

## ISOLATION AND SELECTION OF ACTINOMYCETES STRAINS CAPABLE OF PRODUCING ANTIBIOTICS FROM A PLANTED LAND IN QUOC OAI DISTRICT, HANOI

Nguyen Thi Ngoc Anh\*, Nguyen Thi Phuong Thao, Nguyen Thanh Chung, Vu Kim Thoa, Ta Thi Thu Thuy  
Ha Noi Open University

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><b>Received:</b> 25/3/2021</p> <p><b>Revised:</b> 29/4/2021</p> <p><b>Published:</b> 29/4/2021</p>	<p>In this study, we isolated and selected actinomycetes strains with antibiotic activity from cultivated soil in Quoc Oai district, to orient the search for new antibiotic compounds. 89 strains of actinomycetes have been isolated, divided into 4 color groups with different ratios: white (36.0%); gray (34.8%); yellow (18.0%) and brown (11.2%). In which, 44 strains inhibited <i>Escherichia coli</i>, 11 inhibited strains of <i>Bacillus subtilis</i> and 9 were resistant to both types of microorganisms tested above. The selection of strain CH8.1 has the strongest antibacterial activity against the two types of microorganisms mentioned above. A survey on ISP2 medium showed that CH8.1 has the best growth at 28°C, neutral pH, NaCl concentration is 4%. A survey on growth on ISP9 medium shows that CH8.1 is capable of using a variety of sugar sources such as: D- glucose, succrose, D-galactose, mantose, D-cellobiose, raffinose. Based on the classification of the International Sterilizer Program (ISP), combined with the 16S rDNA sequence of strain CH8.1 is named <i>Streptomyces manipurencis</i> CH8.1.</p>
<p><b>KEYWORDS</b></p> <p>Actinomycetes</p> <p>Antibiotic</p> <p><i>Escherichia coli</i></p> <p><i>Bacillus subtilis</i></p> <p><i>Streptomyces manipurencis</i></p>	

## PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN CHỦNG XẠ KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG SINH CHẤT KHÁNG SINH TỪ ĐẤT TRỒNG TRỌT TẠI HUYỆN QUỐC OAI, HÀ NỘI

Nguyễn Thị Ngọc Anh\*, Nguyễn Thị Phương Thảo, Nguyễn Thành Chung, Vu Kim Thoa, Tạ Thị Thu Thủy  
Trường Đại học Mở Hà Nội

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
<p><b>Ngày nhận bài:</b> 25/3/2021</p> <p><b>Ngày hoàn thiện:</b> 29/4/2021</p> <p><b>Ngày đăng:</b> 29/4/2021</p>	<p>Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân lập và tuyển chọn một số chủng xạ khuẩn có hoạt tính kháng sinh từ đất trồng trọt ở huyện Quốc Oai, nhằm định hướng cho việc tìm kiếm các chất kháng sinh mới. Nghiên cứu đã phân lập được 89 chủng xạ khuẩn, chia làm 4 nhóm màu với tỷ lệ khác nhau: trắng (36,0%); xám (34,8%); vàng (18,0%) và nâu (11,2%). Trong đó, có 44 chủng ức chế vi khuẩn <i>Escherichia coli</i>, 11 chủng ức chế vi khuẩn <i>Bacillus subtilis</i> và 9 chủng ức chế cả 2 loài vi khuẩn kiểm định trên. Tuyển chọn được chủng CH8.1 có hoạt tính kháng 2 loài vi khuẩn kiểm định mạnh nhất. Khảo sát khả năng sinh trưởng trên môi trường ISP2 cho thấy, chủng CH8.1 có khả năng sinh trưởng tốt nhất ở 28°C, pH trung tính, nồng độ NaCl là 4%. Khảo sát khả năng sinh trưởng trên môi trường ISP9 cho thấy, chủng CH8.1 có khả năng sử dụng đa dạng các nguồn đường như: D- glucose, succrose, D-galactose, mantose, D-cellobiose, raffinose. Căn cứ vào phương pháp của Chương trình xạ khuẩn Quốc tế (ISP), kết hợp với giải trình tự 16S rDNA, chủng CH8.1 được đặt tên là <i>Streptomyces manipurencis</i> CH8.1.</p>
<p><b>TỪ KHÓA</b></p> <p>Xạ khuẩn</p> <p>Chất kháng sinh</p> <p><i>Escherichia coli</i></p> <p><i>Bacillus subtilis</i></p> <p><i>Streptomyces manipurencis</i></p>	

\* Corresponding author. Email: ngocanhcnsh@hou.edu.vn

## 1. Giới thiệu

Nghiên cứu sinh tổng hợp các hoạt chất sinh học, chất kháng sinh từ thực vật, vi sinh vật đang là định hướng quan trọng được nhiều nhóm nghiên cứu trên thế giới quan tâm thực hiện. Trong thực tế, hiệu quả điều trị của nhiều nhóm kháng sinh ngày càng giảm bởi hiện tượng kháng thuốc của vi sinh vật gây bệnh ngày càng tăng [1]. Nhiều công ty dược phẩm lớn, cùng với nhiều nhà khoa học trên thế giới đã đặt mục tiêu nghiên cứu tạo ra kháng sinh mới hiệu quả hơn, ít bị kháng thuốc bởi vi sinh vật, chủ yếu có nguồn gốc từ xạ khuẩn [2].

Xạ khuẩn có đóng góp quan trọng với phát triển và sản xuất kháng sinh, bởi vì một số lượng lớn các loại thuốc kháng sinh đang được sử dụng hiện nay như erythromycin, streptomycin, rifamycin và gentamycin, đều là các sản phẩm được phân lập từ xạ khuẩn đất [3]. Trong đó, các chất kháng sinh được tổng hợp từ *Streptomyces* chiếm khoảng 80% tổng sản phẩm kháng sinh [4]

Mặt khác, xạ khuẩn phân bố chủ yếu trong đất. Số lượng xạ khuẩn trong đất không chỉ phụ thuộc vào loại đất mà còn phụ thuộc mức độ canh tác của đất và khả năng bao phủ của thực vật. Đất giàu chất dinh dưỡng hữu cơ, khoáng và lớp đất trên bề mặt thường gặp số lượng xạ khuẩn lớn. Sự phân bố xạ khuẩn còn phụ thuộc nhiều vào độ pH môi trường, chúng có nhiều trong các lớp đất trung tính và kiềm yếu hoặc axit yếu [5]. Đất trồng trọt tại huyện Quốc Oai có lớp bề mặt tối xốp, độ pH trung tính từ 6 – 7,5, đất màu mỡ, có độ che phủ của thực vật tương đối cao, rất thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của xạ khuẩn. Hiện nay, vẫn chưa có công trình nào nghiên cứu về xạ khuẩn tại khu vực này. Bài báo này nghiên cứu phân lập và tuyển chọn chủng xạ khuẩn có khả năng sinh kháng sinh từ đất trồng trọt tại huyện Quốc Oai, Hà Nội.

## 2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng 6 mẫu đất từ các xã Nghĩa Hương, Đồng Quan, Ngọc Liệp, Thạch Thán, Ngọc Mỹ, Cấn Hữu tại huyện Quốc Oai, Hà Nội. Các mẫu thu được tại tầng mặt tại các vị trí khác nhau với các đặc điểm sinh thái khác nhau, được đánh giá là đặc thù bởi khu hệ thực vật đặc trưng bao gồm đất trồng hoa màu, đất trồng cây dược liệu, đất lâu ngày không canh tác.

Các chủng vi khuẩn được sử dụng để thử hoạt tính sinh học gồm *Escherichia coli* JM109, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* được nhận từ bộ sưu tập giống vi sinh vật của Phòng thí nghiệm Sinh học phân tử, Khoa Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Mở Hà Nội.

Các môi trường được dùng để phân lập và nghiên cứu hình thái xạ khuẩn bao gồm: Gause I (g/l):  $K_2HPO_4$  0,5;  $MgSO_4$  0,5;  $KNO_3$  1; NaCl 0,5;  $FeSO_4$  0,01; tinh bột tan 20; agar 20. SAPEC – tinh bột tan (g/l): sucrose 30;  $KH_2PO_4$  1;  $NaNO_3$  2; KCl 0,5;  $MgSO_4$  0,5;  $FeSO_4$  0,01; tinh bột tan 10; agar 20. ISP1 (g/l): Tryptone 5; cao nấm men 3; agar 20; pH = 7. ISP2 (g/l): Cao nấm men 4; dịch chiết malt 10; glucose 4; agar 20; pH = 7,3. ISP3 (g/l): Bột yến mạch 20; agar 20; dung dịch muối vi lượng 1,0 ml; pH = 7. ISP4 (g/l): Tinh bột tan 10;  $K_2HPO_4$  1;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1; NaCl 1;  $(NH_4)_2SO_4$  2;  $CaCO_3$  2; dung dịch muối vi lượng 1,0 ml; agar 20; pH = 7,5. ISP5 (g/l): L-asparagine 1; glycerin 10;  $K_2HPO_4$ ; dung dịch muối vi lượng 1,0 ml; agar 20; pH = 7,0. ISP6 (g/l): Petone 10; cao nấm men 1; sắt amoni xitrat 0,5; agar 20; pH = 7,0. ISP7 (g/l): Glycerine 15; L-tyrosine 0,5; L-asparagine 1;  $K_2HPO_4$  0,5;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,5; NaCl 0,5;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0,01; dung dịch muối vi lượng 1,0 ml; agar 20; pH = 7,0. R2YE (g/l): Sucrose 10,3;  $K_2SO_4$  0,025;  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  1,012; glucose 1,0; cao nấm men 0,5; dung dịch khoáng:  $KH_2PO_4$  1,0 ml; TES 10,0 ml;  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  8,0 ml; dung dịch muối vi lượng 0,2 ml; L-proline 1,5 ml; NaOH 0,5 ml trong 100 ml nước cất và chuẩn pH 7,2. NDYE (g/l): Cao nấm men 0,5;  $NaNO_3$  0,428; maltose 1,5; glucose 2,5; HEPES 0,477;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,012;  $K_2PO_4$  0,023; dung dịch khoáng: dung dịch muối vi lượng 200  $\mu$ l; NaOH 1,0 ml trong 100 ml nước cất.

Môi trường nuôi cấy vi sinh vật kiểm định là môi trường LB (g/l): Tryptone 1; cao nấm men 0,5; NaCl 1; agar 10.

## 2.2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.2.1. Phân lập xạ khuẩn

Mẫu đất được mang về phòng thí nghiệm, tiến hành phơi khô 7 ngày trong điều kiện tự nhiên. Sau đó, nhặt bỏ sỏi, đá, các xác hữu cơ và đem mẫu nghiền trong cối thủy tinh rồi tiến hành sàng qua rây có đường kính 2 mm. Mẫu đất nghiền xong được đựng trong các túi nhựa PE kín và bảo quản trong tủ đông  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Phân lập theo phương pháp của Vinogradkii (1952): pha loãng mẫu đất đến  $10^{-3}$ , dùng pipet hút 0,1 ml dung dịch huyền phù pha loãng  $10^{-3}$  nhỏ lên bề mặt của môi trường thạch trên đĩa petri có môi trường phân lập đặc hiệu (Guase I, SAPEC- tinh bột tan, ISP-2, ISP4), sau đó dùng que trang dàn đều giọt dịch trên bề mặt môi trường thạch, sau đó nuôi cấy xạ khuẩn ở nhiệt độ  $28 - 30^{\circ}\text{C}$ , từ 7-14 ngày rồi tiến hành quan sát và phân loại khuẩn lạc xạ khuẩn với khuẩn lạc các loại vi sinh vật khác [6].

### 2.2.2. Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của các chủng xạ khuẩn phân lập

Sàng lọc xạ khuẩn sinh kháng sinh bằng phương pháp cấy chấm điểm (Crawford, 1993): Dùng que cấy vô trùng cấy từng khuẩn lạc đã tinh sạch lên đĩa thạch LB 1% agar đã được cấy vi khuẩn kiểm định. Các đĩa này được nuôi ở  $28^{\circ}\text{C}$  trong 48h sau đó đọc kết quả dựa vào đường kính vòng vô khuẩn.

Sử dụng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch theo Dhanasekaran và dtg (2012) để khảo sát khả năng kháng khuẩn: Xạ khuẩn được nuôi cấy trên môi trường ISP2 lỏng, nuôi lắc 150 vòng/phút, ở  $28^{\circ}\text{C}$ . Dịch xạ khuẩn được thu sau 5 ngày nuôi cấy sẽ được đưa vào lỗ thạch trên đĩa petri chứa môi trường LB 1% agar đã được phủ vi sinh vật kiểm định. Dịch xạ khuẩn có khả năng ức chế vi sinh vật kiểm định được thể hiện qua vòng sáng xuất hiện quanh giếng thạch sau 18 - 24 giờ.

### 2.2.3. Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học của chủng xạ khuẩn đã tuyển chọn

Đặc điểm hình thái: Được xác định dựa trên các đặc điểm nuôi cấy bao gồm: màu sắc của khuẩn ty khí sinh (KTKS), màu sắc của khuẩn ty cơ chất (KTCC), khả năng hình thành sắc tố tan [7] và sự hình thành sắc tố melanin. Chuỗi bào tử và bề mặt bào tử được nhuộm Gram và quan sát dưới kính hiển vi điện tử sau 7 - 14 ngày nuôi cấy [8], [9].

Đặc điểm sinh hóa: Quan sát khả năng đồng hóa nguồn cacbon và nitơ của xạ khuẩn trên môi trường ISP9 (g/l:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2,64;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2,38;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  5,65;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,0; dung dịch B 1,0 ml; agar 20; pH = 7,0) có bổ sung 1,0% các nguồn cacbon và 0,1% nguồn nitơ tương ứng [8], [9].

Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến khả năng sinh trưởng của xạ khuẩn, lần lượt với các yếu tố: nhiệt độ (20; 24; 28; 32; 36;  $40^{\circ}\text{C}$ ), pH ban đầu (5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0; 10) và các nồng độ NaCl (từ 1 - 10%) trên môi trường ISP2 [9].

### 2.2.4. Phân loại dựa trên phân tích trình tự gen 16S rDNA

Xạ khuẩn nuôi cấy trên môi trường R2YE lỏng, sau 72 giờ tiến hành ly tâm ở 4000 vòng/phút ở  $4^{\circ}\text{C}$  trong 10 phút để thu tế bào. DNA tổng số của xạ khuẩn được tách theo phương pháp của Sambrook và Rusell (2001) [10] và gen 16S rDNA được khuếch đại nhờ phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu 27F 5'- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG - 3' và 1492R 5'- TACGGYTACCTTGTTACGACTT - 3' (Genset). Phản ứng được thực hiện với chu trình nhiệt là:  $94^{\circ}\text{C}$ : 5 phút, 25 chu kỳ ( $94^{\circ}\text{C}$ : 30s,  $55^{\circ}\text{C}$ : 30s,  $72^{\circ}\text{C}$ : 60s),  $72^{\circ}\text{C}$ : 10 phút. Sản phẩm của phản ứng sẽ được kiểm tra bằng chạy điện di trên gel agarose 1%. Kích thước đoạn DNA thu được sau khi khuếch đại được so sánh trên thang DNA chuẩn (1Kb Plus DNA ladder Marker). Sản phẩm PCR được tinh sạch và được gửi đi giải trình tự tại Apical Scientific Sequencing, Malaysia. So sánh trình tự gen tương ứng trên cơ sở dữ liệu Genbank nhờ công cụ BLAST

([www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)). Mức độ tương đồng di truyền của các chủng được xây dựng dựa trên phần mềm Bioedit và MegaX.

### 2.2.5. Xác định hoạt tính kháng sinh

Chủng xạ khuẩn được tuyển chọn nuôi trên môi trường R2YE lỏng ở điều kiện 28°C, tốc độ lắc 150 vòng/phút, trong 4 ngày sau đó ly tâm ở 4000 vòng/phút, trong 10 phút để thu dịch lên men. Dịch lên men được lắc đều với dung môi hữu cơ ethyl acetate với tỷ lệ 1:1 trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng, sau đó thu kháng sinh tan trong ethyl acetate và quay cô thu nhận kháng sinh thô. Nhỏ kháng sinh thô vào mảnh giấy lọc và thử hoạt tính với các vi khuẩn kiểm định. Sau 18 giờ kiểm tra vòng kháng khuẩn.

## 3. Kết quả và thảo luận

### 3.1. Phân lập và tuyển chọn các chủng xạ khuẩn

Từ các mẫu đất phân lập từ các xã tại huyện Quốc Oai, nhóm nghiên cứu đã tiến hành phân lập trên các môi trường đặc hiệu thu được 89 chủng xạ khuẩn với các đặc điểm hình thái và màu sắc khuẩn lạc khác nhau. Các chủng sau khi phân lập, bước đầu được phân nhóm dựa vào màu sắc của hệ sợi khí sinh được xác định dựa trên bảng màu của Tresner và Buckus, chia các chủng xạ khuẩn thành 8 nhóm màu khác nhau [8], [11]. Trong số 89 chủng xạ khuẩn phân lập được có 4 nhóm màu xuất hiện với số lượng và tỷ lệ khác nhau: nhóm 1: KTKS có màu trắng, có 32 chủng (36,0%); nhóm 2: KTKS màu xám, có 31 chủng (34,8%); Nhóm 3: KTKS màu vàng, có 16 chủng (18,0%); Nhóm 4: KTKS màu nâu, có 10 chủng (11,2%).

### 3.2. Khảo sát khả năng kháng vi khuẩn kiểm định từ các chủng xạ khuẩn phân lập

Sau khi phân lập và làm thuần 89 chủng xạ khuẩn, để tuyển chọn các chủng xạ khuẩn có khả năng sinh tổng hợp chất kháng khuẩn, nhóm nghiên cứu tiến hành kiểm tra hoạt tính kháng khuẩn của các chủng xạ khuẩn bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch (Hình 1). Kết quả có 46/89 chủng sinh kháng sinh ở các mức độ khác nhau, được kí hiệu theo quy ước: 2 chữ cái đầu là viết tắt tên xã (NH: Nghĩa Hương, DQ: Đồng Quang, CH: Cán Hữu, NM: Ngọc Mỹ, NL: Ngọc Liệp, TT: Thạch Thán), các số là thứ tự chủng phân lập được. Trong đó, có 44 chủng kháng vi khuẩn Gram (+), 11 chủng kháng vi khuẩn Gram (-). 9 chủng CH 8.1, CH 8.4, CH 8.7, CH 9.4, CH 9.5, CH 9.7, NM 3.2, TT 8.2, TT 8.4 có hoạt tính kháng cả hai loại VSV Gram (+) và Gram (-) được chọn để thực hiện các bước tiếp theo (Bảng 1).

**Bảng 1.** Khả năng kháng vi khuẩn kiểm định của các chủng xạ khuẩn đã phân lập

STT	Chủng xạ khuẩn	Đường kính vòng kháng khuẩn (D-d, mm)		STT	Chủng xạ khuẩn	Đường kính vòng kháng khuẩn (D-d, mm)	
		<i>B. subtilis</i> (G+)	<i>E. coli</i> (G-)			<i>B. subtilis</i> (G+)	<i>E. coli</i> (G-)
1	NH 1.1	3	-	24	CH 9.8	21	-
2	DQ 2.1	10	-	25	CH 9.9	2	-
3	DQ 2.2	4	-	26	NM 1.1	10	-
4	DQ 2.3	3	-	27	NM 1.2	12	-
5	DQ 2.4	9	-	28	NM 2.1	12	-
6	DQ 3.1	20	-	29	NM 3.1	13	-
7	DQ 3.2	25	-	<b>30</b>	<b>NM 3.2</b>	<b>8</b>	<b>8</b>
<b>8</b>	<b>CH 8.1</b>	<b>31</b>	<b>27</b>	31	NM 3.3	8	-
9	CH 8.2	5	-	32	NM 3.4	6	-
10	CH 8.3	21	-	33	NM 3.5	9	-
<b>11</b>	<b>CH 8.4</b>	<b>10</b>	<b>9</b>	34	NM 3.6	16	-
12	CH 8.5	20	-	35	NL 4.1	14	-
13	CH 8.6	10	-	36	NL 4.2	15	-
<b>14</b>	<b>CH 8.7</b>	<b>7</b>	<b>4</b>	37	TT 7.1	2	-
15	CH 8.8	9	-	38	TT 7.2	1	-

STT	Chủng xạ khuẩn	Đường kính vòng kháng khuẩn (D-d, mm)		STT	Chủng xạ khuẩn	Đường kính vòng kháng khuẩn (D-d, mm)	
		<i>B. subtilis</i> (G+)	<i>E. coli</i> (G-)			<i>B. subtilis</i> (G+)	<i>E. coli</i> (G-)
16	CH 8.9	-	15	39	TT 8.1	9	-
17	CH 9.1	7	-	40	TT 8.2	24	20
18	CH 9.2	-	5	41	TT 8.3	12	-
19	CH 9.3	35	-	42	TT 8.4	22	18
20	CH 9.4	20	15	43	TT 8.5	13	-
21	CH 9.5	13	5	44	TT 8.6	9	-
22	CH 9.6	26	-	45	TT 9.1	5	-
23	CH 9.7	12	5	46	TT 9.2	10	-

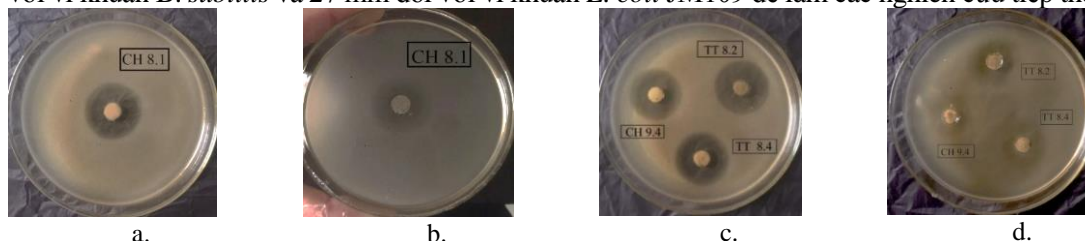
Các chủng xạ khuẩn phân lập có khả năng sinh tổng hợp chất kháng khuẩn thu được từ mẫu đất tại các xã khác nhau cũng có tỷ lệ khác nhau được biểu thị ở bảng 2.

**Bảng 2.** Số lượng các chủng xạ khuẩn có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất kháng khuẩn ở các địa điểm lấy mẫu

Địa điểm	Đặc điểm nơi lấy mẫu				Số chủng	Tỷ lệ (%)	Số lượng 10 <sup>3</sup> CFU/1g
	Loại đất	Độ ẩm	pH	Thảm thực vật			
Cán Hữu	Đất cát pha	50%	6,5-7,0	Trồng rau, cây dược liệu	19	41,3	150
Ngọc Mỹ	Đất sét pha cát	60%	6,0	Trồng rau	10	21,7	97
Thạch Thán	Đất cát pha	50%	6,5-7,0	Trồng rau, cây dược liệu	9	19,6	115
Đồng Quang	Đất sét pha cát	65%	6,0	Trồng lúa	5	10,9	80
Ngọc Liệp	Đất thịt	45%	7,0	Trồng lúa	2	4,3	45
Nghĩa Hương	Đất thịt	45%	7,5	Bỏ hoang	1	2,2	40

Như vậy, các mẫu đất thu được từ các xã Cán Hữu, Ngọc Mỹ, Thạch Thán là đất trồng rau, trồng cây dược liệu, nhiều dinh dưỡng, độ ẩm phù hợp, độ pH trung tính nên có số lượng xạ khuẩn có khả năng kháng khuẩn là nhiều nhất (82,6%). Còn mẫu đất thu được từ 2 xã Đồng Quang và Ngọc Liệp cho số lượng xạ khuẩn có khả năng kháng khuẩn là thấp hơn (15,2%). Số lượng xạ khuẩn phân lập từ xã Nghĩa Hương là thấp nhất (1 chủng chiếm 2,2%) có thể do mẫu đất thu được từ đất bỏ hoang, ít chất dinh dưỡng, độ pH không thích hợp, độ ẩm thấp nên xạ khuẩn phát triển ít. Kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu trước đó về sự phân bố của xạ khuẩn trong môi trường đất [5]. Mặt khác, trong 46 chủng đã phân lập có khả năng kháng khuẩn có 9 chủng có khả năng kháng cả 2 loại vi sinh vật kiểm định đều được phân lập từ mẫu đất trồng cây dược liệu (Bảng 1). Điều này bước đầu chứng tỏ mối quan hệ giữa thảm thực vật đến sự phân bố của xạ khuẩn.

Chọn lọc chủng CH 8.1 có khả năng kháng cả 2 loại vi sinh vật kiểm định mạnh nhất là 31 mm đối với vi khuẩn *B. subtilis* và 27 mm đối với vi khuẩn *E. coli* JM109 để làm các nghiên cứu tiếp theo.



**Hình 1.** Hoạt tính kháng khuẩn của một số chủng đã phân lập  
a,c. Với *B. subtilis*; b,d. Với *E. coli* JM109

### 3.3. Một số đặc điểm sinh học của các chủng xạ khuẩn tuyển chọn

#### 3.3.1. Đặc điểm hình thái

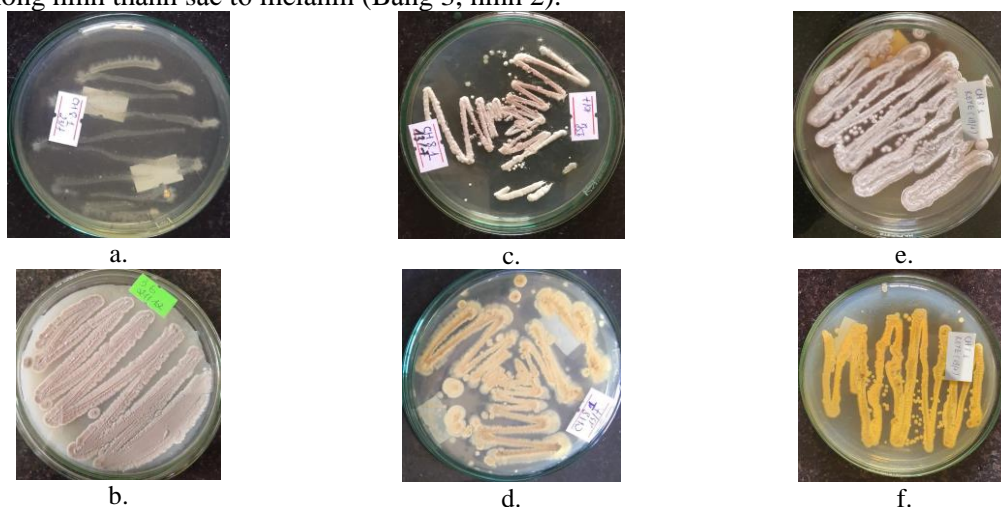
Màu sắc của một số chủng xạ khuẩn khi nuôi cấy trên môi trường ISP thường khác nhau, đây là yếu tố đầu tiên để phân loại xạ khuẩn theo khóa định tên loài xạ khuẩn ISP Nonomura [12] và

khóa phân loại của Bergey [9]. Khuẩn ty khí sinh và khuẩn ty cơ chất của chủng xạ khuẩn CH8.1 được so sánh với bảng màu của Tresner và Backus [11], cùng với khả năng hình thành sắc tố tan và sự hình thành sắc tố melanin cũng là một trong những yếu tố phân loại xạ khuẩn.

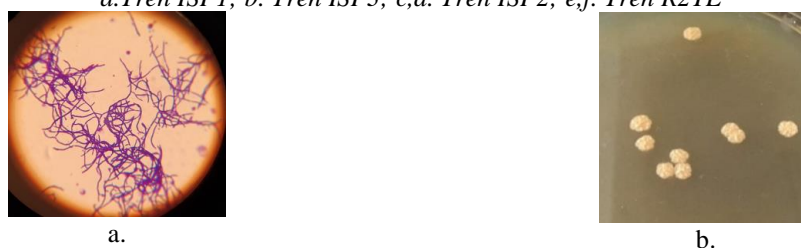
**Bảng 3.** Đặc điểm hình thái xạ khuẩn CH8.1 trên các môi trường nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy	Màu sắc khuẩn ty		Sắc tố	
	KTKS	KTCC	Sắc tố tan	Sắc tố melanin
ISP1	Trắng	Vàng nhạt	Vàng nhạt	-
ISP2	Xám	Vàng	Vàng nhạt	-
ISP3	Xám	Trắng	-	-
ISP4	Xám	Vàng	Vàng nhạt	-
ISP5	Xám	Vàng	-	-
ISP6	Xám	Vàng	-	-
R2YE	Xám	Vàng đậm	Vàng nhạt	-
NDYE	Xám	Vàng đậm	Vàng nhạt	-

Như vậy chủng xạ khuẩn CH8.1 đều phát triển tốt trên các môi trường ISP1 đến ISP6 và môi trường R2YE và NDYE. Trên các môi trường ISP, thời gian hình thành bào tử của chủng xạ khuẩn CH8.1 trung bình là 4 đến 5 ngày; còn trên môi trường R2YE và NDYE, chủng xạ khuẩn này có thời gian sinh bào tử dài hơn là 7 ngày. Trên môi trường ISP2, ISP3, ISP4, ISP5, ISP6, R2YE và NDYE, khuẩn ty khí sinh của chủng xạ khuẩn CH8.1 có màu xám, màu trắng trên môi trường ISP1. Chủng CH8.1 có khuẩn ty cơ chất có màu vàng đến vàng sậm trên tất cả các môi trường thử nghiệm. Chúng hình thành sắc tố tan trên môi trường ISP1, ISP2, ISP4, R2YE, NDYE và không hình thành sắc tố melanin (Bảng 3, hình 2).



**Hình 2.** Màu sắc KTKS và KTCC của chủng xạ khuẩn CH8.1 trên một số môi trường nuôi cấy  
a. Trên ISP1; b. Trên ISP3; c, d. Trên ISP2; e, f. Trên R2YE



**Hình 3.** Đặc điểm hình thái của chủng xạ khuẩn CH8.1 trên môi trường ISP2.

a. Khuẩn ty xạ khuẩn quan sát dưới kính hiển vi 1000X; b. Khuẩn lạc xạ khuẩn sau 4 ngày nuôi cấy

Chủng xạ khuẩn CH8.1 sau 7 ngày nuôi cấy trên môi trường ISP2 lỏng, nhuộm Gram và quan sát dưới kính hiển vi điện tử với độ phóng đại 1000X, cho thấy khuẩn ty dài, không đứt đoạn, từ sợi chính phân ra rất nhiều sợi nhánh, sợi mang bào tử hơi cong (RF) và bắt màu tím với thuốc nhuộm Gram (Hình 3). Chủng CH8.1 sau khi pha loãng  $10^{-3}$  và cấy trên môi trường ISP2 sau 4 ngày nuôi cấy cho khuẩn kích thước khoảng 2 - 4 mm, có màu vàng nhạt, bề mặt lồi, có rãnh thẳng.

### 3.3.2. Đặc điểm sinh lý, sinh hóa

Khả năng đồng hóa các nguồn cacbon và nitơ khác nhau là một trong những đặc điểm sinh lý, sinh hóa quan trọng của xạ khuẩn theo Nomomura trong ISP (1974) [12]. Nuôi cấy chủng xạ khuẩn CH8.1 trên môi trường ISP9 có bổ sung nguồn đường và nguồn nitơ khác nhau. Kết quả cho thấy, chủng CH8.1 có khả năng đồng hóa đa dạng các nguồn đường khác nhau, đặc biệt là khả năng đồng hóa cao nhất với glucose, maltose, galactose; đồng hóa kém hơn với succrose, raffinose, cellulose; đồng hóa kém hoặc không đồng hóa được lactose, mannitol, xylose; không có khả năng sinh trưởng trên môi trường không cung cấp nguồn cacbon (Bảng 4). Chủng CH8.1 có khả năng sử dụng đa số nguồn nitơ đã kiểm nghiệm như: L-asparagine, L-tyrosine, glycerine, tryptone, peptone,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  và  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (Bảng 4); không sinh trưởng được nếu môi trường không cung cấp nguồn nitơ.

Quá trình sinh trưởng, phát triển và trao đổi chất của vi sinh vật chịu ảnh hưởng mạnh mẽ của các yếu tố môi trường. Chủng xạ khuẩn CH8.1 được nuôi cấy trên môi trường ISP2 với các điều kiện nhiệt độ, pH và nồng độ NaCl khác nhau. Kết quả cho thấy, chủng xạ khuẩn này sinh trưởng trong điều kiện nhiệt độ từ 26 - 36°C và tốt nhất ở 28°C; pH từ 6-10 và tốt nhất ở pH = 7,5; nồng độ NaCl từ 1 - 5% và tốt nhất ở 4%. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với Sirisha và cộng sự (2013) [13] rằng đa số các chủng xạ khuẩn chỉ sinh trưởng được trong môi trường có nồng độ muối dưới 10%.

**Bảng 4.** Khả năng đồng hóa nguồn cacbon và nitơ của các chủng xạ khuẩn CH8.1

Nguồn cacbon (1,0%, w/v)	Khả năng sinh trưởng	Nguồn nitơ (1,0%, w/v)	Khả năng sinh trưởng
D- Glucose	+	L- asparagin	+
Succrose	+	L- tyrosin	+
Mantose	+	Glycerin	+
Lactose	+/-	Tryptone	+
D- mannitol	+/-	Peptone	+
D- galactose	+	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	+
D- xylose	+/-	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	+
D- cellobiose	+		
Raffinose	+		
Không có carbon	-	Không có nitrogen	-
Nhiệt độ thích hợp	28°C		
pH thích hợp	7,5		
Nồng độ NaCl thích hợp	4%		

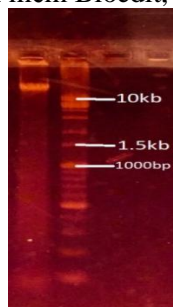
Ghi chú: (+): có khả năng; (-) không có khả năng; (+/-): có thể hoặc không.

### 3.4. Xác định trình tự gen mã hóa 16S rDNA của chủng xạ khuẩn CH8.1

Chủng xạ khuẩn CH8.1 sau khi nuôi cấy 96 giờ trong môi trường R2YE được đem ly tâm thu tế bào. Tế bào xạ khuẩn được dùng để tách DNA tổng số theo phương pháp của Sambrook và Rusell [10]. DNA tổng số của xạ khuẩn được hòa tan trong nước deion và chạy điện di kiểm tra trên gel agarose 1% cho kết quả với băng DNA đậm trên đường chạy có kích thước trên 10 kb (Hình 4).

Dùng DNA tổng số của xạ khuẩn để làm khuôn cho phản ứng PCR đoạn gen 16S rDNA với cặp mồi đặc hiệu. Sản phẩm PCR được chạy điện di kiểm tra cho kết quả 1 băng DNA duy nhất có kích thước tương ứng khoảng 1,4 kb tương ứng với kết quả mong muốn khi thiết kế mồi (Hình

5). Tinh sạch đoạn 16S rDNA này sau đó gửi đi giải trình tự và sắp xếp trình tự nucleotide của gen này trên phần mềm Bioedit, cho kết quả như hình 5.



Hình 4. Điện di sản phẩm DNA tổng số của chủng xạ khuẩn CH8.1

Hình 5. Điện di sản phẩm PCR 16S rDNA của chủng xạ khuẩn CH8.1

Trình tự gen 16S rDNA của chủng xạ khuẩn CH8.1 được đưa lên phần mềm BLAST và so sánh với các trình tự gen đã công bố trên Genbank (NCBI), cho thấy có độ tương đồng khá cao (100%) với các gen tương ứng của các chủng *Streptomyces manipurensis*. Sắp xếp trình tự 16S của chủng xạ khuẩn XH8.1 cùng các chủng xạ khuẩn có độ tương đồng cao trên Genbank bằng phần mềm Bioedit và xây dựng cây phát sinh chủng loại trên phần mềm MegaX, cho kết quả như hình 6. Chủng xạ khuẩn CH8.1 có quan hệ họ hàng gần gũi với các chủng thuộc loài *S. manipurensis*. Kết hợp với kết quả so sánh đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa theo khóa phân loại ISP (Nomomura, 1974) [12] và Bergey [8], do vậy chủng xạ khuẩn này được đặt tên là *Streptomyces manipurensis* CH8.1.

```

16S rDNA CH8.1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110
AGTGGCAACGGGTGAGTACACAGTGGGCAATCTGCCCTCAGCTCTGGACAAAGCCCTGGAACGGGGTCTAATACCGGATACCCTCTGCCGATGGCCAGGGGTTG

16S rDNA CH8.1 120 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220
AAAGCTCCGGCGGTCAAGGATGAGCCCGGGCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAACGGCCCAAGGGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGCCAGCCGGCCACACTG

16S rDNA CH8.1 230 240 250 260 270 280 290 300 310 320 330
GGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCTGGGGAATATTCGCAATGGCGAAGCCCTGATGCGAGGACCCCGGTGAGGGATGACGGCTTCGGGTTG

16S rDNA CH8.1 340 350 360 370 380 390 400 410 420 430 440
TAAACTCTTTCAGCAGGGAAGGCAAGTGCAGGTACCTGCAGAAGAGCCCGGCTAATACGTGCCAGGACCCCGGTAATACGTAGGGCCGCAAGCGTTGTCGGG

16S rDNA CH8.1 450 460 470 480 490 500 510 520 530 540 550
AATATTGGGCGTAAGAGCTCTAGCGGGCTTGTCACTCGGATGTGAAGCCCGAGGCTTAACCTCGGGTCTGCATTGATACGGGCTAGCTAGAGTGTGGTAGGGGA

16S rDNA CH8.1 560 570 580 590 600 610 620 630 640 650 660
GATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCCAGATATCAGGAGGAACCCCGTGGCGAAGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACCTGAGGAGCGAAGCGCTGGGAG

16S rDNA CH8.1 670 680 690 700 710 720 730 740 750 760 770
CGAACAGGATAGTACCCCTGTAGTCCACGCCCTAAAGCTTGGGACTTCCACGCTCGGTGCCGAGCTAAAGCTTAAGTCCCGCCCTGG

16S rDNA CH8.1 780 790 800 810 820 830 840 850 860 870 880
GGAGTACGGCCCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCAAGCGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGGCAACCGAAGAACCTTACCAAGCGTTGACA

16S rDNA CH8.1 890 900 910 920 930 940 950 960 970 980 990
TATACCGAAAGCATTAGAGATAGTGCCCCTTGTGGTCCGGTATACAGGTGGTGCATGGTCTCGTCAAGCTCGTGTGAGATGTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCG

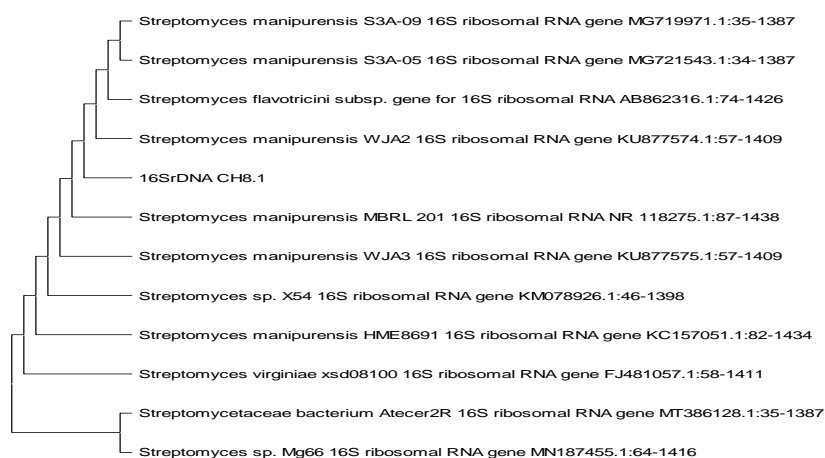
16S rDNA CH8.1 1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100
CAACCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGTGGGGACTCACAGGAGACCGCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCAATCATGCCCC

16S rDNA CH8.1 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200 1210
TTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCAGTACCGTAGGTTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGCTCGCAAC

16S rDNA CH8.1 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300 1310 1320
TCGACCCCATGAAGTGGAGTTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTTGCTCGGTAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCCCGCTCACGTCACGAAAGTCCGGTAACAC

16S rDNA CH8.1 1330 1340 1350
CCGAAAGCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGAGGGAG
    
```

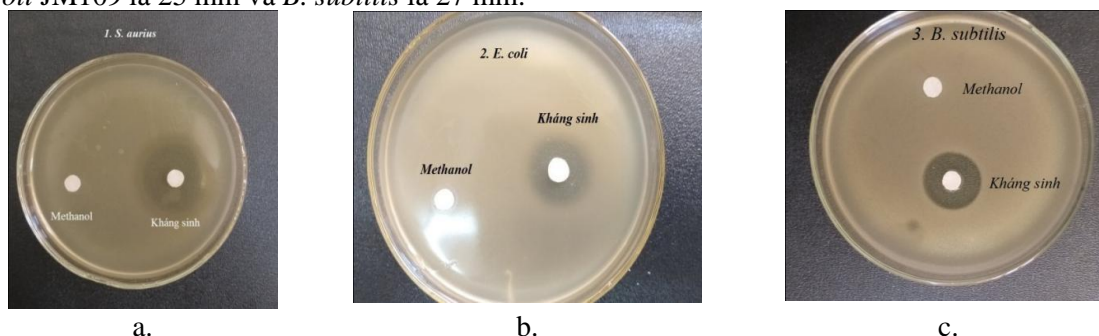
Hình 6. Trình tự nucleotide của gen 16S rDNA của chủng xạ khuẩn CH8.1 sử dụng phần mềm Bioedit



Hình 7. Cây phát sinh loài của chủng xạ khuẩn CH8.1 dựa trên trình tự gen 16S rDNA

### 3.5. Đánh giá hoạt tính kháng sinh thô được tổng hợp từ chủng xạ khuẩn CH8.1

Chủng xạ khuẩn CH8.1 được lên men trong môi trường R2YE sau đó được tách chiết và thu nhận kháng sinh thô. Kháng sinh thô sau đó được hòa tan trong methanol và được bảo quản ở  $-20^{\circ}\text{C}$ . Thử hoạt tính kháng sinh thô bằng phương pháp khoan giấy lọc trên môi trường có chứa các loại vi sinh vật kiểm định, cho kết quả đường kính vòng kháng khuẩn với *S. aureus* là 30 mm, với *E. coli* JM109 là 25 mm và *B. subtilis* là 27 mm.



Hình 7. Kết quả thử hoạt tính kháng khuẩn của kháng sinh thô trên từng vi khuẩn kiểm định  
 a. Vi khuẩn *S. aureus*; b. Vi khuẩn *E. coli* JM109; c. Vi khuẩn *B. subtilis*.

## 4. Kết luận

Đã tuyển chọn được chủng CH8.1 có khả năng ức chế các loại vi sinh vật kiểm định cao nhất. Căn cứ vào kết quả nghiên cứu về đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa và phân tích trình tự gen 16S rDNA, chủng xạ khuẩn CH8.1 được phân lập từ đất trồng trọt huyện Quốc Oai, Hà Nội được đặt tên là *Streptomyces manipurensis* CH8.1. Chủng có khả năng đồng hóa đa dạng các nguồn carbon, nguồn nitơ thử nghiệm và sinh trưởng tốt ở  $28^{\circ}\text{C}$ , pH trung tính, nồng độ NaCl 4%.

Chủng *Streptomyces manipurensis* CH8.1 có khả năng kháng khuẩn mạnh với cả 3 loài vi khuẩn kiểm định với đường kính vòng kháng khuẩn là 30 mm (*S. aureus*), 27 mm (*B. subtilis*) và 25 mm (*E. coli* JM109).

## TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] G. V. Doern, M. A. Pfaller, and M. E. Erwin, "The prevalence of fluoroquinolone resistance among clinically significant respiratory tract isolates of *Streptococcus pneumoniae* in the United States and Canada—1997 results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program," *Diagn Microbiol Infect Dis.*, vol. 32, pp. 313-316, 1998.

- 
- [2] P. Kekuda, K. S. Shobha, and R. Onkarappa, "Fascinating diversity and potent biological activities of actinomycete metabolites," *Pharm Res.*, vol. 3, pp. 250-256, 2010.
- [3] D. A. Hopwood, "Cracking the Polyketide Code," *PloS Biology*, vol. 2, no. 2, 2004, Art. no. e35.
- [4] D. Dhanasekaran, N. Thajuddin, and A. Panneerselvam, *Applications of Actinobacterial Fungicides in Agriculture and Medicine*, Fungicides for Plant and Animal Diseases, 2012, pp. 1-27.
- [5] X. T. Nguyen, D. Nguyen, H. Hoang, and T. H. Vu, *Soil biology curriculum*. Vietnam Education Publishing House (in Vietnamese), 2007.
- [6] T. D. Nguyen, *Microbial biology*. Vietnam Education Publishing House (in Vietnamese), 2000.
- [7] N. Tariq, "Antimicrobial activity of Cinnamomum cassia against diverse microbial flora with its nutritional and medicinal impacts," *Pak J Bot*, vol. 38, pp. 169-174, 2006.
- [8] E. Shirling and G. D. Gottlieb, "Methods for characterization of *Streptomyces* species," *Int J Syst Bacteriol*, vol. 16, pp. 313-340, 1966.
- [9] T. Stanley, M. G. Williams, and J. G. Sharpe, "Bergey's manual of systematic bacteriology," *Williams and Wilkins*, vol. 4, pp. 2452-2492, 1989.
- [10] J. Sambrook and D. Russell, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3<sup>rd</sup>, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.
- [11] H. D. Trener and E. J. Buckus, "System of color wheels for *Streptomyces* taxonomy," *Appl. Microbiol.*, vol. 11, pp. 335-338, 1963.
- [12] H. Nonomura, "Key for classification and identification of species of rare actinomycetes isolated from soils in Japan," *Hakku Kogaku Zasshi*, vol. 52, pp. 71-77, 1974.
- [13] B. Sirisha, R. Harith, J. Mohan, K. Siva, K. S. Kumar, and T. Ramana, "Bioactive compounds from marine actinomycetes isolated from the sediments of bay of Bengal," *IJPCBS*, vol. 3, no. 2, pp. 257-264, 2013.