

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG KHÁNG KHUẨN CỦA *Streptomyces* spp. ĐỐI VỚI MỘT SỐ VI KHUẨN GÂY BỆNH TRÊN RAU QUẢ SAU THU HOẠCH

Nguyễn Thy Đan Huyền*, Nguyễn Thị Thủy Tiên, Nguyễn Hiền Trang,
Lê Thanh Long

Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

*Tác giả liên hệ: nguyenthidanhuyen@huaf.edu.vn

Nhận bài: 21/04/2023 Hoàn thành phản biện: 13/06/2023 Chấp nhận bài: 21/06/2023

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá khả năng kháng của 50 chủng xạ khuẩn *Streptomyces* đối với bệnh đốm đen trên quả cam do *Pseudomonas syringae* P01 gây ra, bệnh thối mềm trên quả cà chua do *Pectobacterium carotovorum* Ecc4 và bệnh thối mềm trên quả đu đủ do *Erwinia papayae* M16 gây ở điều kiện *in vitro* bằng phương pháp kẻ vạch vuông góc. Có 33, 19 và 17 chủng thể hiện khả năng kháng vi khuẩn tương ứng đối với *P. syringae* P01, *P. carotovorum* Ecc4 và *E. papayae* M16. Trong đó, chủng *Streptomyces murinus* NARZ thể hiện khả năng kháng mạnh nhất đối với cả 3 chủng vi khuẩn gây bệnh. Khả năng kháng khuẩn của dịch nổi (CFS) thu được từ *S. murinus* NARZ được xác định bằng phương pháp khuếch tán qua giếng thạch, đường kính vòng kháng khuẩn đạt $20,90 \pm 0,91$; $23,53 \pm 0,79$ và $26,52 \pm 0,53$ mm tương ứng với các vi khuẩn *P. syringae* P01, *P. carotovorum* Ecc4 và *E. papayae* M16. Kết quả khảo sát độ bền nhiệt (30, 60, 90 và 121°C/15 phút) và bền pH (5, 6, 7, 8, 9) của CFS thu nhận từ *S. murinus* NARZ cho thấy chúng vẫn duy trì khả năng kháng khuẩn tốt khi xử lý ở nhiệt độ 121°C trong 15 phút và pH trong khoảng 5 - 7 đối với cả 3 chủng vi khuẩn khảo sát. Kết quả của nghiên cứu này có ý nghĩa trong việc sử dụng các chủng *Streptomyces* có khả năng sinh kháng sinh tự nhiên như tác nhân kiểm soát sinh học trong bảo quản rau quả sau thu hoạch.

Từ khóa: Bệnh sau thu hoạch, Độ bền nhiệt, Độ bền pH, Kháng khuẩn, *Streptomyces murinus*

EVALUATION OF ANTIBACTERIAL ACTIVITIES of *Streptomyces* spp. AGAINST PATHOGENIC BACTERIAL CAUSING POST-HARVEST DISEASES ON FRUITS AND VEGETABLES

Nguyen Thy Dan Huyen*, Nguyen Thi Thuy Tien, Nguyen Hien Trang,
Le Thanh Long

University of Agriculture and Forestry, Hue University

ABSTRACT

This study was carried out to evaluate the antibacterial activities of 50 strains of *Streptomyces* against *Pseudomonas syringae* P01, causing black pit disease on orange, *Pectobacterium carotovorum* Ecc4 causing soft rot disease on tomato, and *Erwinia papayae* M16 causing the soft rot disease on papaya using perpendicular streak method. The number of strains showing antagonistic activities against *P. syringae* P01, *P. carotovorum* Ecc4, and *E. papayae* M16 were 33, 19, and 17, respectively. Among these, the *Streptomyces murinus* NARZ strain showed the strongest antibacterial activities against all three pathogen bacteria. The antibacterial diameters were 20.90 ± 0.91 , 23.53 ± 0.79 , and 26.52 ± 0.53 mm associated with *P. syringae* P01, *P. carotovorum* Ecc4, and *E. papayae* M16, respectively. The tests of the heat stability (30, 60, 90 and 121°C/15 min) and pH stability (5, 6, 7, 8, 9) of the CFS obtained from *S. murinus* NARZ indicated that they maintained good antibacterial activities when treated at 121°C for 15 minutes and pH in the range of 5-7 for all three tested bacteria. This study implied that *Streptomyces* sp. synthesizes natural antibiotic compounds as biocontrol agents in the post-harvest preservation of fruits and vegetables.

Keywords: Antibacterial activity, Heat stability, pH stability, Post-harvest diseases, *Streptomyces murinus*

1. MỞ ĐẦU

Rau quả tươi đóng vai trò quan trọng đối với dinh dưỡng của con người với hàm lượng vitamin B, C, K cao và giàu khoáng chất như canxi, kali, magiê và chất xơ phong phú (Yahia và cs., 2019). Trên toàn thế giới, sản lượng rau quả tươi đã tăng 30% trong những năm qua (Hess và Sutcliffe, 2020). Tuy nhiên, trên rau quả hiện nay thường tồn tại những tác nhân gây bệnh do vi khuẩn và nấm ảnh hưởng đến chất lượng của rau quả, làm rau quả nhanh hư hỏng (Gram và cs., 2002). Điển hình như các bệnh do vi khuẩn và nấm gây ra trên cam làm ảnh hưởng đến năng suất và chất lượng của quả sau thu hoạch (Trần Bảo Trâm và cs., 2021), sự thối rữa bệnh lý do nấm hoặc vi khuẩn gây ra làm quả yếu đi và ảnh hưởng đến khả năng chín của quả (Kassim và cs., 2020). Trên cà chua, vi khuẩn *Erwinia* sp. có thể xâm nhập vào cây qua các vết thương hoặc thông qua các khe hở tự nhiên trên bề mặt thực vật do xây xước, côn trùng. Vi khuẩn khi xâm nhập vào vết thương của quả cà chua sẽ sinh trưởng và nhân lên, sản sinh ra các enzyme phá vỡ thành tế bào, làm mềm mô và chảy dịch, dịch này cung cấp chất dinh dưỡng cho vi khuẩn phát triển. Vi khuẩn tiếp tục di chuyển, tiết ra enzyme và gây thối nhũn quả cà chua (Doolotkeldieva và cs., 2016). Vi khuẩn *Erwinia papayae* gây bệnh thối nhũn trên quả đu đủ cũng đã được báo cáo từ nhiều nguồn trên thế giới (Gardan và cs., 2004) với triệu chứng gồm các đốm đen trên quả, quả bị mềm nhũn dẫn đến thối quả (Maktar và cs., 2008). Những bệnh này do vi sinh vật gây ra làm ảnh hưởng đến nguồn cung rau quả và lương thực của thế giới (Pacios - Michelena và cs., 2021).

Thuốc trừ sâu hóa học và thuốc kháng sinh đã được sử dụng từ lâu để phòng chống lại các bệnh do vi khuẩn ở thực vật.

Tuy nhiên, việc sử dụng các hợp chất này gây ra một số vấn đề như tăng khả năng kháng thuốc của mầm bệnh, đất nhiễm mặn và ô nhiễm môi trường (Rodríguez và cs., 2020). Do đó việc tìm kiếm các tác nhân kháng vi sinh vật mới để kiểm soát vi khuẩn và nấm bệnh trên thực vật thay thế, thân thiện với môi trường và ít phụ thuộc vào hóa chất là một điều cần thiết. Hiện nay, sử dụng các chất hoạt tính sinh học từ vi sinh vật đang là một biện pháp đầy tiềm năng nhằm kiểm soát nhóm tác nhân nấm và vi khuẩn gây bệnh sau thu hoạch (Trần Bảo Trâm và cs., 2021).

Xạ khuẩn được coi là tác nhân kiểm soát sinh học trong nông nghiệp do có khả năng sinh nhiều hoạt chất được sử dụng để kiểm soát vi khuẩn và vi nấm gây bệnh thực vật (Schrey và Tarkka, 2008). Chúng có khả năng tiết các chất chuyển hóa thứ cấp ức chế sinh trưởng (kháng sinh, độc tố, chất hoạt động bề mặt, chất dễ bay hơi), có thể ngăn chặn hoặc tiêu diệt vi sinh vật khác (Hibbing và cs., 2010). Các loài xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces* được xem là nguồn sản xuất chất kháng sinh nhiều nhất (Qin và cs., 1994).

Mặc dù xạ khuẩn chi *Streptomyces* được xem như là tác nhân có hoạt tính sinh học mạnh, có tiềm năng kháng nấm, kháng khuẩn trong lĩnh vực nông nghiệp nhưng việc sử dụng chúng như là một tác nhân kiểm soát một số bệnh hại do vi khuẩn gây ra trên rau quả vẫn chưa được nghiên cứu một cách đầy đủ. Mục tiêu của nghiên cứu này là tìm kiếm các chủng *Streptomyces* có khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh như bệnh đốm đen trên cam, thối nhũn trên cà chua và đu đủ, đồng thời đánh giá độ bền nhiệt độ và độ bền pH của dịch nổi thu nhận từ các chủng *Streptomyces* được chọn ở điều kiện *in vitro*.

2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung

Vi khuẩn *Pseudomonas syringae* P01 gây bệnh đốm đen trên cam, *Pectobacterium carotovorum* Ecc4 gây bệnh thối nhũn trên cà chua, *Erwinia papayae* M16 gây bệnh thối mềm trên đu đủ và 50 chủng *Streptomyces* được cung cấp bởi phòng Thí nghiệm vi sinh, khoa Cơ khí và Công nghệ, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Sàng lọc sơ bộ khả năng kháng khuẩn của các chủng *Streptomyces*

Sàng lọc khả năng kháng khuẩn của các chủng *Streptomyces* sp. bằng cách sử dụng kỹ thuật cấy vệt vuông góc theo mô tả của Dezfully và Ramanayaka (2015). Các chủng *Streptomyces* được cấy vệt ở tâm đĩa Petri (rộng khoảng 1,5 cm, dài bằng đường kính đĩa) có chứa môi trường ISP4 (International Streptomyces Project 4), các đĩa được ủ ở 28 - 30°C trong 4 - 5 ngày. Sau đó, vi khuẩn gây bệnh được cấy vệt vuông góc với vệt *Streptomyces*. Ủ đĩa ở 30°C, sau 24 giờ, xác định khả năng kháng khuẩn của các chủng *Streptomyces* dựa trên việc quan sát sự phát triển của vi khuẩn trên đĩa. Sàng lọc, tuyển chọn các chủng *Streptomyces* có hoạt tính kháng khuẩn mạnh dựa trên khoảng cách ức chế sự phát triển của vi khuẩn, tính từ vệt khuẩn lạc *Streptomyces* đến vị trí vi khuẩn có thể phát triển. Chủng *Streptomyces* có khả năng kháng mạnh khi chúng ức chế gần như hoàn toàn sự phát triển của vi khuẩn; kháng yếu khi chúng chỉ ức chế một phần sự phát triển của vi khuẩn, vi khuẩn vẫn có thể phát triển về phía vệt *Streptomyces*. Chủng *Streptomyces* không có khả năng kháng là chủng mà vi khuẩn có khả năng phát triển

đến rìa khuẩn lạc của *Streptomyces*.

2.2.2. Thu dịch nổi không chứa tế bào (Cell Free Supernatant_CFS)

Sau khi sàng lọc, tuyển chọn được chủng *Streptomyces* có khả năng kháng khuẩn mạnh nhất, nuôi cấy chủng *Streptomyces* đã chọn trong bình tam giác 250 ml có 100 ml môi trường ISP4 trên máy lắc (180 vòng/ phút) ở nhiệt độ $28 \pm 2^\circ\text{C}$ trong 7 ngày. Ly tâm dịch nuôi cấy ở 4°C (10.000 vòng/phút) trong 15 phút, thu sinh khối và dịch nổi. Phần dịch nổi được lọc qua màng lọc có kích thước lỗ lọc 0,22 μm để loại bỏ tế bào, thu dịch nổi không chứa tế bào (CFS) để xác định khả năng kháng khuẩn của chủng *Streptomyces* (Tendulkar và cs., 2003).

2.2.3. Xác định độ bền nhiệt và bền pH của CFS

Độ bền nhiệt độ và pH về khả năng kháng khuẩn của CFS cũng được xác định dựa trên phương pháp khuếch tán giếng thạch. Đối với thí nghiệm khảo sát độ bền nhiệt độ, CFS được điều chỉnh về pH 7, nâng và giữ ở các khoảng nhiệt độ 30, 60, 90 và 121°C trong 15 phút trong nồi cách thủy, làm nguội. Đối với thí nghiệm khảo sát độ bền pH, sử dụng HCl 0,1 N và NaOH 0,1 N để hiệu chỉnh pH của CFS và kháng sinh Erythromycin đến pH 5, 6, 7, 8 và 9. Đối với mỗi thí nghiệm, bổ sung 100 μl CFS đã xử lý nhiệt vào các giếng thạch đã chuẩn bị sẵn để đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ và pH đến khả năng kháng khuẩn của CFS, lặp lại ba lần đối với mỗi nhiệt độ và pH khảo sát (Hwang và cs., 2018).

2.2.4. Xác định khả năng kháng khuẩn của CFS

Khả năng kháng khuẩn của CFS thu từ chủng *Streptomyces* đã chọn được xác định theo phương pháp khuếch tán giếng thạch (Valgas và cs., 2007). Trải đều 100 μl

mỗi chủng vi khuẩn *P. syringae* P01, *P. carotovorum* Ecc4 và *E. papayae* M16 (1×10^5 CFU/ml) trên bề mặt các đĩa Petri có chứa 20 ml môi trường Mueller Hinton Agar, mỗi chủng vi khuẩn 3 đĩa. Trên mỗi đĩa, đục 3 giếng thạch có đường kính 7 mm. Trong đó, giếng thứ nhất chứa 100 μ l nước cất đã tiệt trùng làm đối chứng âm, giếng thứ hai chứa 100 μ l dung dịch kháng sinh Erythromycin (30 μ g/ml) làm đối chứng dương và giếng thứ ba chứa 100 μ l CFS đã xử lý theo các thí nghiệm khảo sát để đánh giá khả năng kháng khuẩn của chúng (Prakasham và cs., 2012). Các đĩa được giữ ở nhiệt độ 4°C trong 4 giờ, sau đó ủ ở 37°C trong 24 giờ. Hoạt tính kháng khuẩn được đánh giá dựa trên đường kính vòng kháng khuẩn, được xác định theo công thức: ĐK = (D – d) (mm). Trong đó: ĐK là đường kính vòng ức chế vi khuẩn (mm), D là đường kính vòng kháng khuẩn (bao gồm đường kính lỗ thạch) (mm), d là đường kính lỗ thạch (mm).

2.2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Các giá trị trung bình các kết quả thí nghiệm được xử lý sử dụng phần mềm IBM SPSS Statistics 25 chạy trên môi trường Windows. Kết quả thí nghiệm được phân

tích phương sai một nhân tố ANOVA, so sánh các giá trị trung bình bằng kiểm định Duncan và phương pháp so sánh cặp (paired-samples T-test) (với mức ý nghĩa $p = 0,05$).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Sàng lọc sơ bộ các chủng *Streptomyces* có khả năng kháng các vi khuẩn gây bệnh trên quả

Trong số 50 chủng *Streptomyces* được đánh giá, có 33 chủng có khả năng kháng với vi khuẩn *P. syringae* P01, 19 chủng có khả năng kháng với vi khuẩn *P. carotovorum* Ecc4 và 17 chủng có khả năng kháng với *E. papayae* M16. Trong đó, 10 chủng N2R3, NTY03, NARZ, NV203, NĐ203, NN414, N4R1, NVA01, NTY04 và NYĐ01 có khả năng kháng đối với cả 3 chủng vi khuẩn này. Tuy nhiên, dựa vào khoảng cách giữa vạch *Streptomyces* và vị trí mà vi khuẩn có thể phát triển (số liệu không thể hiện), chủng NARZ có khả năng kháng mạnh nhất nên được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo. Trước đó, chủng này đã được định danh là chủng *Streptomyces murinus* NARZ dựa trên trình tự gene 16S rRNA.

Bảng 1. Kết quả sàng lọc sơ bộ khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh trên quả của 50 chủng *Streptomyces*

Chủng <i>Streptomyces</i>	Vi khuẩn gây bệnh			Chủng <i>Streptomyces</i>	Vi khuẩn gây bệnh		
	<i>P. syringae</i>	<i>P. carotovorum</i>	<i>E. papayae</i>		<i>P. syringae</i>	<i>P. carotovorum</i>	<i>E. papayae</i>
	P01	Ecc4	M16		P01	Ecc4	M16
HC111	+	-	+	N2R3	+	+	+
NNY02	+	+	-	NTY03	+	+	+
NBA02	+	-	-	NARZ	+	+	+
HN211	+	-	-	NV406	+	+	-
HTĐ03	+	-	-	NV203	+	+	+
NĐ203	+	+	+	NTA01	+	-	-
NT415	+	-	-	HN111	+	+	-
NT403	-	-	-	NBY01	+	-	-
HĐM01	+	+	-	NNY01	-	-	-
NĐ212	-	-	-	NTA03	-	-	-
H16	+	-	-	NNA08	-	-	-
NBA05	+	+	-	NNA03	-	-	-
NN414	+	+	+	NNY08	-	-	-
NN401	-	-	-	NBA03	+	+	-
NNA04	-	-	-	G125105	-	-	-
NN203	-	-	-	NV204	+	+	-
NN201	-	-	-	N4R1	+	+	+
NT413	+	-	+	HT123	-	-	-
HC6	+	-	+	HĐM32	+	+	+
N2R4	-	-	-	NT201	-	-	-
NB201	+	+	-	NBY05	-	-	+
N4B5	+	-	+	NVA01	+	+	+
NĐ401	+	-	+	HT125	-	-	-
NTY04	+	+	+	H12	+	+	-
NBY08	+	-	-	NYĐ01	+	+	+

(-) Không có hoạt tính kháng nấm; (+) Có hoạt tính kháng nấm.

Bảng 1 thể hiện kết quả nghiên cứu sơ bộ về khả năng kháng khuẩn là bước đầu quan trọng để chọn những chủng *Streptomyces* có khả năng kháng khuẩn tốt. Promnuan và cs. (2020) đã đánh giá khả năng kháng vi khuẩn *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *X. oryzae* pv. *oryzae* và *P. carotovorum* gây bệnh trên khoai tây, ớt xanh và bắp cải của 25 chủng *Streptomyces*

phân lập từ loài ong mật. Chiết xuất thô của chủng *S. ramulosus* (DSC3-6) có khả năng kháng cao nhất đối với sự phát triển của vi khuẩn *X. oryzae* pv. *oryzae* (Promnuan và cs., 2020). Le và cs. (2022) đã phân lập chủng *Streptomyces* sp. AN090126 từ đất nông nghiệp ở Hàn Quốc và thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn đối với một số loại nấm và vi khuẩn gây bệnh thực vật như bệnh héo rũ cà chua do vi khuẩn *R.*

solanacearum, bệnh thối mềm bắp cải do vi khuẩn *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* gây ra. Chủng *Streptomyces* sp. AN090126 đã thể hiện hoạt tính kháng khuẩn đáng kể với nồng độ ức chế tối thiểu là 20,82 – 250 µg/mL (Le và cs., 2022).

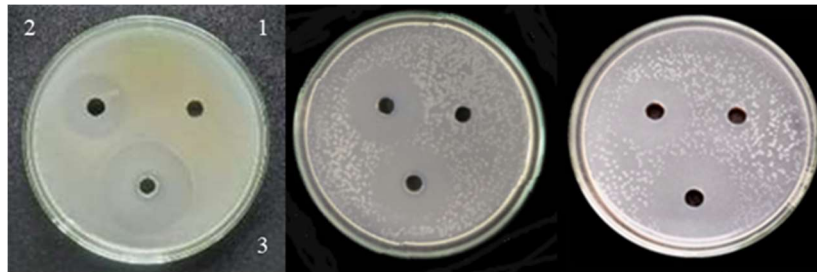
3.2. Khả năng kháng khuẩn của CFS từ chủng *S. murinus* NARZ

Tất cả các kết quả thí nghiệm đánh giá khả năng kháng khuẩn cho thấy các mẫu đối chứng là nước cất đều không tạo vòng kháng khuẩn. Do đó, chúng tôi chỉ so sánh khả năng kháng khuẩn của CFS thu nhận từ chủng *S. murinus* NARZ với đối chứng dương Erythromycin (30 µg/ml) bằng phương pháp so sánh cặp (paired-samples T-test) với mức ý nghĩa p = 0,05 (Bảng 2, Hình 1).

Bảng 2. Khả năng kháng khuẩn của *S. murinus* NARZ đối với ba chủng vi khuẩn gây bệnh

Chất kháng	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)		
	<i>P. syringae</i> P01	<i>P. carotovorum</i> Ecc4	<i>E. papayae</i> M16
CFS của <i>S. murinus</i> NARZ	20,90 ^a ± 0,91	23,53 ^a ± 0,79	26,52 ^a ± 0,53
Erythromycin (30 µg/ml)	15,13 ^b ± 0,70	23,97 ^a ± 0,23	22,03 ^b ± 0,88

Trong cùng một cột, các giá trị trung bình đường kính vòng kháng khuẩn có cùng chữ cái in thường là không sai khác ở mức ý nghĩa 0,05.



a) *P. syringae* P01 b) *P. carotovorum* Ecc4 c) *E. papayae* M16

(1- nước cất; 2- Erythromycin; 3- CFS từ chủng *S. murinus* NARZ)

Hình 1. Đường kính vòng kháng khuẩn của CFS từ chủng *S. murinus* NARZ và Erythromycin đối với ba vi khuẩn gây bệnh

Cả CFS từ chủng *S. murinus* NARZ và Erythromycin (30 µg/ml) đều thể hiện khả năng ức chế sự phát triển cả 3 chủng vi khuẩn khảo sát. Ngoại trừ đường kính vòng kháng khuẩn đối với *P. carotovorum* Ecc4 của CFS từ *S. murinus* NARZ và Erythromycin là tương đương nhau, tương ứng 23,53 ± 0,79 mm và 23,97 ± 0,23 mm, đối với hai chủng vi khuẩn còn lại, đường kính vòng kháng khuẩn tạo ra bởi CFS từ chủng *S. murinus* NARZ luôn cao hơn so với Erythromycin (30 µg/ml).

Streptomyces là một trong những vi sinh vật có khả năng sản sinh nhiều nhất các

loại hợp chất có hoạt tính sinh học, đặc biệt là các loại kháng sinh (Franco và cs., 2010). Một số nghiên cứu cho rằng, *S. murinus* có khả năng sản xuất kháng sinh actinomycin X (Frommer, 1959). Actinomycin là kháng sinh chromopeptide lactone được sản xuất bởi *Streptomyces* sp. (Kurosawa và cs., 2006). Trong đó, các hợp chất tinh khiết của actinomycin X₂ thể hiện hoạt tính kháng khuẩn mạnh đối với nhiều loài vi khuẩn Gram âm và Gram dương như: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus cholermidis*, *Salmonella typhi* và *Escherichia coli* với giá trị nồng độ ức chế tối thiểu trong khoảng từ 1,95 đến

31,25 µg/mL (Sharma và cs., 2019). Mặt khác, một nghiên cứu khác còn chỉ ra chủng xạ khuẩn *S. murinus* còn có khả năng sinh ra kháng sinh actinorhodin (Sharma và cs., 2020). Bên cạnh đó, actinorhodin cũng thể hiện hoạt tính kháng sinh ức chế sự phát triển của *S. aureus* với MIC (Minimum inhibitory concentration_Nồng độ ức chế tối thiểu) là 4 µg/mL (Mak và cs., 2017). Vì vậy, những hợp chất này là kháng sinh chính có vai trò quan trọng giúp cho việc kháng khuẩn của chủng *S. murinus* NARZ.

3.3. Độ bền nhiệt của CFS từ chủng *S. murinus* NARZ

Streptomyces có khả năng sản sinh ra chất kháng sinh, chất kháng nấm, các enzyme (chitinase, glucanase, proteinase) và các hợp chất chuyển hóa có hoạt tính sinh học khác có khả năng ức chế sự phát triển của các vi sinh vật gây bệnh thực vật (Evangelista-Martínez và cs., 2020). Trong số đó, có một số chất nhạy cảm với nhiệt độ, do đó chúng tôi xác định độ bền nhiệt của CFS thu nhận từ chủng *S. murinus* NARZ.

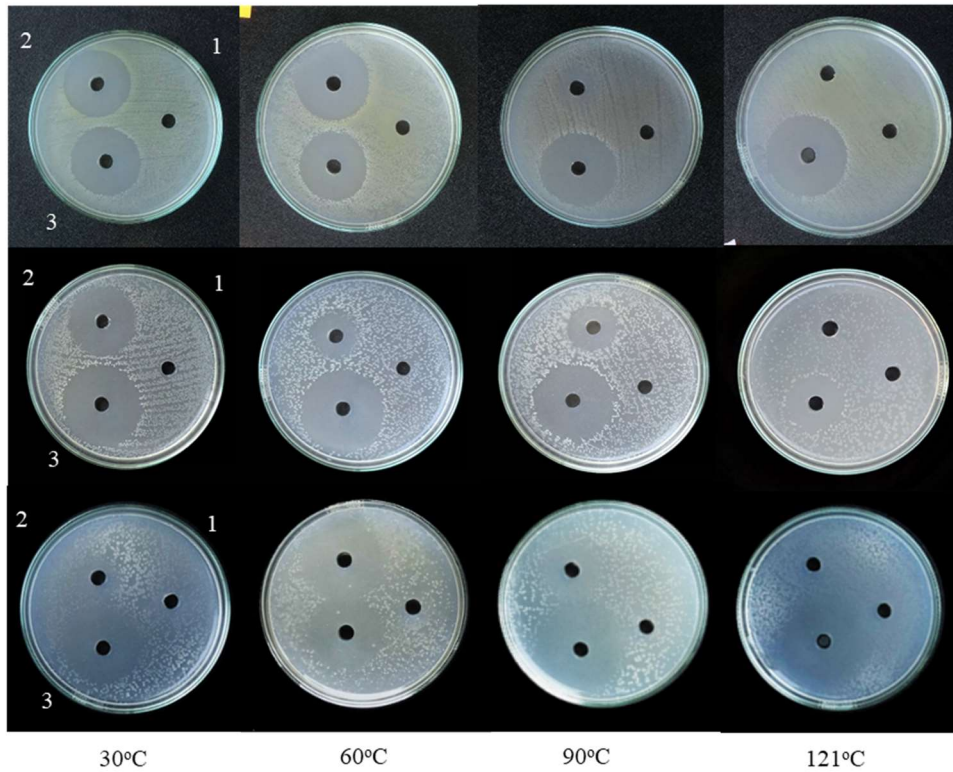
Bảng 3. Đường kính vòng kháng khuẩn của CFS thu nhận từ chủng *S. murinus* NARZ và Erythromycin sau khi xử lý ở các mức nhiệt độ khác nhau

Chất kháng	Vi khuẩn	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)			
		30°C	60°C	90°C	121°C
CFS	<i>P. syringae</i> P01	25,90 ^{aA} ± 0,59	24,64 ^{bA} ± 0,28	23,86 ^{cA} ± 0,07	23,05 ^{dA} ± 0,43
		Erythromycin	24,74 ^{aB} ± 0,38	22,84 ^{bB} ± 0,49	9,64 ^{cB} ± 0,21
CFS	<i>P. carotovorum</i> Ecc4	29,93 ^{aA} ± 0,80	29,20 ^{aA} ± 0,65	23,22 ^{bA} ± 0,58	17,80 ^{eA} ± 0,66
		Erythromycin	24,13 ^{aB} ± 0,74	17,00 ^{bB} ± 0,85	15,20 ^{cB} ± 0,09
CFS	<i>E. papayae</i> M16	28,41 ^{aA} ± 0,74	27,67 ^{aA} ± 0,31	24,98 ^{bA} ± 0,05	22,42 ^{cA} ± 0,25
		Erythromycin	24,61 ^{aB} ± 0,63	23,64 ^{bB} ± 0,70	16,7 ^{cB} ± 0,02

Trong cùng một hàng, các giá trị trung bình đường kính vòng kháng khuẩn có chữ cái in thường khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức 0,05. Trong cùng một cột, các giá trị trung bình đường kính vòng kháng khuẩn có chữ cái in hoa khác nhau theo từng cặp chất kháng (CFS và Erythromycin) trên từng chủng vi khuẩn thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức 0,05.

Nhiệt độ xử lý càng cao, khả năng kháng khuẩn của cả CFS thu từ chủng *S. murinus* NARZ và Erythromycin càng giảm. Điều đáng chú ý là ở cùng một mức nhiệt độ giống nhau, hoạt tính kháng khuẩn của Erythromycin đều thấp hơn hoạt tính kháng khuẩn của chủng *S. murinus* NARZ. Ngoài ra, Erythromycin không có khả năng kháng cả ba chủng vi khuẩn gây bệnh trên cam, đu đủ và cà chua sau khi xử lý ở 121°C trong 15 phút, trong khi đó ở mức nhiệt độ này, CFS thu nhận từ chủng *S. murinus* NARZ vẫn duy

trì tính kháng khuẩn tốt. So với hoạt tính kháng khuẩn của CFS xử lý ở 30°C, hoạt tính kháng khuẩn của CFS thu từ chủng *S. murinus* NARZ sau khi xử lý ở 121°C giảm còn 59,47 - 88,99% đối với ba chủng vi khuẩn khảo sát. Điều này chứng tỏ các chất có khả năng kháng khuẩn của CFS thu từ *S. murinus* NARZ có tính bền nhiệt cao, có thể cho rằng hoạt tính kháng khuẩn của chúng phần lớn là nhờ vào các chất kháng sinh hơn là các enzyme (Bảng 3 và Hình 2).



(1- nước cất; 2- Erythromycin; 3- CFS từ chủng *S. murinus* NARZ)

Hình 2. Độ bền nhiệt của CFS thu được từ chủng *S. murinus* NARZ đến hoạt tính kháng vi khuẩn *Pseudomonas syringae* P01 (hàng trên), *Pectobacterium carotovorum* Ecc4 (hàng giữa) và *Erwinia papayae* M16 (hàng dưới)

Các chất ức chế có bản chất là các chất kháng sinh có nguồn gốc vi sinh vật (bacteriocin) thu được từ chủng *S. variabilis* SCA - 5 và chủng *S. labedae* SCA - 8 phân lập từ cá chẻm đã được xác định là có khả năng bền nhiệt. Hoạt tính kháng khuẩn của bacteriocin thô này có thể duy trì lên đến hơn 50% hoạt tính ở

100°C và vẫn chưa bị mất hoạt tính khi nhiệt độ lên đến 121°C (Kurnianto và cs., 2021). Hernández-Saldaña và cs. (2020) cho thấy bacteriocin do *S. griseus* và *S. nigrescens* tạo ra bị giảm 50% hoạt tính ở 100°C và hoạt tính ổn định ở pH từ 3 - 7 (Hernández-Saldaña và cs., 2020).

3.4. Độ bền pH về khả năng kháng khuẩn của CFS thu từ chủng *S. murinus* NARZ

Bảng 4. Đường kính vòng kháng khuẩn của CFS thu từ *S. murinus* NARZ và Erythromycin sau khi xử lý ở các pH khác nhau

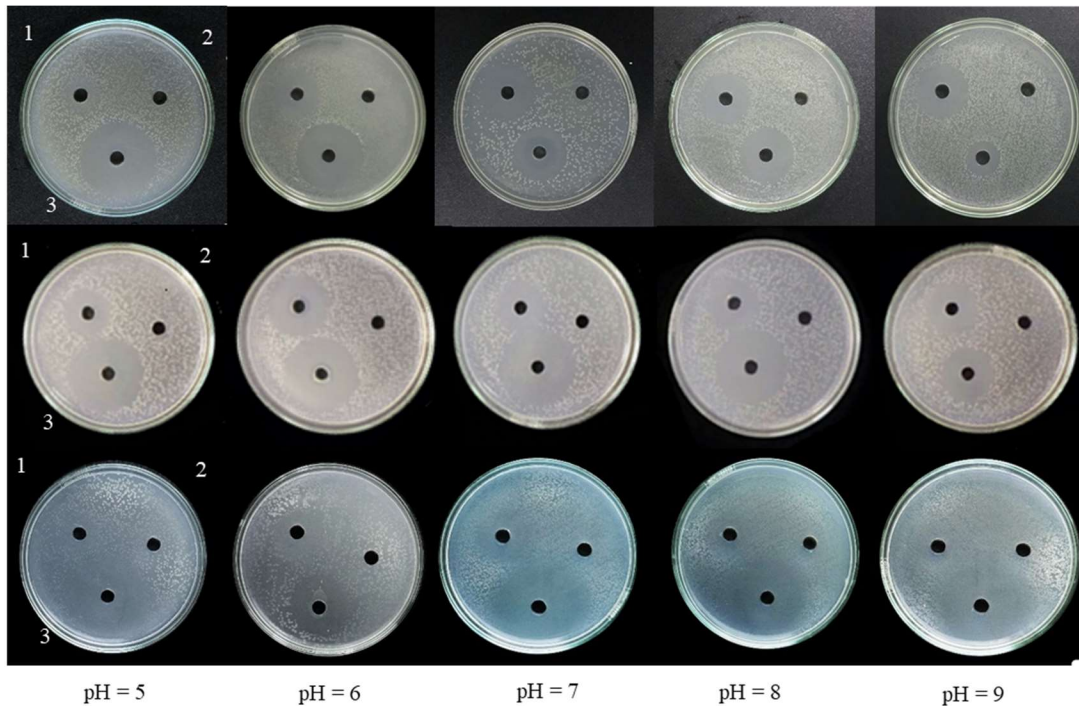
Chất kháng	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm) tại các mức pH khác nhau				
	pH = 5	pH = 6	pH = 7	pH = 8	pH = 9
CFS	21,94 ^{aA} ± 0,74	19,93 ^{bA} ± 0,48	16,63 ^{cB} ± 0,59	15,74 ^{cA} ± 0,34	9,86 ^{dB} ± 0,42
Erythromycin	0,00 ^{cB} ± 00	17,26 ^{bB} ± 0,74	19,93 ^{aA} ± 0,30	15,60 ^{cA} ± 0,55	13,73 ^{dA} ± 0,48
CFS	27,30 ^{bA} ± 0,71	28,10 ^{bA} ± 0,62	29,23 ^{aA} ± 0,40	25,63 ^{cA} ± 0,40	17,70 ^{dA} ± 0,58
Erythromycin	14,20 ^{bB} ± 0,61	16,63 ^{aB} ± 0,62	14,40 ^{bB} ± 0,63	12,70 ^{cB} ± 0,30	11,57 ^{dB} ± 0,51
CFS	28,42 ^{cA} ± 0,38	29,43 ^{bA} ± 0,50	30,29 ^{aA} ± 0,44	26,77 ^{dA} ± 0,42	19,51 ^{eA} ± 0,28
Erythromycin	5,87 ^{cB} ± 0,64	15,30 ^{aB} ± 0,59	15,48 ^{aB} ± 0,53	14,49 ^{aB} ± 0,51	9,21 ^{bB} ± 0,20

Đường kính vòng kháng khuẩn của CFS từ *S. murinus* NARZ và Erythromycin đối với vi khuẩn *P. syringae* P01 (hàng trên), *P. carotovorum* Ecc4 (hàng giữa) và *E. papayae* M16 (hàng dưới).

Trong cùng một hàng, các giá trị trung bình đường kính vòng kháng khuẩn có chữ cái in thường khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức 0,05. Trong cùng một cột, các giá trị trung bình đường kính vòng kháng khuẩn có chữ cái in hoa khác nhau theo từng cặp chất kháng (CFS và Erythromycin) trên từng chủng vi khuẩn thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức 0,05.

Hoạt tính kháng khuẩn của CFS thu từ chủng *S. murinus* NARZ đối với ba chủng vi khuẩn khảo sát vẫn được duy trì trong khoảng pH từ 5 - 9, pH càng tăng thì hoạt tính kháng khuẩn của CFS thu từ chủng *S. murinus* NARZ càng giảm (ngoại trừ đối với vi khuẩn *P. syringae* P01). Hoạt tính kháng khuẩn của CFS thu từ chủng *S. murinus* NARZ cao nhất ở pH 7 đối với 2 chủng vi khuẩn *P. carotovorum* Ecc4 và *E. papayae* M16, đường kính vòng kháng khuẩn đạt tương ứng là 29,23 và 30,29 mm (Bảng 4, Hình 3).

Ở cả 3 chủng vi khuẩn khảo sát, hoạt tính kháng khuẩn của Erythromycin đều nhỏ hơn hoạt tính kháng khuẩn của CFS từ chủng *S. murinus* NARZ, ngoại trừ pH 7 và 9 đối với chủng vi khuẩn *P. syringae* P01 có hoạt tính kháng khuẩn của Erythromycin lớn hơn. Ở pH 5, hoạt tính kháng khuẩn của Erythromycin yếu đối với 2 chủng vi khuẩn *P. carotovorum* Ecc4 và *E. papayae* M16 và không thể hiện khả năng kháng đối với chủng vi khuẩn *P. syringae* P01. Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu của Bonferoni và cs. (2007), tác dụng kháng sinh của Erythromycin bị phân hủy nhanh chóng ở pH = 5 (Bonferoni và cs., 2007).



(1- nước cất; 2- Erythromycin; 3- CFS từ chủng *S. murinus* NARZ)

Hình 3. Độ bền pH của CFS thu được từ chủng *S. murinus* NARZ đến hoạt tính kháng vi khuẩn *Pseudomonas syringae* P01 (hàng trên), *Pectobacterium carotovorum* Ecc4 (hàng giữa) và *Erwinia papayae* M16 (hàng dưới)

Chủng xạ khuẩn *Streptomyces* SS52 cũng đã được xác định có hoạt tính kháng khuẩn không phụ thuộc pH acid hay kiềm, hoạt tính kháng khuẩn thể hiện tốt ở pH 2, 7 và 13 với các vi khuẩn và nấm kiểm nghiệm là *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Mycrosporium gypseum*. Tuy nhiên, hoạt tính kháng khuẩn thể hiện tốt nhất ở môi trường pH 13 (Nguyễn Văn Hương và cs., 2020). *Streptomyces* sp. (chủng SS12) được phân lập từ đất ở Ấn Độ đã được chứng minh có thể sản sinh các hợp chất sinh học có khả năng kháng nấm *Aspergillus* sp. ổn định trong khoảng pH 4 - 9, đường kính vùng ức chế đạt từ 38 - 41 mm sau 24 giờ (Singh và cs., 2013). Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy sự tương đồng với các nghiên cứu này về hoạt tính kháng khuẩn khi xử lý CFS ở các pH khác nhau.

4. KẾT LUẬN

Trong số 50 chủng xạ khuẩn *Streptomyces* được đánh giá hoạt tính kháng khuẩn, *S. murinus* NARZ là chủng có khả năng kháng mạnh đối với cả 3 chủng vi khuẩn *P. syringae* P01, *P. carotovorum* Ecc4 và *E. papayae* M16. Chủng *S. murinus* NARZ thể hiện khả năng kháng khuẩn ở cả nhiệt độ 121°C, tuy nhiên hoạt tính kháng khuẩn thể hiện tốt nhất ở 30°C. Hoạt tính kháng khuẩn duy trì ở pH từ 5 - 9 trong đó tốt nhất ở pH = 5 đối với *P. syringae* P01 và pH = 6 đối với *P. carotovorum* Ecc4 và *E. papayae* M16. Kết quả này có tiềm năng trong việc nghiên cứu ứng dụng chủng *S. murinus* NARZ trong kiểm soát vi khuẩn gây bệnh đốm đen trên cam, bệnh thối mềm trên cà chua và đu đủ sau thu hoạch trên rau quả.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ của Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế về điều kiện thực hiện và tài trợ kinh phí nghiên cứu trong khuôn khổ đề tài nghiên cứu thuộc nhóm nghiên cứu mạnh cấp trường, mã số NCM.ĐHNH.2021-04.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tài liệu tiếng Việt

Nguyễn Văn Hương, Bùi Thị Hồng Chiên, Ngô Thị Minh Thu, Nguyễn Hữu Đạt và Nguyễn Ngọc Hiếu. (2020). Nghiên cứu hoạt tính kháng khuẩn của xạ khuẩn nội sinh phân lập từ các cây dược liệu Việt Nam. *Hội nghị sinh học toàn quốc 2020 (Công nghệ sinh học Y Dược)*, 786 - 791.

Trần Bảo Trâm, Nguyễn Thị Hiền, Trần Bình Minh, Nguyễn Thị Thùy Linh, Hoàng Thị Vân Anh, Thái Hạnh Dung, Trần Văn Tuấn và Vũ Xuân Tạo. (2021). Nghiên cứu hoạt tính kháng nấm gây bệnh trên cam của chủng xạ khuẩn XK1 phân lập từ đất trồng cam, *Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 63(5), 41 - 45.

2. Tài liệu tiếng nước ngoài

Bonferoni, M. C., Cerri, G., De' Gennaro, M., Juliano, C., & Caramella, C. (2007). Zn²⁺-exchanged clinoptilolite – rich rock as active carrier for antibiotics in anti – acne topical therapy. *In vitro* characterisation and preliminary formulation studies. *Applied Clay Science*, 36(1 – 3), 95 – 102.

Dezfully, N. K., & Ramanayaka, G. R. (2015). Isolation, identification and assessment of the antimicrobial activity of *Streptomyces flavogriseus*, strain Actk2, from a soil sample from Kodagu, Karnataka state in India. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 8(2), 1 - 8.

Doolotkeldieva, T., Bobusheva, S., & Suleymankisi, A. (2016). Biological Control of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* by *Streptomyces* Species. *Advances in Microbiology*, 6(2), 104 - 114.

Evangelista-Martínez, Z., Contreras-Leal, E. A., Corona-Pedraza, L. F., & Gastélum-Martínez, É. (2020). Biocontrol potential of *Streptomyces* sp. CACIS-1.5CA against phytopathogenic fungi causing post-harvest fruit diseases. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 30(1), 2 - 10.

Franco, C. M., Quintana, A., Duque, C., Suarez, C., Rodríguez, M. X., & Barea, J. M. (2010). Evaluation of actinomycete strains for key traits related with plant growth promotion and mycorrhiza helping activities. *Applied Soil Ecology*, 45(3), 209 - 217.

Frommer, W. (1959). Zur Systematik der Actinomycin bildenden Streptomyceten. *Archiv Für Mikrobiologie*, 32(2), 187–206. <https://doi.org/10.1007/BF00425228>

Gardan, L., Christen, R., Achouak, W., & Prior, P. (2004). *Erwinia papayae* sp. nov., a pathogen of papaya (*Carica papaya*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(1), 107 - 113.

Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J. B., Christensen, A. B., & Givskov, M. (2002) Food spoilage–interactions between food spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiol*, 78, 79 – 97.

Hernández-Saldaña O. F., Barboza-Corona J. E., Bideshi D. K., & Casados-Vázquez L. E. (2020). New bacteriocin-like substances produced by *Streptomyces* species with activity against pathogens. *Folia Microbiologica (Praha)*, 65(4), 669 – 678.

Hess, T., & Sutcliffe, C. (2018). The exposure of a fresh fruit and vegetable supply chain to global water-related risks. *Water International*. 43(6), 746 - 761.

Hibbing, M. E., Fuqua, C., Parsek, M. R., & Peterson, S. B. (2010). *Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle*. *Nature Reviews Microbiology*, 8(1), 15 - 25.

Hwang, I. C., Oh, J. K., Kim, S. H., Oh, S., & Kang, D. K. (2018). Isolation and characterisation of an anti-listerial bacteriocin from *Leuconostoc lactis* SD501. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 38(5), 1008 - 1018.

Kassim, A., Workneh, T. S., & Laing, M. D. (2020). A Review Of The Post-harvest characteristics and pre-packaging treatments of citrus fruit. *Aims Agriculture and food*, 5(3), 337 - 364.

Kurnianto, M. A., Kusumaningrum, H. D., Kurnianto, M. A., Kusumaningrum, H. D., Lioe, H. N., & Chasanah, E. (2021). Partial Purification and Characterisation of Bacteriocin-Like Inhibitory Substances Produced by *Streptomyces* sp. Isolated from

- the Gut of *Chanos chanos*. *Biomed Research International*, 1 - 12. DOI: 10.1155/2021/7190152.
- Kurosawa, K., Bui, V. P., VanEssendelft, J. L., Willis, L. B., Lessard, P. A., Ghiviriga, I., Sambandan, T. G., Rha, C. K., & Sinskey, A. J. (2006). Characterisation of *Streptomyces* MITKK-103, a newly isolated actinomycin X2-producer. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(1), 145–154
- Le, K. D., Yu, N. H., Park, A. R., Park, D – J., Kim, C - J., & Kim, J – C. (2022), *Streptomyces* sp. AN090126 as a biocontrol agent against bacterial and fungal plant diseases. *Microorganisms*, 10, 1 - 16.
- Mak, S., & Justin, R. N. (2017). Actinorhodin is a redox-active antibiotic with a complex mode of action against Gram-positive cells. *Molecular Microbiology*, 106, 597 – 613.
- Maktar, N. H., Kamis, S., Mohd Yusof, F. Z., & Hussain, M. H. (2008). *Erwinia papayae* causing papaya dieback in Malaysia. *Plant Pathology*, 57, 774.
- Pacios – Michelena, S., Gonzalez, C. N. A., Alvarez – Perez, O. B., Rodriguez – Herrera, R., Chasvez – Gonzalez, M., Valdes, R. A., Valdes J. A. A., Salas, M. G., & Ilyina, A. (2021), Application of *Streptomyces* antimicrobial compounds for the control of phytopathogens. *Food System*, 5, <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.696518>
- Prakasham, R. S., Kumar, B. S., Kumar, Y. S., & Shankar, G. G. (2012). Characterisation of silver nanoparticles synthesised by using marine isolate *Streptomyces albidoflavus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(5), 614 - 621.
- Promnuan, Y., Promsai, S., & Meela, S. (2020). Antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. isolated from *Apis dorsata* combs against some phytopathogenic bacteria. *Peer Journal*. DOI: 10.7717/peerj.10512 2/13.
- Qin, Z., Peng, K., Zhou, X., Liang, R., Zhou, Q., Chen, H., Hopwood, D.A. Kieser, T., & Deng, Z. (1994), Development of a gene cloning system for *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *yingchengensis*, a producer of three useful antifungal compounds, by elimination of three barriers to DNA transfer. *Journal of Bacteriology*, 176(7), 2090 - 2095.
- Rodríguez, M., Torres. M., Blanco, L., Béjar, V., Sampedro, I., & Llamas, I. (2020). Plant growth-promoting activity and quorum quenching-mediated biocontrol of bacterial phytopathogens by *Pseudomonas segetis* strain P6. *Scientific Rep.*, 10, 1 - 12.
- Schrey, S.D., & Tarkka, M.T. (2008). Friends and foes: streptomycetes as modulators of plant disease and symbiosis, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 94(1), 1 - 19.
- Sharma, M., & Manhas, R. K. (2019). Purification and characterisation of actinomycins from *Streptomyces* strain M7 active against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin resistant *Enterococcus*. *BMC Microbiology*, 19(1), 1-14.
- Sharma, P., & Thakur, D. (2020). Antimicrobial biosynthetic potential and diversity of culturable soil actinobacteria from forest ecosystems of northeast india. *Scientific Reports*, 10(1), 1-18.
- Singh, S., Rawat, A., & Sharma, D. C. (2013). Antifungal antibiotic of *Streptomyces* sp. ss12: production and characterisation, *International Journal of Current Research and Review*, 5(11), 17 - 29.
- Tendulkar, S., Patkar, A., & Chattoo, B. (2003). A simple protocol for isolation of fungal DNA. *Biotechnology Letters*, 25, 1941 – 1944.
- Valgas, C., De Souza, S. M., Smânia, E. F. A., & Smânia, A. (2007). Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(2), 369 - 380.
- Yahia, E. M., García-Solís, P., & Celis, M. E. M. (2019). *Contribution of Fruits and Vegetables to Human Nutrition and Health Post-harvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier.