

Khảo sát ảnh hưởng của một số nguồn cacbon và nitơ đến khả năng sinh trưởng và kháng khuẩn của chủng *Streptomyces* sp. HM9 phân lập từ hải miên

Phạm Thị Miên^{1*}, Lê Kiều Hân², Nguyễn Thị Kim Cúc²

¹Viện Hải dương học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 1 Cầu Đá, phường Trần Phú, TP Nha Trang, tỉnh Khánh Hoà, Việt Nam

²Khoa Công nghệ sinh học, Trường Đại học Nha Trang, 2 Nguyễn Đình Chiểu, phường Vĩnh Thọ, TP Nha Trang, tỉnh Khánh Hoà, Việt Nam

Ngày nhận bài 2/8/2021; ngày chuyển phản biện 4/8/2021; ngày nhận phản biện 23/8/2021; ngày chấp nhận đăng 30/8/2021

Tóm tắt:

Từ rất lâu xạ khuẩn *Streptomyces* đã được biết đến như là nguồn sinh các chất tự nhiên có hoạt tính sinh học. Trong nghiên cứu này, xạ khuẩn biển *Streptomyces* HM9 phân lập từ hải miên được tối ưu hóa môi trường với một số nguồn cacbon (C) và nitơ (N) khác nhau nhằm đánh giá khả năng sinh chất kháng sinh (KS) phổ rộng. Tinh bột và $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ là nguồn C và N thích hợp cho sinh trưởng của HM9. Tinh bột và casein thích hợp cho chủng HM9 kháng lại vi khuẩn *Vibrio*, trong khi lactose và NH_4Cl tác động tốt nhất đến hoạt động kháng khuẩn của HM9 đối với chủng kiểm định chuẩn *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Không có sự trùng lặp về các chất làm nguồn C cũng như N đối với khả năng sinh KS của chủng HM9 kháng lại vi khuẩn Gram dương và Gram âm, điều đó cho thấy có thể chủng HM9 sử dụng các nguồn C và N khác nhau để sinh ra các chất KS khác nhau. Đây là công bố đầu tiên về xạ khuẩn biển sử dụng các nguồn C, N để sinh chất KS kháng vi khuẩn kiểm định Gram dương và vi khuẩn gây bệnh cơ hội Gram âm nhóm *Vibrio* phân lập từ ngoài môi trường nuôi hải sản. Kết quả này là cơ sở cho những nghiên cứu ứng dụng khai thác chất KS làm thuốc chữa bệnh hoặc sử dụng xạ khuẩn biển trong bảo quản hải sản.

Từ khóa: hoạt tính kháng khuẩn, nguồn cacbon, nguồn nitơ, *Streptomyces*.

Chỉ số phân loại: 1.6

1. Đặt vấn đề

Lịch sử khám phá và sản xuất thuốc KS có nguồn gốc từ *Streptomyces* được bắt đầu với streptothricin do xạ khuẩn *Streptomyces lavendulae* sinh ra và sau đó là streptomycin từ xạ khuẩn *S. griseus*, từ đó cho đến ngày nay có đến 80% số thuốc KS đang dùng là từ *Streptomyces*, chẳng hạn như streptomycin, cephalosporin, neomycin, vancomycin, kanamycin, bleomycin [1]. Nystatin được phân lập từ *S. noursei* vào năm 1950 và đang được dùng rất hiệu quả để chữa các bệnh do nấm gây ra, đặc biệt là nhiễm nấm *Candida* sp. trên da bao gồm phát ban, bệnh nhiễm trùng miệng và nhiễm nấm âm đạo [2]. Daptomycin được phát hiện vào cuối những năm 1980, đến 10 năm sau, nó được sản xuất từ *S. roseosporus*. Daptomycin là một loại KS diệt khuẩn phổ rộng có tác dụng chống lại vi khuẩn gây nhiễm trùng máu *Staphylococcus aureus* kháng thuốc methicillin và các *Enterococcus* kháng thuốc vancomycin. Hiện tại, daptomycin được dùng để điều trị cho những bệnh nhân nhiễm trùng da và cấu trúc da, nhiễm khuẩn và nhiễm khuẩn huyết [3].

Kể từ khi phát hiện KS đầu tiên từ *Streptomyces*, các loài xạ khuẩn thuộc giống này được quan tâm nghiên cứu nhiều hơn và được biết đến như nguồn dược liệu tự nhiên có hoạt tính sinh học. Do đó, cũng đã có rất nhiều nghiên

cứu về thành phần dinh dưỡng [4, 5], điều kiện môi trường nuôi cấy [6, 7], nghiên cứu về sinh học phân tử [8, 9] để thu được khối lượng lớn các chất mong muốn từ sinh khối của xạ khuẩn này. Cacbon (C) và nitơ (N) là những nguyên tố thiết yếu quan trọng nhất cho sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật, trong đó có *Streptomyces*.

Streptomyces có thể sử dụng tinh bột, glucose, sucrose, maltose, lactose, axit hữu cơ và rượu ethylic làm nguồn C, và sodium nitrate, axit aspartic, axit glutamic làm nguồn N cho sinh trưởng và sinh chất KS neomycin [10]. Ba nguồn N khác nhau là ammonium sulphate $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ammonium nitrate (NH_4NO_3) và sodium nitrate (NaNO_3) được sử dụng cho nghiên cứu sinh trưởng và sản sinh nystatin của *S. noursei*. Chủng xạ khuẩn này có khả năng đồng hóa cả ba nguồn N thử nghiệm [11]. Tuy nhiên, mỗi loài sử dụng nguồn dinh dưỡng C, N không giống nhau. Thực tế, các nguồn C và N khác nhau ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và hiệu quả sinh chất KS cũng khác nhau. Nồng độ các cơ chất thiết yếu như C, N cũng có những ngưỡng giới hạn đối với từng loài vi sinh vật. Ở nồng độ 3,5 g/100 ml dextrose làm giảm số lượng chất KS của *Streptomyces* sp. LH9, trong khi ở nồng độ 2 g/100 ml thì chủng này sinh KS ở mức cao nhất [12]. Khoảng pH 6,5-8 được coi là thích hợp cho *Streptomyces* sinh trưởng và sinh tổng hợp chất KS [13].

*Tác giả liên hệ: Email: mien.pham@gmail.com

Effects of some carbon and nitrogen sources on antibacterial activity of sponge-derived *Streptomyces* sp. strain HM9

Thi Mien Pham^{1*}, Kieu Han Le², Thi Kim Cuc Nguyen²

¹Institute of Oceanography, Vietnam Academy of Science and Technology,
1 Cau Da Street, Tran Phu Ward, Nha Trang City, Khanh Hoa Province, Vietnam

²Department of Biotechnology, Nha Trang University,

2 Nguyen Dinh Chieu Street, Vinh Tho Ward, Nha Trang City, Khanh Hoa Province, Vietnam

Received 2 August 2021; revised 23 August 2021; accepted 30 August 2021

Abstract:

Streptomyces has been known as a source of natural bioactive substances so far. In this present study, the sponge-derived *Streptomyces* HM9 was optimised with a number of different carbon (C) and nitrogen (N) sources to evaluate the broad-spectrum antibacterial ability. Starch and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ were favourable carbon and nitrogen sources to the growth of the strain HM9. Starch and casein were suitable carbon and nitrogen sources for antibacterial activity of strain HM9 against *Vibrio*, whereas lactose and NH_4Cl were beneficial on the inhibition of standard indicator *Bacillus subtilis* ATCC 6633. There was no overlap of C and N sources for the antibacterial activity of the strain HM9 against Gram-positive and Gram-negative bacteria, indicating that strain HM9 used different sources of C and N to produce different antibiotics. This is the first report on a marine *Streptomyces* strain using C and N sources to produce antibiotics against Gram-positive bacteria and opportunistic Gram-negative *Vibrio* pathogen isolated from the ambient aquaculture. This result may pave the way for further research on exploiting antibiotics as medicine or using them for seafood preservation.

Keywords: antibacterial activity, carbon sources, nitrogen sources, *Streptomyces*.

Classification number: 1.6

Tuy nhiên, chủng *Streptomyces* sp. MS-266 có pH tối ưu là 6 [14]. Mỗi loài đều có dải nhiệt độ tối ưu riêng, đa số nhiệt độ sinh trưởng và sinh chất có hoạt tính sinh học của *Streptomyces* tối ưu là 25-35°C. Nghiên cứu của Singh và cộng sự [15] cho thấy, chủng *S. sannanensis* SU118 có nhiệt độ tối ưu cho sự sinh trưởng và sinh KS tốt nhất ở 28°C, trong khi chủng *Streptomyces* KGG32 có nhiệt độ tối ưu là 30°C [16].

Từ nghiên cứu sàng lọc các chủng có sinh các chất hoạt tính trước đó, chủng xạ khuẩn sống cùng hải miên có sinh các chất kháng khuẩn phổ rộng và được xác định là

Streptomyces sp. chủng HM9 [17]. Để hướng tới nghiên cứu sản xuất KS phổ rộng từ chủng xạ khuẩn biển tiềm năng này, chúng tôi tiến hành khảo sát môi trường dinh dưỡng nhằm tối ưu chủng HM9 với một số nguồn C và N khác nhau trên môi trường starch casein broth-SCB và pH 7,6 nuôi cấy ở nhiệt độ phòng, thử nghiệm kháng khuẩn với *Bacillus subtilis* ATCC 6633 và vi khuẩn gây bệnh cơ hội thuộc chi *Vibrio* phân lập từ nước biển tại khu vực nuôi cá bè trên vịnh Nha Trang.

2. Phương pháp nghiên cứu

Môi trường và nuôi cấy chủng HM9: môi trường SCB (g/l) gồm: KNO_3 (2), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,05), K_2HPO_4 (2), NaCl (2), CaCO_3 (0,02), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01), nguồn C (10 g/l) bao gồm: tinh bột, glucose, sucrose, maltose, lactose và nguồn N (0,3 g/l) bao gồm: Casein, urea, NH_4Cl , NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và pH=7,6±0,2 được dùng để khảo sát theo phương pháp một biến một lúc [18]. Chủng *Streptomyces* sp. HM9 nuôi trên môi trường Marine Agar (HiMedia, Ấn Độ) sau 5 ngày nuôi cấy ở 25°C được cấy chuyển sang các bình 250 ml chứa 100 ml môi trường SCB với các nguồn C và N khác nhau, nuôi cấy lắc 120 vòng/phút ở nhiệt độ phòng, thu dịch nuôi vào các ngày 3, 5 và 7 để thực hiện các thí nghiệm kháng khuẩn ngay sau khi thu. Dịch nuôi ly tâm 10.000 vòng/phút trong 5 phút ở 25°C để thu sinh khối, sinh khối được sấy đến khô ở 70°C trên giấy bạc trong lò ổn nhiệt (hot oven). Sinh khối khô được tính toán theo khối lượng trung bình cộng và độ lệch chuẩn (n=3).

Chuẩn bị các chủng kiểm định: cấy mới chủng kiểm định *B. subtilis* lên Nutrient Agar (NA). Lấy 2-4 khuẩn lạc cấy chuyển sang môi trường Marine Broth, nuôi lắc 120 vòng/phút ở 37°C cho đến khi đạt mật độ 10^6 cfu/ml theo tiêu chuẩn McFarland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ cfu/ml).

Phân lập xác định vi khuẩn thuộc chi *Vibrio*: vi sinh vật gây bệnh cơ hội Gram âm thuộc chi *Vibrio* được phân lập từ nước biển tại khu vực nuôi cá bè ở Hòn Miếu, vịnh Nha Trang [19] và được định danh qua phương pháp truyền thống [20] trên các môi trường chọn lọc cho *Vibrio* như Thiosulfatecitrate-bile salts-sucrose agar (TCBS) và CHROMagar™ *Vibrio* (Pháp). Ba chủng V1, V2, V3 được phân lập đến thuần trên TCBS, ghi kết quả về màu sắc hình dạng, sau đó được định danh tiếp theo với Chromagar được trình bày chi tiết tại [21]. Chủng V1 trên TCBS có màu vàng và trên Chromagar không màu, do đó V1 có thể thuộc loài *Vibrio alginolyticus*. Khuẩn lạc V2 trên TCBS màu xanh lá chuối và trên Chromagar màu xanh ngọc lam, do đó V2 được xác định là *Vibrio vulnificus*. Khuẩn lạc V3 trên TCBS màu xanh lá cây và trên Chromagar màu trắng, do đó chưa xác định được loài này, có thể do chủng V3 yếu nên không thể bắt màu chỉ thị của môi trường, hoặc chủng này không thuộc 4 loài mà môi trường Chromagar có thể định danh. Chủng kiểm định chuẩn *B. subtilis* và ba chủng V1, V2, V3 được giữ giống trên môi trường Marine Broth (HiMedia,

Ấn Độ) có 50% glycerol và lưu trữ ở -80°C tại Viện Hải dương học.

Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (Minimum Inhibitory Concentration - MIC) của KS làm đối chứng dương: KS rifampicin (BioRad, Pháp) được pha loãng trong môi trường Marine Broth vô trùng ở dải nồng độ giảm dần (64, 32, 16, 8 và 4 $\mu\text{g/ml}$) để tìm nồng độ thấp nhất ức chế vi sinh vật kiểm định [22]. Tại nồng độ 4 $\mu\text{g/ml}$ xác định có sự ức chế và được chọn làm đối chứng dương.

Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn: thử nghiệm 25, 50 và 100 μl dịch HM9 đối kháng lại với một lượng cố định 50 μl vi khuẩn kiểm định và dịch môi trường nuôi cấy tương ứng là 125, 100 và 50 μl sao cho đạt đến tổng thể tích cuối cùng là 200 μl /giếng. Mẫu trắng (blank) chỉ chứa môi trường nuôi cấy (200 μl), đối chứng dương là KS 150 μl (4 $\mu\text{g/ml}$) + 50 μl dịch vi khuẩn kiểm định, đối chứng âm chỉ có vi khuẩn kiểm định 200 μl . Thử nghiệm đánh giá dịch nuôi sau 3, 5, 7 ngày của chủng HM9 lên sự ức chế vi khuẩn kiểm định (*B. subtilis* và ba chủng *Vibrio* V1, V2, V3) trên đĩa ELISA 96 giếng sau 24 giờ nuôi ở nhiệt độ 25°C . Đo độ đục (OD) với máy đọc đĩa ELISA-iMark™ Microplate Absorbance Reader ở bước sóng 655 nm. Kết quả được xác định dựa trên số liệu đo OD tính toán với phần mềm MPN (Microplate Manager) tương ứng.

Xử lý số liệu: tất cả các thí nghiệm được thực hiện lặp lại 3 lần. Dữ liệu được biểu thị bằng giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn của giá trị trung bình của ba lần lặp lại. Kết quả được tính toán và xử lý thống kê theo phép thử Turkey-ANOVA, Kruskal Wallis-SPSS, và phần mềm R (Dunn) để so sánh các giá trị trung bình mẫu khác biệt đáng kể với nhau ở mức có ý nghĩa ($p \leq 0,05$) và biểu diễn ở dạng đồ thị sử dụng phần mềm Microsoft Excel 2013.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Ảnh hưởng của nguồn C đến sự sinh trưởng HM9

Kết quả ảnh hưởng của nguồn C khác nhau đến sinh trưởng của HM9 được thể hiện trong bảng 1.

Bảng 1. Sinh khối HM9 với các nguồn C sau 3, 5, 7 ngày nuôi cấy.

Nguồn C	Sinh khối ngày 3 (mg/ml)	Sinh khối ngày 5 (mg/ml)	Sinh khối ngày 7 (mg/ml)
Tinh bột	3,556 $\pm$ 0,619	4,333 $\pm$ 0,598	2,400 $\pm$ 0,577
Glucose	1,511 $\pm$ 0,694	2,067 $\pm$ 0,917	1,756 $\pm$ 0,668
Sucrose	0,200 $\pm$ 0,067	0,378 $\pm$ 0,139	0,200 $\pm$ 0,067
Maltose	3,444 $\pm$ 0,795	4,311 $\pm$ 0,648	1,467 $\pm$ 0,067
Lactose	2,489 $\pm$ 0,860	3,022 $\pm$ 0,379	1,711 $\pm$ 0,454

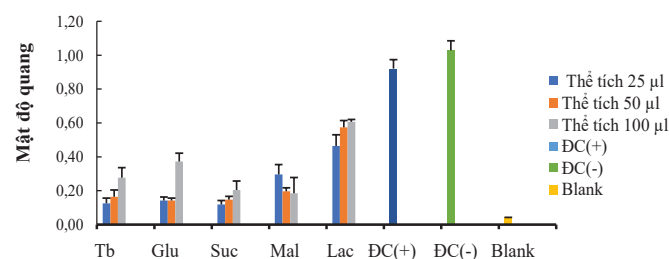
Các chữ cái a, b, c trong cùng một cột thể hiện sai khác có ý nghĩa thống kê theo phép thử Turkey tại cùng mốc thời gian ($p \leq 0,05$).

Nhìn chung, khi được nuôi cấy với các nguồn C khác nhau, chủng HM9 có cùng xu thế đạt sinh khối cao nhất tại ngày thứ 5. Nghiên cứu của S.H.A. Zahrani (2007) [23] cho

thấy, chủng *Streptomyces* J12 cho sinh khối cao nhất sau 6 ngày nuôi cấy với nguồn tinh bột, trong khi đó sucrose tạo ra sinh khối thấp nhất trong các nguồn C khảo sát. Các tác giả khác như I.M. Ababutai và cs (2013) [14], C. Singh và cs (2017) [6] công bố nguồn C là tinh bột thích hợp nhất cho sinh trưởng của *Streptomyces* khi so sánh với các nguồn khác như glucose, sucrose, maltose, fructose.

3.2. Ảnh hưởng của các nguồn C đến hoạt tính kháng khuẩn của HM9

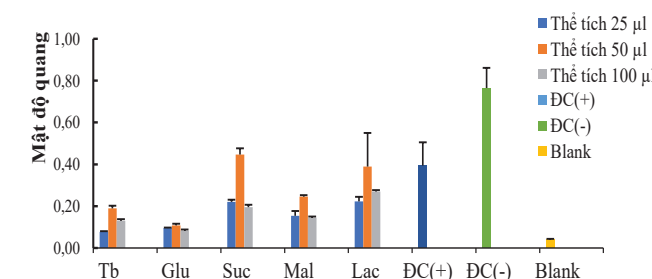
Chủng HM9 khi nuôi trong môi trường nuôi cấy có chứa các nguồn C khác nhau có sự khác nhau đáng kể về khả năng ức chế vi khuẩn *Vibrio* V1 và khác nhau ở cả 3 mức dịch 25, 50 và 100 μl (Kruskal-Wallis, $p=0,0007$). Khả năng kháng V1 tương đối tốt khi OD đo được ở cả 3 mức khảo sát thấp hơn rất nhiều và có sự sai khác có ý nghĩa so với đối chứng dương (KS+V1) (hình 1).



Hình 1. Ảnh hưởng của nguồn C đến khả năng kháng khuẩn chủng vi khuẩn *Vibrio* V1.

Tb: tinh bột, Glu: glucose, Suc: sucrose, Mal: maltose, Lac: lactose. KS+V1=ĐC(+): đối chứng dương, V1=ĐC(-): đối chứng âm, Blank: chỉ có môi trường.

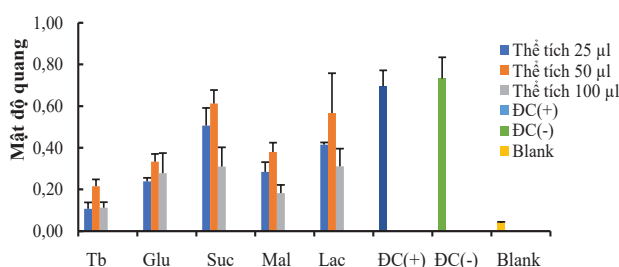
Khi nguồn C là sucrose thì mật độ vi khuẩn kiểm định đo được là thấp nhất so với các nguồn C khác. Điều này cho thấy sucrose là nguồn C thích hợp cho chủng HM9 sinh chất KS ức chế vi khuẩn kiểm định, tuy nhiên, xét về sinh khối (bảng 1) thì sucrose không phải là nguồn C tốt nhất cho sinh trưởng của HM9. Trong khi đó, tinh bột không chỉ thích hợp cho sinh trưởng mà còn thích hợp cho việc sản xuất chất kháng khuẩn ức chế V1.



Hình 2. Ảnh hưởng của nguồn C đến khả năng kháng khuẩn chủng vi khuẩn *Vibrio* V2.

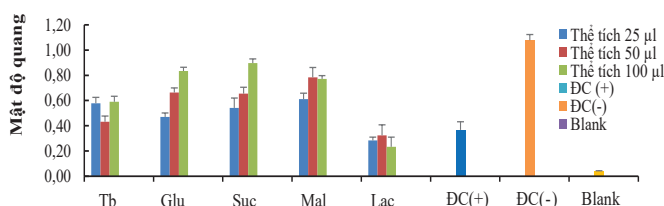
Tb: tinh bột, Glu: glucose, Suc: sucrose, Mal: maltose, Lac: lactose. KS+V2=ĐC(+): đối chứng dương, V2=ĐC(-): đối chứng âm, Blank: chỉ có môi trường.

Hình 2 cho thấy, đa số các nguồn C đều được HM9 sử dụng và thể hiện khả năng ức chế V2 ở mỗi nguồn ứng với mỗi thể tích là khác nhau và khác cả khi so với đối chứng dương (KS+V2) có ý nghĩa về mặt thống kê (Kruskal-Wallis, $p=0,00002$). Ở nguồn C là glucose với thể tích 25 và 100 μl có giá trị OD lần lượt là 0,096 ($p=0,05$) và 0,083 ($p=0,02$), nguồn tinh bột với thể tích 25 μl có giá trị OD 0,077 ($p=0,02$), giá trị OD của đối chứng dương 0,394. Nguồn C là tinh bột và glucose thích hợp cho khả năng sinh KS của chủng HM9 qua việc ức chế V2 tốt hơn các nguồn C khác như nguồn sucrose và khả năng ức chế này cao hơn cả KS rifampicin (đối chứng dương).



Hình 3. Ảnh hưởng của nguồn C đến khả năng kháng vi khuẩn *Vibrio* V3.
Tb: tinh bột, Glu: glucose, Suc: sucrose, Mal: maltose, Lac: lactose. KS+V3=ĐC(+): đối chứng dương, V3=ĐC(-): đối chứng âm, Blank: chỉ có môi trường.

Từ hình 3 cho thấy sự khác nhau về khả năng ức chế V3 khi nuôi với các nguồn C khác nhau ở cả 3 mức dịch thí nghiệm, sự khác nhau về khả năng ức chế V3 này có ý nghĩa về mặt thống kê (Kruskal-Wallis, $p=0,0002$). Chủng HM9 với nguồn C là tinh bột cho hoạt tính ức chế V3 tốt nhất với thể tích 100 và 25 μl dịch nuôi ($p=0,02$), maltose với thể tích 100 μl ($p=0,05$), glucose với thể tích 25 μl ($p=0,05$).



Hình 4. Ảnh hưởng của nguồn C đến khả năng kháng vi khuẩn *B. subtilis*

Tb: tinh bột, Glu: glucose, Suc: sucrose, Mal: maltose, Lac: lactose. KS+vi khuẩn *B. subtilis*=ĐC(+): đối chứng dương, vi khuẩn *B. subtilis*=ĐC(-): đối chứng âm, Blank: chỉ có môi trường.

Từ hình 4 cho thấy lactose là nguồn cacbon được HM9 sử dụng để sinh chất ức chế *B. subtilis* tốt hơn các nguồn khác. Cùng thể tích 100 μl thì lactose cho giá trị OD là 0,233, OD của sucrose và glucose lần lượt là 0,898 và 0,835, và sự sai khác này có ý nghĩa thống kê với $p=0,02<0,05$. So với lactose; sucrose, maltose và glucose cho kết quả ức chế thấp hơn, nhưng vẫn thể hiện tính kháng khuẩn có ý nghĩa so với đối chứng âm (Kruskal-Wallis, $p=0,00004<0,05$).

Một số nguồn C như tinh bột, maltose, sucrose, trehalose, xylose và glucose đã được thử nghiệm cho nghiên cứu sinh chất KS ở *Streptomyces* sp. AS4 phân lập từ trầm tích rừng ngập mặn, glucose là nguồn C thích hợp nhất cho chủng này sinh chất KS kháng lại *B. subtilis* [24]. Trong một nghiên cứu khác, galactose lại là nguồn C phù hợp nhất cho sự sinh trưởng cũng như sinh tổng hợp kanamycin của *S. kanamyceticus*, mặc dù dextrin, tinh bột hòa tan, và tinh bột khoai tây cho năng suất sinh khối cao hơn [25].

3.3. Ảnh hưởng của nguồn N đến sự sinh trưởng của HM9

Kết quả sinh khối (bảng 2) được thể hiện dưới dạng trung bình, độ lệch chuẩn ($n=3$). Qua bảng 2 cho thấy, nguồn N là $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ cho sinh khối cao nhất với $9,044\pm 1,826$ mg/ml và casein với $4,289\pm 1,212$ mg/ml sau 5 ngày nuôi cấy. Nguồn N là urea cho sinh khối thấp nhất so với các nguồn N khảo sát, có thể urea làm cho môi trường pH trở nên kiềm nên không phù hợp cho sinh trưởng của HM9. Chủng này có thể cần nhiều thời gian hơn (nhiều hơn 7 ngày) để đạt mật độ sinh trưởng cao nhất trong môi trường nuôi với urea. Tuy nhiên nghiên cứu này khảo sát thời gian chung cho tất cả các nguồn C và N trong thời gian thống nhất là 7 ngày.

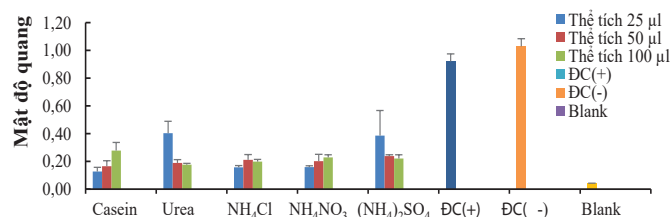
Bảng 2. Ảnh hưởng của các nguồn N đến sinh trưởng của HM9.

Nguồn N	Ngày 3 (mg/ml)	Ngày 5 (mg/ml)	Ngày 7 (mg/ml)
Casein	$3,555^b\pm 0,619$	$4,289^{ab}\pm 1,212$	$2,400^a\pm 0,577$
Urea	$0,800^a\pm 0,067$	$1,467^a\pm 0,657$	$2,402^a\pm 1,264$
NH_4Cl	$2,911^b\pm 0,582$	$7,200^{bc}\pm 1,752$	$4,689^b\pm 1,118$
NH_4NO_3	$2,022^a\pm 0,619$	$5,467^{bc}\pm 1,067$	$2,200^a\pm 0,529$
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$2,600^b\pm 0,917$	$9,044^c\pm 1,826$	$5,267^b\pm 0,306$

Các chữ cái a, b, c trong cùng một cột thể hiện sai khác trung bình mẫu có ý nghĩa thống kê giữa các nguồn N với nhau theo phép thử Turkey tại cùng thời điểm nuôi cấy ($p\leq 0,05$).

3.4. Ảnh hưởng của nguồn N đến khả năng kháng khuẩn của HM9

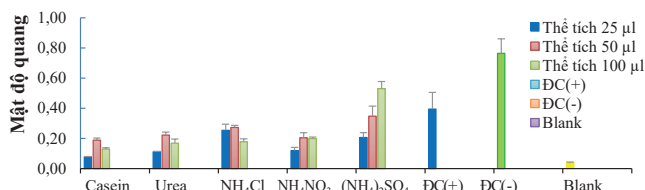
Kết quả ảnh hưởng của các nguồn N đến khả năng kháng chủng *Vibrio* V1 được trình bày trong hình 5. Các nguồn N được khảo sát đều có ảnh hưởng có ý nghĩa đến khả năng kháng khuẩn của chủng HM9, sự khác nhau ở các nhóm có ý nghĩa về mặt thống kê (Kruskal-Wallis; $p=0,0002$).



Hình 5. Ảnh hưởng của nguồn N đến khả năng kháng V1.

ĐC(+): đối chứng dương, gồm KS+vi khuẩn V1, ĐC(-): đối chứng âm, chỉ gồm vi khuẩn V2, Blank: chỉ có môi trường.

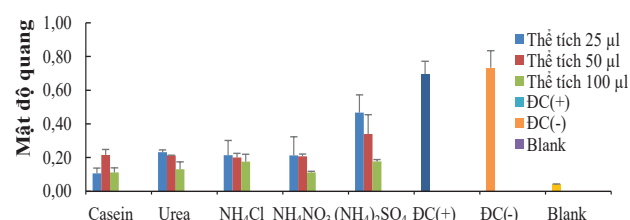
Giá trị OD đo được ở thể tích 25 μ l của casein là 0,126; nguồn N là NH_4Cl và NH_4NO_3 có giá trị OD lần lượt là 0,157 và 0,159; các giá trị này thấp hơn giá trị OD của đối chứng dương (KS+V1) là 0,921 và có ý nghĩa về mặt thống kê với p ở casein là $0,02 < 0,05$ và p của NH_4Cl và NH_4NO_3 là $0,05 \leq 0,05$. Từ hình 5 cho thấy, casein, NH_4Cl và NH_4NO_3 là các nguồn N thích hợp cho chủng HM9 sinh chất ức chế V1.



Hình 6. Ảnh hưởng của nguồn N đến khả năng kháng với chủng Vibrio V2.

DC(+): đối chứng dương, gồm KS+vi khuẩn V2, DC(-): đối chứng âm, chỉ gồm vi khuẩn V2, Blank: chỉ có môi trường.

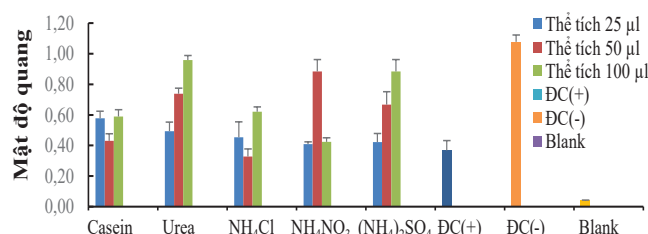
Hình 6 cho thấy, các nguồn N khác nhau trong môi trường nuôi HM9 với 3 thể tích khác nhau đều có khả năng ức chế được V2, đáng kể là sự khác biệt thể hiện rõ nhất và có ý nghĩa (Kruskal-Wallis; $p=0,00004$) với đối chứng âm (V2). Khi HM9 sử dụng casein làm nguồn N có giá trị OD đạt 0,77 ở thể tích 25 μ l so với OD của đối chứng dương (KS+V2) là 0,39 và sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ($p=0,03$). Các nguồn N được khảo sát đều cho thấy chủng HM9 sinh tổng hợp chất KS được sinh ra trong dịch nuôi, trừ trường hợp $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ở cả ba mức dịch khảo sát chỉ có mức thể tích 25 ml cho giá trị OD thấp hơn có ý nghĩa với đối chứng dương; với thể tích 100 μ l có giá trị OD là 0,53, cao hơn OD của đối chứng dương, nghĩa là KS có trong thể tích dịch khảo sát hoạt động kém hiệu quả hơn so với đối chứng dương, có thể $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ít thích hợp cho khả năng sinh chất KS của HM9.



Hình 7. Ảnh hưởng của nguồn N đến khả năng kháng V3.

DC(+): đối chứng dương, gồm KS+vi khuẩn V3, DC(-): đối chứng âm, chỉ gồm vi khuẩn V3, Blank: chỉ có môi trường.

Từ hình 7 cho thấy, HM9 sử dụng các nguồn N khác nhau ở mỗi thể tích khác nhau đều có khả năng ức chế được V3 (Kruskal-Wallis, $p=0,0003$). Trong đó, casein và NH_4NO_3 ở thể tích 100 μ l là các nguồn N tốt cho HM9 sinh chất ức chế V3 với giá trị OD lần lượt là 0,107 và 0,131 (OD của đối chứng dương là 0,695 với $p=0,03$). Điều này cho thấy casein và NH_4NO_3 là các nguồn N thích hợp cho HM9 sinh chất KS để ức chế V3.



Hình 8. Ảnh hưởng của nguồn N đến khả năng kháng B. subtilis.

DC(+): đối chứng dương gồm KS+vi khuẩn *B. subtilis*, DC(-): đối chứng âm, chỉ gồm vi khuẩn *B. subtilis*, Blank: chỉ có môi trường.

Hình 8 cho thấy, HM9 sử dụng các nguồn N khác nhau (tương ứng với các thể tích khác nhau) có khả năng ức chế *B. subtilis* so với đối chứng âm chỉ có vi khuẩn kiểm định *B. subtilis* (Kruskal-Wallis, $p=0,00005 < 0,05$, $n=3$). Tuy nhiên khả năng ức chế *B. subtilis* không cao hơn so với DC(+). Chỉ có nguồn NH_4Cl ở thể tích 50 μ l cho khả năng ức chế *B. subtilis* tốt với giá trị OD là 0,328, so với giá trị OD của đối chứng dương 0,433 giá trị này có ý nghĩa về mặt thống kê với $p=0,02 < 0,05$.

R. Haritha và cs (2012) [26] công bố $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ là nguồn N thích hợp cho sự sinh trưởng của xạ khuẩn *S. carpatensis* phân lập từ trầm tích biển. Đáng chú ý là ở nghiên cứu của D. Thakur và cs (2009) [27], xạ khuẩn cũng được tối ưu ở môi trường có pH và nhiệt độ nuôi cấy tương tự như nghiên cứu của chúng tôi, kết quả cho thấy urea không phải là nguồn N thích hợp cho sự sinh trưởng của *Streptomyces* sp. 201. Ở một nghiên cứu khác đã chỉ ra rằng, ammonium (NH_4^+) thích hợp cho sự sinh trưởng, tuy nhiên nồng độ cao ammonium có ảnh hưởng bất lợi đến việc sinh KS nystatin khi mà lượng phosphate và glucose vẫn còn trong môi trường nuôi. Khi lượng ammonium giảm dần trong môi trường nuôi (do vi sinh vật sử dụng) thì chúng sinh nhiều nystatin hơn. Trong khi đó, sodium nitrate (NaNO_3) kéo dài pha tiềm phát (lag phase) và do đó lượng nystatin được sinh ra thấp hơn 50% so với lượng nystatin được sinh ra khi chủng xạ khuẩn này được nuôi cấy với nguồn N là ammonium. Nystatin được sinh ra có liên quan chặt chẽ đến tốc độ sinh trưởng. Khi tốc độ sinh trưởng giảm thì lượng KS được sinh ra nhiều hơn [11]. Nguồn N vô cơ và hữu cơ gồm ammonium sulphate ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), cao thịt bò, peptone, cao nấm men và casein được dùng để tối ưu hóa dinh dưỡng cho sinh trưởng và sinh chất KS của chủng *Streptomyces* sp. AS4. Kết quả cho thấy, cao nấm men, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, cao thịt bò lần lượt là những nguồn N thích hợp cho chủng này sinh chất KS [24]. Do đó, tối ưu các chất dinh dưỡng chính là cung cấp các chất ban đầu khác nhau cho vi sinh vật để cho chúng sinh trưởng và phát triển, thông qua quá trình trao đổi chất để thu được các chất có hoạt tính sinh học khác nhau.

4. Kết luận

Tinh bột là nguồn C thích hợp cho sinh trưởng của HM9, đồng thời cũng là nguồn C thích hợp cho khả năng sinh chất KS kháng lại vi khuẩn *Vibrio*. Trong khi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ là nguồn N thích hợp cho sinh trưởng của HM9, casein là nguồn N thích hợp nhất cho sinh chất KS kháng *Vibrio*, và NH_4Cl là nguồn N thích hợp nhất cho HM9 sinh chất KS kháng vi khuẩn *B. subtilis* ATCC 6633. Khi sử dụng các nguồn C và N khác nhau, chủng HM9 cho khả năng đối kháng với hai chủng vi khuẩn kiểm định khác nhau. Điều đó cho thấy, chủng xạ khuẩn này có thể sinh ra những chất KS khác nhau hoặc những KS phổ rộng. Vì vậy, cần có những nghiên cứu tiếp theo về thành phần các chất trao đổi bậc hai được sinh ra, tinh sạch và phân tích cấu trúc các chất có hoạt tính kháng khuẩn từ chủng xạ khuẩn này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] R.E.D.L. Procópio, I.R.D. Silva, M.K. Martins, et al. (2012), "Antibiotics produced by *Streptomyces*", *The Braz. Jour. Infec. Diseases*, **16**(5), pp.466-471, DOI: 10.1016/j.bjid.2012.08.014.
- [2] R.F. Jennison, J.D.L. Jones (1957), "Treatment of monilial vaginitis: A clinical trial of nystatin", *Brit. Med. Jour.*, **1**(5011), pp.145-146, DOI: 10.1136/bmj.1.5011.145.
- [3] A.G. Ruiz, R.A. Seaton, K. Hamed (2016), "Daptomycin: An evidence-based review of its role in the treatment of Gram-positive infections", *Infect. Drug. Resist.*, **9**, pp.47-58, DOI: 10.2147/IDR.S99046.
- [4] B. Jia, Z.H. Jin, L.H. Mei (2008), "Medium optimization based on statistical methodologies for pristinemycin production by *Streptomyces pristinaespiralis*", *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **144**(2), pp.133-143, DOI: 10.1007/s12010-007-8012-3.
- [5] T.Y. Yun, R.J. Feng, D.B. Zhou, et al. (2018), "Optimization of fermentation conditions through response surface methodology for enhanced antibacterial metabolite production by *Streptomyces* sp. 1-14 from cassava rhizosphere", *PLOS ONE*, **13**(11), DOI: 10.1371/journal.pone.0206497.
- [6] C. Singh, R.S. Parmar, P. Jadon, et al. (2017), "Optimization of cultural conditions for production of antifungal bioactive metabolites by *Streptomyces* spp. isolated from soil", *Inter. Jour. of Curr. Microbi. and Appl. Sci.*, **6**(2), pp.386-396, DOI: 10.20546/ijcmas.2017.602.043.
- [7] W. Zhou, X. Liu, P. Zhang, et al. (2014), "Effect analysis of mineral salt concentrations on nosiheptide production by *Streptomyces actuosus* Z-10 using response surface methodology", *Molecules (Basel, Switzerland)*, **19**(10), pp.15507-15520, DOI: 10.3390/molecules191015507.
- [8] E.R. Stulberg, G.L. Lozano, J.B. Morin, et al. (2016), "Genomic and secondary metabolite analyses of *Streptomyces* sp. 2AW provide insight into the evolution of the cycloheximide pathway", *Front. Microbiol.*, **7**, DOI: 10.3389/fmicb.2016.00573.
- [9] H. Xia, X. Li, Z. Li, et al. (2020), "The application of regulatory cascades in *Streptomyces*: yield enhancement and metabolite mining", *Front. Microbiol.*, **11**, DOI: 10.3389/fmicb.2020.00406.
- [10] M.K. Majumdar, S.K. Majumdar (1967), "Utilization of carbon and nitrogen-containing compounds for neomycin production by *Streptomyces fradiae*", *Appl. Microbiol.*, **15**(4), pp.744-749, DOI: 10.1128/am.15.4.744-749.1967.
- [11] E. Jonsbu, T.E. Ellingsen, J. Nielsen (2000), "Effects of nitrogen sources on cell growth and production of nystatin by *Streptomyces noursei*", *J. Antibiot.*, **53**(12), pp.1354-1362, DOI: 10.7164/antibiotics.53.1354.
- [12] L. Hameed, R. Omran (2017), "Optimization of medium composition for antibacterial metabolite production from *Streptomyces* sp.", *Asia Jour. of Phar. and Cli. Res.*, **10**(9), pp.381-385, DOI: 10.22159/ajpcr.2017.v10i9.19813.
- [13] F.A. Ripa, F. Nikkon, S. Zaman, et al. (2009), "Optimal conditions for antimicrobial metabolites production from a new *Streptomyces* sp. RUPA-08PR isolated from Bangladeshi soil", *Mycobiology*, **37**(3), pp.211-214, DOI: 10.4489/MYCO.2009.37.3.211.
- [14] I.M. Ababutai, Z.K.A. Aziz, N.A.A. Meshhenn (2013), "Optimization of environmental and nutritional conditions to improve growth and antibiotic productions by *Streptomyces* sp. isolated from Saudi Arabia soil", *Inter. Res. Jour. of Microbi.*, **4**(8), pp.179-187, DOI: 10.14303/irjm.2013.042.
- [15] L.S. Singh, H. Sharma, N.C. Talukdar (2014), "Production of potent antimicrobial agent by actinomycete, *Streptomyces sannanensis* strain SU118 isolated from phoomdi in Loktak Lake of Manipur, India", *BMC. Microbiol.*, **14**, DOI: 10.1186/s12866-014-0278-3pp.
- [16] M. Oskay (2011), "Effects of some environmental conditions on biomass and antimicrobial metabolite production by *Streptomyces* sp. KGG32", *Inter. Jour. of Agri. and Bio.*, **13**(3), pp.317-324.
- [17] P.T. Mien, D.V. Ha, H.X. Ben, et al. (2020), "Antimicrobial activities of sponge-derived microorganisms from coastal waters of Central Vietnam", *Journal of Marine Science and Engineering*, **8**(8), DOI: 10.3390/jmse8080594.
- [18] M.A. Almalki (2020), "In-vitro screening and biosynthesis of secondary metabolites from a new *Streptomyces* sp. SA1 from a marine environment", *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **21**(13), pp.1333-1341, DOI: 10.2174/1389201021666200622120850.
- [19] P.T. Mien, N.K. Hanh, N.M. Hieu, et al. (2019), "A study on bacteria associated with three hard coral species from Ninh Thuan waters by epifluorescence and most diluted culture method", *Journal of Marine Science and Technology*, **19**(2), pp.271-283 (in Vietnamese).
- [20] N.L. Dung, D.X. Muom, N.P. Tien (1976), *Methods of Microbiology Research*, Science and Technology Publishing House, pp.184-199 (in Vietnamese).
- [21] L.K. Han (2019), *Survey of Some Factors in The Culture Environment of Streptomyces Sp. HMC-3 for Growth and Resistance to Bacillus Subtilis ATCC 6633 and Vibrio spp.*, Bachelor Thesis, Nha Trang University.
- [22] P. Sharma, M.C. Kalita, D. Thakur (2016), "Broad spectrum antimicrobial activity of forest-derived soil actinomycete, *Nocardia* sp. PB-52", *Frontiers in Microbiology*, **7**, DOI: 10.3389/fmicb.2016.00347.
- [23] S.H.A. Zahrani (2007), "Studies on the antimicrobial activity of *Streptomyces* sp. isolated from Jazan", *Inter. Jour. of Curr. Microbiol. and App. Sci.*, **19**, pp.127-138.
- [24] D.A.A. Farraj, R. Varghese, C. Vágvölgyi, et al. (2020), "Antibiotics production in optimized culture condition using low cost substrates from *Streptomyces* sp. AS4 isolated from mangrove soil sediment", *Jour. of King Saud Uni-Science*, **32**(2), pp.1528-1535, DOI: 10.1016/j.jksus.2019.12.008.
- [25] K. Basak, S.K. Majumdar (1973), "Utilization of carbon and nitrogen sources by *Streptomyces kanamyceticus* for kanamycin production", *Antimicrob. Agents Chemother.*, **4**(1), pp.6-10, DOI: 10.1128/AAC.4.1.6.
- [26] R. Hariitha, S.K. Kandula, A. Swathi, et al. (2012), "Characterization of marine *Streptomyces carpaticus* and optimization of conditions for production of extracellular protease", *Microbio. Jour.*, **2**(1), pp.23-35, DOI: 10.3923/mj.2012.23.35.
- [27] D. Thakur, T.C. Bora b, G.N. Bordoloi, et al. (2009), "Influence of nutrition and culturing conditions for optimum growth and antimicrobial metabolite production by *Streptomyces* sp. 201", *J. Mycol. Med.*, **19**(3), pp.161-167, DOI: 10.1016/j.mycmed.2009.04.001.