

# Nghiên cứu hoạt tính kháng khuẩn của các chủng xạ khuẩn nội sinh trong cây Trinh nữ hoàng cung (*Crinum latifolium*)

- Trương Minh Phụng
- Lê Thị Thúy Hằng

Trung Tâm Nghiên cứu và Ứng dụng Sinh học

- Phạm Thị Hào
- Nguyễn Thị Huỳnh My
- Nguyễn Hoàng Chương

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 22 tháng 05 năm 2016, nhận đăng ngày 28 tháng 11 năm 2017)

## TÓM TẮT

Từ cây Trinh nữ hoàng cung (*Crinum latifolium*) chúng tôi đã phân lập được ba chủng xạ khuẩn nội sinh. Kết quả khảo sát kháng khuẩn sơ bộ cho thấy một trong ba chủng xạ khuẩn này thể hiện hoạt tính kháng khuẩn trên môi trường phân lập SFM. Kết quả định danh chủng xạ khuẩn có hoạt tính kháng khuẩn cho thấy chủng này có thể là *Streptomyces diastaticus* subsp. *ardesiacus*. Hoạt tính kháng khuẩn bắt đầu xuất hiện tại thời điểm sau 18 giờ nuôi cấy cho thấy sinh tổng hợp chất kháng khuẩn được điều hòa theo thời gian phát triển và biệt hóa. Kết quả khảo sát ảnh

hưởng của nhiệt độ nuôi cấy trên sinh tổng hợp chất kháng khuẩn cho thấy hàm lượng chất kháng khuẩn được sinh tổng hợp ở nhiệt độ 28 °C cao hơn so với ở 37 °C. Cuối cùng, chủng xạ khuẩn SS004 cho thấy hoạt tính kháng khuẩn đa dạng trên nhiều loại môi trường nuôi cấy khác nhau. Đáng chú ý là trên môi trường FM3, chủng *Streptomyces* này kháng lại cả những vi khuẩn kháng kháng sinh. Điều này mở rộng hướng nghiên cứu và ứng dụng trong lĩnh vực kháng khuẩn của chủng *Streptomyces* nội sinh này trong tương lai.

**Từ khóa:** *Streptomyces*, kháng khuẩn, Trinh nữ hoàng cung, vi khuẩn nội sinh

## MỞ ĐẦU

Các chất chuyển hóa thứ cấp có nguồn gốc từ *Streptomyces* có nhiều hoạt tính sinh học như kháng khuẩn, kháng phân bào, kháng nấm, ức chế miễn dịch, kháng côn trùng. Hai phần ba số thuốc kháng sinh đang sử dụng hiện nay ở người và động vật có nguồn gốc từ nhóm 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 [1]. Phần lớn các chủng xạ khuẩn cho đến nay được phân lập từ môi trường đất thuộc nhiều thành phần khác nhau, phần còn lại được phân lập từ môi trường biển, sông hồ và gần đây nhất là phân lập từ thực vật, đặc biệt là những thực vật được sử dụng như dược liệu trong các

y học dân gian [2]. Các chủng vi sinh vật nội sinh, đặc biệt là *Streptomyces* chỉ mới được bắt đầu nghiên cứu mạnh trong những năm gần đây và cho thấy có tiềm năng lớn trong lĩnh vực sản sinh các chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính sinh học [3]. Đặc biệt, có những giả thuyết về các chất có hoạt tính sinh học đã biết của các cây thuốc có nguồn gốc từ các vi sinh vật nội sinh của cây. Ngoài ra, còn có các giả thuyết có sự trao đổi gene giữa thực vật và các vi sinh vật nội sinh trong thực vật, trong đó có những gene liên quan đến việc tổng hợp các hợp chất thiên nhiên có hoạt tính sinh học [2]. Như vậy, một kho tàng các chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính sinh học từ các chủng vi sinh vật nội sinh nói chung và *Streptomyces* nội sinh nói riêng đang chờ được khám phá và khai

thác. Điều này đặc biệt có ý nghĩa trong lĩnh vực kháng khuẩn khi hiện nay tình trạng vi khuẩn đề kháng kháng sinh trở nên nghiêm trọng và nhu cầu cho các kháng sinh mới là cấp thiết.

Ở Việt Nam, cây Trinh nữ hoàng cung (*Crinum latifolium*) đã được sử dụng từ lâu trong dân gian để điều trị các loại bệnh khác nhau, đặc biệt là ung thư, bằng các chất chuyển hóa thứ cấp trong cây. Có khả năng lớn là các chủng vi sinh vật nội sinh trong cây Trinh nữ hoàng cung cũng có khả năng sản sinh các chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính sinh học quý. Ngoài ra, một chất chuyển hóa thứ cấp có khả năng có nhiều hoạt tính sinh học cùng lúc như kháng khuẩn và kháng ung thư [4, 5]. Vì vậy, chúng tôi quyết định nghiên cứu phân lập các chủng xạ khuẩn nội sinh từ cây Trinh nữ hoàng cung và nghiên cứu hoạt tính kháng khuẩn từ các chủng xạ khuẩn này với hy vọng tìm ra các hợp chất kháng khuẩn mới nhằm đối phó với tình trạng kháng kháng sinh ở vi khuẩn như hiện nay.

#### VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Cây Trinh nữ hoàng cung được thu hái ngoài thiên nhiên. Các hóa chất sử dụng trong đề tài được cung cấp bởi Prolabo và Merck. Master mix PCR được cung cấp bởi Qiagen. Cặp primer nhân bản gen 16S rRNA là 27F-1495R được tổng hợp và cung cấp bởi IDTDNA. Các chủng vi sinh vật thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn được cung cấp bởi Trung tâm Nghiên cứu và Ứng dụng Sinh học. Các chủng vi sinh vật trong nghiên cứu này là các chủng vi sinh vật gây bệnh ở người và gồm hai nhóm: nhóm không kháng kháng sinh và nhóm kháng kháng sinh. Danh sách các vi sinh vật thử nghiệm được cung cấp chi tiết ở phần kết quả và thảo luận.

#### Phân lập các chủng xạ khuẩn nội sinh từ cây Trinh nữ hoàng cung

Sau khi được thu hái ngoài tự nhiên, phần thân, rễ, lá, củ của cây Trinh nữ hoàng cung được rửa sạch với nước máy để loại bỏ đất, cát. Sau đó, các bộ phận này được rửa tiếp tục với dung dịch Tween 20 1 % trong vài giây, tiếp theo sau là rửa với nước cất vô trùng. Các bộ phận này được rửa với dung dịch

NaOCl 5 % trong 5 phút theo sau là bước rửa với dung dịch  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  5 % trong 10 phút để trung hòa tác động của NaOCl. Bước kế tiếp là rửa các bộ phận của cây Trinh nữ hoàng cung với dung dịch ethanol 70 % trong 5 phút theo sau là rửa lại với nước vô trùng. Cuối cùng, rửa các bộ phận của cây bằng dung dịch  $\text{NaHCO}_3$  10 % trong 10 phút. Các bước thu nhận các chủng *Streptomyces* nội sinh từ thực vật được tham khảo công trình của Qin và cộng sự năm 2009 [6].

Các bộ phận của cây sau khi xử lý vô trùng được nghiền nát trong nước muối sinh lý để giải phóng các vi sinh vật nội sinh. Dịch nghiền được trải trên môi trường SFM bổ sung nalidixic acid (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), cycloheximide (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) và nystatin (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Ủ đĩa môi trường chứa dịch nghiền ở 28 °C trong 7 ngày. Tiến hành cấy chuyển làm thuần các khuẩn lạc đặc trưng cho nhóm xạ khuẩn và giữ bào tử của các chủng xạ khuẩn này trong dung dịch glycerol 30 % ở -20 °C.

#### Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của các chủng xạ khuẩn bằng phương pháp khuếch tán kháng sinh trên thạch

Cây các chủng xạ khuẩn đã được làm thuần trong môi trường SFM lỏng và lắc ở nhiệt độ phòng trong 4 ngày. Sau 4 ngày, môi trường nuôi cấy được ly tâm để thu phần dịch nổi không chứa sinh khối xạ khuẩn. Cho 100  $\mu\text{L}$  dịch nổi vào các lỗ đã được đục sẵn trên các đĩa môi trường MHA chứa các vi sinh vật thử nghiệm khác nhau. Sau đó, ủ các đĩa thạch thử nghiệm ở 37 °C qua đêm. Tiến hành ghi nhận kết quả kháng khuẩn thông qua việc đo kích thước vòng vô khuẩn xuất hiện trên các mặt đĩa thạch chứa vi sinh vật thử nghiệm.

#### Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ trên hoạt tính kháng khuẩn của chủng xạ khuẩn nội sinh

Chủng xạ khuẩn có hoạt tính kháng khuẩn được nuôi cấy trong môi trường SFM lỏng ở 28°C và ở 37°C. Sau đó, tiến hành khảo sát hoạt tính kháng khuẩn bằng phương pháp khuếch tán trên thạch như trên. Ở mỗi nhiệt độ, thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

### Khảo sát thời gian tổng hợp chất kháng khuẩn ở chủng xạ khuẩn có hoạt tính kháng khuẩn

Chủng xạ khuẩn có hoạt tính kháng khuẩn được nuôi cấy trong môi trường SFM lỏng ở nhiệt độ phòng. Dịch nuôi cấy được trích ra ở các thời điểm 6 h, 12 h, 18 h, 24 h, 30 h, 36 h, 42 h, 48 h kể từ thời điểm bắt đầu nuôi cấy. Các dịch vi khuẩn này được thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn bằng phương pháp đục lỗ như trên. Ở mỗi thời điểm khảo sát, thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

### Khảo sát ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy trên khả năng sinh chất kháng khuẩn của chủng xạ khuẩn

Chủng xạ khuẩn có hoạt tính kháng khuẩn được cấy trong 6 loại môi trường lỏng khác nhau bao gồm: SFM, FM3, SS, GSB, ISP1, ISP2. Sau 4 ngày nuôi cấy, các dịch môi trường nuôi cấy được thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn bằng phương pháp đục lỗ đã mô tả ở trên. Ở mỗi môi trường nuôi cấy, thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

### Định danh phân tử chủng xạ khuẩn có hoạt tính kháng khuẩn

Chủng xạ khuẩn có hoạt tính kháng khuẩn được nuôi cấy trên môi trường SFM trong 4 ngày ở nhiệt độ phòng. Sau đó, thu nhận sinh khối xạ khuẩn và

tách chiết DNA xạ khuẩn bằng phương pháp đun sôi. DNA này được sử dụng làm bản mẫu để nhân bản đoạn gene 16S rRNA với cặp primer 27F-1495R bằng phương pháp PCR. Sản phẩm PCR 16S rRNA được tinh sạch và giải trình tự nucleotide. Trình tự nucleotide 16S rRNA của SS004 được hiệu chỉnh bằng phần mềm BioEdit. Cây phát sinh chủng loại dựa trên 16S rRNA được xây dựng với phần mềm MEGA6.

### Xử lý thống kê

Các kết quả kháng khuẩn biểu diễn bằng vòng kháng khuẩn xử lý bằng công cụ Excel với các công cụ tương ứng.

### KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### Kết quả phân lập chủng xạ khuẩn nội sinh từ cây Trinh nữ hoàng cung

Từ cây Trinh nữ hoàng cung, chúng tôi đã phân lập được ba chủng xạ khuẩn được ký hiệu lần lượt là SS004, SS005 và SS006. Các chủng xạ khuẩn sau phân lập được làm thuần trên môi trường SFM. Hình dạng ba chủng xạ khuẩn trên môi trường SFM [7] được trình bày trong Hình 1. Các khuẩn lạc có kích thước 2x2 cm trên Hình 1.



Hình 1. Khuẩn lạc sau khi làm thuần của SS004, SS005, SS006

Chủng SS004 được phân lập từ củ của cây Trinh nữ hoàng cung. Khuẩn lạc SS004 trên môi trường SFM có màu xám, rìa răng cưa, bào tử dạng phấn, bề mặt khô. Chủng SS005 được phân lập từ rễ của cây Trinh nữ hoàng cung. Khuẩn lạc SS5 trên môi trường SFM có màu xám trắng, mép tròn đều, bào tử dạng phấn, bề mặt khô. Chủng SS6 được phân lập từ rễ của

cây Trinh nữ hoàng cung. Khuẩn lạc SS006 trên môi trường SFM có màu xám trắng, mép chia thùy, bào tử dạng phấn, bề mặt hơi ướt. Tất cả các khuẩn lạc của SS004, SS005 và SS006 có hình dạng bên ngoài tương đồng với hình dạng đặc trưng của các chủng xạ khuẩn như có cấu tạo dạng sợi liên kết với nhau tạo thành khuẩn lạc với nhiều màu sắc khác nhau. Các sợi

này được chia thành hai loại khác biệt là sợi cơ chất cắm sâu vào môi trường dinh dưỡng và sợi khí sinh hình thành nên bề mặt trên của xạ khuẩn và cũng là sợi phát sinh bào tử. Khuẩn lạc xạ khuẩn thường rắn chắc, xù xì, có thể có dạng da, dạng phấn, dạng nhung, dạng vôi tùy thuộc vào kích thước bào tử. Khuẩn lạc thường có dạng phóng xạ. Như vậy, chúng tôi đã phân lập được ba chủng xạ khuẩn từ cây Trinh nữ hoàng cung và ba chủng này sẽ được khảo sát trong các thí nghiệm tiếp theo.

**Kết quả khảo sát sơ bộ hoạt tính kháng khuẩn**

**Bảng 1.** Kết quả khảo sát sơ bộ hoạt tính kháng khuẩn của SS004, SS005, SS006

VSV khảo sát Xạ khuẩn	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Salmonella enteritica</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
SS004	+	+	-	+	-	+	-	-
SS005	-	-	-	-	-	-	-	-
SS006	-	-	-	-	-	-	-	-

(-): không có hoạt tính kháng khuẩn; (+): có hoạt tính kháng khuẩn

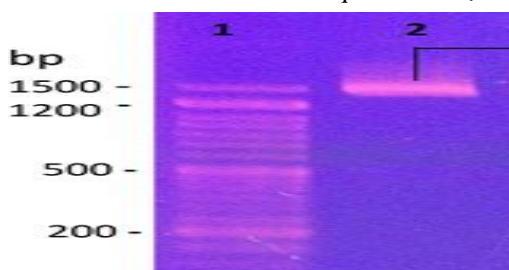
Kết quả ở Bảng 1 cho thấy chỉ có chủng xạ khuẩn SS004 thể hiện hoạt tính kháng khuẩn trên 4 trong số 8 vi sinh vật khảo sát. Điều này cho thấy hợp chất kháng khuẩn do SS004 sinh ra trên môi trường SFM có phổ hoạt tính rộng khi có tác dụng trên nhiều loại vi khuẩn khác nhau và với vi nấm *Candida albicans*. Hai chủng xạ khuẩn SS005 và SS006 không thể hiện hoạt tính kháng khuẩn trên môi trường SFM. Như vậy, SS004 là chủng xạ khuẩn tiềm năng sinh

Ba chủng xạ khuẩn được khảo sát khả năng sinh hoạt chất kháng khuẩn bằng phương pháp khuếch tán trên thạch. Các chủng vi sinh vật thử nghiệm hoạt tính bao gồm: *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritica*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Candida albicans*. Các chủng vi sinh vật này đại diện cho nhóm vi khuẩn Gram âm, Gram dương, trực khuẩn, cầu khuẩn, xoắn khuẩn và vi nấm. Kết quả kháng khuẩn của ba chủng xạ khuẩn SS004, SS005, SS006 được trình bày trong Bảng 1.

chất kháng khuẩn nên được chọn trong các nghiên cứu tiếp theo.

**Định danh phân tử chủng xạ khuẩn**

Để định danh phân tử chủng xạ khuẩn SS004, chúng tôi sử dụng phương pháp xây dựng cây phát sinh chủng loại (phylogenetic tree trên gen 16S rRNA. DNA bộ gene tách chiết từ SS004 được nhân bản với cặp primer 27F-1495R [8] trong phản ứng PCR để thu nguyên liệu cho giải trình tự nucleotide. Kết quả PCR được trình bày trong Hình 2.



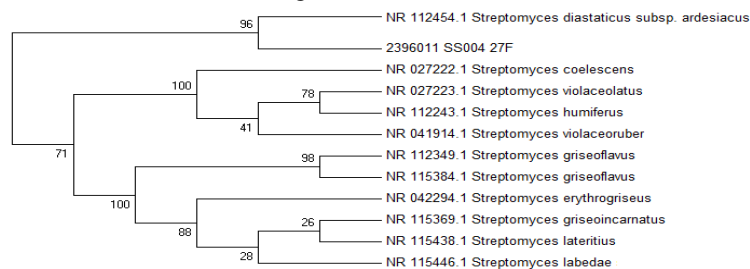
**Hình 2.** Kết quả nhân bản đoạn gene 16S rRNA của SS004

Giếng 1: thang DNA 100 bp. Giếng 2: sản phẩm PCR trên DNA bộ gene SS004 với cặp primer 27F-1495R

Kết quả điện di ở Hình 2 cho thấy đã thu được sản phẩm có kích thước khoảng 1,5 kb như mong đợi. Không có vạch sản phẩm ký sinh cho thấy phản ứng PCR có độ đặc hiệu cao. Sản phẩm PCR này được tinh sạch để giải trình tự nucleotide bằng phương pháp Sanger.

Chúng tôi thực hiện giải trình tự nucleotide sản phẩm PCR 16S rRNA từ SS004 theo hai chiều. Sau đó, hiệu chỉnh trình tự nucleotide đã giải dựa trên các tín hiệu huỳnh quang bằng phần mềm BioEdit kết hợp với so sánh dữ liệu 16S rRNA của các chủng xạ

khuẩn trên GenBank. Đoạn trình tự nucleotide của gene 16S rRNA của SS004 sau khi được giải và hiệu chỉnh sẽ được sử dụng để xây dựng cây phát sinh chủng loại ở bước tiếp theo. Để xây dựng cây phát sinh chủng loại nhằm định danh SS004, chúng tôi thu thập trình tự nucleotide 16S rRNA của hơn 1000 chủng xạ khuẩn trên GenBank. Các trình tự này được sử dụng cùng với trình tự 16S rRNA SS004 để xây dựng nên cây phát sinh chủng loại nhằm định danh phân tử chủng xạ khuẩn SS004. Phương pháp xây dựng cây phát sinh loài được tiến hành với phần mềm MEGA6. Kết quả định danh phân tử SS004 được trình bày trong Hình 3.

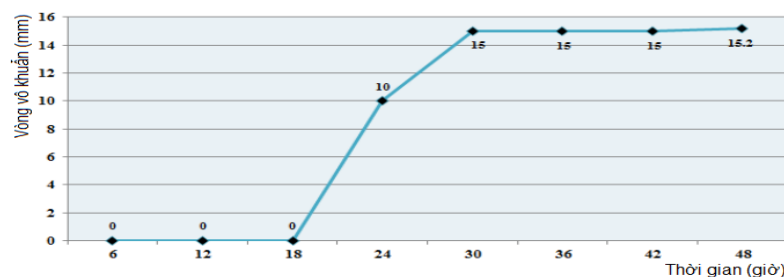


Hình 3. Kết quả xây dựng cây phát sinh loài nhằm định danh phân tử chủng xạ khuẩn SS004

Kết quả từ cây phát sinh chủng loại cho thấy SS004 có sự tương đồng cao với chủng xạ khuẩn *Streptomyces diastaticus* subsp. *ardesiacus* với tỷ lệ bootstrap lên đến 96 %. Kết quả này khẳng định SS004 là xạ khuẩn. Tuy nhiên để khẳng định SS004 có phải là *Streptomyces diastaticus* subsp. *ardesiacus* hay không thì cần thực hiện thêm các thí nghiệm khảo sát về mặt vi sinh, sinh hóa cũng như kết quả chụp hình dưới kính hiển vi điện tử.

### Khảo sát thời gian sinh chất kháng khuẩn của chủng SS004

Để khảo sát thời điểm sinh chất kháng khuẩn, SS004 được nuôi cấy trong môi trường SFM lỏng. Mẫu được thu tại các thời điểm 6 h, 12 h, 18 h, 24 h, 30 h, 36 h, 42 h, 48 h kể từ thời điểm bắt đầu nuôi cấy và được khảo sát hoạt tính kháng khuẩn trên môi trường MHA. Kết quả được trình bày trong Hình 4.



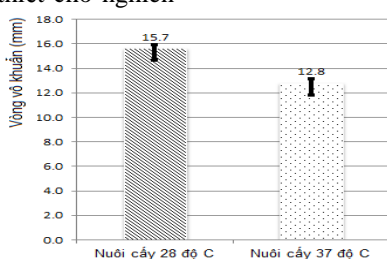
Hình 4. Khảo sát thời gian sinh chất kháng khuẩn của SS004

Kết quả ở Hình 4 cho thấy SS004 bắt đầu sinh hợp chất kháng khuẩn sau 18 h kể từ khi bắt đầu nuôi cấy và hợp chất kháng khuẩn đạt nồng độ bão hòa trong môi trường lỏng sau 30 h trở đi. Kết quả này chứng tỏ việc sinh chất kháng khuẩn được điều hòa biểu hiện ở chủng SS004. Ở *Streptomyces*, các hợp chất kháng khuẩn thường do các nhóm gene (gene cluster) chịu trách nhiệm sinh tổng hợp và các gen trong nhóm chịu kiểm soát bởi các nhân tố bên trong lẫn bên ngoài cluster. Việc sinh hợp chất kháng khuẩn ở *Streptomyces* thường xảy ra ở giai đoạn sau của quá trình tăng trưởng khi có sự thay đổi về mặt hình dạng từ dạng khuẩn ty sơ cấp sang khuẩn ty thứ cấp và hình thành bào tử. Kết quả này cần thiết cho nghiên

cứu sinh tổng hợp và đặc biệt là điều hòa sinh tổng hợp chất kháng khuẩn ở SS004 sau này.

**Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ trên khả năng sinh chất kháng khuẩn của chủng SS004**

Nhiệt độ là một trong những nhân tố có ảnh hưởng đến sản sinh chất chuyển hóa thứ cấp ở *Streptomyces*. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên việc sinh chất kháng khuẩn của SS004 bằng cách nuôi cấy SS004 trong môi trường SFM được khảo sát ở hai nhiệt độ là 28 °C và 37 °C trong 4 ngày. Dịch nuôi cấy được khảo sát hoạt tính kháng khuẩn và kết quả được trình bày ở Hình 5.



**Hình 5.** Ảnh hưởng của nhiệt độ trên khả năng sinh chất kháng khuẩn của SS004

Kết quả cho thấy đường kính trung bình của vòng kháng khuẩn ở 28 °C là 15,7 mm là lớn hơn so với vòng kháng khuẩn ở 37 °C là 12,8 mm (P<0,05). Các chủng vi khuẩn *Streptomyces* thường sinh trưởng tốt nhất ở nhiệt độ trong khoảng 28–30 °C, vì vậy, khả năng sinh chất kháng khuẩn cũng có thể tối ưu trong khoảng nhiệt độ này so với nhiệt độ 37 °C, là nhiệt độ tối ưu cho nhiều loài vi khuẩn khác. Tuy nhiên, cũng có những trường hợp *Streptomyces* lại tăng cường sinh chất kháng khuẩn ở nhiệt độ 37 °C so với 28 °C như *S. hygroscopicus* sản sinh validamycin A. Trong trường hợp này, cơ chế tăng cường sản sinh chất kháng khuẩn ở nhiệt độ cao được giải thích do sự tăng cường chuyển hóa con đường pentose phosphate, tăng cường sinh tổng hợp protein và tăng cường mức độ phiên mã tổng quát dẫn đến tăng cường sinh tổng hợp validamycin A [9]. Hợp chất kháng khuẩn do SS004 sản sinh trong môi trường SFM không thuộc vào trường hợp được tăng cường tổng hợp ở nhiệt độ cao (37 °C) như *S. hygroscopicus* sinh validamycin A vừa kể trên. Vì vậy, nhiệt độ 28

°C được chọn để lên men sinh tổng hợp chất kháng khuẩn ở SS004 trên môi trường SFM.

**Khảo sát ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy trên khả năng sinh hợp chất kháng khuẩn của SS004**

Các hợp chất dinh dưỡng có trong môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng đến khả năng sinh hợp chất kháng khuẩn ở *Streptomyces*. Trên thực tế, một chủng *Streptomyces* sản sinh ra các hợp chất kháng khuẩn khác nhau trên các môi trường nuôi cấy khác nhau. Dựa trên cơ sở này, chúng tôi chọn một số môi trường nuôi cấy thường được sử dụng để lên men sinh chất kháng khuẩn ở *Streptomyces* nhằm khảo sát sự ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy trên khả năng sinh chất kháng khuẩn của SS004. Các môi trường được sử dụng là SS [10], GSB [11], ISP1, ISP2 [12], FM3 [13], SFM. Ngoài 8 chủng vi sinh vật thử nghiệm ở trên, chúng tôi cũng sử dụng thêm các chủng vi sinh vật khác là các chủng vi sinh vật kháng sinh được phân lập trong lâm sàng. Kết quả khảo sát được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2. Khảo sát ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy trên khả năng sinh chất kháng khuẩn của SS004

VSV kiểm định	Môi trường					
	SS	GSB	ISP-1	SFM	FM3	ISP-2
<i>Bacillus subtilis</i>	-	21	-	21	24	13
<i>Candida albicans</i>	-	20	-	20	18	15
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	10	15	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella enteritica</i>	-	-	-	13	16	13
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	12	12
<i>Vibrio cholera</i>	-	-	-	-	15	-
<i>Candida albicans-1*</i>	-	-	-	-	16	-
<i>Enterococcus faecalis -1*</i>	-	13	-	13	18	-
<i>Escherichia coli- 1*</i>	-	-	-	13	15	-
<i>Escherichia coli- 2*</i>	-	-	-	-	12	-
<i>Klebsiella pneumonia*</i>	-	13	-	14	17	11
<i>Staphylococcus aureus-1*</i>	-	10	-	11	13	-
<i>Staphylococcus aureus-2*</i>	-	-	-	-	20	-
<i>Shigella sonnei*</i>	-	-	-	-	12,5	-
<i>Staphylococcus sp*</i>	-	20	-	20	23	11
<i>Acinetobacter DN24*</i>	-	13	-	15	16,5	11
<i>Acinetobacter DN27*</i>	-	-	-	9	10	9
<i>Acinetobacter DN47*</i>	-	-	-	11	12	15
<i>Acinetobacter DN53*</i>	-	10	-	12	15	10
<i>Acinetobacter DN55*</i>	-	-	-	9	11	-
<i>Acinetobacter DN56*</i>	-	-	-	8	11	-

(-): không có hoạt tính kháng khuẩn; các số nguyên biểu thị đường kính vòng vô khuẩn và được tính bằng mm.  
(\*): các chủng vi sinh vật kháng kháng sinh.

Kết quả ở Bảng 2 cho thấy SS004 không tạo ra hợp chất kháng khuẩn trên hai môi trường là SS và ISP1. SS004 sản sinh ra hợp các chất kháng khuẩn trên các môi trường như GSB, SFM, FM3, ISP2. Các hợp chất kháng khuẩn trong các môi trường này là khác nhau vì phổ kháng khuẩn giữa chúng hoàn toàn khác biệt. Đặc biệt, chất kháng khuẩn sinh ra trong môi trường FM3 có phổ kháng khuẩn rộng nhất kháng được 22/24 chủng vi sinh vật thử nghiệm bao gồm cả những chủng vi sinh vật kháng kháng sinh (chủng vi sinh vật đánh dấu \*). Kết quả này khẳng định các thành phần có trong môi trường dinh dưỡng ảnh hưởng đến khả năng sinh hợp chất kháng khuẩn ở *Streptomyces*. Cơ chế kích hoạt sản sinh hợp chất kháng khuẩn bằng môi trường chưa được tìm hiểu rõ

ràng ở vi khuẩn, tuy nhiên có thể các thành phần khác nhau trong các môi trường hoạt động như các tín hiệu hóa học. Các tín hiệu này gắn vào các thụ thể tương ứng trong tế bào vi khuẩn dẫn đến sự thay đổi nồng độ  $Ca^{+}$ , các hormon cảnh báo (alarmones), các gốc tự do (ROS) nội bào. Chính sự thay đổi về nồng độ các hợp chất này kiểm soát sự phiên mã các nhóm gene chịu trách nhiệm sinh tổng hợp các chất thứ cấp trực tiếp hoặc tác động thông qua các nhân tố kích hoạt phiên mã của các nhóm gen này [14].

## KẾT LUẬN

Cây Trinh nữ hoàng cung (*Crinum latifolium*) chứa các chủng *Streptomyces* nội sinh. Một trong các chủng *Streptomyces* này là SS004 cho thấy có khả năng kháng lại các vi sinh vật gây bệnh. Thông qua

định danh phân tử bằng 16S rRNA, SS004 có khả năng là *Streptomyces diastaticus* subsp. *ardesiacus* tuy nhiên cần thêm các phương pháp định danh khác để khẳng định. SS004 sinh hợp chất kháng khuẩn sau 18 h nuôi cấy trong môi trường SFM và nhiệt độ nuôi cấy có ảnh hưởng đến hàm lượng hợp chất kháng khuẩn sản sinh. Đặc biệt khi thay đổi môi trường nuôi cấy, SS004 sản sinh những hợp chất kháng khuẩn mới có phổ rộng và kháng lại được những vi sinh vật

đã kháng với các kháng sinh điều trị. SS004 là chủng *Streptomyces* tiềm năng cho các nghiên cứu tiếp theo về khả năng sinh hợp chất kháng khuẩn, đặc biệt hợp chất kháng khuẩn chống lại các chủng vi sinh vật gây bệnh kháng kháng sinh.

*Lời cảm ơn:* Nghiên cứu này được cung cấp kinh phí và vật liệu bởi Trung tâm Nghiên cứu và Ứng dụng Sinh học.

## Study of the antimicrobial activity of endophytic *Streptomyces* strains isolated from *Crinum latifolium*

- **Truong Minh Phung**
- **Le Thi Thuy Hang**

Center for Research and Application Bioscience

- **Pham Thi Hao**
- **Nguyen Thi Huynh My**
- **Nguyen Hoang Chuong**

University of Science, VNU-HCM

### ABSTRACT

We isolated three strains of endophytic *Streptomyces* from *Crinum latifolium*. Preliminary screening of antimicrobial activity showed one strain (SS004) with antibacterial activity on SFM medium. SS004 was identified as *Streptomyces diastaticus* subsp. *ardesiacus* based on 16S rRNA nucleotide sequence analysis. Antimicrobial activity produced by SS004 appeared merely after 18 hours of culture in SFM medium proving that the biosynthesis of the antimicrobial compounds was controlled in the same

type as those as in other *Streptomyces* strains. SS004 produced more antimicrobial compound at 28 °C than at 37 °C. SS004 showed diversity in antimicrobial compound production on different media, notably on FM3 medium which has antibacterial activity against several antibiotic-resistant bacteria. In conclusion, endophytic *Streptomyces* strains are remarkable for their production of antimicrobial compounds.

**Keywords:** *Streptomyces*, antibacterial, *Crinum latifolium*, endophytic bacteria

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. H.C. Nguyen, Study of the spiramycin biosynthesis and its regulation in *Streptomyces ambofaciens*, *PhD Thesis*, University Paris Sud 11 (2009).
- [2]. J. Berdy, Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. *The Journal of Antibiotics*, 65, 385–395 (2012).
- [3]. J. Li, G.Z. Zhao, H.H. Chen, H.B. Wang, S. Qin, W.Y. Zhu, L.H. Xu, C.L. Jiang, W.J. Li, Antitumour and antimicrobial activities of endophytic *Streptomyces* from pharmaceutical plants in rainforrest, *Letters in Applied Microbiology*, 47, 6, 574–580 (2008).



- [4]. J.B. Jouda, J.D. Tamokou, C.D. Mbazona, P. Sarkar, P.K. Bag, J. Wandji, Anticancer and antibacterial secondary metabolites from the endophytic fungus *Penicillium* sp. CAM64 against multi-drug resistant Gram-negative bacteria, *African Health Sciences*, 16, 3, 734–743 (2016)
- [5]. M.S. Ahmad, A.Q. El-Gendy, R.R. Ahmed, H.M. Hassan, H.M. El-Kabbany, A.G. Merdash, Exploring the antimicrobial and antitumor potentials of *Streptomyces* sp. AMG12-1 isolated from Egyptian soil, *Frontiers in Microbiology*, 8, doi: 10.3389/fmicb.2017.00438 (2017).
- [6]. S. Qin, J. Li, H.H. Chen, G.Z. Zhao, W.Y. Zhu, C.L. Jiang, L.H. Xu, W.J. Li, Isolation, diversity and antimicrobial activity of rare actinobacteria from medicinal plants of tropical rain forests in Xishuangbanna, China, *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 19, 6176–6186 (2009).
- [7]. T. Kieser, J.M. Bibb, J.M. Buttner, F.K. Chater, A.D. Hopwood, Practical *Streptomyces* Genetics, *John Innes Foundation* (2000).
- [8]. A.J. Frank, C.I. Reich, S. Sharma, J.S. Weisbaum, B.A. Wilson, G.J. Olsen, Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes, *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 8, 2461–2470 (2008).
- [9]. Y. Liao, Z.H. Wei, L. Bai, Z. Deng, J.J. Zhong, Effect of fermentation temperature on validamycin A production by *Streptomyces hygroscopicus* 5008, *Journal of Biotechnology*, 142, 271–274 (2009).
- [10]. K.S. Sathish, V.B. Kokati, In-vitro antimicrobial activity of marine actinobacteria against multidrug resistance *Staphylococcus aureus*, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2, 10, 787–792 (2012).
- [11]. L.S. Singh, H. Sharma, N.C. Talukdar, Production of potent antimicrobial agent by actinomycete, *Streptomyces sannaensis* strain SU118 isolated from phoomdi in Lotak lake of Manipur, India, *BMC Microbiology*, 14, 278 (2014).
- [12]. E.B. Shirling, D. Gottlieb, Methods for characterization of *Streptomyces* species, *International Journal of Systematic and Evolutionary*, 16, 313–340 (1966)
- [13]. K. Hong, A.H. Gao, Q.Y. Xie, H. Gao, L. Zuang, H.P. Lin, H.P. Yu, J. Li, X.S. Yao, M. Goodfellow, J.S. Ruan, Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soil and plants in China, *Marine Drugs*, 7, 1, 24–44 (2009).
- [14]. U.E. Abdelmohsen, T. Grkovic, S. Balasubramanian, M.S. Kamel, R.J. Quinn, U. Hentschel, Elicitation of secondary metabolites in actinomycetes, *Biotechnology Advances*, 33, 798–811 (2015).