

**NGHIÊN CỨU ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY THÍCH HỢP
 ĐỂ CHŨNG *ASPERGILLUS TERREUS* Đ1
 PHÂN LẬP TỪ RỪNG NGẬP MẶN CẦN GIỜ
 SINH TỔNG HỢP CHẤT KHÁNG SINH**

TRẦN THỊ MINH ĐỊNH*, TRẦN THANH THỦY**

TÓM TẮT

*Từ 58 chủng nấm sợi phân lập được từ rừng ngập mặn Cần Giờ, đã tuyển chọn được chủng nấm sợi Đ1 có hoạt tính kháng sinh mạnh. Kết quả giải trình tự gen 28S rRNA cho thấy chủng Đ1 thuộc loài *Aspergillus terreus*. Các điều kiện nuôi cấy thích hợp cho chủng này sinh tổng hợp chất kháng sinh đã được khảo sát và xác định.*

Từ khóa: *Aspergillus*, chất kháng sinh, tối ưu điều kiện nuôi cấy.

ABSTRACT

Optimization of culture conditions for antibiotic production of *Aspergillus terreus* D1 isolated from Can Gio mangrove

*From 58 filamentous fungi strains isolated from Can Gio mangrove soil, a strain which has the best antimicrobial activity was obtained. Based on 28S rRNA sequence, this strain was classified to *Aspergillus terreus* species. The culture conditions for antibiotic production of this strain were optimized.*

Keywords: *Aspergillus*, antibiotic, culture conditions optimization.

1. Mở đầu

Trong những năm gần đây, các nhà khoa học đặc biệt quan tâm nghiên cứu các đối tượng vi sinh vật (VSV) từ các hệ sinh thái đặc biệt, trong đó có rừng ngập mặn (RNM). Bởi theo các nhà khoa học, chúng là nguồn sinh các chất có hoạt tính sinh học dồi dào, trong đó có chất kháng sinh (CKS). Và thực tế, họ đã phát hiện nhiều hợp chất kháng khuẩn, kháng nấm, kháng virus, kháng ung thư,... từ VSV rừng ngập mặn với hoạt tính mạnh hơn rất nhiều so với VSV từ đất liền.

Trong số các VSV sinh kháng sinh, nấm sợi (NS) là đối tượng có ý nghĩa cả về mặt lịch sử lẫn y học. NS là đối tượng sinh ra một lượng lớn CKS kháng vi khuẩn (VK), kháng virus, kháng khối u và kháng nấm. Trong số 23.000 chất từ VSV có hoạt tính sinh học như kháng nấm, kháng khuẩn, kháng virus,... có đến 42% trong số đó có nguồn gốc từ các loài thuộc giới nấm. [2]

Các nghiên cứu cho thấy nấm biển có hoạt tính kháng sinh (KS) kháng được phổ rộng các VSV [5]. Cuomo và cộng sự (1995) so sánh hoạt tính KS của 1500 chủng nấm

* ThS, Trường Đại học Sư phạm TPHCM

** TS, Trường Đại học Sư phạm TPHCM

phân lập từ biển với 1450 mẫu phân lập từ đất liền, kết luận rằng có nhiều mẫu nấm phân lập từ biển có hoạt tính KS hơn từ đất liền. Carsten Christophersen và cộng sự (1999) nghiên cứu trên 227 chủng NS phân lập từ biển (trong đó có RNM), kết quả có 7 chủng có khả năng kháng *Vibrio parahaemolyticus*, 55 chủng kháng *S. aureus*. [3]

Cho đến nay, các nghiên cứu về CKS của nấm biển, trong đó có nấm RNM, đã phát hiện được nhiều chất, bao gồm:

- Chất kháng khuẩn: nigrospoxydon A từ nấm *Nigrospora* sp. kháng lại *S. aureus* (Trisuwan và cộng sự, 2008) và kháng MRSA. [5]

- Chất kháng nấm: isoculmorin (Alam và cộng sự, 1996), culmorin (Strongman và cộng sự 1987), icrosphaeropsin từ *Microsphaeropsis* sp. (Höller và cộng sự, 2000), mactanamide (Lorenz và cộng sự, 1998), 2 chất thuộc nhóm macrodiolide từ *Cladosporium herbarum* (Jadulco và cộng sự, 2001), 3 chất thuộc nhóm lipodepsipeptide tác động lên quá trình tổng hợp thành tế bào của nấm và có tiềm năng trong việc trị bệnh nấm ngoài da (Schilingham và cộng sự, 1998). [5]

- Chất chống ung thư: penochalasin A-C chống lại dòng tế bào P388 leukemia (Numata và cộng sự, 1996; Iwamoto và cộng sự, 1999), trichidenones A-C (Amagata và cộng sự, 1998), communesins A và B từ *Penicillium* sp. (Numata và cộng sự, 1993, 1996), paeciloxocin A chống lại dòng tế bào HepG2 (Wen và cộng sự, 2010), pentostatin A-D, nigrosporanene A chống lại dòng tế bào MCF-7 và Vero (IC50: 9.37, 5.42 µg/ml) (Rukachaisirikul và cộng sự, 2010); *Xylaria psidii* có hoạt tính mạnh ở IC50 4 µg/ml và 1,5 µg/ml (Tarman và cộng sự, 2011). [5]

Ở Việt Nam, có một số công trình nghiên cứu về nấm sợi RNM:

- “Tổng kết kết quả nghiên cứu về tính đa dạng và vai trò của NS phân lập từ một số RNM ở hai tỉnh Nam Định và Thái Bình” của Mai Thị Hằng (2002).

- “Khảo sát hoạt tính đối kháng và tiềm năng ứng dụng của các chủng NS phân lập từ một số khu RNM Nam Định và Thái Bình” của Mai Thị Hằng, Lê Thanh Huyền (2002).

- “Khảo sát khả năng kí sinh gây bệnh côn trùng và tiềm năng kiểm soát sinh học của nấm RNM Nam Định” của Mai Thị Hằng, Nguyễn Vĩnh Hà (2002).

- Phan Thanh Phương (2007), Bùi Thị Nha (2008), Phạm Thị Thùy Trinh (2008), Phạm Gia Cần (2009), Phùng Văn Phúc (2009), Khổng Thị Thu Hà (2010), Trương Mai Thanh Thanh (2010) nghiên cứu về khả năng sinh KS của một số chủng NS được phân lập từ RNM Cần Giờ. Các nghiên cứu này đã phát hiện được nhiều loài NS có khả năng sinh KS ức chế VK, NS, nấm men.

Nhìn chung, những nghiên cứu về nấm sợi RNM sinh KS trên thế giới và trong nước cho thấy, các CKS từ nấm sợi RNM có hoạt tính mạnh hơn nhiều so với CKS từ các VSV có nguồn gốc từ đất liền. Điều này chứng tỏ việc tìm kiếm các CKS mới từ khu hệ VSV RNM là một hướng đi đúng đắn.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Các giống VSV đã sử dụng

- Các chủng NS phân lập từ đất RNM Cần Giờ.
- Vi khuẩn *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* nhận từ bộ sưu tập giống của Phòng Thí nghiệm Vi sinh – Sinh hóa, Trường ĐHSPTPHCM.

Các MT nghiên cứu đã sử dụng

MT1. Glucose 20 g, cao nấm men 2 g, peptone 5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 g, KH_2PO_4 1g, nước cất 1 lít. [10]

MT2. Cao malt 2,1 g, glicerol 4 g, peptone 1g, nước cất 1 lít. [9]

MT3. Cao nấm men 9g, glucose 20 g, KH_2PO_4 1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 g, peptone 1,8 g, nước cất 1 lít. [9]

MT4. $NaNO_3$ 3 g, K_2HPO_4 1 g, KCl 0,5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, cao nấm men 5 g, sucrose 30 g, nước cất 1 lít. [7]

MT5. Glucose 30 g, bột đậu tương 2,5 g, cao nấm men 0,5 g, KH_2PO_4 1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g, NaCl 0,5 g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,5 g, $FeCl_3 \cdot 2H_2O$ 2 mg, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 2 mg, nước cất 1 lít.

MT6. Cao nấm men 4 g, glucose 20 g, agar 20 g, nước biển 1 lít. [6]

MT7. Cao malt 20 g, peptone 1 g, glucose 20 g, agar, nước biển 1 lít.

MT8. $NaNO_3$ 3,5 g, K_2HPO_4 1,5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 g, KCl 0,5 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,01 g, glucose 20 g, agar 20 g, nước biển 1 lít.

MT9. (*MT nuôi vi khuẩn kiểm định*) Cao thịt 5 g, peptone 5 g, NaCl 5 g, agar 20 g, nước cất 1 lít.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Các chủng NS được phân lập từ đất RNM theo phương pháp của Agate A.D. (1988). Sau đó, để tuyển chọn chủng có hoạt tính kháng sinh mạnh, các chủng NS này được thử hoạt tính đối kháng với vi khuẩn *B. subtilis* và *E. coli* theo phương pháp của Egorov N.X (1985). [4]

Chủng Đ1 được phân loại đến chi theo mô tả đặc điểm hình thái của Bùi Xuân Đông (2004) [1], A. Samson (1996) [8]. Giải trình tự gen 28S rRNA của chủng này và so sánh với ngân hàng gen NCBI để phân loại đến loài.

Khảo sát ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy (MT, nguồn carbon, nguồn nitrogen, nồng độ NaCl, pH, nhiệt độ, thời gian) đến hoạt tính kháng sinh của chủng Đ1 bằng cách thay đổi các điều kiện nuôi cấy nói trên và thử hoạt tính kháng sinh theo phương pháp của Kirby - Bauer (1966).

3. Kết quả và biện luận

3.1. Tuyển chọn chủng nấm sợi có hoạt tính kháng khuẩn

Từ 58 chủng NS phân lập được từ RNM Cần Giò (kí hiệu từ Đ1 – Đ58), chúng tôi tiến hành tuyển chọn chủng NS có hoạt tính đối kháng mạnh bằng cách thử hoạt tính kháng khuẩn của các chủng NS này với VK kiểm định là *B. subtilis* và *E. coli*. Kết quả được trình bày trong bảng 1.

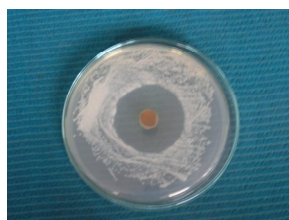
Bảng 1. Hoạt tính đối kháng của các chủng NS phân lập từ RNM Cần Giò

STT	Kí hiệu chủng	Hoạt tính đối kháng, D-d (cm)		STT	Kí hiệu chủng	Hoạt tính đối kháng, D-d (cm)	
		<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>			<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
1	Đ1	2,74	1,10	30	Đ30	0,50	-
2	Đ2	-	-	31	Đ31	0,75	-
3	Đ3	1,40	-	32	Đ32	-	-
4	Đ4	-	-	33	Đ33	-	-
5	Đ5	-	-	34	Đ34	0,60	-
6	Đ6	-	-	35	Đ35	0,50	-
7	Đ7	0,75	-	36	Đ36	1,45	-
8	Đ8	1,45	-	37	Đ37	0,45	-
9	Đ9	1,05	-	38	Đ38	-	1,00
10	Đ10	1,00	-	39	Đ39	-	1,75
11	Đ11	1,60	-	40	Đ40	-	-
12	Đ12	-	-	41	Đ41	0,60	-
13	Đ13	0,60	-	42	Đ42	0,60	-
14	Đ14	0,60	-	43	Đ43	1,10	-
15	Đ15	-	-	44	Đ44	1,20	0,90
16	Đ16	-	-	45	Đ45	0,95	-
17	Đ17	1,10	-	46	Đ46	-	-
18	Đ18	-	-	47	Đ47	0,65	-
19	Đ19	-	-	48	Đ48	1,50	-
20	Đ20	0,60	-	49	Đ49	1,20	-
21	Đ21	1,60	-	50	Đ50	-	-
22	Đ22	0,60	-	51	Đ51	1,60	-
23	Đ23	0,90	-	52	Đ52	1,50	-
24	Đ24	-	-	53	Đ53	1,70	-
25	Đ25	-	-	54	Đ54	1,85	-
26	Đ26	-	-	55	Đ55	-	-
27	Đ27	1,70	-	56	Đ56	-	-
28	Đ28	0,70	-	57	Đ57	1,80	-
29	Đ29	1,00	-	58	Đ58	1,10	-

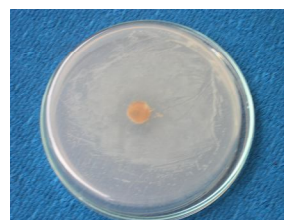
Kết quả được trình bày trong bảng 3.1 cho thấy trong số 58 chủng NS có:

- 1/58 chủng đối kháng với cả *B. subtilis* và *E. coli*. 19/58 chủng không có hoạt tính đối kháng với cả *B. subtilis* và *E. coli*.
- 3/58 chủng có hoạt tính đối kháng với *E. coli*, trong đó 1/58 chủng đối kháng ở mức trung bình, 2/58 chủng đối kháng ở mức yếu.
- 37/58 chủng có hoạt tính đối kháng với *B. subtilis*. 1/58 chủng đối kháng với *B. subtilis* ở mức rất mạnh. 9/58 chủng đối kháng với *B. subtilis* ở mức trung bình. 26/58 chủng kháng *B. subtilis* ở mức yếu.

Chủng Đ1 có hoạt tính kháng với *B. subtilis* ở mức rất mạnh ($D-d = 2,74 \pm 0,01$ cm), kháng *E. coli* ở mức yếu ($D-d = 1,10 \pm 0,00$ cm). CKS của chủng Đ1 kháng VKG(+) ở mức rất mạnh nên có giá trị cho những nghiên cứu tiếp theo.



Hình 1. Hoạt tính kháng *B. subtilis* của chủng Đ1



Hình 2. Hoạt tính kháng *E. coli* của chủng Đ1

3.2. Đặc điểm sinh học và phân loại chủng Đ1

Nuôi chủng Đ1 trên MT Czapek ở 25°C, quan sát hình dạng, màu sắc, bề mặt khuẩn lạc, sắc tố tiết vào MT. Làm tiêu bản quan sát hình dạng, màu sắc khuẩn ty, đặc điểm cơ quan sinh sản. Kết quả được trình bày trong bảng 2.

Bảng 2. Đặc điểm phân loại chủng nấm sợi Đ1

Đặc điểm chủng Đ1	Đặc điểm phân loại chi <i>Aspergillus</i> theo Bùi Xuân Đồng (2004) [1], A. Samson (1996) [8]
<ul style="list-style-type: none"> - Khuẩn lạc ban đầu có màu trắng, sau chuyển thành vàng nâu, cuối cùng chuyển thành màu nâu. - Khuẩn ty phân nhánh, không màu, có vách ngăn. - Giá bào tử trần không phân nhánh, có phần đỉnh phình ra thành bông hình nửa cầu. - Khối bào tử trần dạng hình tia tỏa tròn. 	<ul style="list-style-type: none"> - Khuẩn lạc thường phát triển nhanh, có màu trắng, vàng, vàng nâu, nâu đen hoặc hơi có màu lục. - Khuẩn ty phân nhánh, không màu, màu nhạt hoặc trong sẫm màu, có vách ngăn. - Giá bào tử trần không phân nhánh, không có hoặc ít có vách ngăn ngang, có phần đỉnh to ra thành bông hình chùy, hình elipse hoặc hình nửa cầu. - Khối bào tử trần có thể có các dạng hình cột, hình cầu hoặc hình tia tỏa tròn.

So sánh kết quả quan sát được và đặc điểm trong khóa phân loại của Bùi Xuân Đồng (2004), Samson A. R. (1996), chúng tôi kết luận chủng Đ1 thuộc chi *Aspergillus*.



Hình 3. Khuẩn lạc chủng Đ1



Hình 4. Cơ quan sinh sản chủng Đ1

Để định danh đến loài chủng *Aspergillus* Đ1, chúng tôi gửi chủng này đến công ty xét nghiệm Nam Khoa giải trình tự gen 28S rRNA, kết quả như sau:

```
GAAAGGGAAGCGCTTGCAACCAGACTCGCTCGCGGGGTTTCAGCCGGG
CTTCGGCCCCGGTGTACTTCCCCGCGGGCGGGCCAGCGTCGGTTTGGGCGGC
CGGTCAAAGGCCTCCGGAATGTAGCGCCCTTCGGGGCGCCTTAATGCCGGG
GGTGCAATGCGGCCAGCCTGGACCGAGGAACGCGCTTCGGCACGGACGCT
GGCATAATGGTTGTAAACGACCCGTCTTGAAAC
```

So sánh với ngân hàng gen NCBI, trình tự gen 28S rRNA của chủng *Aspergillus* Đ1 có độ tương đồng 100% với loài *Aspergillus terreus*. Kết luận: chủng Đ1 thuộc loài *Aspergillus terreus*.

3.3. Khảo sát ảnh hưởng của các điều kiện MT lên khả năng sinh trưởng và sinh kháng sinh

Các điều kiện nuôi cấy như thành phần MT, nguồn carbon, nguồn nitrogen, pH MT, nhiệt độ nuôi cấy, ... có ảnh hưởng rất lớn đến sự sinh trưởng cũng như khả năng sinh kháng sinh của VSV nói chung, NS nói riêng. Do đó việc nghiên cứu tìm ra các điều kiện nuôi cấy thích hợp cho sinh tổng hợp CKS là điều cần thiết.

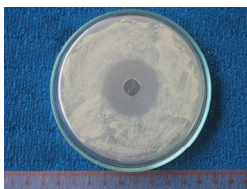
3.3.1. Ảnh hưởng của MT nuôi cấy

Nuôi chủng *Asp. terreus* Đ1 trên các MT khác nhau (MT1 đến MT8 như đã trình bày trong phần 2.1.), sau 6 ngày thử hoạt tính đối kháng với *B. subtilis*, kết quả được trình bày trong bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của MT nuôi cấy lên khả năng sinh trưởng và sinh kháng sinh của chủng nấm sợi *Asp. terreus* Đ1

STT	Môi trường	Hoạt tính đối kháng, D-d (cm)	Sinh khối (g)
1	MT1	1,38 ± 0,04	0,605 ± 0,026
2	MT2	1,38 ± 0,04	0,100 ± 0,012
3	MT3	1,41 ± 0,03	0,840 ± 0,064
4	MT4	0,32 ± 0,02	0,855 ± 0,003
5	MT5	0,68 ± 0,15	0,350 ± 0,006
6	MT6	3,20 ± 0,05	0,365 ± 0,003
7	MT7	1,85 ± 0,06	0,185 ± 0,020
8	MT8	1,81 ± 0,10	0,680 ± 0,000

Kết quả cho thấy chủng *Asp. terreus* Đ1 có hoạt tính đối kháng với *B. subtilis* mạnh nhất khi nuôi cấy trong MT6. Ở MT4, chủng *Asp. terreus* Đ1 sinh trưởng mạnh nhất nhưng lại có hoạt tính đối kháng với *B. subtilis* yếu nhất. Điều này cho thấy khả năng sinh trưởng và sinh kháng sinh của chủng *Asp. terreus* Đ1 là không đồng nhất với nhau. So với các MT khác, MT6 có thêm 2 loại khoáng là Ca (dưới dạng CaCl₂) và Zn (dưới dạng ZnSO₄). Theo N.S. Egorov (1985) [4], Fe và Zn cần thiết cho sự sinh tổng hợp một số chất kháng sinh. Có thể 2 loại khoáng này có tác dụng tích cực đến quá trình sinh tổng hợp chất kháng sinh của chủng *Asp. terreus* Đ1.



Hình 5. Hoạt tính kháng sinh của chủng *Asp. terreus* Đ1 trên MT6

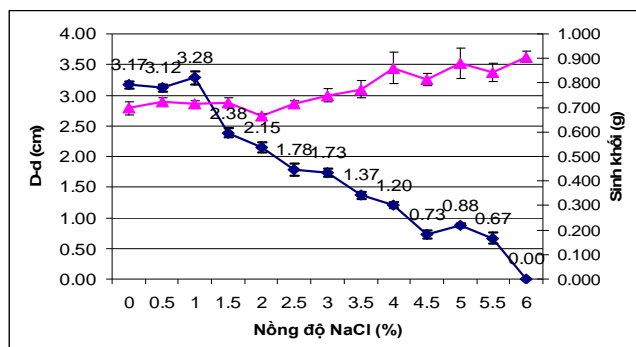


Hình 6. Hoạt tính kháng sinh của chủng *Asp. terreus* Đ1 trên MT4

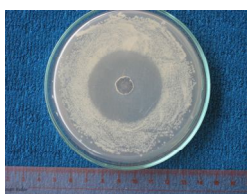
3.3.2. Ảnh hưởng của nồng độ muối

Độ mặn của MT là một trong những yếu tố ảnh hưởng quan trọng đến khả năng sinh trưởng và sinh kháng sinh của NS. Do đó, chúng tôi đã tiến hành khảo sát ảnh hưởng của nồng độ muối NaCl trong MT bằng cách nuôi chủng *Asp. terreus* Đ1 trên MT6 thay đổi nồng độ muối từ 0-6%, sau 6 ngày khảo sát hoạt tính đối kháng với *B. subtilis*, kết quả được trình bày trong đồ thị 1.

Đồ thị 1. Ảnh hưởng của nồng độ NaCl lên hoạt tính kháng khuẩn chủng *Asp. terreus* Đ1



Kết quả cho thấy chủng *Asp. terreus* Đ1 có hoạt tính kháng sinh mạnh trong khoảng nồng độ muối NaCl từ 0-1%. Khi nồng độ muối >1%, hoạt tính kháng sinh của chủng này giảm. Đến nồng độ NaCl 6% chủng *Asp. terreus* Đ1 không còn hoạt tính kháng sinh. Khả năng sinh trưởng của chủng này tăng dần trong khoảng nồng độ NaCl từ 0-5,5%. Điều này chứng tỏ chủng *Asp. terreus* Đ1 là chủng ưa mặn.



Hình 7. Hoạt tính kháng sinh của chủng *Asp. terreus* Đ1 ở nồng độ muối 1%



Hình 8. Hoạt tính kháng sinh của chủng *Asp. terreus* Đ1 ở nồng độ muối 6%

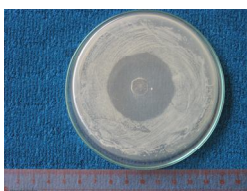
3.3.3. Ảnh hưởng của nguồn carbon

Nuôi chủng *Asp. terreus* Đ1 trên MT6, 1% NaCl, thay đổi nguồn carbon bằng các loại đường glucose, maltose, galactose, tinh bột, lactose, ri đường, fructose, sucrose, sau 6 ngày khảo sát hoạt tính đối kháng với *B. subtilis*, kết quả được trình bày trong bảng 4.

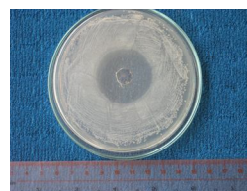
Bảng 4. Ảnh hưởng của nguồn carbon lên hoạt tính KS chủng *Asp. terreus* Đ1

Nguồn carbon	Hoạt tính đối kháng, D-d (cm)	Sinh khối (g)
Glucose	3,06 ± 0,14	0,74 ± 0,04
Maltose	2,42 ± 0,11	0,73 ± 0,01
Galactose	1,13 ± 0,26	0,49 ± 0,04
Tinh bột	3,08 ± 0,14	0,78 ± 0,05
Lactose	2,88 ± 0,06	0,84 ± 0,16
Ri đường	2,87 ± 0,07	0,56 ± 0,01
Fructose	2,97 ± 0,04	0,74 ± 0,01
Sucrose	2,42 ± 0,12	0,91 ± 0,03

Kết quả cho thấy chủng *Asp. terreus* Đ1 có hoạt tính kháng sinh trên tất cả các nguồn carbon nghiên cứu. Trong đó, chủng này có hoạt tính kháng sinh rất mạnh (D-d $\geq 2,5$ cm) trên các nguồn carbon là glucose, tinh bột, lactose, ri đường và fructose. Trên 2 nguồn carbon là glucose và tinh bột chủng này cho hoạt tính mạnh nhất.



Hình 9. Hoạt tính kháng sinh của chủng *Asp. terreus* Đ1 trên MT có nguồn carbon là glucose



Hình 10. Hoạt tính kháng sinh của chủng *Asp. terreus* Đ1 trên MT có nguồn carbon là maltose

3.3.4. Ảnh hưởng của nguồn N

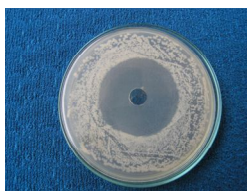
Nuôi chủng *Asp. terreus* Đ1 trên MT6, 1% NaCl, nguồn carbon là glucose, thay đổi nguồn nitrogen, sau 6 ngày khảo sát hoạt tính đối kháng với *B. subtilis*, kết quả được trình bày trong bảng 5.

Bảng 5. Ảnh hưởng của nguồn nitrogen lên hoạt tính kháng sinh của chủng *Asp. terreus* Đ1

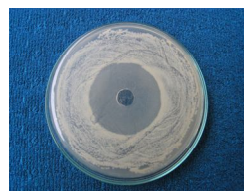
Nguồn nitrogen	Hoạt tính đối kháng, D-d (cm)
0,5g bột đậu tương + 2,5g cao nấm men	3,54 \pm 0,05
3g cao thịt	2,20 \pm 0,05
3g cao nấm men	3,00 \pm 0,06
3g bột đậu tương	1,70 \pm 0,09
1,5g peptone + 1,5 g cao thịt	1,55 \pm 0,04
3g NH ₄ Cl	1,64 \pm 0,07
3g (NH ₄) ₂ SO ₄	1,68 \pm 0,03
3g NH ₄ NO ₃	1,70 \pm 0,05
2,5g bột đậu tương + 0,5 g cao nấm men	3,33 \pm 0,05
3g NaNO ₃	1,85 \pm 0,00
3g peptone	2,38 \pm 0,07

Kết quả cho thấy chủng *Asp. terreus* Đ1 có hoạt tính kháng sinh trên tất cả các nguồn nitrogen nghiên cứu. Trong đó, chủng này có hoạt tính kháng sinh mạnh trên nguồn nitrogen là cao nấm men và cao nấm men + bột đậu tương. Khi MT chỉ có nguồn nitrogen là bột đậu tương thì hoạt tính kháng sinh của chủng này không mạnh. Khi MT chỉ có nguồn nitrogen là cao nấm men, thì chủng này cho hoạt tính kháng sinh

rất mạnh. Khi MT có cả 2 nguồn nitrogen là cao nấm men và đậu tương thì chủng này cho hoạt tính kháng sinh mạnh hơn cả. Chủng này cho hoạt tính kháng sinh mạnh nhất khi trong MT có 0,5g bột đậu tương và 2,5g cao nấm men.



Hình 11. Hoạt tính kháng sinh của chủng *Asp. terreus* Đ1 trong MT có nguồn nitrogen là 0,5g bột đậu tương và 2,5g cao nấm men



Hình 12. Hoạt tính kháng sinh của chủng *Asp. terreus* Đ1 trong MT có nguồn nitrogen là 2,5g bột đậu tương và 0,5 g cao nấm men

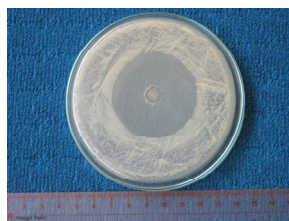
3.3.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Nuôi chủng *Asp. terreus* Đ1 trên MT6, 1% NaCl, nguồn carbon là glucose, nguồn nitrogen gồm 0,5 g bột đậu tương và 2,5g cao nấm men, ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau. Sau 6 ngày khảo sát hoạt tính đối kháng với *B. subtilis*, kết quả được trình bày trong bảng 6.

Bảng 6. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt tính kháng sinh chủng *Asp. terreus* Đ1

Nhiệt độ (°C)	Hoạt tính đối kháng, D-d (cm)	Sinh khối (g)
20	3,24 ± 0,09	1,31 ± 0,01
25	3,83 ± 0,17	1,30 ± 0,05
30	3,39 ± 0,06	1,61 ± 0,06
35	2,64 ± 0,06	1,21 ± 0,07
40	1,26 ± 0,06	1,31 ± 0,01

Kết quả cho thấy chủng *Asp. terreus* Đ1 có hoạt tính kháng sinh ở tất cả các điều kiện nhiệt độ nghiên cứu. Trong đó, chủng này cho hoạt tính rất mạnh trong khoảng nhiệt độ từ 20-35°C, mạnh nhất ở 25°C.



Hình 13. Hoạt tính kháng sinh của chủng *Asp. terreus* Đ1 ở 25°C

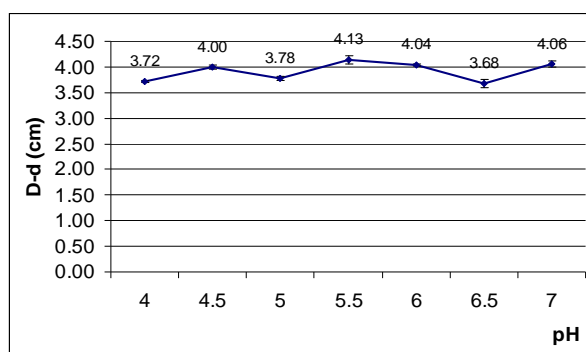


Hình 14. Hoạt tính kháng sinh của chủng *Asp. terreus* Đ1 ở 35°C

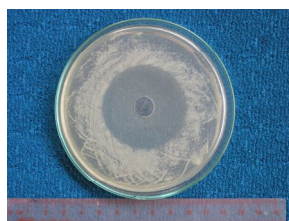
3.3.6. Ảnh hưởng của pH ban đầu trong MT nuôi cấy

Nồng độ ion H⁺ hoặc OH⁻ làm thay đổi độ phân li của các chất trong MT do đó pH có ảnh hưởng quan trọng đến sinh trưởng, trao đổi chất của VSV. pH còn ảnh hưởng quan trọng đến hoạt tính enzyme, đến sản phẩm trung gian, đến sự phân li, sự hòa tan,... do đó ảnh hưởng đến sinh tổng hợp kháng sinh. Vì vậy, chúng tôi tiến hành khảo sát ảnh hưởng của pH lên hoạt tính kháng sinh của chủng *Asp. terreus* Đ1. Nuôi chủng này trên MT6, 1% NaCl, nguồn carbon là glucose, nguồn nitrogen gồm 0,5 g bột đậu tương + 2,5g cao nấm men, ở 25°C, với pH MT được điều chỉnh trong khoảng từ 4 - 7 bằng NaOH 1N và HCl 1N. Sau 6 ngày, khảo sát hoạt tính đối kháng với *B. subtilis*, kết quả được trình bày trong đồ thị 2.

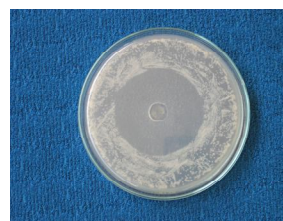
Đồ thị 2. Ảnh hưởng của pH lên hoạt tính kháng sinh chủng *Asp. terreus* Đ1



Kết quả cho thấy chủng *Asp. terreus* Đ1 có hoạt tính kháng sinh rất mạnh ở tất cả các điều kiện pH nghiên cứu. Trong đó, chủng này có hoạt tính kháng sinh mạnh nhất ở pH 5,5.



Hình 15. Hoạt tính kháng sinh của chủng *Asp. terreus* Đ1 trên pH = 4,5

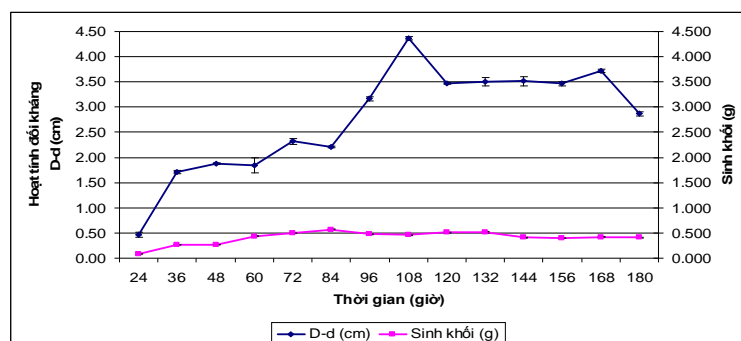


Hình 16. Hoạt tính kháng sinh của chủng *Asp. terreus* Đ1 trên pH = 5,5

3.3.7. Động thái lên men

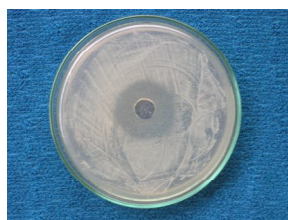
Nuôi chủng *Asp. terreus* Đ1 trên MT6, 1% NaCl, nguồn carbon là glucose, nguồn nitrogen 0,5 g bột đậu tương + 2,5g cao nấm men, ở 25°C, pH MT 5,5. Sau 12 giờ khảo sát hoạt tính đối kháng với *B. subtilis*, đo pH dịch lên men và cân sinh khối khô, kết quả được trình bày trong đồ thị 3.

Đồ thị 3. Động thái quá trình lên men

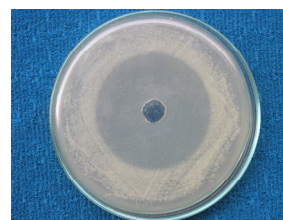


Kết quả cho thấy, sinh khối của chủng *Asp. terreus* Đ1 tăng dần từ 24h đến khoảng 84h, sau đó đạt trạng thái ổn định đến khoảng 132h và giảm nhẹ. pH MT giảm trong thời gian đầu, từ pH ban đầu của MT là 5,5 giảm đến 3,84 sau 48h nuôi cấy.

Hoạt tính kháng sinh của chủng nấm sợi nghiên cứu tăng dần sau 24h, đạt mức rất mạnh sau 96h nuôi cấy và đạt cực đại ở 108h, sau đó giảm nhẹ và giữ trạng thái ổn định cho đến 168h. Hoạt tính kháng sinh ổn định ở mức mạnh trong thời gian khá dài (72h, từ 96h-168h) tạo điều kiện thuận lợi cho việc thu chất kháng sinh từ chủng NS này.



Hình 17. Hoạt tính kháng sinh của chủng *Asp. terreus* Đ1 sau 48h



Hình 18. Hoạt tính kháng sinh của chủng *Asp. terreus* Đ1 sau 108h

Như vậy, sau khi chúng tôi khảo sát tìm các điều kiện nuôi cấy thích hợp cho hoạt tính kháng sinh của chủng *Asp. terreus* Đ1, hoạt tính đối kháng của chủng này với *B. subtilis* tăng lên đáng kể từ $2,74 \pm 0,01$ cm đến $4,37 \pm 0,03$ cm (tăng 1,59 lần).

4. Kết luận

Qua quá trình tiến hành đề tài, chúng tôi đã thu được những kết quả như sau:

- Đã phân lập được 58 chủng NS từ RNM Cần Giờ và tuyển chọn được chủng Đ1 có hoạt tính đối kháng mạnh với *B. subtilis*.
- Đã định danh chủng nấm sợi Đ1 có hoạt tính kháng sinh mạnh thuộc loài *Aspergillus terreus*.
- Đã khảo sát và tìm ra các điều kiện nuôi cấy thích hợp cho chủng *Asp. terreus* Đ1 sinh kháng sinh mạnh nhất như sau: glucose 30 g, bột đậu tương 0,5 g, cao nấm men 2,5 g, KH_2PO_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g, NaCl 0,5 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, $\text{FeCl}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 mg, nước cất 1 lít; pH 5,5; nhiệt độ nuôi cấy 25°C; thời gian nuôi cấy 108 giờ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bùi Xuân Đổng (2004), *Vi nấm dùng trong công nghệ sinh học*, Nxb Khoa học và kỹ thuật, tr. 154-160.
2. Brakhage A. A., Scheper T. (2004), *Molecular Biotechnology of Fungal β -Lactam Antibiotics and Related Peptide Synthetases - Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Vol. 88, Springer Berlin Heidelberg New York, pp. 47-49.
3. Carsten Christophersen, Oscar Crescente, Jens C. Frisvad, Lone Gram, Joan Nielsen, Per Halfdan Nielsen, Lisa Rahbæk (1999), “Antibacterial activity of marine-derived fungi”, *Mycopathologia*, 143(3), pp. 135-138.
4. Egorov N.S. (1985), *Antibiotics - A scientific approach*, MIR, pp. 76-340.
5. Gareth Jones E. B. (2011), “Fifty years of marine mycology”, *Fungal Diversity*, 50, pp. 73-112.
6. Masahira Nakagawa, Arika Hirota, Heiichi Sakai (1982), “Terrecyclic acid A, A new antibiotic from *Aspergillus terreus*”, *The Journal of Antibiotics*, 35(7), pp. 778-782.
7. Petur W. Dalsgaard, Thomas O. Larsen, Carsten Christophersen (2005), “Bioactive Cyclic Peptides from the Psychrotolerant Fungus *Penicillium algidum*”, *The Journal of Antibiotics*, 58(2), pp.141-144.
8. Robert A. Samson, Ellen S. Hoekstra, Jens C. Frisvad (2004), *Intruduction to food and airborne fungi*, Centraalbureau voor Schimmelculture_Utrecht, pp. 52-76.
9. Simone Rochfort, Joanne Ford, Simon Ovenden, Soo San Wan, Samantha George, Howard Wildman, R. Murray Tait, Barbara Meurer-Grimes, Susan Cox, Jonathan Coates, David Rhodes (2005), “A Novel Aspochalasin with HIV-1 Integrase Inhibitory Activity from *Aspergillus flavipes*”, *The Journal of Antibiotics*, 58(4), pp. 279-283.
10. Soo-Jin Choo, Hae-Ryong Park, In-Ja Ryoo, Jong-Pyung Kim, Bong-Sik Yun, Chang-Jin Kim, Kazuo Shin-ya, Ick-Dong Yoo (2005), “Deoxyverrucosidin, a Novel GRP78/BiP Down-regulator, Produced by *Penicillium* sp.”, *The Journal of Antibiotics*, 58(3), pp. 210-213.

(Ngày Tòa soạn nhận được bài: 05-6-2013; ngày phản biện đánh giá: 20-6-2013;
ngày chấp nhận đăng: 21-6-2013)