

NGHIÊN CỨU CHŨNG XẠ KHUẨN HLD 3.16 CÓ HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN PHÂN LẬP TỪ VÙNG VEN BỜ BIỂN VIỆT NAM

Nguyễn Văn Hiếu, Nguyễn Phương Huệ, Vũ Thị Hạnh Nguyên, Phan Thị Hồng Thảo, Phạm Thanh Huyền, Phí Quyết Tiến, Lê Gia Hy*

Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KHCNVN, 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

*Email: Legiahy@ibt.ac.vn

Đến Tòa soạn: 7/5/2012, Chấp nhận đăng: 26/2/2013

TÓM TẮT

Chủng xạ khuẩn HLD 3.16 được phân lập từ các mẫu nước, bùn và đất thu thập ở vùng ven biển Hạ Long – Quảng Ninh và được phân loại thuộc chi *Streptomyces*. Qua xác định các đặc điểm hình thái, sinh hóa và sinh lý của chủng HLD 3.16 cho thấy, chủng này có nhiều điểm tương đồng với loài *Streptomyces autotrophicus*. Chủng HLD 3.16 có khả năng sinh một số enzyme ngoại bào như: amylase, cellulase và protease. Chủng có hoạt tính kháng khuẩn ức chế các vi khuẩn *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Sarcina lutea* M5, *Bacillus cereus* var. *mycoides* ATCC 11778, *Escherichia coli* ATCC 15224, *Escherichia coli* PA2, *Alcaligenes faecalis*, *Salmonella typhi* IFO14193, *Pseudomonas auroginosa* và hoạt tính kháng nấm *Candida albicans* ATCC 12031, *Aspergillus niger* 114. Môi trường thích hợp cho lên men sinh tổng hợp chất kháng khuẩn có thành phần (g/l): tinh bột tan 15; glucose 2,5; pepton 4; (NH₄)₂SO₄ 2,5; CaCO₃ 2. Điều kiện thích hợp cho sinh tổng hợp chất kháng khuẩn từ chủng HLD 3,16 đã được xác định: pH 7,0 - 7,5, nhiệt độ 30 °C, giống bổ sung 4,0 % (v/v), thể tích môi trường/thể tích bình nuôi là 10 % (v/v), thời điểm thích hợp để thu hồi chất kháng sinh là sau 108 giờ lên men. Dịch sau lên men được chiết bằng n- butanol và 2-butanon cho chất kháng khuẩn có phổ hấp phụ UV lớn nhất tương ứng tại bước sóng 220, 260 và 258 nm.

Từ khóa: *Streptomyces autotrophicus*, đặc điểm sinh học, kháng khuẩn, xạ khuẩn biển.

1. MỞ ĐẦU

Trong những năm gần đây, do sự gia tăng các bệnh mới, số nhóm vi sinh vật kháng thuốc và độc tính của một số thuốc kháng sinh bán tổng hợp đang được sử dụng, các nhà khoa học đã chuyển hướng nghiên cứu và tìm kiếm các hợp chất có giá trị dược học từ vi sinh vật biển. Đến nay, với số lượng lớn các hợp chất có hoạt tính sinh học được phát hiện, vi sinh vật biển trở thành mục tiêu quan trọng đối với ngành công nghiệp sinh học trên con đường tìm kiếm và sản xuất các loại thuốc mới, các hoạt chất kháng khuẩn và chống ung thư [1, 2, 3]. Môi trường biển Việt Nam, với những nghiên cứu về các nhóm vi sinh vật như vi khuẩn, xạ khuẩn, vi khuẩn lam, nấm mốc có khả năng sinh chất kháng khuẩn và ức chế tế bào ung thư còn chưa nhiều, nhưng

những kết quả đánh giá về độ đa dạng sinh học và mức độ chọn lọc thu được cho thấy, vi sinh vật từ các hệ sinh thái ở những vùng biển của Việt Nam có độ đa dạng sinh học cao, tính chọn lọc và cạnh tranh vẫn đang là điều bí mật, sẽ là nguồn nguyên liệu tiềm năng hứa hẹn cho sự ra đời các loại thuốc chữa bệnh hiểm nghèo thế hệ mới. Bài báo này trình bày các nghiên cứu liên quan đến chủng xạ khuẩn HLD3.16, phân lập từ vùng biển Hạ Long – Quảng Ninh, bao gồm đặc điểm hình thái, sinh lí, sinh hóa, ảnh hưởng của một số yếu tố nuôi cấy như nguồn cacbon, nitơ trong môi trường và điều kiện lên men đến khả năng sinh chất kháng khuẩn. Các kết quả thu được là bước đầu tiên và quan trọng để cải thiện mức độ sinh tổng hợp kháng sinh từ xạ khuẩn này, đồng thời là cơ sở cho nghiên cứu thu nhận chất kháng sinh, hướng tới sản xuất thuốc trong tương lai.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Chủng giống vi sinh vật

Vi sinh vật kiểm định gồm: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Sarcina lutea* M5, *Bacillus cereus* var. *mycoides* ATCC 11778, *Escherichia coli* ATCC 15224, *Alcaligenes faecalis*, *Salmonella typhi* IFO14193, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* ATCC 12031 và *Aspergillus niger* 114 nhận từ Bộ sưu tập giống của Phòng Công nghệ lên men-Viện Công nghệ sinh học.

2.2. Môi trường

Môi trường phân lập xạ khuẩn (g/l): Tinh bột 10; casein 5; NaNO₃ 1; 100 µg/ml cycloheximide; nước cất 500 ml + nước biển 500 ml; thạch 18 - 20 [4].

Môi trường lên men gồm: MT 7 (g/l): Tinh bột tan 10; glucose 5; pepton 6; (NH₄)₂SO₄ 2,5; CaCO₃ 2; nước cất 1l; pH 6,5-7. MT 79 (g/l): Glucose 10; peptone 10; casein thủy phân 2; cao nấm men 2; NaCl 6; K₂HPO₄ 0,2; thạch 20; nước cất 1l, pH 7,2-7,4. MT 2 (g/l): Ri đường 20; pepton 5; glucose 10; saccharose 20; CaCO₃ 2; nước cất 1l; pH 6,5-7. MT A-4 (g/l): Glucose 10; bột đậu tương 10; NaCl 5; CaCO₃ 1l; pH 7. MT A-12 (g/l): Tinh bột tan 10; ri đường 10; bột đậu tương 10; K₂HPO₄ 2; CaCO₃ 1; NaCl 5; nước cất 1l; pH 7 [5].

Môi trường nuôi vi sinh vật kiểm định MPA (g/l): Cao thịt 5; pepton 10; NaCl 5; thạch 20; nước cất 1l; pH 7 [6].

2.3. Phương pháp

2.3.1. Lấy mẫu và tuyển chọn chủng xạ khuẩn có hoạt tính kháng sinh

Dụng cụ dùng lấy mẫu phải vô trùng để tránh nhiễm chéo. Mẫu nước được lấy cách bề mặt 0,5 - 2,0 m. Mẫu đất, bùn được lấy bằng cách loại bỏ lớp đất dày 5 - 10 cm trên bề mặt, sau đó lấy phần đất tiếp theo cho vào túi đã được khử trùng, gài cẩn thận. Mẫu được bảo quản trong tủ lạnh ở 4 °C cho đến khi xử lí và phân tích.

Các mẫu được pha loãng đến nồng độ 10⁻², sau đó được trang lên các đĩa petri có chứa môi trường phân lập xạ khuẩn nuôi 28 °C trong 7 ngày, xác định các chủng xạ khuẩn căn cứ vào hình thái khuẩn lạc. Khuẩn lạc các chủng xạ khuẩn có điểm tròn, tạo thành các đường trong đồng tâm, bề mặt khô và bám chắc vào môi trường.

Các chủng xạ khuẩn được nuôi trên môi trường ISP2 thạch ở 28 °C, sau 72 giờ đục những cục thạch có đường kính $d = 6$ mm đặt lên trên các đĩa đã chứa vi sinh vật kiểm định. Đĩa chứa vi sinh vật kiểm định được chuẩn bị như sau: nhân giống vi sinh vật kiểm định trên môi trường MP lỏng 16 giờ ở nhiệt độ 37 °C, xác định số lượng, sau đó bổ sung vào môi trường MPA đã khử trùng và làm nguội tới 40 °C sao cho đạt mật độ 10^{5-7} CFU/ml, trộn đều và đổ vào các đĩa petri. Các đĩa petri chứa vi sinh vật kiểm định sau khi đặt cục thạch để ở nhiệt độ 4 °C – 6 °C, sau 6 - 8 giờ chuyển nuôi ở 37 °C trong thời gian 14 - 16 giờ, lấy ra đo đường kính vòng kháng khuẩn (D, mm). Chủng xạ khuẩn cho đường kính vòng kháng khuẩn lớn sẽ được chọn nghiên cứu tiếp [4].

2.3.2. Xác định hoạt tính kháng khuẩn theo phương pháp khuếch tán trên thạch

Đục lỗ trên môi trường thạch đã cấy vi sinh vật kiểm định, nhỏ vào lỗ dung dịch cần thử. Đổ vào tủ lạnh 4 - 6 giờ cho chất kháng khuẩn khuếch tán vào môi trường, sau đó nuôi ở tủ ấm 37 °C trong 24 giờ để vi sinh vật kiểm định sinh trưởng. Hoạt tính kháng khuẩn được xác định bằng đường kính vòng vô khuẩn (D-d, mm), đường kính càng lớn thì hoạt tính càng cao [6].

2.3.3. Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học của chủng HLD 3.16

Chủng xạ khuẩn được nghiên cứu đặc điểm hình thái theo các phương pháp của Chương trình phân loại xạ khuẩn Quốc tế (International *Streptomyces* Project) (ISP). Đặc điểm nuôi cấy như màu sắc khuẩn ty khí sinh (KTKS) và khuẩn ti cơ chất (KTCC) được kiểm tra trên các môi trường: cao nấm men- cao malt agar (ISP2); oatmeal agar (ISP3); muối khoáng- tinh bột agar (ISP4); glycerol-asparagine agar (ISP5); peptone- cao nấm men-vi lượng agar (ISP6); tyrosine agar (ISP7); cao nấm men-glucose agar (ISP1). Nghiên cứu đặc điểm bào tử và chuỗi bào tử khi nuôi xạ khuẩn trên môi trường ISP1 và ISP2 ở nhiệt độ 28 °C bằng cách đặt lamên nghiêng một góc 45° với bề mặt môi trường và vuông góc với đường cấy, sau 7 - 14 ngày quan sát dưới kính hiển vi điện tử [4, 7, 8, 9].

Khả năng đồng hóa các nguồn cacbon của chủng xạ khuẩn thể hiện khi nuôi trên môi trường khoáng có bổ sung (1 %): glucose, xylose, arabinose, rhamnose, fructose, galactose, raffinose, manitol, inositol và saccharose. Tương tự, khả năng sử dụng các nguồn nitơ của xạ khuẩn được nghiên cứu khi nuôi trên môi trường khoáng bổ sung các acid amin nồng độ 0,1 % ở 28 °C trong 14 ngày [4, 7, 8, 9].

2.3.5. Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện lên men đến khả năng sinh chất kháng khuẩn

Chủng HLD 3.16 được lên men trên môi trường MT 7 trong bình tam giác 250 ml, trên máy lắc với tốc độ 220 vòng/ phút, ở nhiệt độ 28 °C, lần lượt thay đổi từng yếu tố thí nghiệm: Ảnh hưởng của các yếu tố môi trường bao gồm hàm lượng glucose từ 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 và 15,0 (g/l), tinh bột 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 và 25,0 (g/l); pepton 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 và 8,0 (g/l); ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy: môi trường nhân giống Gause I, MT XK và ISP2, tỉ lệ tiếp giống 1,0; 2,0; 3,0, 4,0 và 5,0 (%); pH môi trường lên men ban đầu 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 và 10,0; thể tích môi trường nuôi/ thể tích bình là 5; 10; 15; 20; 25 và 30 %(v/v).

2.3.6. Xác định đường khử

Xác định đường khử bằng phương pháp DNSA (dinitrosalicylic acid). Dựa trên phản ứng tạo màu giữa lượng đường khử còn lại trong dịch lên men với thuốc thử DNSA. Từ đồ thị lập được đối với glucose tinh khiết sẽ tính được hàm lượng đường khử quy về glucose có trong mẫu [10].

2.3.7. Xác định sinh khối khô

Dịch lên men được lọc qua giấy lọc Whatman đã biết trước trọng lượng, phần giấy lọc chứa sinh khối xạ khuẩn đem sấy ở nhiệt độ 105 °C đến khối lượng không đổi.

2.3.8. Tách chiết chất kháng khuẩn từ dịch lên men chủng HLD 3.16

Dịch lên men được li tâm 8000 vòng/phút ở nhiệt độ 4 °C trong 10 phút, thu dịch loại sinh khối. Dịch sau li tâm được bổ sung dung môi n-butanol và 2-butanone theo tỉ lệ 1 : 1 (v/v) (đối với sinh khối: cân 1sinh khối ướt sau khi rửa sạch loại bỏ hoàn toàn nước, bổ sung 5 ml dung môi), lắc 200 vòng/phút ở 4 °C trong 2 giờ. Dịch sau lắc để tĩnh trong thời gian 6 - 8 giờ ở nhiệt độ 4 °C, thu phần dịch nổi và loại bỏ dung môi, kiểm tra hoạt tính kháng khuẩn theo phương pháp khoan giấy lọc với các chủng vi sinh vật kiểm định và xác định phổ hấp phụ chất kháng khuẩn trên máy quang phổ UV 1601 của hãng Shimadzu.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đặc điểm sinh học của chủng xạ khuẩn HLD 3.16

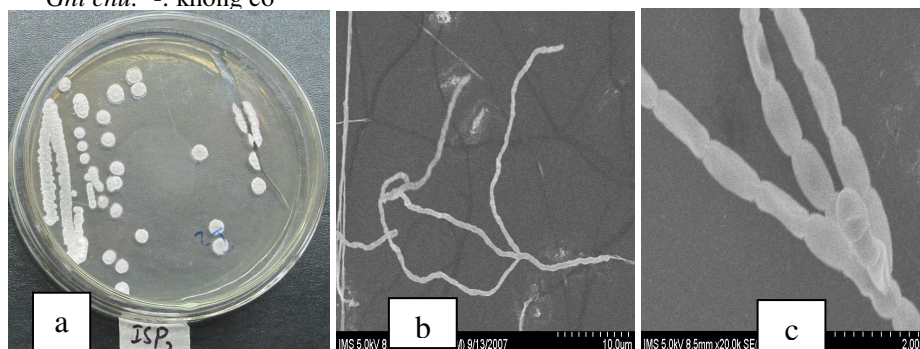
Từ mẫu nước và bùn ở vùng biển Hạ Long, Quảng Ninh, đã phân lập và tuyển chọn được chủng xạ khuẩn kí hiệu HLD 3.16 có khả năng ức chế nhiều vi sinh vật kiểm định như *E. coli* ATCC 15224, *B. subtilis* ATCC 6633, *B. cereus var. mycoides* ATCC 11778, *Sarcina lutea* M5. Chủng HLD 3.16 khi được nuôi cấy trên môi trường ISP 2 tạo khuẩn lạc có bề mặt nhẵn, bào tử có màu trắng đến xám, trong quá trình sinh trưởng không sinh melanin, tuy nhiên trên môi trường ISP3 có sinh sắc tố tan nâu nhạt (bảng 1). Chủng HLD 3.16 có khuẩn ty cơ chất màu trắng xám đến vàng nhạt, sinh nhánh mạnh và không bị đứt. Cuống sinh bào tử thẳng, hơi lượn sóng (RF), phân nhánh, bào tử tạo thành chuỗi với 10 - 50 bào tử, bề mặt bào tử nhẵn (Sm) (hình 1 c). Bào tử có hình que, kích thước từ 0,8 - 1,2 μm \times 0,4 - 0,6 μm .

Chủng HLD 3.16 sinh trưởng tốt trong khoảng nhiệt độ 10 – 45 °C và tối ưu ở 28 °C, trong khoảng pH từ 5 – 10, tối ưu ở pH 7,0. Chủng có khả năng sinh trưởng ở nồng độ muối NaCl \leq 7 %, và sinh một số enzyme như: amylase, cellulase, protease; sinh trưởng tốt trên môi trường có bổ sung một số chất (%): crystal violet (10^{-4}), phenol (0,1) và sodium azide (0,01), và bị ức chế ở nồng độ sodium azide 0,02 (bảng 2). Khi so sánh chủng HLD3.16 với các chủng xạ khuẩn được mô tả trong khóa phân loại ISP cho thấy, chủng HLD 3.16 có đặc điểm tương đồng với loài *Streptomyces autotrophicus* của Takamiya và Tubaki (1956), dạng chủng aa-1-1; ISP 5011 nhóm A-2 [12, 15, 20, 23], do vậy chủng HLD 3.16 được đặt tên là *S. autotrophicus* HLD 3.16.

Bảng 1. Đặc điểm nuôi cấy chủng xạ khuẩn HLD 3.16 trên một số môi trường.

MT	Màu sắc của khuẩn ti		Sắc tố	
	KTKS	KTCC	Sắc tố tan	Melanin
ISP1	Trắng xám b	Đỏ 4ie	-	-
ISP2	Trắng xám 2fe	Xám nâu 7ih	-	-
ISP3	Đỏ 5cb	Đỏ nâu nhạt 4ie	Đỏ nâu nhạt	-
ISP4	Trắng a	Vàng trắng	-	-
ISP5	Vàng kem 1ba	Vàng 1ba	-	-
ISP6	Trắng 13ba	Vàng xám 2fe	-	-
ISP7	Trắng xám bi	Xám nâu 4li	-	-

Ghi chú: -: không có



Hình 1. Hình thái khuẩn lạc và chuỗi bào tử của chủng xạ khuẩn HLD 3.16: Khuẩn lạc: a; Chuỗi bào tử dưới kính hiển vi điện tử quét: b (× 1000) và c (× 2000).

Bảng 2. Một số đặc điểm sinh học của chủng xạ khuẩn HLD 3.16.

Đặc điểm	Chủng HLD3.16	Đặc điểm	Chủng HLD3.16
Cuống sinh bào tử	RF (hình 1b)	Khả năng sử dụng nguồn đường	
Bề mặt bào tử	Bào tử hình trụ, nhẵn Sm (hình 1c)	Arabinose	+
Số lượng bào tử trên một chuỗi	3 - 50	D-xylose	+
Màu khuẩn ti khí sinh	Vàng trên ISP 2 và 5	Myo-Inositol	+
Màu khuẩn ty cơ chất	Đỏ trên ISP 1, Trắng và vàng trên ISP 3 và 4	D-Manitol	+
Sắc tố tan	Nâu nhạt trên ISP 3	D-fructose	+
Sắc tố Melanin	Không	L-rhamnose	+
Nhiệt độ sinh trưởng	10 – 45 °C	Saccharose	+
Nhiệt độ tối ưu	28 °C	Raffinose	+
pH sinh trưởng	5 - 10	D-Glucose	+

Nồng độ muối NaCl (%)	≤7	Khoáng	+
Crystal violet 10 ⁻⁴ % (w/v)	+	Khả năng sử dụng nguồn nitơ :	
Phenol 0,1 % (w/v)	+	L-Arginin	+
Sodium azide 0,01 % (w/v)	++	L-Lysin	-
Sodium azide 0,02 % (w/v)	-	L-Threonin	+
Khả năng thủy phân	+	L-Cystein	-
Casein	+	L-Tryptophan	-
Tinh bột	+	L-Arginin monodo	-
Cellulose	+	L-Isoleucin	-

Ghi chú: +: sinh trưởng bình thường; -: không rõ ràng

3.2. Nghiên cứu một số yếu tố ảnh hưởng đến quá trình sinh tổng hợp chất kháng khuẩn của chủng HLD 3.16

Chủng HLD 3.16 được lên men ở 28 °C trong 96 giờ, trên một số môi trường đặc trưng cho sinh tổng hợp chất kháng sinh cho xạ khuẩn MT 2, MT 7, MT A-4, MT A-12 và MT 79, kết quả thu được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của môi trường lên men đến khả năng sinh chất kháng khuẩn của chủng HLD3.16.

Chủng	Đường kính vòng vô khuẩn (D-d, mm)									
	MT7		A4		A12		MT79		MT2	
	DLM	SK	DLM	SK	DLM	SK	DLM	SK	DLM	SK
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	17,5	-	15,2	-	14,5	-	13,5	-	12,1	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 15224	14,5	-	14,4	-	12,4	-	12,5	-	11,3	-
<i>Sarcina lutea</i> M5	14,3	-	13,6	-	12,3	-	11,4	-	10,2	-
<i>Aspergillus niger</i> 114	16,3	-	15,4	-	15,2	-	13,5	-	11,4	-

Ghi chú: SK: sinh khối; DLM: dịch lên men.

Trong 5 môi trường sử dụng lên men chủng HLD3.16 cho sinh tổng hợp hoạt chất kháng khuẩn, môi trường MT7 cho kết quả cao nhất với tất cả các chủng vi sinh vật kiểm định (vòng kháng *B. subtilis* ATCC 6633 đạt 17,5 mm), đồng thời sinh khối khi được tách chiết bằng dung môi n-butanol và 2-butanone đều không thấy xuất hiện vòng kháng khuẩn, điều này chứng tỏ các hợp chất kháng khuẩn sau quá trình sinh tổng hợp được tiết vào môi trường lên men. Do vậy, môi trường MT7 được chọn để nghiên cứu một số yếu tố ảnh hưởng tới sinh tổng hợp chất

kháng khuẩn như: nguồn cacbon (tinh bột, glucose) và nitơ (pepton), pH ban đầu, ảnh hưởng của độ thông khí....

3.2.1. Ảnh hưởng của lượng tinh bột, glucose và pepton

Glucose đã có ảnh hưởng mạnh đến quá trình sinh tổng hợp chất kháng khuẩn của chủng HLD 3.16. Với nồng độ nghiên cứu trong khoảng từ 1 đến 15 (g/l), tại nồng độ glucose 2,5 (g/l) lượng chất kháng khuẩn sinh ra lớn nhất, tạo vòng vô khuẩn đạt 19,4 (mm) (bảng 4). Khi nồng độ glucose >5 (g/l), lượng kháng sinh không những không tăng mà còn giảm, điều này hoàn toàn phù hợp với các nghiên cứu đã công bố là glucose sẽ ảnh hưởng ức chế ngược đến sự sinh kháng sinh [11]. Khi nghiên cứu ảnh hưởng của tinh bột đến khả năng sinh tổng hợp chất kháng khuẩn của chủng HLD 3.16, kết quả thu được cao nhất tại nồng độ tinh bột 15 (g/l) tương ứng với vòng vô khuẩn là 19,5 (mm). Ở nồng độ tinh bột > 15 (g/l) hợp chất kháng khuẩn sinh ra có xu hướng giảm. Khi sử dụng tinh bột làm nguồn cacbon đã nâng cao khả năng sinh hợp chất kháng khuẩn từ chủng HLD3.16, kết quả này tương tự với nghiên cứu nâng cao khả năng sinh hợp chất kháng khuẩn của chủng *S. avermitilis* 14-12A [12].

Bảng 4. Ảnh hưởng của hàm lượng glucose, tinh bột và pepton đến khả năng sinh chất kháng khuẩn của chủng HLD3.16.

Khối lượng glucose (g/l)	Đường kính vòng vô khuẩn (D-d, mm)		Khối lượng tinh bột (g/l)	Đường kính vòng vô khuẩn (D-d, mm)		Khối lượng pepton (g/l)	Đường kính vòng vô khuẩn (D-d, mm)	
	<i>B. subtilis</i> ATCC 6630	<i>E. coli</i> ATCC 15224		<i>B. subtilis</i> ATCC 6630	<i>E. coli</i> ATCC 15224		<i>B. subtilis</i> ATCC 6630	<i>E. coli</i> ATCC 15224
1,0	16,1	14,3	5,0	12,1	13,2	2,0	20,1	14,5
<u>2,5</u>	<u>19,4</u>	<u>16,5</u>	10,0	17,2	17,5	<u>4,0</u>	<u>21,3</u>	<u>17,6</u>
5,0	18,3	16,4	<u>15,0</u>	<u>19,5</u>	<u>17,2</u>	6,0	20,2	14,6
7,5	17,4	16,2	20,0	12,7	14,6	8,0	20,3	14,1
10,0	17,1	15,1	25,0	11,3	13,2	10,0	20,5	14,6

Sau khi chọn được nồng độ tinh bột và glucose thích hợp, đã nghiên cứu ảnh hưởng của nguồn pepton đến khả năng sinh tổng hợp chất kháng khuẩn của chủng HLD 3.16 với hàm lượng trong khoảng 2 - 8 (g/l), ở nồng độ pepton 4 (g/l) lượng chất kháng khuẩn thu được lớn nhất tương ứng với vòng vô khuẩn đạt 21,3 (mm), khi tăng hàm lượng pepton lên lượng kháng sinh có xu hướng giảm, đây là kết quả của sự mất cân bằng giữa tỉ lệ C:N, do vậy nồng độ pepton 4 (g/l) đã được chọn. Kết quả này cũng tương tự với kết quả nghiên cứu nâng cao khả năng sinh hợp chất kháng khuẩn của chủng *Streptomyces* sp.KGG32 [13]. Tuy nhiên trong nghiên cứu nâng cao khả năng sinh hợp chất kháng khuẩn của chủng xạ khuẩn *Streptomyces avermitilis* 14-12A, nguồn nitơ thích hợp là cao nấm men [12].

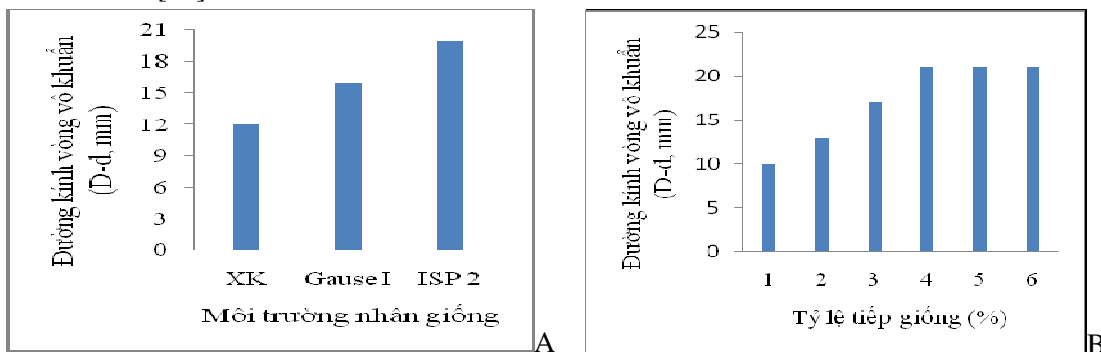
3.2.2. Ảnh hưởng môi trường nhân giống

Trong quá trình lên men kháng sinh, môi trường nhân giống có ảnh hưởng rất lớn và là bước khởi đầu cho quá trình tổng hợp kháng sinh về sau. Sử dụng môi trường nhân giống giàu

chất dinh dưỡng sẽ giúp cho các chủng xạ khuẩn tăng nhanh sinh khối, là điều kiện tiên quyết cho quá trình sinh kháng sinh ở giai đoạn sau. Trong nghiên cứu, chúng tôi đã sử dụng các môi trường Gause I, ISP 2, MT XK làm môi trường nhân giống. Đây là các môi trường giàu dinh dưỡng, tạo điều kiện cho chủng HLD 3.16 phát triển tốt trước khi được đưa vào lên men sinh tổng hợp chất kháng khuẩn. Kết quả cho thấy khi nhân giống trên môi trường ISP 2 chuyển vào lên men lượng chất kháng khuẩn được sinh ra cao nhất tương ứng với vòng vô khuẩn đạt 20,3 (mm) với chủng vi sinh vật kiểm định *B. subtilis* ATCC 6630 (hình 4A), điều này cũng tương tự như nghiên cứu ảnh hưởng một số yếu tố đến khả năng sinh rapamycin của chủng *Streptomyces hygroscopicus* ATCC29253 [14].

3.2.3. Ảnh hưởng của tỉ lệ giống

Trong quá trình lên men của chủng xạ khuẩn HLD3.16, tỉ lệ tiếp giống có ảnh hưởng mạnh đến quá trình sinh trưởng và sinh tổng hợp chất kháng khuẩn. Với lượng giống cấy vào môi trường lên men < 3 %, chủng HLD3.16 sinh trưởng và hoạt tính kháng khuẩn thấp hơn so với khi lên men có lượng giống bổ sung là 4, 5 và 6 (%). Hoạt tính kháng khuẩn thu được cao nhất khi lượng giống tiếp vào là 4 (%) tương ứng với vòng vô khuẩn thu được đối với chủng *B. subtilis* ATCC 6630 là 20,5 (mm) (Hình 4B). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng tương tự như trong nghiên cứu thu nhận rapamycin của chủng *Streptomyces hygroscopicus* ATCC29253[15].



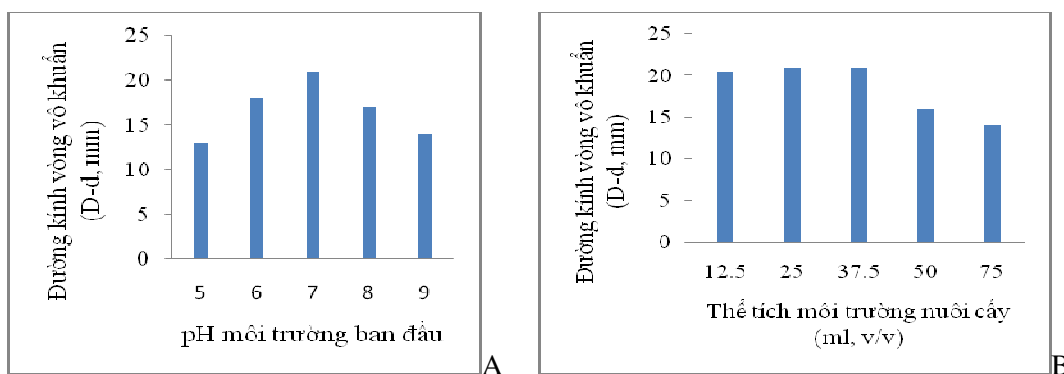
Hình 4. Ảnh hưởng của môi trường nhân giống và tỉ lệ giống đến khả năng sinh chất kháng khuẩn của chủng HLD 3.16.

3.2.4. Ảnh hưởng pH ban đầu đến quá trình lên men

Nghiên cứu ảnh hưởng của pH môi trường ban đầu đến quá trình sinh chất kháng khuẩn được thực hiện trong khoảng pH 5 - 9, khả năng sinh chất kháng khuẩn của chủng HLD 3.16 cao nhất ở pH 7,0 tương ứng với vòng kháng khuẩn đối với chủng *B. subtilis* ATCC 6630 đạt 22,1 (mm) (hình 5A). Khi pH môi trường >7,0 hoạt tính kháng khuẩn giảm dần. Giá trị pH tối ưu cho sinh hoạt chất kháng khuẩn của chủng HLD3.16 thấp hơn giá trị pH cho lên men thu hợp chất kháng khuẩn của chủng *Streptomyces* sp. KGG32 (pH 7,5) [13], và cao hơn khi lên men thu hợp chất kháng khuẩn của chủng *S. rimosus* MY02 (pH 6,0) [16].

3.2.5. Ảnh hưởng của độ thông khí

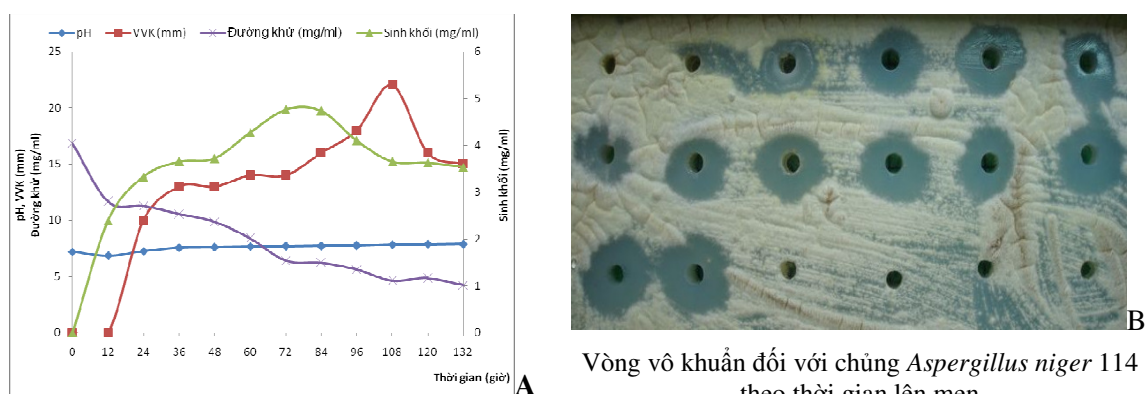
Xạ khuẩn là nhóm vi sinh vật hiếu khí, nồng độ oxy bổ sung trong quá trình lên men sẽ quyết định khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp chất kháng sinh [17]. Khi nuôi chủng HLD 3.16 trên môi trường MT7 thay đổi thể tích môi trường lên men, đã có ảnh hưởng đến sự khuếch tán oxy không khí vào môi trường nuôi, kết quả nhận thấy với lượng môi trường lên men chiếm 10 - 15 % thể tích bình sẽ cho hiệu quả tổng hợp chất kháng khuẩn cao nhất, tương ứng với vòng kháng khuẩn đối với chủng *B. subtilis* ATCC 6630 là 20,5 (mm) (hình 5B). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng tương ứng với nghiên cứu thu nhận rapamycin của chủng *S. hygroscopicus* ATCC29253 [8].



Hình 5. Ảnh hưởng của pH môi trường lên men và độ thông khí đến khả năng sinh chất kháng khuẩn của chủng HLD 3.16.

3.2.6. Biến động của quá trình lên men sinh tổng hợp chất kháng khuẩn của chủng HLD 3.16

Trong quá trình lên men chủng HLD3.16 trên môi trường và điều kiện đã lựa chọn được, chúng tôi đã nghiên cứu biến động các giá trị bao gồm: pH, lượng đường khử, sinh khối và hoạt tính kháng khuẩn. Kết quả cho thấy, hoạt tính kháng sinh thu được lớn nhất ở thời điểm 108 giờ tương ứng với vòng kháng chủng kiểm định *B. subtilis* ATCC6633 là 22,3 (mm) (hình 6A) và chủng *Asp. niger* 114 là 24,1 (mm) (hình 6 B), sinh khối đạt giá trị lớn nhất ở 84 giờ. Hoạt tính kháng khuẩn của chủng HLD 3.16 cao nhất khi lên men trong khoảng thời gian 84 - 108 giờ, phù hợp với một số nghiên cứu cho rằng đây là thời gian thu nhận hợp chất kháng khuẩn từ các chủng *Streptomyces* sp. KGG32 [13].



Hình 6. Biến động các yếu tố trong quá trình lên men sinh tổng hợp chất kháng khuẩn của chủng HLD 3.16 trên môi trường MT7.

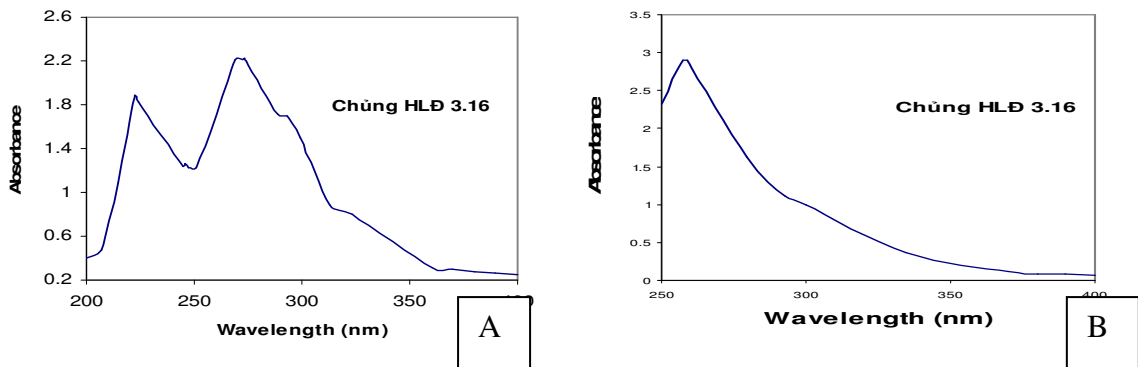
3.3. Đặc điểm chất kháng khuẩn từ dịch lên men chủng HLD 3.16

Tách chiết chất kháng khuẩn từ dịch lên men của chủng HLD 3.16 sử dụng 2 loại dung môi n-butanol và 2- butanon. Kết quả kiểm tra khả năng ức chế các chủng vi sinh vật kiểm định của dịch chiết được trình bày tại bảng 5.

Bảng 5. Hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết chủng HLD 3.16.

Chủng vi sinh vật kiểm định	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)	
	Chiết bằng n-butanol	Chiết bằng 2- Butanol
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	12,0	12,6
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 21778	15,5	15,3
<i>Escherichia coli</i> ATCC 15224	12,1	16,0
<i>Sarcina lutea</i> M5	10,9	15,2
<i>Alcaligenes faecalis</i>	10,7	-
<i>Salmonella typhi</i> IFO14193	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-
<i>Candida albicans</i> ATCC 12031	-	8,3
<i>Aspergillus niger</i> 114	-	14,0

Chất kháng khuẩn từ dịch lên men của chủng HLD316 được chiết tách bằng 2 dung môi và đo quang phổ hấp phụ UV bằng máy quang phổ UV 1601 của hãng Shimadzu (hình 7). Đỉnh hấp phụ tối đa nằm trong khoảng bước sóng 200- 400 nm (220, 260 và 258 nm), cho thấy có một lượng hợp chất kháng khuẩn tự nhiên đã được chiết ra từ dịch lên men. Hợp chất kháng khuẩn được hấp phụ cực đại tại bước sóng 220 và 260 nm khi tách chiết bằng dung môi n-butanol (hình 7 A); khi tách chiết bằng dung môi 2- butanon thì phổ hấp phụ cực đại tại bước sóng 258 nm (hình 7B). Như vậy, trong dịch lên men của chủng *S. autotrophicus* HLD 3.16 có thể chứa 1 hoặc 2 loại hợp chất kháng khuẩn khác nhau (kết quả không được trình bày). Các dữ liệu quang phổ của hợp chất kháng khuẩn thu nhận từ dịch lên men của chủng HLD 3.16 có nhiều đặc điểm tương đồng một số các hợp chất kháng khuẩn được tách chiết từ dịch lên men của các chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. [3, 6, 11].



Hình 7. Phổ hấp phụ UV của chất kháng khuẩn từ dịch lên men của chủng HLD3.16 được tách chiết bằng n- butanol (A) và 2- butanon (B).

4. KẾT LUẬN

Từ các mẫu nước, bùn và đất thu thập ở vùng ven biển Hạ Long – Quảng Ninh đã phân lập và tuyển chọn được chủng xạ khuẩn HLD3.16 có hoạt tính kháng khuẩn cao. Dựa vào khóa phân loại ISP đã xác định chủng HLD 3.16 có nhiều điểm tương đồng với loài *Streptomyces autotrophicus* của Takamiya và Tubaki (1956), dạng chủng aa-1-1; ISP 5011 nhóm A-2, đặt tên là *S. autotrophicus* HLD 3.16. Nghiên cứu một số yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men chất kháng khuẩn, xác định được môi trường lên men thích hợp là (g/l): Tinh bột tan 15; glucose 2,5; pepton 4; (NH₄)₂SO₄ 2,5; CaCO₃ 2, pH 7; môi trường nhân giống là ISP2, tỉ lệ tiếp giống 4 (%), thể tích dịch nuôi cấy/ thể tích bình là 10 %. Chủng HLD 3.16 tích lũy sinh khối cao nhất đạt 4,76 mg/ml ở 84 giờ lên men và chất kháng sinh cao nhất ở 108 giờ (đường kính vòng kháng khuẩn đạt 24 mm với chủng kiểm định *A. niger* 114). Dịch sau lên men được tách chiết bằng n-butanol và 2-butanon cho chất kháng khuẩn có phổ hấp phụ UV lớn nhất tương ứng tại bước sóng 220, 260 và 258 nm.

Lời cảm ơn. Công trình thuộc đề tài "Nghiên cứu tuyển chọn các chất có hoạt tính kháng sinh mới dùng cho mục đích y dược từ vi sinh vật biển Việt Nam" (Cấp Viện KH-CN VN).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Arasu V., Duraipandiyam M. V., Agastian P., Ignacimuthu S. - Antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-26 recovered from Western Ghats of Tamil Nadu, Mycmed. **18** (2008) 147-153.
2. Hong K., Gao A. H., Xie Q. Y., Gao H., ZHuang L., Lin H. P., Yu H. P., Yao X. S., Goodfellow M., Ruan J. S. - Actinomycetes for marine drug discovery soils and plants in China, Marine Drug **7** (2009) 24-44.
3. Selvakumar D., Ashokkumar B., Dhevendaran K. - Isolation of marine *Streptomyces* and the evaluation of its bioactive potential, African. J. Microbiology Research **4** (4) (2010) 240-248.
4. Shirling E. G., Gottlieb D. - Methods for characterization of *Streptomyces* species, Int. J. Syst. Bacteriol. **16** (1966) 313-340.
5. Cornick M. M., McGuire J. M. L. - Vancomycin and method for its preparation, US Patent 622264 (1962).
6. Egorov N. X. - Thực tập vi sinh vật học (Nguyễn Lâm Dũng dịch), Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, 1976.
7. Nonomura H. - Key for classification and identification of 458 species of the *Streptomyces* included in ISP, J. Ferment. Technol. **52** (2) (1974) 78-92.
8. Pridham T. G., Gottlieb D. - The utilization of carbon compounds by some Actinomycetales as an aid for species determination, J. Bacteriol. **56** (1948)107- 114.
9. Williams S. T., Sharpe M. E., Holteds J. G. - Bergey's manual of systematic bacteriology, Williams & Wilkins **4** (1989) 2451-2492.
10. Miller G. L. - Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, Anal. Chem. **31** (1959) 426-428.
11. Nadjwade B. K., Chadrashekhara S., Ali M. S., Prakara S. G., Fakirappa V. M. - Isolation and morphological characterization of antibiotic producing actinomycetes, Tropical J. pharmaceutical research **9** (2010) 231-236.

12. Gao H., Liu M., Liu J., Dai H., Zhou X., Liu X., Zhuo Y., Zhang W., Zhang L. - Medium optimization for the production of avermectin B1a by *Streptomyces avermitilis* 14-12A using response surface methodology, *Bioresour Technol.* **100** (2009) 4012–4016.
13. Mustafa O. - Effects of some environmental conditions on biomass and antimicrobial metabolite production by *Streptomyces* sp. KGG32, *Int. J. Agric. Biol.* **13** (2011) 317–324.
14. Sallam L. A. R., El-Refai A. F., Osman M. E., Hamdy A. A., Ahmed E. M., Mohamed M. A - Some physiological factors affecting rapamycin production by *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 29253, *J. American Science* **6** (2010) 188-194.
15. Hamdy A. A., El-Refai A.F, Sallam L. A. R, Osman M.E, Om Kalthoum H. K., Mohamed M. A. - Seed stage manipulation as a tool for improving rapamycin production by *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 29253, *Australian J. Basic. Appl. Science* **5** (2) (2011) 1-7.
16. Yu J., Liu Q., Liu X., Sun Q., Yan J., Qi X., Fan S. - Effect of liquid culture requirements on antifungal antibiotic production by *Streptomyces rimosus* MY02. *Bioresource Technol.* **99** (2008) 2087–2091.
17. Philips D. H. - Oxygen transfer into mycelial pellets, *Biotechnol. Bioeng.* **8** (1966) 456-460.
18. Parthasarathi S., Kim C. J., Kim P. K., Sathya S., Manikandan M., Manikandan T., Balakrishnan K. - Taxonomic characterization and UV/VIS analysis of antagonistic marine actinomycete isolated from South West Coast of South Korea, *Int. J. Med. Res.* **1** (2) (2010) 99-105.
19. Swaadoun I., Hameed K. M, Moussauui A. - Characterization and analysis of antibiotic activity of some aquatic *Actinomycetes*, *Microbios* **99** (1999)173-179.
20. Sánchez S., Chavez A., Forero A., Huante Y. G., Romero A., Sánchez M., Rocha D., Sánchez B., Avalos M., Trampe S. G., Sanoja R. R., Langley E., Ruiz B. - Carbon source regulation of antibiotic production, *J. Antibiot.* **63** (2010) 442–459.

ABSTRACT

STUDYING ON MARINE ACTINOMYCETE STRAIN HLD 3.16 FROM THE COAST OF VIETNAM FOR PRODUCING ANTIMICROBIAL COMPOUNDS

Nguyen Van Hieu, Nguyen Phuong Nhue, Vu Thi Hanh Nguyen, Phan Thi Hong Thao,
Pham Thanh Huyen, Phi Quyet Tien, Le Gia Hy*

Institute of Biotechnology, VAST

*Email: Legiahy@ibt.ac.vn

The actinomycete strain HLD 3.16 was isolated from marine sediments collected from Ha Long Bay, Quang Ninh and classified into the genus *Streptomyces*. The morphological, biochemical and physiological characters of strain HLD 3.16 conformed to the characteristics of the species *Streptomyces autotrophicus*. Strain HLD 3.16 can produce some enzyme such as amylase, cellulase, protease and exhibited both antibacterial activities against *Bacillus subtilis*

ATCC 6633, *Sarcina lutea* M5, *Bacillus cereus* var. *mycoides* ATCC 11778, *Escherichia coli* ATCC 15224, *Escherichia coli* PA2, *Alcaligenes faecalis*, *Salmonella typhi* IFO14193, *Pseudomonas auroginosa* and antifungal activity against *Candida albicans* ATCC 12031, *Aspergillus niger* 114. For producing high antimicrobial compounds, the strain was grown in medium containing (g/l): soluble starch 15; glucose 2,5; pepton 4; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,5; CaCO_3 2. The favourable conditions for antimicrobial compound production by the strain HLD 3.16 was established as pH of 7.0-7.5, temperature of 30°C, precultured supplement of 4,0% (v/v), volume of medium in shaking flask of 10% (v/v) and harvested time at 108 hours of cultivation. The crude antibiotic extracted from culture broth using n- butanol and 2-butanon were absorbed at wavelengths of 220, 260 nm and 258 nm, respectively.

Keywords: Antimicrobial activity, biological characteristics, marine actinomycetes, *Streptomyces autotrophicus*