

# Nghiên cứu khả năng kháng vi sinh vật của các chủng vi khuẩn cộng sinh với tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng *Steinernema* sp. TĐ3 phân lập từ Tam Đảo, Vĩnh Phúc

Hoàng Thị Bích<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Phương<sup>1</sup>,  
Phạm Ngọc Tuyên<sup>2</sup>, Lê Thị Mai Linh<sup>3</sup>, Phan Kế Long<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Viện Hóa học các Hợp chất thiên nhiên;

<sup>2</sup> Quỹ phát triển KH&CN Quốc gia;

<sup>3</sup> Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật

## Đặt vấn đề

Ngày nay, nhờ sự có mặt của nhiều kháng sinh có tác dụng diệt khuẩn mạnh nên đã góp phần giải quyết được nhiều bệnh nhiễm trùng mắc phải. Tuy nhiên tỷ lệ đề kháng kháng sinh của vi khuẩn đang ngày càng tăng cao (ở Mỹ: khoảng 70%)<sup>[1,2]</sup>. Chính vì vậy, ngoài những kháng sinh tổng hợp, kháng sinh bán tổng hợp, kháng sinh tự nhiên đang có mặt trên thị trường thì ngành công nghiệp dược phẩm đang tìm kiếm những chất kháng vi sinh vật từ những nguồn gốc khác vừa có hiệu lực cao, vừa có hoạt phổ rộng mà lại thân thiện với môi trường.

Các vi khuẩn cộng sinh với tuyến trùng ký sinh gây bệnh với côn trùng (Entomopathogenic Nematodes - EPN) đang là đối tượng nghiên cứu mới của các nhà khoa học về khả năng sinh chất kháng khuẩn, kháng nấm khi chúng có khả năng ngăn chặn các vi sinh vật khác xâm nhập vào xác chết côn trùng vật chủ nhằm bảo vệ nguồn thức ăn cho tuyến trùng. Chính vì vậy, tiến hành nghiên cứu phân lập các vi khuẩn cộng sinh tuyến trùng *Steinernema* sp. TĐ3 từ Tam Đảo, Vĩnh Phúc với mong muốn tìm kiếm những chủng vi khuẩn có khả năng kháng khuẩn, kháng nấm hoạt phổ rộng và hiệu lực cao phục vụ trong y dược và nông nghiệp.

## Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

### Vật liệu

### Tuyến trùng

Tuyến trùng *Steinernema* sp. TĐ3 phân lập ở Tam Đảo, Vĩnh Phúc: ấu trùng bươm sấp lớn

(*Galleria mellonella*) (BSL) do phòng Tuyến trùng học - Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật - Viện KH&CNVN cung cấp.

Vi sinh vật kiểm định (VSVKD)

- Vi khuẩn Gram (-): *Escherichia coli* ATCC 25922

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25923

- Vi khuẩn Gram (+): *Bacillus subtilis* ATCC 27212

*Staphylococcus aureus* ATCC 12222

- Nấm sợi: *Aspergillus niger* (439)

*Fusarium oxysporum* (M42)

- Nấm men: *Candida albicans* (SH 20)

*Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 7754)

### Môi trường

Môi trường phân lập vi khuẩn cộng sinh (Môi trường NBTA)<sup>[3]</sup>

Tryptone 1%, cao nấm men 0.5%, NaCl 0.5%, bromothymol blue (BTB) 0.0025%, triphenyltetrazolium chlorid (TTC) 0.004%, agar 1.5%, pH7.

Khử trùng ở 1atm/30 phút, để nguội môi trường < 50°C mới bổ sung TTC

Môi trường nuôi cấy vi khuẩn cộng sinh (Môi trường LB)<sup>[3]</sup>

Tryptone 1%, cao nấm men 0.5%, NaCl 0.5%, agar 1.5%, pH 7

Khử trùng ở 1atm/30 phút

Môi trường nuôi cấy vi sinh vật kiểm định (VSVKD)<sup>[4]</sup>

- Môi trường MPA (đối với vi khuẩn)

Cao thịt 0.3%, pepton 1%, NaCl 0.5%, agar 1.5%, pH 7

# ● Nghiên cứu - Kỹ thuật

Khử trùng ở 1atm trong 30 phút

- Môi trường Sabouraud (đối với nấm)

Glucose 3%, pepton 1%, 3, agar 1,5%; pH 5-6.

Khử trùng ở 0,8 atm trong 30 phút.

**Các phương pháp nghiên cứu** <sup>[3,4,5]</sup>

**Phương pháp xâm nhiễm tuyến trùng vào ấu trùng BSL**

Ấu trùng xâm nhiễm (IJs) thường được bảo quản lạnh ở 12 -14°C nên trước khi nhiễm nên để IJs ấm dần lên tới nhiệt độ phòng (20 - 24°C).

Tiến hành gây nhiễm khoảng 50-60 tuyến trùng/ấu trùng BSL. Để trong tối ở 25-28°C. Sau 24, 48h. Thu những ấu trùng BSL đã chết để phân lập VKCS và thu IJs bằng phương pháp Whitetrap để giữ nguồn tuyến trùng cho các nghiên cứu tiếp theo.

**Phương pháp phân lập vi khuẩn cộng sinh**

Ấu trùng bướm sấp lớn chết sau 24 -48h được chuyển vào một cốc thủy tinh và rửa bằng cồn 70% trong 5 -10 phút. Mổ xác chết bằng panh kẹp lột nhẹ phần lưng của xác sâu, chú ý không làm vỡ ruột ấu trùng bướm sấp lớn để tránh nhiễm. Dùng que cấy vòng đã vô trùng dưới ngọn lửa đèn cồn lấy một giọt huyết tương rồi cấy zic zắc trên đĩa petri có chứa môi trường NBTA. Nuôi cấy trong tủ ấm ở 30°C, sau 24 - 48 h quan sát khuẩn lạc thu được.

**Phương pháp thử sơ bộ hoạt tính kháng VSVKĐ**

Vi khuẩn cộng sinh được cấy trên môi trường NBTA và nuôi trong tủ ấm 30°C, 48-72h. Dùng khoan nút chai đục lấy các thỏi thạch chứa VKCS trên bề mặt, đặt chúng vào đĩa petri có chứa 2% VSVKĐ. Để các đĩa này trong tủ lạnh 12h cho chất kháng sinh khuếch tán vào môi trường thạch, sau đó đặt vào tủ ấm 37°C đối với vi khuẩn, đọc kết quả sau 24h; tủ ấm 30°C đối với nấm và đọc kết quả sau 48h. Hoạt tính kháng VSV được xác định theo đường kính vòng vô khuẩn (D-d, mm): D là đường kính vòng vô khuẩn, d là đường kính thỏi thạch.

**Thử hoạt tính kháng VSVKĐ bằng phương pháp đục lỗ thạch**

Các chủng VKCS được nuôi trong môi trường LB, phân phối môi trường có chứa 2% VSVKĐ vào đĩa petri dày khoảng 0,8 -1 cm. Xấy khô mặt thạch trong box cấy 45 phút. Sau đó, dùng que đục lỗ có đường kính 1cm đục lỗ

trong đĩa thạch. Bơm dịch nuôi cấy các chủng VKCS tuyến trùng đã ly tâm vào lỗ thạch sao cho dịch không tràn lên miệng lỗ. Để các đĩa thạch vào trong tủ lạnh 4°C trong 12h để cho dịch nuôi cấy khuếch tán vào thạch. Sau đó, chuyển các đĩa thạch sang tủ ấm 37°C/24h với vi khuẩn và 30°C/48h đối với nấm men. Quan sát và đo vòng vô khuẩn xung quanh lỗ thạch.

Khả năng kháng khuẩn và kháng nấm gây bệnh được xác định bằng hiệu số (D-d) giữa đường kính vòng vô khuẩn (D) và đường kính của lỗ thạch (d).

**Phương pháp tách chiết hoạt chất kháng VSVKĐ**

- Thu nhận cặn chiết từ dịch lên men của các chủng VKCS

Tiến hành lên men 500 ml dịch với 5 % dịch men giống trong 3 ngày ở 30°C. Thu dịch nuôi cấy và chiết 3 lần ở nhiệt độ phòng với dung môi ethylacetat (EtOAc) theo tỷ lệ 1:1. Loại bỏ dung môi để thu được cặn chiết EtOAc.

- *Xác định hoạt tính kháng VSVKĐ của cặn chiết EtOAc theo phương pháp pha loãng liên tục*

Hoạt tính kháng vi sinh vật của cặn chiết EtOAc được tiến hành trên phiến vi lượng 96 giếng (96-well microtiter plate) theo phương pháp pha loãng liên tục của Vanden Bergher và Vlietlink <sup>[6]</sup>.

- Đối chứng dương:

+ Ampicilin cho vi khuẩn Gr (+)

+ Tetracyclin cho vi khuẩn Gr (-)

+ Nystatin hoặc Amphotericin B cho nấm sợi và nấm men.

Kháng sinh pha trong DMSO 100% với nồng độ thích hợp: Ampicilin 50nM, tetracyclin 10 mM, nystatin 0,04 mM

- Đối chứng âm: Vi sinh vật kiểm định không trộn kháng sinh và chất thử.

- Tiến hành thí nghiệm:

Các chủng kiểm định được hoạt hóa và pha loãng tới nồng độ 0,5 đơn vị Mc Fland rồi tiến hành thí nghiệm trên các phiến thí nghiệm.

Chủng có hoạt tính sau sàng lọc ban đầu được pha loãng theo các thang nồng độ thấp dần, từ (5-10) thang nồng độ để tính giá trị nồng độ tối thiểu mà ở đó vi sinh vật bị ức chế phát triển gần như hoàn toàn.

Mẫu thô có MIC ≤ 200 µg/ml; mẫu tinh có MIC ≤ 50 µg/ml là có hoạt tính.

**Kết quả và thảo luận**

**Phân lập vi khuẩn cộng sinh với tuyến trùng *Steinernema* sp.**

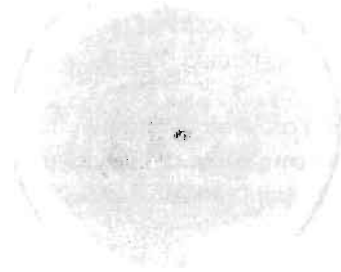
Gây nhiễm IJs của tuyến trùng *Steinernema* sp. TĐ3 phân lập từ Tam Đảo – Vĩnh Phúc cho BSL với mật độ 50-60 IJs/sâu. Kết quả cho thấy, sau 24h thì sâu bắt đầu chết, xác ấu trùng BSL sẽ có màu vàng nâu, không có mùi thối và mềm, dai khi gấp bằng kẹp và tỷ lệ chết là 100% sau 48h.

Các xác ấu trùng BSL được sử dụng để phân lập VKCS. Trong nhiều lần lặp lại, thu được các vi khuẩn ở 2 pha:

- Pha sơ cấp có đặc điểm: khuẩn lạc tròn lồi, màu xanh lá cây, mép viền có răng cưa. Khi cấy trong môi trường NBTA có chứa 0,8% agar thì các vi khuẩn có khả năng di động nên tạo nhu động (swarming) xung quanh khuẩn lạc. Vùng quanh khuẩn lạc trong, một phần agar bị biến màu<sup>[3]</sup>.

- Pha thứ cấp có đặc điểm: khuẩn lạc tròn, lồi và màu đỏ nâu sẫm, không tạo thành vòng vùng trong suốt xung quanh khuẩn lạc khi cấy trong môi trường chứa 0,8% agar.

Theo các nghiên cứu trước đây, chỉ có những khuẩn lạc ở pha sơ cấp là có khả năng sinh các sản phẩm trao đổi chất thứ cấp nên được chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 1: Pha sơ cấp của VKCS



Hình 2: Pha thứ cấp của VKCS

**Sàng lọc sơ bộ khả năng kháng VSVKD**

Các chủng VKCS ở pha sơ cấp được thử khả năng kháng 8 chủng VKKD theo phương pháp thời thạch. Kết quả được chỉ ra ở bảng 1.

**Bảng 1: Kết quả kiểm tra sơ bộ khả năng kháng VSVKD của các chủng VKCS**

Chủng	Hoạt tính kháng VSVKD (D-d, mm)							
	Vi khuẩn Gr (-)		Vi khuẩn Gr (+)		Nấm men		Nấm mốc	
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>A. niger</i>	<i>F. oxysporum</i>
X <sub>TD</sub> 1	-	-	-	-	-	-	-	-
X <sub>TD</sub> 2	-	-	-	-	-	-	+	+
X <sub>TD</sub> 3	++	+	+++	-	-	+	++	++
X <sub>TD</sub> 4	-	-	+	+++	-	++	-	-
X <sub>TD</sub> 5	++	+	+	++	-	-	-	-
X <sub>TD</sub> 6	+	-	-	-	-	+	-	-
X <sub>TD</sub> 7	-	-	-	-	-	-	-	-
X <sub>TD</sub> 8	+++	+	+++	+++	-	-	+	+
X <sub>TD</sub> 9	-	-	-	-	-	-	-	-
X <sub>TD</sub> 10	++	-	-	++	+	-	++	+++
X <sub>TD</sub> 11	+++	-	++	++	-	+	+	-
X <sub>TD</sub> 12	-	-	-	-	-	-	-	-
X <sub>TD</sub> 13	++	+	-	-	-	+	-	-
X <sub>TD</sub> 14	+++	-	++	++	-	-	++	+
X <sub>TD</sub> 15	-	-	-	-	-	-	-	-
X <sub>TD</sub> 16	-	-	-	-	+	++	-	-
X <sub>TD</sub> 17	-	-	++	++	-	-	++	++
X <sub>TD</sub> 18	+++	-	+++	+++	-	-	+++	+++
X <sub>TD</sub> 19	++	+	+	+	-	-	-	-
X <sub>TD</sub> 20	-	-	-	-	-	-	-	-

Ghi chú: D: Đường kính vòng vô khuẩn; d: đường kính thời thạch; -: Không có hoạt tính; ++: Hoạt tính khá mạnh (5 mm ≤ D-d < 10 mm); +: Hoạt tính yếu (D-d < 5 mm); +++: Hoạt tính rất mạnh (D-d > 10 mm)

# ● Nghiên cứu - Kỹ thuật

Kết quả ở bảng 1 cho thấy trong tổng cộng 20 chủng phân lập được thì có đến 14/20 chủng VKCS có khả năng kháng từ 1 đến 8 loại VSVKĐ. Trong 20 x 8 = 160 lần thử thì tỷ lệ dương tính là 56/160 = 0,35%. Điều này chứng tỏ tiềm năng kháng VSV gây bệnh của các chủng VKCS với *Steinernema* sp. TĐ3. Đáng chú ý là các chủng VKCS kháng mạnh với các chủng vi khuẩn *E. coli*; *B. subtilis*, *S. aureus*, *A. niger* và *F. oxysporum*; kháng yếu hoặc hầu như không có khả năng kháng được *P. aeruginosa*, và 2 chủng nấm men.

Trong số 20 chủng đã phân lập, lựa chọn được 5 chủng có hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm tốt (kháng từ 5 loại VSVKĐ trở lên) là X<sub>TD</sub>3, X<sub>TD</sub>8, X<sub>TD</sub>10, X<sub>TD</sub>14, X<sub>TD</sub>17, X<sub>TD</sub>18 để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo.

## Khả năng kháng VSVKĐ bằng phương pháp đục lỗ thạch

Các chủng vi khuẩn cộng sinh được nuôi cấy trong môi trường LB lỏng, ở 30°C, sau 3 ngày ly tâm, lấy dịch trong và thử hoạt tính bằng phương pháp đục lỗ thạch. Đo đường kính vòng phân giải thu được kết quả chỉ ra ở bảng 2.

**Bảng 2:** Khả năng kháng khuẩn, kháng nấm của vi khuẩn cộng sinh

Chủng	Hoạt tính kháng VSVKĐ (D-d, mm)							
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>A. niger</i>	<i>F. oxysporum</i>
X <sub>TD</sub> 3	15	3	19	0	0	3	10	9
X <sub>TD</sub> 8	18	6	18	17	0	0	5	4
X <sub>TD</sub> 10	14	0	0	13	6	0	12	18
X <sub>TD</sub> 11	20	0	12	16	0	7	4	4
X <sub>TD</sub> 14	18	0	13	15	0	0	12	4
X <sub>TD</sub> 18	22	0	21	22	0	0	17	18

Kết quả từ bảng 2 cho thấy các chủng VKCS phân lập được đều là những chủng kháng VSVKĐ mạnh. Đặc biệt là chủng X<sub>TD</sub>18 có khả năng kháng mạnh với 5 chủng VSVKĐ và được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

## Thu nhận cặn chiết từ dịch lên men của các chủng VKCS

Tiến hành lên men 500 ml dịch với 5% dịch men giống X<sub>TD</sub>18 trong 3 ngày ở 30°C. Sau đó

chiết với ethylacetat (EtOAc) thu được cặn chiết EtOAc có màu vàng nghệ, thu được 0,96g/500ml dịch lên men.

## Hoạt tính kháng VSVKĐ từ cặn chiết EtOAc

Mẫu cặn chiết EtOAc được gửi tới phòng Sinh học thực nghiệm - Viện Hóa học các Hợp chất thiên nhiên để thử hoạt tính bằng phương pháp pha loãng liên tục trên phiến vi lượng 96 giếng. Kết quả được chỉ ra ở bảng 3.

**Bảng 3:** Hoạt tính kháng VSVKĐ từ cặn chiết EtOAc

Chủng	Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC: µg/ml)							
	<i>E.coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>A. niger</i>	<i>F. oxysporum</i>
X <sub>TD</sub> 18	50	-	50	50	-	-	100	100

Mẫu X<sub>TD</sub> 18 là chủng có biểu hiện hoạt tính cao kháng 5/8 VSVKĐ và phù hợp với các kết quả nghiên cứu định tính.

## Kết luận

Từ mẫu tuyến trùng *Steinernema* sp.TĐ3 phân lập từ Tam Đảo, Vĩnh Phúc đã phân lập được các chủng vi khuẩn cộng sinh có khả năng kháng khuẩn, kháng nấm mạnh.

Đã thử hoạt tính kháng vi sinh vật của các chủng vi khuẩn cộng sinh và tìm được chủng X<sub>TD</sub>18 có khả năng kháng mạnh với 5/8 loại vi sinh vật kiểm định với nồng độ ức chế tối thiểu MIC ≤ 100 µg/ml.

## Summary

20 strains of symbiotic bacteria (bacterial symbionts) on the entomopathogenic nematode species *Steinernema* sp. TD3 found in Tam Dao (Vinh Phuc) were isolated. Laboratory evaluation detected X<sub>TD</sub>18 strain having high antimicrobial potential against 5/8 fungal and bacterial species with MIC ≤ 100 µg/ml (crude extract). These bacterial strains should be subjected to further study for isolation of active compounds.

**Keywords:** Antimicrobial, entomopathogenic nematodes, symbiotic bacteria.