

Nghiên cứu hoạt tính kháng *Escherichia coli* sinh enzyme β -lactamase phổ rộng (ESBL) của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. SS473 phân lập từ thực vật

Nguyễn Trung Hiếu¹, Nguyễn Phước Đạt^{1,2}, Nguyễn Thị Ngọc Quyên²,
Trần Lệ Trúc Hà¹, Quan Quốc Đăng³, Nguyễn Hoàng Chương^{4*}

¹Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

²Trung tâm Nghiên cứu và Ứng dụng Sinh học TP Hồ Chí Minh

³Cục Công tác phía Nam, Bộ KH&CN

⁴Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 2/8/2021; ngày chuyển phản biện 4/8/2021; ngày nhận phản biện 31/8/2021; ngày chấp nhận đăng 6/9/2021

Tóm tắt:

E. coli sinh enzyme β -lactamase phổ rộng (ESBL) là vi khuẩn gây bệnh nguy hiểm ở người do khả năng kháng nhiều loại kháng sinh. Đây là vấn đề đặc biệt nghiêm trọng trong bối cảnh số lượng kháng sinh mới được đưa vào sử dụng trong điều trị các bệnh nhiễm trùng do vi khuẩn ngày càng ít. Điều này dẫn tới mối đe dọa về sức khỏe cộng đồng có quy mô toàn cầu và đặt ra nhu cầu cấp thiết phải có các kháng sinh mới trong điều trị bệnh nhiễm khuẩn. Trong nghiên cứu này, các tác giả khảo sát đặc tính kháng khuẩn của một chủng xạ khuẩn phân lập được từ thực vật - chủng xạ khuẩn SS473 phân lập từ cây Xương khỉ (*Clinacanthus nutans*) thể hiện hoạt tính kháng lại các chủng vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL gây bệnh phân lập từ lâm sàng. Ngoài ra, chủng SS473 có phổ kháng khuẩn rộng khi thể hiện hoạt tính kháng khuẩn trên nhiều loại vi khuẩn gây bệnh khác nhau. Môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng đến hoạt tính kháng khuẩn của chủng SS473. Trong thí nghiệm khảo sát tính bền, hoạt tính kháng khuẩn của chủng SS473 vẫn được duy trì đến nhiệt độ 80°C, tuy nhiên hoạt tính này bị mất ở pH 3 và pH 13. Hoạt tính kháng khuẩn của SS473 không bị ảnh hưởng khi bị xử lý bằng tia UV và protease. Dựa trên kết quả phân tích hình thái với môi trường đặc trưng cho nhóm xạ khuẩn và giải trình tự gen 16S rRNA, chủng SS473 được xác định thuộc chi xạ khuẩn *Streptomyces* và được gọi là *Streptomyces* sp. SS473. Kết quả này là tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm xác định hợp chất thứ cấp có hoạt tính kháng khuẩn từ chủng SS473 cũng như nghiên cứu con đường sinh tổng hợp hợp chất có hoạt tính kháng khuẩn.

Từ khóa: *E. coli*, ESBL, kháng khuẩn, SS473, *Streptomyces*.

Chỉ số phân loại: 3.5

Đặt vấn đề

Thời gian gần đây, tỷ lệ vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL (enzyme beta-lactamase phổ rộng) gây bệnh đang tăng lên một cách nhanh chóng ở nhiều nơi trên thế giới, đặc biệt là các nước thuộc khu vực châu Á [1-3]. ESBL là một nhóm enzyme ở vi khuẩn có tác dụng giúp vi khuẩn kháng lại các kháng sinh thuộc nhóm β -lactam gồm cephalosporin và một số dòng kháng sinh khác. Các nghiên cứu tại cộng đồng cũng cho thấy tỷ lệ người khỏe mạnh nhiễm *E. coli* sinh ESBL đang có chiều hướng tăng dần ở hầu hết các châu lục [4]. Ở Việt Nam, một số kết quả nghiên cứu gần đây cho thấy *E. coli* sinh ESBL hiện diện trên bệnh nhân khá cao. Kết quả khảo sát trực khuẩn Gram âm sinh β -lactamase phổ rộng phân lập tại Bệnh viện Đại học Y dược TP Hồ Chí Minh cho thấy tỉ lệ nhiễm vi khuẩn sinh ESBL chiếm 32,4%, trong đó *E. coli* chiếm tỉ lệ cao 71,2% và các chủng vi khuẩn sinh ESBL đề kháng cao với các nhóm kháng sinh aminoglycosides (trừ amikacin) và fluoroquinolones [5]. Một nghiên cứu khác tại bệnh viện Chợ Rẫy cho thấy 174 mẫu phân của bệnh nhân không nhiễm khuẩn tiêu hóa đến khám bệnh có 133 mẫu (76,4%) có vi

khuẩn sinh ESBL và chủ yếu là *E. coli* 65,8% [6].

Xạ khuẩn nổi tiếng với khả năng sinh các chất chuyển hoá thứ cấp có hoạt tính sinh học như kháng vi sinh vật, kháng phân bào, ức chế enzyme, ức chế miễn dịch và các đặc tính sinh học quý khác. Hiện nay, khoảng hai phần ba thuốc kháng sinh đang được sử dụng ở người và động vật có nguồn gốc từ xạ khuẩn, điều này cho thấy tầm ứng dụng rất lớn của xạ khuẩn trong sản xuất các thuốc kháng khuẩn có nguồn gốc vi sinh vật [7]. Xu hướng đề kháng kháng sinh hiện nay đang tạo động lực cho các nhà khoa học nỗ lực tìm kiếm các loại kháng sinh mới hiệu quả hơn trên các chủng vi khuẩn đa kháng thuốc. Điển hình tại Nhật Bản, kháng sinh mới yatakemycin được tách chiết từ *Streptomyces* sp. TP - A0356 cho hiệu quả kháng lại nấm *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* và chống lại các tế bào ung thư với giá trị MIC (nồng độ ức chế tối thiểu) là 0,01-0,3 mg/ml [8]. Tại Hàn Quốc, chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. C684 đã được phân lập và cho thấy khả năng sinh chất kháng sinh laidlomycin, chất này có thể tiêu diệt cả tụ cầu khuẩn kháng methicillin (MRSA) và các cầu khuẩn kháng vancomycin (VRE) [9]. Khi phân lập trên 20 mẫu đất, AI-Hulu và cộng sự cũng phân lập

*Tác giả liên hệ: Email: nhchuong@hcmus.edu.vn

Study of antibacterial activity of *Streptomyces* sp. SS473 isolated from plants against ESBL-producing *Escherichia coli*

Trung Hieu Nguyen¹, Phuoc Dat Nguyen^{1,2}, Thi Ngoc Quyen Nguyen², Le Truc Ha Tran¹, Quoc Dang Quan³, Hoang Chuong Nguyen^{4*}

¹Nguyen Tat Thanh University

²Center for Research and Application in Bioscience, Ho Chi Minh city

³Agency for Southern Affairs of Ministry of Science and Technology

⁴University of Science, Vietnam National University, Ho Chi Minh city

Received 2 August 2021; accepted 6 September 2021

Abstract:

The broad spectrum β -lactamase-producing *E. coli* (ESBL) is a dangerous bacterial pathogen in humans due to its resistance to many antibiotics. This is especially serious in the context of a limited number of new antibiotics for treating bacterial infections. This leads to a global public health threat and places an urgent need for new antibiotics. In this study, the authors investigated the antibacterial properties of an actinomyces strain isolated from the plant *Clinacanthus nutans* against the ESBL-producing *E. coli* strains. These actinomyces strains were designated as SS473. Moreover, SS473 showed a broad spectrum of antibacterial activity on several clinically isolated pathogenic bacteria. Culture media have different effects on the antibacterial activity of SS473. In stability tests, the antibacterial activity of strain SS473 remained at a temperature up to 80°C but was lost at pH 3 and 13. By contrast, the antibacterial activity was not affected by UV and protease treatments. Based on the results of morphological identification with specific media for *Streptomyces* and molecular identification on 16S rRNA gene, strain SS473 was suggested to belong to the *Streptomyces* genus and was named *Streptomyces* sp. SS473. The results in this study will pave the way for the following research on the identification of secondary metabolites having antibacterial activity and their biosynthetic pathways in *Streptomyces* sp. SS473 in the future.

Keywords: antibacterial activity, *E. coli*, ESBL, SS473, *Streptomyces*.

Classification number: 3.5

được chủng *Streptomyces* kháng *E. coli* sinh ESBL mạnh nhất với đường kính vòng kháng khuẩn là từ 12-16 mm [10]. Tại Việt Nam, một nghiên cứu phân lập được chủng *S. autotrophicus* HDL 3.16 từ vùng ven bờ biển Việt nam, chủng này cũng cho thấy tổng hợp được chất có hoạt tính kháng khuẩn cao [11].

Mới đây, các nghiên cứu tập trung phân lập các chủng xạ khuẩn nội sinh trên thực vật, kết quả cho thấy phát hiện được vài chủng xạ khuẩn có khả năng kháng lại các vi khuẩn kháng thuốc. Điển hình như chủng *Streptomyces* sp. SS004 được phân lập từ cây Trinh nữ hoàng cung (*Crinum latifolium*) có khả năng kháng lại cả những vi khuẩn kháng kháng sinh và có thể nuôi cấy [12]. Phân tích hoạt chất từ dịch chiết etyl axetat của chủng *S. cavourensis* YBQ59 phân lập trên cây Quế ở tỉnh Yên Bái thu được các chất 1-monolinolein, bafilomycin D, axit nonactic, daidzein, 3'-hydroxydaidzein. Các chất này thể hiện hoạt tính kháng khuẩn chống lại cả *S. aureus* kháng methicillin ATCC 33591 (MRSA) và *S. epidermidis* ATCC 35984 (MRSE) kháng methicillin. Trong đó, 1-monolinolein, bafilomycin D được đề xuất là chất ức chế cả vi khuẩn kháng thuốc và các dòng tế bào ung thư [13]. Kết quả này cho thấy, nhiều triển vọng phân lập và nuôi cấy được các chủng xạ khuẩn từ thực vật có khả năng kháng lại các chủng vi khuẩn gây bệnh và là tiền đề để nghiên cứu, sản xuất các thuốc kháng sinh kháng lại các chủng vi khuẩn đề kháng kháng sinh.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Chủng xạ khuẩn SS473 được phân lập từ cây Xương khỉ tại Chùa Sam Rong, tỉnh Trà Vinh. Các chủng vi khuẩn gây bệnh gồm *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecium* phân lập từ lâm sàng và được cung cấp bởi Trung tâm Nghiên cứu và Ứng dụng Sinh học TP Hồ Chí Minh. Các hóa chất và thành phần của môi trường sử dụng trong nghiên cứu được cung cấp bởi Xilong (Trung Quốc), Himedia (Ấn Độ), Bioline (Anh). Các primer được cung cấp bởi Phù Sa Biochem (Việt Nam). Các đĩa kháng sinh được cung cấp bởi Công ty Nam khoa Biotek (Việt Nam).

Xác định khả năng sinh ESBL của các chủng *E. coli*

Các chủng *E. coli* trong nghiên cứu này được nuôi cấy trên môi trường Nutrient agar từ 16-18 giờ ở 37°C. Sinh khối được thu nhận và hòa trong nước muối sinh lý (0,9%) ở nồng độ 10⁸ CFU/ml. Sau đó, dịch vi khuẩn được trải trên môi trường MHA. Các khoanh giấy lọc chứa kháng sinh (khoanh kháng sinh) bao gồm cefpodoxime (10 µg), ceftazidime (30 µg), aztreonam (30 µg), cefotaxime (30 µg), ceftriaxone (30 µg) được đặt trên đĩa MHA chứa *E. coli* để thực hiện khảo sát ban đầu sinh ESBL (initial screen test). Để khẳng định kiểu hình sinh ESBL (phenotypic confirmatory test), các khoanh kháng sinh ceftazidime (30 µg), ceftazidime/clavuanic acid (30/10 µg), cefotaxime (30 µg) và cefotaxime/clavuanic acid (30/10 µg) được đặt trên đĩa MHA chứa *E. coli*. Các đĩa MHA được ủ ở 37°C trong 16-18 giờ. Kết quả kháng sinh đồ được ghi nhận bằng cách đo đường kính vòng vô khuẩn xuất hiện quanh các khoanh kháng sinh. Chủng *E. coli* được xác định sinh ESBL khi có vòng vô khuẩn đối với các kháng sinh trong thử nghiệm khảo sát ban đầu cụ thể như

sau: cefpodoxime <17 mm; ceftazidime <22 mm; aztreonam <27 mm; cefotaxime <27 mm; ceftriaxone <25 mm. Chủng *E. coli* được khẳng định khả năng sinh ESBL trong thử nghiệm khẳng định kiểu hình khi vòng vô khuẩn từ khoanh kháng sinh ceftazidime/clavuanic acid lớn hơn vòng vô khuẩn từ khoanh kháng sinh ceftazidime 5 mm và vòng vô khuẩn từ khoanh kháng sinh cefotaxime/clavuanic acid lớn hơn vòng vô khuẩn từ khoanh kháng sinh cefotaxime 5 mm. Các chỉ tiêu xác định khả năng sinh ESBL được thực hiện theo hướng dẫn của CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute - Mỹ) [14].

Xác định phổ kháng khuẩn của chủng SS473

Chủng xạ khuẩn SS473 được nuôi cấy trên môi trường thạch FM3. Sau 5 ngày nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C, các khối thạch với đường kính 8 mm được thu nhận từ đĩa nuôi cấy SS473 và đặt trên các đĩa môi trường MHA đã trải trước các vi khuẩn gây bệnh khác nhau. Các đĩa môi trường MHA được ủ ở 37°C trong 16-18 giờ. Ghi nhận hoạt tính kháng khuẩn của SS473 bằng cách đo đường kính các vòng vô khuẩn trên mặt thạch MHA.

Ảnh hưởng môi trường nuôi cấy đến hoạt tính kháng khuẩn của chủng SS473

Chủng SS473 được nuôi cấy trên các môi trường thạch khác nhau bao gồm FM3, Fermen, PM1, MNGA và A4H. Sau 5 ngày nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C, các khối thạch với đường kính 8 mm từ các môi trường này được thu nhận và đặt trên các đĩa môi trường MHA đã trải trước các vi khuẩn gây bệnh khác nhau. Ủ các đĩa môi trường MHA ở 37°C trong 16-18 giờ. Ghi nhận hoạt tính kháng khuẩn của SS473 bằng cách đo đường kính các vòng vô khuẩn trên mặt thạch MHA.

Khảo sát tính bền của hoạt tính kháng khuẩn từ chủng SS473

Chủng SS473 được nuôi cấy trên môi trường FM3 agar trong 5 ngày ở nhiệt độ 30°C. Sau đó, các môi trường FM3 agar này được vắt bằng vải lọc vô trùng để thu nhận dịch chiết. Dịch chiết môi trường này được sử dụng để khảo sát tính bền trong các điều kiện lý, hóa, sinh học khác nhau. Dịch chiết được xử lý tại các nhiệt độ: nhiệt độ phòng, 60°C, 80°C, 100°C trong 60 phút. Dịch chiết được điều chỉnh pH về giá trị pH 3 và pH 13. Dịch chiết được xử lý với tia UV trong 60 phút. Dịch chiết được xử lý với proteinase K ở nồng độ 1 mg/ml trong 60 phút. Sau đó, các dịch chiết đã xử lý với nhiệt độ, pH, tia UV và protease được khảo sát hoạt tính kháng *E. coli* sinh ESBL bằng phương pháp khuếch tán kháng sinh trên thạch. Ghi nhận hoạt tính kháng khuẩn của các dịch chiết bằng cách đo đường kính các vòng vô khuẩn trên mặt thạch MHA.

Định danh chủng SS473 dựa trên hình thái và sinh học phân tử

Định danh hình thái: chủng SS473 được nuôi cấy trên các môi trường MacConkey, Casein agar, ISP4, ISP5, ISP6, Simmon citrate agar. Sau 5 ngày nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C, tiến hành ghi nhận hình thái khuẩn lạc có đối chiếu với các đặc tính khuẩn lạc của nhóm xạ khuẩn.

Định danh sinh học phân tử: chủng SS473 được nuôi cấy trong môi trường TSB trong 2 ngày. Sau đó, thu sinh khối và tách chiết DNA bộ gen bằng phương pháp phenol/chloroform. Nhân bản vùng

gen 16S rRNA của chủng SS473 với cặp mồi (primer) 27F/1492R và thu nhận sản phẩm PCR. Tiến hành giải trình tự sản phẩm PCR từ gen 16S rRNA của chủng SS473. Sử dụng công cụ 16S-based ID của dịch vụ EZBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net>) để định danh chủng SS473 dựa trên trình tự nucleotide gen 16S rRNA đã giải mã.

Kết quả

Xác định khả năng sinh ESBL của các chủng *E. coli* thu nhận từ lâm sàng

Các chủng vi khuẩn *E. coli* cung cấp bởi Trung tâm Nghiên cứu và Ứng dụng Sinh học được xác định khả năng sinh enzyme β -lactamase phổ rộng (ESBL) bằng phương pháp kháng sinh đồ với các đĩa kháng sinh theo hướng dẫn của CLSI (Mỹ). Theo đó, khả năng sinh ESBL được khảo sát qua hai thử nghiệm: khảo sát ban đầu và khẳng định kiểu hình. Kết quả của thử nghiệm khảo sát ban đầu khả năng sinh ESBL được trình bày ở hình 1.



Hình 1. Kết quả thử nghiệm khảo sát ban đầu khả năng sinh ESBL của các chủng *E. coli*. Ec1, Ec2, Ec3: chủng *E. coli* số 1, 2, 3 trong nghiên cứu. 1: cefpodoxime, 2: cefotaxime, 3: aztreonam, 4: ceftriaxome, 5: ceftazidime.

Kết quả khảo sát ban đầu cho thấy đường kính vòng kháng khuẩn đối với các kháng sinh khảo sát của ba chủng *E. coli* Ec1, Ec2, Ec3 như sau: cefpodoxime <17 mm, cefotaxime <27 mm, aztreonam <27 mm, ceftriaxone <25 mm, ceftazidime <22 mm. Đối chiếu với tiêu chuẩn của CLSI thì cả ba chủng Ec1, Ec2, Ec3 đều có khả năng sinh ESBL. Tiếp theo, thử nghiệm khẳng định kiểu hình sinh tính kháng được tiến hành để khẳng định khả năng sinh ESBL của ba chủng *E. coli*. Kết quả được trình bày ở hình 2.



Hình 2. Kết quả thử nghiệm khẳng định kiểu hình sinh ESBL của các chủng *E. coli*. Ec1, Ec2, Ec3: chủng *E. coli* số 1, 2, 3 trong nghiên cứu. 1: cefotaxime/clavuanic acid, 2: cefotaxime, 3: ceftazidime/clavuanic acid, 4: ceftazidime.

Kết quả khảo sát cho thấy, vòng kháng khuẩn của hỗn hợp hai kháng sinh cefotaxime và clavulanic acid lớn hơn vòng kháng khuẩn của cefotaxime đơn lẻ 5 mm. Tương tự, vòng kháng khuẩn của hỗn hợp hai kháng sinh ceftazidime và clavulanic acid lớn hơn vòng kháng khuẩn của ceftazidime đơn lẻ 5 mm. Đối chiếu với tiêu chuẩn của CLSI thì kết quả này khẳng định ba chủng *E. coli* Ec1, Ec2, Ec3 trong nghiên cứu này sinh ESBL.

Khảo sát hoạt tính kháng E. coli sinh ESBL của chủng xạ khuẩn SS473

Chủng SS473 phân lập từ cây Xương khi có hình thái trên môi trường SFM và có hoạt tính kháng khuẩn kháng các chủng E. coli sinh ESBL ở hình 3.

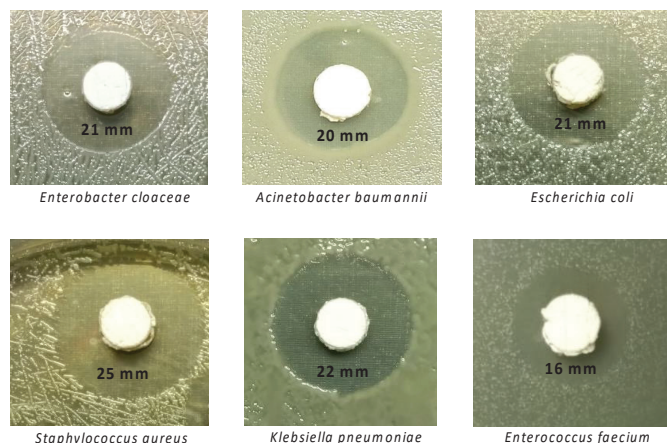


Hình 3. Hình thái và khả năng kháng E. coli sinh ESBL của chủng SS473.

Khi được nuôi cấy trên môi trường sinh chất chuyển hóa thứ cấp là FM3, chủng SS473 thể hiện hoạt tính kháng khuẩn kháng cả ba chủng E. coli sinh ESBL là Ec1, Ec2, Ec3 với đường kính vòng vô khuẩn trung bình là 21,3±0,57 mm.

Khảo sát phổ kháng khuẩn của chủng SS473

Chúng tôi khảo sát phổ kháng khuẩn của chủng SS473 trên một số vi khuẩn gây bệnh phân lập từ mẫu lâm sàng. Chủng SS473 được cấy trên môi trường sinh chất kháng khuẩn là FM3. Kết quả khảo sát phổ kháng khuẩn được trình bày ở hình 4.



Hình 4. Kết quả khảo sát phổ kháng khuẩn của chủng SS473.

Kết quả cho thấy chủng xạ khuẩn SS473 thể hiện hoạt tính kháng nhiều loại vi khuẩn gây bệnh, trong đó vòng vô khuẩn nhỏ nhất là 16 mm đối với E. faecium và lớn nhất là 25 mm đối với S. aureus.

Khảo sát ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy lên hoạt tính kháng khuẩn của SS473

Chúng tôi khảo sát ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy lên hoạt tính kháng khuẩn của chủng SS473. Các môi trường sinh chất kháng khuẩn được khảo sát trong nội dung này bao gồm: FM3, Ferment, PM1, MNGA và A4H. Các vi khuẩn thử nghiệm bao gồm E. cloacae, A. baumannii, S. aureus, E. coli, K. pneumoniae, E. faecium. Số liệu kháng khuẩn trong thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy lên hoạt tính kháng khuẩn của chủng SS473 được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến hoạt tính kháng khuẩn của chủng SS440 và chủng SS473.

Chủng vi khuẩn gây bệnh	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm) của chủng SS473 với các vi khuẩn gây bệnh khi nuôi trên các môi trường khác nhau				
	FM3	Ferment	PM1	MNGA	A4H
E. cloacae	21±0	11,6±0,57	14,3±0,57	13,6±0,57	13,3±0,57
A. baumannii	19,6±0,57	0	12±0	0	0
E. coli sinh ESBL	21±0	0	10,3±0,57	13,3±0,57	12,3±0,57
S. aureus	25,3±0,57	12±0	16±0	15±0	15±0
K. pneumoniae	22±0	12,3±0,57	17±0	16±0	16,6±0,57
E. faecium	16±0	0	0	0	0

Kết quả khảo sát cho thấy môi trường nuôi cấy ảnh hưởng rất khác nhau lên hoạt tính kháng khuẩn của SS473. Chủng SS473 cho hoạt tính kháng khuẩn mạnh trên 6 chủng vi khuẩn khảo sát khi nuôi trên môi trường FM3 (đường kính vòng vô khuẩn từ 16-25 mm). Các môi trường Ferment, PM1, MNGA và A4H kích thích sinh các chất kháng khuẩn khác nhau và yếu hơn so với môi trường FM3.

Khảo sát tính bền của hoạt tính kháng khuẩn từ chủng SS473 đối với nhiệt độ, pH, UV, protease

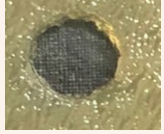
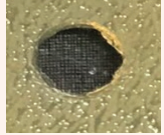
Chúng tôi khảo sát tính bền trong hoạt tính kháng khuẩn của chủng SS473 đối với các tác nhân nhiệt độ, pH, tia UV và protease. Chủng vi khuẩn E. coli Ec1 được sử dụng để thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn trong thí nghiệm này. Kết quả khảo sát tính bền của hoạt tính kháng khuẩn chủng SS473 được trình bày trong các bảng 2-5.

Bảng 2. Kết quả khảo sát tính bền đối với nhiệt độ.

Nhiệt độ xử lý	Hoạt tính kháng khuẩn	Đường kính vòng vô khuẩn	% hoạt tính còn lại
Nhiệt độ phòng (28-29°C)		17,3±0,57 mm	100%
60°C		16,6±0,57 mm	95,9%
80°C		14±0 mm	80,9%
100°C		0 mm	0%

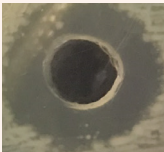
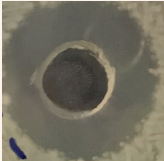
Kết quả khảo sát cho thấy hoạt tính kháng khuẩn giảm khi xử lý ở nhiệt độ 80°C và hoàn toàn mất hoạt tính khi xử lý dịch môi trường ở nhiệt độ 100°C.

Bảng 3. Kết quả khảo sát tính bền đối với pH.

pH xử lý	Hoạt tính kháng khuẩn	Đường kính vòng vô khuẩn	% hoạt tính còn lại
Không xử lý (pH 8,15)		17,3±0,57 mm	100%
pH 3		0 mm	0%
pH 13		0 mm	0%

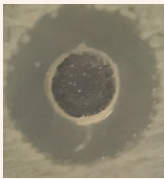

Kết quả khảo sát cho thấy hoạt tính kháng khuẩn của SS473 bị mất khi xử lý ở hai giá trị pH cực đoan là pH 3 và pH 13.

Bảng 4. Kết quả khảo sát tính bền đối với tia UV.

Xử lý UV	Hoạt tính kháng khuẩn	Đường kính vòng vô khuẩn	% hoạt tính còn lại
Không chiếu UV		16,6±0,57 mm	100%
Chiếu UV trong 60 phút		17±0 mm	102,4%

Kết quả khảo sát cho thấy hoạt tính kháng khuẩn của SS473 không bị ảnh hưởng khi xử lý với tia UV trong 60 phút.

Bảng 5. Kết quả khảo sát tính bền đối với protease.

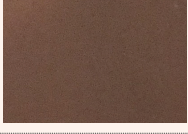





Xử lý protease	Hoạt tính kháng khuẩn	Đường kính vòng vô khuẩn	% hoạt tính còn lại
Dịch nuôi cấy không xử lý protease K		16,6±0,57 mm	100%
Dịch nuôi cấy được xử lý với protease K trong 60 phút ở 37°C		17,6±0,57 mm	106%

Kết quả khảo sát cho thấy, hoạt tính kháng khuẩn của SS473 không bị ảnh hưởng khi xử lý protease trong 60 phút. Kết quả khảo sát tính bền cho thấy, chủng SS473 vẫn giữ được hoạt tính kháng khuẩn đến nhiệt độ 80°C, nhưng bị mất hoạt tính tại hai giá trị pH cực đoan là pH 3 và pH 13. Ngoài ra, hoạt tính kháng khuẩn của chủng SS473 không bị ảnh hưởng bởi tia UV và enzyme protease. Thông tin về tính bền của hoạt tính kháng khuẩn của chủng SS473 là cần thiết để định hướng việc chiết xuất và sử dụng hợp chất kháng khuẩn từ SS473 về sau.

Định danh chủng SSS473 bằng hình thái và phân tử

Kết quả định danh hình thái chủng SS473: để định danh về mặt hình thái chủng SS473, chúng tôi nuôi cấy chủng SS473 trên các môi trường khác nhau bao gồm một số môi trường đặc trưng cho nhóm xạ khuẩn (các môi trường ISP) và quan sát đặc tính vi sinh của chủng SS473 trên các môi trường này. Kết quả định danh về mặt hình thái được trình bày ở bảng 6.

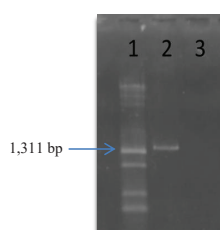
Bảng 6. Kết quả nuôi cấy chủng SS473 trên các môi trường.

STT	Môi trường	Hình ảnh	Mô tả khuẩn lạc
1	MacConkey agar		-Sinh trưởng: -
2	Casein agar		-Sinh trưởng: +++ -Kích thước lớn khoảng 6 mm. -Khuẩn lạc bề mặt bên trong có viền răng cưa, viền ngoài trắng đục. -KTKS: màu trắng đục.
3	ISP4		-Sinh trưởng: +++ -Kích thước lớn khoảng 5 mm. -Khuẩn lạc bề mặt tròn có màu trắng đục. -KTKS: màu vàng nhạt.
4	ISP5		-Sinh trưởng: ++ -Kích thước nhỏ khoảng 2 mm -Khuẩn lạc bề mặt tròn, màu trắng sữa -KTKS: màu vàng nâu
5	ISP6		-Sinh trưởng: +++ -Kích thước lớn khoảng 5 mm. -Khuẩn lạc tròn, bên trong màu trắng, bên ngoài có viền màu trắng đục. -KTKS: màu trắng.
6	Simon citrat agar		-Sinh trưởng: + -Khuẩn lạc nhỏ khoảng 2 mm. -Khuẩn lạc có màu trắng. -KTKS: màu trắng.

Sinh trưởng: “+” kém; “++” tốt; “+++” rất tốt; (-) không mọc; KTKS: khuẩn ty khí sinh.

Kết quả nuôi cấy cho thấy, xạ khuẩn SS473 mọc tốt trên cả 5 môi trường nhưng không mọc được trên môi trường MacConkey do đây là môi trường chọn lọc cho vi khuẩn Gram âm và ức chế vi khuẩn Gram dương. Quan sát hình thái khuẩn lạc chủng SS473 trên các môi trường phân loại ISP cho thấy kích thước khuẩn lạc tương đối nhỏ, màu sắc có thay đổi tùy theo môi trường nuôi cấy, trên các môi trường đều có cấu trúc khuẩn ty cơ chất, sinh bào tử. Vì vậy, chúng tôi bước đầu xác định SS473 có khả năng thuộc nhóm xạ khuẩn và bước tiếp theo chúng tôi sẽ tiến hành định danh phân tử để có kết luận chính xác về chủng SS473.

Kết quả định danh sinh học phân tử của chủng SS473: sau khi thực hiện định danh bằng hình thái, chúng tôi tiến hành định danh về mặt phân tử chủng SS473 dựa trên gen 16S rRNA. Các bước định danh bao gồm tách chiết DNA bộ gen chủng SS473 bằng phương pháp phenol/chloroform, nhân bản trình tự gen 16S rRNA bằng PCR với cặp primer 27F-1495R, giải trình tự sản phẩm PCR và xây dựng cây phát sinh loài để định danh phân tử chủng SS473. Kết quả điện di sản phẩm PCR gen 16S rRNA của chủng SS473 được trình bày ở hình 5.



Hình 5. Kết quả nhân bản gen 16S rRNA của chủng SS473 với cặp primer 27F-1495R. 1: thang DNA; 2: sản phẩm PCR từ chủng SS473; 3: mẫu chứng âm PCR.

Kết quả điện di cho thấy, thu được một sản phẩm có kích thước khoảng 1,5 kb khi so sánh với thang DNA. Không có vạch ký sinh trong sản phẩm PCR. Sản phẩm này được gửi đi giải trình tự nucleotide tại Công ty Macrogen (Hàn Quốc). Kết quả giải trình tự được công bố trên GenBank với mã số truy cập MW181654. Trình tự nucleotide gen 16S rRNA của chủng SS473 được sử dụng để định danh phân tử sử dụng công cụ 16S-based ID của dịch vụ EZBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net>). Kết quả định danh phân tử được trình bày ở hình 6.

EZBioCloud DASHBOARD APPS TOOLS RESOURCES HOW TO CITE ABOUT HELP CENTER SUPPORT LICENSES

List of hits from EzBioCloud 16S database

Tasks	Hit taxon name	Hit strain name	Accession	Similarity	Variation ratio	Hit taxonomy	Completeness (%)
<input type="checkbox"/>	<i>Streptomyces rochei</i>	NRRL 9-2410(T)	MJND0100370	100.00	0/1341	Bacteria;Actinobacteria;Actinomycetales;Streptomyces;Streptomyces;Streptomyces	100.0
<input type="checkbox"/>	<i>Streptomyces enissocaealis</i>	NRRL 9-14395(T)	DQ206641	100.00	0/1341	Bacteria;Actinobacteria;Actinomycetales;Streptomyces;Streptomyces;Streptomyces	100.0
<input type="checkbox"/>	<i>Streptomyces pilosus</i>	NBRC 13071(T)	AB184291	100.00	0/1341	Bacteria;Actinobacteria;Actinomycetales;Streptomyces;Streptomyces;Streptomyces	99.9
<input type="checkbox"/>	<i>Streptomyces geysianus</i>	NBRC 15413(T)	AB184661	99.93	1/1341	Bacteria;Actinobacteria;Actinomycetales;Streptomyces;Streptomyces;Streptomyces	99.9
<input type="checkbox"/>	<i>Streptomyces luteus</i>	TRM 45540(T)	KN209946	99.85	2/1341	Bacteria;Actinobacteria;Actinomycetales;Streptomyces;Streptomyces;Streptomyces	100.0
<input type="checkbox"/>	<i>Streptomyces mutabilis</i>	NBRC 12800(T)	AB184156	99.85	2/1341	Bacteria;Actinobacteria;Actinomycetales;Streptomyces;Streptomyces;Streptomyces	99.6
<input type="checkbox"/>	<i>Streptomyces vinaceodrapus</i>	NRRL 2363(T)	AY99929	99.85	2/1336	Bacteria;Actinobacteria;Actinomycetales;Streptomyces;Streptomyces;Streptomyces	100.0
<input type="checkbox"/>	<i>Streptomyces luteus</i>	NBRC 15417(T)	AB184690	99.48	7/1341	Bacteria;Actinobacteria;Actinomycetales;Streptomyces;Streptomyces;Streptomyces	99.9
<input type="checkbox"/>	<i>Streptomyces djakartensis</i>	NBRC 15409(T)	AB184657	99.48	7/1341	Bacteria;Actinobacteria;Actinomycetales;Streptomyces;Streptomyces;Streptomyces	99.1

Hình 6. Kết quả định danh phân tử dựa trên gen 16S rRNA chủng SS473.

Kết quả định danh bằng phần mềm 16S-based ID cho thấy, chủng SS473 có sự tương đồng rất cao với nhiều loài thuộc chi xạ khuẩn *Streptomyces*. Kết quả định danh phân tử 16S rRNA này chưa đủ để khẳng định chính xác đến mức loài trong hệ thống phân loại nên chúng tôi gọi chủng SS473 là *Streptomyces* sp. SS473.

Bàn luận

Nhu cầu phát hiện các hợp chất tự nhiên có hoạt tính kháng khuẩn đang được quan tâm mạnh mẽ trước tình trạng kháng thuốc của vi khuẩn, đặc biệt là các vi khuẩn gây bệnh ở người. Trong các nguồn cung cấp các hợp chất tự nhiên có hoạt tính kháng khuẩn thì các vi khuẩn thuộc nhóm xạ khuẩn có vai trò quan trọng với hơn 2/3 số kháng sinh được sử dụng trên người và động vật có nguồn gốc từ nhóm vi khuẩn này [15]. Theo truyền thống, các chủng xạ khuẩn có hoạt tính sinh học nói chung và hoạt tính kháng khuẩn nói riêng được phân lập chủ yếu từ đất và nước. Gần đây, các chủng xạ khuẩn phân lập từ thực vật thu hút được sự chú ý vì đây là nguồn phân lập mới và hoạt tính sinh học của thực vật, đặc biệt là các cây thuốc dân gian có thể đến từ các vi sinh vật nội sinh trong cây. Nghiên cứu này cũng nằm trong hướng phân lập các chủng xạ khuẩn nội sinh trong thực vật hướng đến hoạt tính kháng khuẩn kháng *E. coli* sinh ESBL.

Chủng xạ khuẩn SS437 được phân lập từ cây Xương khi có hoạt tính kháng lại các chủng *E. coli* sinh ESBL từ lâm sàng. Ngoài ra, hoạt tính kháng khuẩn của SS473 là đáng chú ý khi có tác dụng ức chế nhiều vi khuẩn gây bệnh thuộc vi khuẩn Gram âm, Gram dương, cầu khuẩn, trực khuẩn. Thực tế, các chủng vi khuẩn gây bệnh được lựa chọn trong nghiên cứu này được Tổ chức Y tế Thế giới liệt vào nhóm các tác nhân gây bệnh nguy hiểm do đặc tính kháng kháng sinh của chúng [16]. Bên cạnh đó, hoạt tính kháng khuẩn của SS473 cũng tương đối bền với các yếu tố lý, hóa, sinh học như nhiệt độ, pH, UV và protease. Hoạt tính này chỉ bị mất ở điều kiện pH axit hoặc kiềm mạnh là pH 3 và pH 13. Hoạt tính kháng khuẩn được duy trì đến nhiệt độ 80°C và không bị ảnh hưởng bởi tia UV và enzyme protease.

Ở xạ khuẩn, các hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học thường do các nhóm gen (gene cluster) chịu trách nhiệm sinh tổng hợp. Các nhóm gen sinh tổng hợp được điều hòa biểu hiện rất khác biệt bởi các yếu tố môi trường, trong đó môi trường và điều kiện nuôi cấy có ảnh hưởng rõ rệt. Trong nghiên cứu này, môi trường FM3 cho thấy khả năng kích thích chủng SS473 sinh hoạt tính kháng khuẩn cao nhất trong số 5 môi trường khảo sát. Môi trường này sẽ được sử dụng cho các nghiên cứu phân lập hợp chất thứ cấp có hoạt tính kháng khuẩn cũng như nghiên cứu con đường sinh tổng hợp và điều hòa sinh tổng hợp hợp chất thứ cấp có hoạt tính kháng khuẩn sau này.

Chủng SS473 cho thấy các đặc điểm hình thái của xạ khuẩn khi được nuôi cấy trên nhiều loại môi trường khác nhau, trong đó có các môi trường nuôi cấy đặc trưng cho nhóm xạ khuẩn (các môi trường ISP). Hơn nữa, kết quả định danh phân tử dựa trên gen 16S rRNA cũng khẳng định SS473 thuộc chi xạ khuẩn *Streptomyces*. Tuy nhiên, để định danh chính xác chủng SS473

đến mức loài thì cần một nghiên cứu tổng hợp (polyphasic taxonomy) bao gồm các bước như định danh hình thái trên các môi trường nuôi cấy khác nhau, xác định khả năng biến dưỡng các cơ chất hữu cơ, phân tích thành phần hóa học của thành tế bào, màng tế bào, giải trình tự và xây dựng cây phát sinh loài trên nhiều gen chỉ thị, chụp hình cấu trúc tế bào dưới kính hiển vi điện tử [17]. Với lý do này, chúng tôi gọi chủng xạ khuẩn SS473 trong nghiên cứu này là *Streptomyces* sp. SS473.

Dựa trên kết quả trong nghiên cứu này về hoạt tính kháng khuẩn của chủng *Streptomyces* sp. SS473, các nghiên cứu khác sẽ được tiến hành tiếp theo nhằm định danh chính xác chủng SS473 đến mức loài, phân lập hợp chất thứ cấp có hoạt tính kháng khuẩn từ SS473, giải trình tự bộ gen và xác định nhóm gen chịu trách nhiệm sinh tổng hợp hợp chất thứ cấp mục tiêu, nghiên cứu con đường sinh tổng hợp và điều hòa sinh tổng hợp của hợp chất thứ cấp mục tiêu. Tất cả những nghiên cứu tiếp theo này tạo tiền đề quan trọng cho việc tổng hợp và ứng dụng hợp chất thứ cấp có hoạt tính kháng khuẩn từ chủng SS473.

KẾT LUẬN

Các kết quả nghiên cứu cho thấy chủng xạ khuẩn SS473 có khả năng kháng lại các chủng vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL cũng như các vi khuẩn gây bệnh khác được phân lập từ mẫu lâm sàng. Chủng SS473 có phổ kháng khuẩn mạnh nhất khi nuôi trên môi trường FM3 so với các môi trường còn lại. Hoạt tính kháng khuẩn của chủng SS473 vẫn được duy trì ở nhiệt độ 80°C, tuy nhiên bị mất hoạt tính ở pH 3 và pH 13. Hoạt tính này không bị ảnh hưởng bởi xử lý với tia UV, cũng như với enzyme protease. Khi nuôi cấy trên các môi trường khác nhau, chủng SS473 thể hiện đầy đủ các đặc điểm hình thái đặc trưng cho xạ khuẩn. Kết quả phân tích trình tự gen 16S rRNA cho thấy chủng SS473 có sự tương đồng rất cao với các loài thuộc chi *Streptomyces*. Dựa trên kết quả định danh hình thái và phân tử, chúng tôi gọi chủng SS473 là *Streptomyces* sp. SS473.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ NTTU trong đề tài mã số 2020.01.102. Chúng tôi cũng xin cảm ơn Trung tâm Nghiên cứu và Ứng dụng Sinh học đã cung cấp các chủng vi khuẩn sử dụng trong nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] O. Tenaillon, D. Skurnik, B. Picard, E. Denamur (2010), "The population genetics of commensal *Escherichia coli*", *Nature Reviews Microbiology*, **8**(3), pp.207-217.

[2] T.A. Russo, J.R. Johnson (2003), "Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem", *Microbes and Infection*, **5**(5), pp.449-456.

[3] F.R. Blattner, G. Plunkett, C.A. Bloch, N.T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J.D. Glasner, C.K. Rode, G.F. Mayhew, J. Gregor, N.W. Davis,

H.A. Kirkpatrick, M.A. Goeden, D.J. Rose, B. Mau, Y. Shao (1997), "The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12", *Science*, **277**(5331), pp.1453-1462.

[4] D. Rawat, D. Nair (2010), "Extended-spectrum β -lactamases in Gram negative bacteria", *Journal of Global Infectious Diseases*, **2**(3), pp.263-274.

[5] S. Dahmena, V. Métayera, E. Gay, J.-Y. Madeca, M. Haennia (2013), "Characterization of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-carrying plasmids and clones of *Enterobacteriaceae* causing cattle mastitis in France", *Veterinary Microbiology*, **162**(2-4), pp.793-799.

[6] C. Ewers, M. Grobbel, A. Bethe, L.H. Wieler, S. Guenther (2011), "Extended-spectrum beta-lactamases-producing Gram-negative bacteria in companion animals: action is clearly warranted", *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, **124**(3/4), pp.94-101.

[7] R. Cantón, A. Novais, A. Valverde, E. Machado, L. Peixe, F. Baquero, T.M. Coque (2008), "Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe", *Clinical Microbiology and Infection*, **14**(1), pp.144-153.

[8] Y. Igarashi, K. Futamata, T. Fujita, A. Sekine, H. Senda, H. Naoki, T. Furumai (2003), "Yatakemycin, a novel antifungal antibiotic produced by *Streptomyces* sp. TP-A0356", *Journal Antibiotics*, **56**(2), pp.107-113.

[9] J.C. Yoo, J.H. Kim, J.W. Ha, N.S. Park, J.K. Sohng, J.W. Lee, S.C. Park, M.S. Kim, C.N. Seong (2007), "Production and biological activity of laidlomycin, anti-MRSA/VRE antibiotic from *Streptomyces* sp. CS684", *Journal of Microbiology*, **45**(1), pp.6-10.

[10] S.M.Kh. Al-Hulu (2015), "Antibacterial activity of *Streptomyces* spp. against extended spectrum beta lactamase bacilli isolated from Urine samples", *Al-Kufa University Journal for Biology*, **7**(1), pp.327-331.

[11] N.V. Hiếu, N.P. Huệ, V.T.H. Nguyên, P.T.H. Thảo, P.T. Huyền, P.Q. Tiên, L.G. Hy (2013), "Nghiên cứu chủng xạ khuẩn HLD 3.16 có hoạt tính kháng khuẩn phân lập từ vùng bờ biển Việt Nam", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, **51**(1), tr.29-41.

[12] T.M. Phụng, L.T.T. Hằng, P.T. Hào, N.T.H. My, N.H. Chương (2017), "Nghiên cứu hoạt tính kháng khuẩn của các chủng xạ khuẩn nội sinh trong cây Trinh nữ hoàng cung (*Crinum latifolium*)", *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ*, **20**(5), tr.69-76.

[13] H.N.T. Vu, D.T. Nguyen, H.Q. Nguyen, H.H. Chu, S.K. Chu, M.V. Chau, Q.T. Phi (2018), "Antimicrobial and cytotoxic properties of bioactive metabolites produced by *Streptomyces cavouensis* YBQ59 isolated from *Cinnamomum cassia* Pries in Yen Bai province of Vietnam", *Current Microbiology*, **75**(3), DOI: 10.1007/s00284-018-1517-x.

[14] F. Cockerill, Clinical (2008), *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Eighteenth Informational Supplement*.

[15] N.H. Chương (2009), *Nghiên cứu sinh tổng hợp và điều hòa sinh tổng hợp kháng sinh spiramycin ở Streptomyces ambofaciens*, Luận án Tiến sĩ, Đại học Paris Sud 11.

[16] E. Tacconelli, et al. (2018), "Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis", *Lancet Infectious Diseases*, **18**(3), pp.318-327.

[17] L. Li, J. Wang, Y.-J. Zhou, H.-W. Lin, Y.-H. Lu (2019), "*Streptomyces reniochaliniae* sp. nov. and *Streptomyces diacarni* sp. nov., from marine sponges", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **69**(1), pp.99-104.