by *Streptomyces albogriseolus* from mangrove sediments. Molecules, 15: 9298-9307.
- Michael A Kohanski, Daniel J Dwyer, James J Collins, 2010. How antibiotics kill bacteria: from targets to network. Nat Rev Microbiol., 8(6): 423 - 435.
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T (1989) Molecular cloning, A laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Shaaban Mohamed, Abdel-Razik Ahmed S, Abdel-Aziz Mohamed S, AbouZied Azza A., Fadel Mohamed (2013). Bioactive Secondary Metabolites from marine *Streptomyces albogriseolus* isolated from Red Sea Coast. Journal of Applied Sciences Research, 9(1): 996.
- Shirling E.B., Gottlieb D. (1966). International of systematic bacteriology: Method for characterization of *Streptomyces* species. Department of Botany and Bacteriology Ohio Wesleyan University, Delaware, Ohio and Department of Plant Pathology University of Illinois, Urbana, Illinois.
- Sirisha B., R. Harith, YSYV. Jagan Mohan, K. Siva Kumar, T. Ramana (2013). Bioactive compounds from marine actinomycetes isolated from the sediments of bay of Bengal. IJPCBS 2013, 3(2): 257-264.
- Stanley T. Williams M. E. Sharpe, J. G. Holt (1989). Bergey's Manual of Systematic bacteriology, Williams & Wilkins, 4: 2452-2492.
- Tresner H. D., E.J.B. (1963). System of Color Wheels for *Streptomyces* Taxonomy. Appl. Microbiol., 11: 8.
- Zeng Q., Huang H., Zhu J., Fang Z., Sun Q., Bao S. (2013). A new nematicidal compound produced by *Streptomyces albogriseolus* HA10002. Antonie van Leeuwenhoek, 103: 1107-1111.