

NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CỦA CHỦNG XẠ KHUẨN CH9.4 PHÂN LẬP TỪ ĐẤT TRỒNG TRỌT HUYỆN QUỐC OAI, HÀ NỘI

STUDY ON BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF ACTINOMYCETE STRAIN CH9.4 ISOLATED FROM CROPLAND IN QUOC OAI DISTRICT, HANOI

*Nguyễn Thị Ngọc Anh**, *Nguyễn Thị Phương Thảo**,
*Nguyễn Thành Chung**, *Phạm Thị Dinh**, *Tạ Thị Thu Thủy**

Ngày tòa soạn nhận được bài báo: 02/03/2022
Ngày nhận kết quả phản biện đánh giá: 05/09/2022
Ngày bài báo được duyệt đăng: 30/09/2022

Tóm tắt: Trong môi trường đất, *Streptomyces* thường chiếm tỷ lệ chính trong tổng số quần thể xạ khuẩn và được công nhận là nguồn cung cấp phong phú các hợp chất có hoạt tính sinh học hữu ích. Chủng xạ khuẩn CH9.4 được phân lập từ đất trồng trọt huyện Quốc Oai, Hà Nội thể hiện hoạt tính sinh học cao, kháng cả vi khuẩn Gram âm và Gram dương, sinh trưởng tốt trên nhiều loại môi trường nuôi cấy với nhiệt độ sinh trưởng tối ưu là 28^oC, pH 7,5. Dựa vào nghiên cứu đặc điểm sinh học và phân tích trình tự gen mã hóa 16S rDNA, chủng CH9.4 có độ tương đồng cao với chủng *Streptomyces cinnamonensis*, do đó được đặt tên là *S. cinnamonensis* CH9.4. Phân tích sự có mặt của gen chức năng liên quan đến sinh tổng hợp kháng sinh cho thấy chủng *S. cinnamonensis* CH9.4 mang gen mã hóa polyketide loại 2. Như vậy chủng *S. cinnamonensis* CH9.4 có tiềm năng cao trong nghiên cứu sinh tổng hợp kháng sinh từ vi sinh vật.

Từ khóa: chất kháng sinh, xạ khuẩn, *Streptomyces*, polyketide, vi khuẩn.

Abstract: In the soil environment, *Streptomyces* often make up a major proportion of the total actinomycete population and are recognized as a rich source of useful bioactive compounds. Actinomycete strain CH9.4 was isolated from cropland in Quoc Oai district, Hanoi showed high biological activity as resistance to both Gram-negative and gram-positive bacteria, and good growth on a variety of culture media at different temperatures. Optimum growth of CH9.4 strain is 28^oC, pH 7.5. Based on the biological characterization study and analysis of the 16S rDNA gene sequence, CH9.4 strain has a high similarity with *Streptomyces cinnamonensis* strain, hence the name *S. cinnamonensis* CH9.4. Analysis of the presence of functional genes involved in antibiotic biosynthesis showed that the strain *S. cinnamonensis* CH9.4 carried the gene encoding polyketide type 2. Thus, the strain *S. cinnamonensis* CH9.4 has a high potential for research. biosynthesis of antibiotics from microorganisms.

Keywords: antibiotics, actinomycetes, *Streptomyces*, polyketides, bacteria.

* Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm – Trường Đại học Mở Hà Nội

I. Đặt vấn đề

Kể từ đầu những năm 1940, lịch sử của thuốc kháng sinh đã liên quan rất nhiều đến vi sinh vật. Một trong những nhóm vi khuẩn tạo ra nhiều loại kháng sinh quan trọng là Actinobacteria [1,2]. Chi quan trọng nhất của chúng là *Streptomyces*, có dạng sợi giống như nấm và đã trở thành nguồn cung cấp khoảng 2/3 tổng số kháng sinh tự nhiên đã biết [3]. Trong số các chất kháng sinh do *Streptomyces* tạo ra, polyketides là một trong những nhóm hợp chất rất quan trọng. Một số ví dụ về polyketide do *Streptomyces* sản xuất là rapamycin, oleandomycin, actinorhodin, daunorubicin và caprazamycin đã được ứng dụng rộng rãi trong y học và dược phẩm [4,5,6,7,8].

Polyketides là một nhóm lớn các chất chuyển hóa thứ cấp có sự đa dạng đáng chú ý về cấu trúc và chức năng của chúng [9,10]. Polyketides thể hiện một loạt các hoạt tính sinh học như kháng khuẩn [11, 12], kháng nấm [13], chống ung thư [14], kháng virus [15], ức chế miễn dịch [16], chống cholesterol và hoạt động chống viêm [17] *Streptomyces* được biết đến nhiều nhất như một trong những nhà sản xuất polyketides quan trọng. Nghiên cứu sàng lọc các chủng xạ khuẩn đất có khả năng sinh tổng hợp các chất kháng sinh thuộc nhóm polyketide là một hướng nghiên cứu khá tiềm năng ở Việt Nam. Bài báo này tập trung nghiên cứu đặc điểm sinh học và phân loại chủng xạ khuẩn CH9.4 có khả năng sinh kháng sinh polyketide được phân lập từ đất trồng trọt tại huyện Quốc Oai, Hà Nội.

II. Phương pháp nghiên cứu:

2.1. Vi khuẩn và môi trường nuôi cấy

Chủng xạ khuẩn CH9.4 phân lập từ đất trồng trọt huyện Quốc Oai có khả năng kháng cao với vi khuẩn kiểm định G⁺ và G⁻ được bảo quản và lưu trữ tại phòng thí nghiệm khoa Công nghệ Sinh học, trường

Đại học Mở Hà Nội

Các vi khuẩn kiểm định *Escherichia coli* JM109, *Bacillus subtilis* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* CCARM 3090 được cung cấp bởi phòng thí nghiệm Sinh học phân tử, khoa Công nghệ Sinh học, trường Đại học Mở Hà Nội.

Các hóa chất được sử dụng trong nghiên cứu được cung cấp bởi các hãng Merck (Đức), Bio Basic (Canada), Himedia (Ấn Độ), Promega (Mỹ), Trung Quốc.

Môi trường nuôi cấy: Các môi trường theo ISP (International Streptomyces Project) [18], môi trường R2YE, NDYE được sử dụng để nuôi cấy và phân loại xạ khuẩn. Môi trường LB được dùng để nuôi cấy vi khuẩn kiểm định.

2.2. Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học của chủng xạ khuẩn CH9.4

Đặc điểm hình thái: Màu sắc của khuẩn ty cơ chất (KTCC), khuẩn ty khí sinh (KTKS) và sắc tố tan tiết ra môi trường được đánh giá theo Shirling và Gottlieb (1966) trên bảng màu của Tresner và Backus (1963) [20,21] Chuỗi bào tử và bề mặt bào tử được quan sát dưới kính hiển vi điện tử sau thời gian nuôi là 7 ngày và 14 ngày [20,22]

Đặc điểm sinh hóa: Quan sát khả năng đồng hóa nguồn cacbon và nitơ của xạ khuẩn lần lượt trong môi trường ISP9 (g/l- (NH₄)₂SO₄ 2.64, KH₂PO₄ 2.38, K₂HPO₄.3H₂O 5.65, MgSO₄.7H₂O 1; dung dịch B 1.0 ml, agar 20, pH = 7.0) có bổ sung 1% các nguồn cacbon và 0.1% nguồn nitơ tương ứng [20,22].

Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến khả năng sinh trưởng của xạ khuẩn CH9.4 gồm các yếu tố: nhiệt độ (20, 24, 28, 32, 36, 40°C), pH ban đầu (5; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0; 10) và nồng độ NaCl (1-10%) trên môi trường ISP2 [22].

2.3. Tách ADN tổng số và khuếch đại đoạn gen mã hóa 16S rADN, PKS I và PKS II của chủng xạ khuẩn CH9.4

Chủng CH9.4 nuôi cấy trên môi trường R2YE lỏng, sau 72 giờ tiến hành ly tâm ở 4000 vòng/phút, trong 10 phút, ở 4°C, thu tế bào. DNA tổng số của xạ khuẩn được tách theo phương pháp của Sambrook và Rusell (2001) [23] và gen mã hóa 16S rDNA, PKS-I và PKS-II được khuếch đại bằng phương pháp PCR sử dụng 3 cặp mồi 16S rADN (27F 5'-AGAGTTTGTATCMTGGCTCAG-3' và 1492R 5'- TACGGYTACCTTGTTA CGACTT-3') (Genset); PKS I (K1F: 5'- TSAAGTCSAAC ATCGGBCA-3' và M6R: 5'- CGCAGGTTSCS GTACCAGTA- 3'); PKS II (KSaF: 5'- TSGCSTGCTTG GAYGCSATC -3' và KSaR: 5'-TGGAANCCGCCGAA BCCGCT-3') [24] theo chu trình nhiệt: 94°C trong 5 phút, 25 chu kỳ (94°C trong 30s, 55°C (27F/1492R) hay 57°C (K1F/M6R) hay 58°C (KSaF/KSaR) trong 30s, 72°C trong 1 phút), và 72°C trong 10 phút, giữ mẫu ở 4°C. Sản phẩm của phản ứng PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%. Kích thước của đoạn ADN thu được sau phản ứng PCR được so sánh với thang ADN chuẩn (1Kb Plus DNA ladder Marker). Sản phẩm PCR được tinh sạch và được gửi đi giải trình tự tại Apical Scientific Sequencing, Malaysia. So sánh trình tự gen tương ứng trên cơ sở dữ liệu Genbank nhờ công cụ BLAST (www.ncbi.nih.gov).

2.4. Phân tích kết quả giải trình tự gen và xây dựng cây phát sinh loài

Mức độ tương đồng di truyền của các chủng được phân tích dựa trên phần mềm Bioedit và phần mềm Mega-X để xây dựng cây phát sinh loài bằng cách sử dụng mô hình khoảng cách Tajima-Nei. Một nghìn bản sao bootstrap đã được thực hiện và cây phân loại được hiển thị [26].

2.5. Xác định hoạt tính kháng sinh thô

Chủng CH9.4 được nuôi trên môi trường R2YE lỏng ở điều kiện 28°C, tốc độ lắc 150 vòng/phút, trong 4 ngày sau đó ly tâm ở 4000 vòng/phút, trong 10 phút để thu dịch lên men. Dịch lên men được lắc đều với dung môi hữu cơ Ethyl acetate với tỷ lệ 1:1 trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng, sau đó thu kháng sinh tan trong ethyl acetate và quay cô thu nhận kháng sinh thô. Nhỏ kháng sinh thô vào mảnh giấy lọc và thử hoạt tính với các vi sinh vật kiểm định. Sau 18 giờ kiểm tra vòng kháng khuẩn.

III. Kết quả và thảo luận

3.1. Đặc điểm sinh học của chủng xạ khuẩn CH9.4

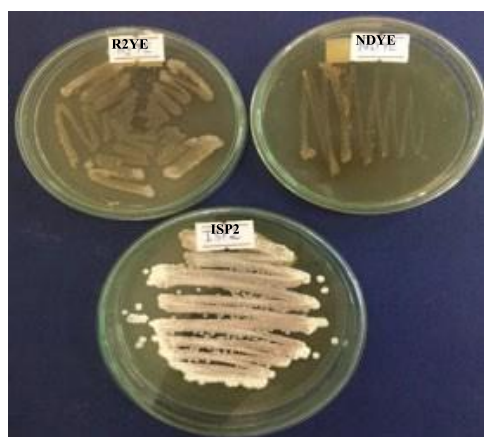
3.1.1. Đặc điểm hình thái

Màu sắc của một số chủng xạ khuẩn khi nuôi cấy trên môi trường ISP thường khác nhau, đây là yếu tố đầu tiên để phân loại xạ khuẩn theo khóa định tên loài xạ khuẩn ISP Nonomura [18] và khóa phân loại của Bergey [19]. Khuẩn ty khí sinh và khuẩn ty cơ chất của các chủng xạ khuẩn được so sánh với bảng màu của Tresner và Backus [21], cùng với khả năng hình thành sắc tố tan và sự hình thành sắc tố melanin cũng là một trong những yếu tố phân loại xạ khuẩn.

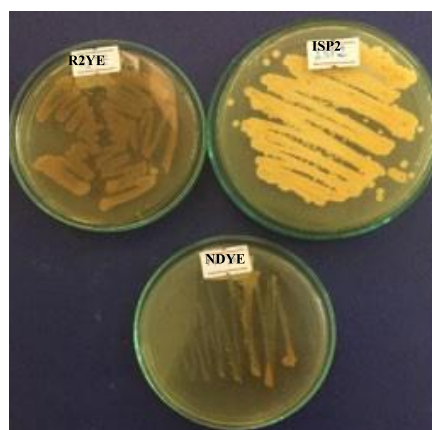
Chủng xạ khuẩn CH9.4 cũng phát triển tốt trên các môi trường ISP1 đến ISP6 và môi trường R2YE và NDYE. Trên các môi trường ISP, chủng CH9.4 sinh trưởng nhanh, thời gian hình thành bào tử của CH9.4 trung bình là 3- 4 ngày; còn trên môi trường R2YE và NDYE, chủng xạ khuẩn này có thời gian sinh bào tử dài hơn là 7 ngày. Khuẩn ty khí sinh của chủng này trên môi trường ISP1 có màu nâu nhạt; trên ISP2, ISP3, ISP4, ISP5, ISP6 có màu nâu, và trên R2YE và NDYE có màu nâu sậm. Chủng CH9.4 có khuẩn ty cơ chất có màu vàng sậm đến vàng nâu (hơi đen) trên tất cả các môi trường thử nghiệm. Chúng hình thành sắc tố tan màu nâu và không hình thành sắc tố melanin

Bảng 3.1. Đặc điểm hình thái của chủng CH9.4 trên môi trường nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy	Màu sắc khuẩn ty		Sắc tố	
	KTKS	KTCC	Sắc tố tan	Sắc tố melanin
ISP1	Nâu nhạt	Vàng nhạt	Nâu	-
ISP2	Nâu	Vàng sậm	Nâu	-
ISP3	Nâu	Vàng	-	-
ISP4	Nâu	Vàng cam	Nâu	-
ISP5	Nâu	Vàng sậm	Nâu	-
ISP6	Nâu	Vàng sậm	Nâu	-
R2YE	Nâu sậm	Vàng Nâu	Nâu đen	-
NDYE	Nâu sậm	Vàng nâu	Nâu đen	-



a. Khuẩn ty khí sinh



b. Khuẩn ty cơ chất

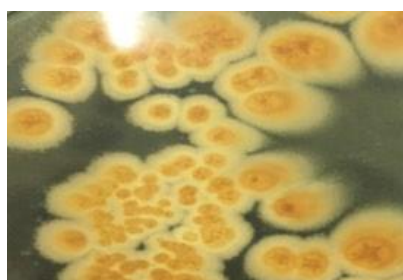
Hình 3. 1. Màu sắc khuẩn ty của chủng xạ khuẩn CH9.4 trong các môi trường khác nhau

Chủng CH9.4 được nuôi lỏng trong môi trường ISP4 ở 28°C, trong 4 ngày rồi đem pha loãng đến nồng độ 10^{-5} , 10^{-6} và cấy chang trên môi trường ISP4 đặc để quan sát hình thái khuẩn lạc và quan sát dưới kính hiển vi với độ phóng đại 1000x để xác định hình thái khuẩn ty. Kết quả thu được như hình 3.2.

Chủng CH9.4 sau 3 ngày nuôi cấy trên môi trường ISP4 đặc, khuẩn lạc sinh bào tử có màu hồng nâu với kích thước khoảng 2-3mm. Khuẩn lạc có viền hình răng cưa, bề mặt sần sùi, hơi lồi và không bóng. KTCC của CH9.4 có màu vàng cam, không hình thành sắc tố melanin; sợi khí sinh có dạng bụi sợi dài, ít phân nhánh, các tế bào dài và bắt màu tím theo phương pháp nhuộm Gram.



a - Khuẩn lạc sau 3 ngày nuôi cấy



b - Khuẩn ty cơ chất



c- Hình thái khuẩn ty

Hình 3.2. Đặc điểm hình thái của CH9.4 trên môi trường ISP4

3.1.2. Một số đặc điểm sinh hóa của chủng xạ khuẩn CH9.4

Khả năng đồng hóa các nguồn cacbon và nitơ khác nhau là một trong những đặc điểm sinh lý, sinh hóa quan trọng của xạ khuẩn theo Nomomura trong ISP (1974) [18]. Nuôi cấy chủng CH9.4 trên môi trường ISP9 có bổ sung các nguồn đường và nguồn nitơ khác nhau. Kết quả cho thấy, các chủng xạ khuẩn đã tuyển chọn có khả năng đồng hóa đa dạng các nguồn đường khác nhau, đặc biệt là khả năng đồng hóa cao nhất với glucose, maltose, galactose, succtose; đồng hóa kém hơn với lactose, mannitol, cellobiose; không có khả năng đồng hóa xylose và raffinose; không có khả năng sinh trưởng trên môi trường không cung cấp nguồn cacbon (Bảng 3.2). Có khả năng sử dụng đa số nguồn nitơ đã kiểm

NGHIỆM như: L-asparagine, L-tyrosine, glycerine, tryptone, peptone, (NH₄)₂SO₄ và NH₄NO₃ (Bảng 3.2); không sinh trưởng được nếu môi trường không cung cấp nguồn nitơ; cho sắc tố tan màu nâu sậm.

Quá trình sinh trưởng, phát triển và trao đổi chất của vi sinh vật chịu ảnh hưởng mạnh mẽ của các yếu tố môi trường. Chủng CH9.4 được nuôi cấy trên môi trường ISP2 với các điều kiện nhiệt độ, pH và nồng độ NaCl khác nhau. Kết quả cho thấy, chủng này sinh trưởng trong điều kiện nhiệt độ từ 26 – 36^o C và tốt nhất ở 28^o C; pH từ 6-10 và tốt nhất ở pH = 7,5; nồng độ NaCl từ 1 - 5% và tốt nhất ở 4%. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với Sirisha và cs. (2013) [25] rằng đa số các chủng xạ khuẩn chỉ sinh trưởng được trong môi trường có nồng độ muối dưới 10%.

Bảng 3.2. Một số đặc điểm sinh hóa của chủng xạ khuẩn CH9.4

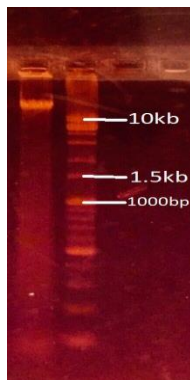
Nguồn carbon (1,0%; w/v)	Khả năng sinh trưởng	Nguồn nitrogen (1,0%; w/v)	Khả năng sinh trưởng
D- Glucose	+	L- asparagin	+
Succrose	+	L- tyrosin	+
Mantose	+	Glycerin	+
Lactose	+/-	Tryptone	+
D- mannitol	+/-	Peptone	+
D- galactose	+	(NH ₄) ₂ SO ₄	+
D- xylose	-	NH ₄ NO ₃	+
D- cellobiose	+	Không có nitrogen	-
Raffinose	-		
Không có carbon	-		
Nhiệt độ thích hợp		28 ^o C	
pH thích hợp		7,5	
Nồng độ NaCl		4%	

3.2. Phân tích trình tự 16S rDNA

Tế bào xạ khuẩn được dùng để tách DNA tổng số theo phương pháp của Sambrook và Rusell (2001) [23]. DNA tổng số của xạ khuẩn được hòa tan trong nước deion và chạy điện di kiểm tra trên gel agarose 1% cho kết quả như hình 3.3 có 1 băng DNA duy nhất, có kích thước trên 10Kb. Điều này chứng tỏ đã tách

thành công DNA tổng số của các chủng xạ khuẩn.

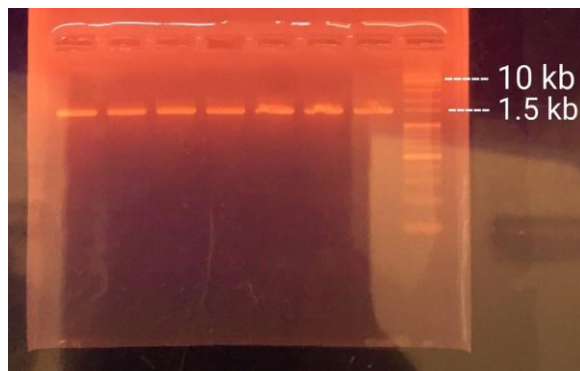
DNA tổng số của CH9.4 được dùng làm khuôn cho phản ứng PCR với cặp mồi suy biến. Sản phẩm PCR được chạy điện di trên bản gel agarose 1,0% cho kết quả 1 vạch duy nhất với kích thước tương ứng gần 1,5 kb tương ứng với kết quả mong đợi khi thiết kế mồi (Hình 3.4).



Hình 3.3. Điện di DNA tổng số của các chủng xạ khuẩn CH9.4

Sản phẩm PCR đoạn gen 16S rDNA của chủng CH9.4 được tinh sạch sau đó được gửi đi giải trình tự tại Apical Scientific sequencing, Malaysia, cho kết quả được trình bày dưới đây:

ACCCATGCAAGTCGAACGAT-
 GAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGT-
 GGCGAACGGGTGAGTAACACGTG-
 GGCAATCTGCCCTTCACTCTGGG-
 ACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTA-
 ATACCGGATAACCACTCCTGCCTG-
 CATGGGCGGGGGTTGAAAGCTC-
 CGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCG-
 GCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTA-
 ATGGCCTACCAAGGCGACGACGG-
 GTAGCCGGCCTGAGAGGGCGAC-
 CGGCCACACTGGGACTGAGACAC-
 GGCCCAGACTCCTACGGGAGG-
 CAGCAGTGGGGAATATTGCACAAT-
 GGGCGAAAGCCTGATGCAGCGAC-
 GCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTC-
 GGGTTGTAAACCTCTTTTCAG -
 CAGGGAAGAAGCGAAAGTGAC-
 GGTACCTGCAGAAGAAGCGC -
 CGGCTAACTACGTGCCAGCAGC-
 CGCGGTAATACGTAGGGCGCAAG-
 CGTTGTCCGGAATTATTGGGCG-
 TAAAGAGCTCGTAGGGCGGCTTGT-
 CACGTCGGATGTGAAAGCCCGAG-
 GCTTAACCTCGGGTCTGCATTC-

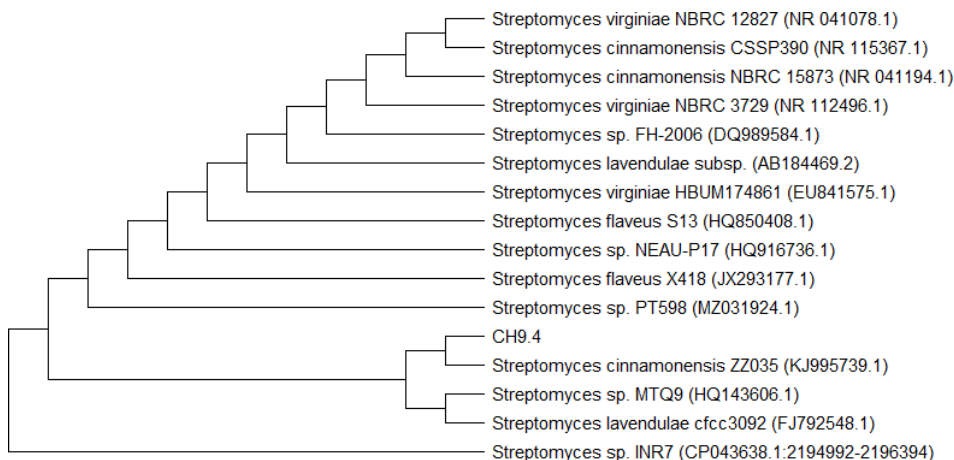


Hình 3.4. Điện di sản phẩm PCR của đoạn gen 16S rDNA của chủng xạ khuẩn CH9.4

GATACGGGCTAGCTAGAGTGTG-
 GTAGGGGAGATCGGAATTCCTG-
 GTGTAGCGGTGAAATGCGCAGA-
 TATCAGGAGGAACACCGGTGG-
 CGAAGGCGGATCTCTGGGCCAT-
 TACTGACGCTGAGGAGCGAAAG-
 CGTGGGGAGCGAACAGGATTAG-
 ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA-
 AACGTTGGGAACTAGGTGTTGGC-
 GACATTCCACGTCGTCGGTGCCG-
 CAGCTAACGCATTAAGTTCCTCCG-
 CCTGGGGAGTACGGCCGCAAG-
 GCTAAACTCAAAGGAATTGACG-
 GGGGCCCGCACAAGCGGGCGGAG-
 CATGTGGCTTAATTCGACGCAAC-
 GCGAAGAACCTTACCAAGGCTTG-
 ACATATAACGGAAAGCATTAGAGA-
 TAGTGCCCCCTTGTGGTTCGG-
 TATACAGGTGGTGCATGGCTGTC-
 GTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTG-
 GGTTAAGTCCCGCAACGAGCG-
 CAACCCTTGTCTGTGTTGCCAG-
 CATGCCCTTCGGGGTGATGGG-
 GACTCACAGGAGACCGCCGGGGT-
 CAACTCGGAGGAAGGTGGGGAC-
 GACGTCAAGTCATCATGCCCTTAT-
 GTCTTGGGCTGCACACGTGCTA-
 CAATGGCCGGTACAATGAGCTGC-
 GATACCGTGAGGTGGAGCGAATCT-
 CAAAAGCCGGTCTCAGTTCG-

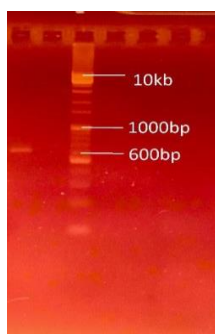
GATTGGGGTCTGCAACTCGAC-
 CCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTA-
 ATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGT-
 GAATACGTTCCCGGGCCTTGTACA-

CACCGCCCGTCACGTCACGAAAG-
 TCGGTAACACCCGAAGCCGGTG-
 GCCCAACCCTTGTGGAGGGAGCT-
 GTCGAAGGTGGACNNGGGGCGG



Hình 3.5. Cây phát sinh loài dựa trên trình tự 16S rDNA của chủng xạ khuẩn CH9.4 (Lịch sử tiến hóa được suy ra bằng phương pháp Neighbor-Joining. Cây tối ưu có tổng chiều dài nhánh = 773,75000000 được hiển thị. Tỷ lệ phần trăm cây sao chép trong đó các đơn vị phân loại liên kết được nhóm lại với nhau trong thử nghiệm bootstrap (500 lần lặp lại) được hiển thị bên cạnh các nhánh. Khoảng cách tiến hóa được tính bằng cách sử dụng phương pháp số hiệu và được tính bằng đơn vị của số hiệu cơ bản trên mỗi chuỗi. Phân tích này liên quan đến 16 trình tự nucleotide. Tất cả các vị trí chứa khoảng trống và dữ liệu bị thiếu đã bị loại bỏ (tùy chọn xóa hoàn toàn). Có tổng cộng 1347 vị trí trong tập dữ liệu cuối cùng. Các phân tích tiến hóa được thực hiện trong MEGA X).

3.3. Xác định gen mã hóa PKS của chủng xạ khuẩn CH9.4



Hình 3.6. Kết quả khuếch đại đoạn gen mã hóa polyketide loại 2 của các chủng CH9.4

Polyketide là những chất chuyển hóa thứ cấp đa dạng về cấu trúc đã được tìm thấy ứng dụng rộng rãi trong dược

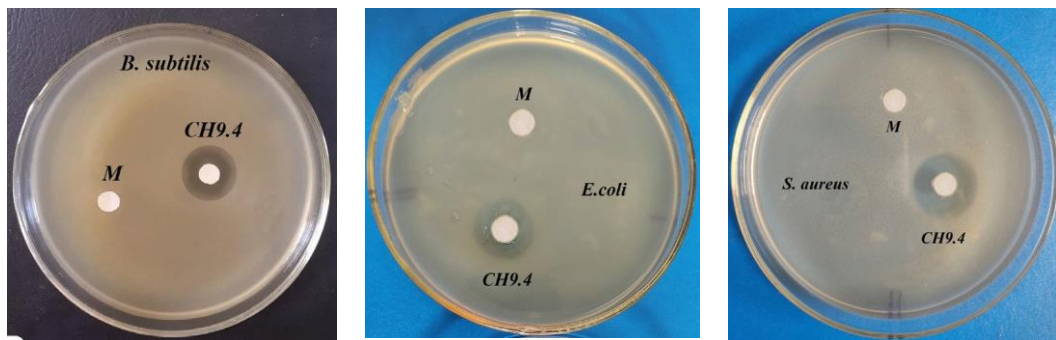
phẩm, đặc biệt là kháng sinh. Vì vậy, việc sàng lọc và đánh giá các gen liên quan đến quá trình trao đổi chất thứ cấp là rất cần thiết để đánh giá tiềm năng sinh tổng hợp chất kháng sinh của chủng xạ khuẩn tuyển chọn.

DNA tổng số của CH9.4 được dùng làm khuôn để khuếch đại đoạn gen mã hóa PKS bằng phản ứng PCR với các cặp mồi đặc hiệu. Kết quả hình 3.6 cho thấy chủng CH9.4 có sản phẩm sau khuếch đại cho 1 băng duy nhất có kích thước khoảng 600 bp tương ứng với gen mã hóa PKSII, còn với phản ứng với PKS I không cho sản phẩm. Điều này chứng tỏ, chủng CH9.4 mang gen mã hóa kháng sinh polyketide loại II nhưng không mang gen mã hóa PKS I.

3.4. Đánh giá hoạt tính kháng sinh thô thu được từ chủng xạ khuẩn CH9.4

Chủng xạ khuẩn CH9.4 được lên men trong môi trường R2YE sau đó được tách chiết và thu nhận kháng sinh thô. Kháng sinh thô sau đó được hòa tan trong methanol và được bảo quản ở -20°C . Thử hoạt tính kháng sinh thô bằng phương pháp khoan giấy lọc trên môi trường có

chứa các loại vi sinh vật kiểm định, cho kết quả đường kính vòng kháng khuẩn với *B. subtilis* là 10 mm, với *E. coli* JM109 là 10 mm và với *S. aureus* là 12 mm (hình 3.7). Như vậy kháng sinh thô được thu nhận từ chủng xạ khuẩn *S. cinnamomensis* CH9.4 có khả năng kháng khuẩn rộng đối với cả vi khuẩn Gram (+) và Gram (-), rất có tiềm năng trong nghiên cứu chất kháng sinh mới có hoạt tính cao.



Hình 3.7. Hoạt tính kháng sinh thô của *S. cinnamomensis* CH9.4 với các loại VK kiểm định

IV. Kết luận

Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học và phân tích trình tự 16S rDNA cho thấy chủng CH9.4 có đặc điểm gần gũi với *S. cinnamomensis* và được đặt tên là *S. Cinnamomensis* CH9.4. Chủng này có khả năng đồng hóa đa dạng các nguồn cacbon và nitrogen, trong đó tốt nhất với đường glucose, sucrose, mantose và galactose; phát triển tốt ở 28°C , pH=7,5 và nồng độ NaCl là 4%.

Chủng CH9.4 có khả năng kháng khuẩn cao với cả 3 loại vi khuẩn kiểm định và mang gen mã hóa polyketide loại 2 nên được dự đoán có tiềm năng sinh kháng sinh cao.

Tài liệu tham khảo:

- [1]. R. Müller, J. Wink, Future potential for anti-infectives from bacteria—How to exploit biodiversity and genomic potential. Int. J. Med. Microbiol, 304:3–13, (2014).
- [2]. Y. Widyastuti, P. Lisdiyanti, S. Ratnakomala, G. Kartina, R. Ridwan, R.

Rohmatussolihat, N. Rosalinda Prayitno, E. Triana, N. Widhyastuti, et. al., Genus diversity of Actinomycetes in Cibinong Science Center, West Java, Indonesia, Microbiol, 6:165–172, (2012).

[3]. X. Lucas, C. Senger, A. Erxleben, B.A. Grüning, K. Döring, J. Mosch, S. Flemming, S. Günther, StreptomeDB: A resource for natural compounds isolated from Streptomyces species. Nucleic Acids Res, 41:D1130–D1136, (2013).

[4]. M. Igarashi, Y. Takahashi, T. Shitara, H. Nakamura, H. Naganawa, T. Miyake, Y. Akamatsu, Caprazamycins, novel liponucleoside antibiotics, from Streptomyces sp, J. Antibiot, 58:327–337, (2005).

[5]. S. Dutta, B. Basak, B. Bhunia, S. Chakraborty, A. Dey, Kinetics of rapamycin production by Streptomyces hygroscopicus MTCC 4003. 3 Biotech, 4:523–531, (2014).

[6]. L. Rodríguez, D. Rodríguez, C. Olano, A.F. Braña, C. Méndez, J.A. Salas, Functional analysis of the oleandomycin biosynthetic pathway in Streptomyces antibioticus, J. Bacteriol., 183:5358–5363, (2001).

- [7]. M. Elibol, *Optimization of medium composition for actinorhodin production by Streptomyces coelicolor A3(2) with response surface methodology*, Process Biochem, 39:1057–1062, (2004).
- [8]. A.R. Pokhrel, A.K. Chaudhary, H.T. Nguyen, D. Dhakal, T.T. Le, A. Shrestha, K. Liou, J.K. Sohng, *Overexpression of a pathway specific negative regulator enhances production of daunorubicin in bldA deficient Streptomyces peucetius ATCC 27952*, Microbiol. Res., 192:96–102, (2016).
- [9]. B.S. Moore, J.N. Hopke, *Discovery of a new bacterial polyketide biosynthetic pathway*, ChemBioChem, 2:35–38, (2001).
- [10]. J.S. Rokem, A.E. Lantz, J. Nielsen, *Systems biology of antibiotic production by microorganisms*, Nat. Prod. Rep., 24:1262, (2007).
- [11]. Y. Katsuyama, N. Funai, I. Miyahisa, S. Horinouchi, *Synthesis of unnatural flavonoids and stilbenes by exploiting the plant biosynthetic pathway in Escherichia coli*, Chem. Biol, 14:613–621, (2007).
- [12]. I. Chopra, M. Roberts, *Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance*, Microbiol. Mol. Biol. Rev., 65:232–260, (2001).
- [13]. M.A. Ghannoum, L.B. Rice, *Antifungal agents: Mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance*, Clin. Microbiol. Rev., 12:501–517, (1999).
- [14]. O. Tacar, P. Sriamornsak, C.R. Dass, *Doxorubicin: An update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems*, J. Pharm. Pharmacol., 65:157–170, (2013).
- [15]. M.A.M. Shushni, R. Singh, R. Mentel, U. Lindequist, *Balticolid: A new 12-membered macrolide with antiviral activity from an Ascomycetous fungus of marine origin*, Mar. Drugs, 9:844–851, (2011).
- [16]. J. Li, S.G. Kim, J. Blenis, *Rapamycin: One drug, many effects*, Cell Metab, 19:373–379, (2014).
- [17]. N.W.C.J. Van de Donk, M.M.J. Kamphuis, H.M. Lokhorst, A.C. Bloem, *The cholesterol lowering drug lovastatin induces cell death in myeloma plasma cells*, Leukemia, 16:1362–1371, (2002).
- [18]. H. Nomomura, *Key for classification and identification of 458 species of the Streptomyces included in ISP*, J. Ferment. Technol. 52(2) (1974) 78.
- [19]. W. Wilkins, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, Vol. 3, Vol. 4. Publisher Springer-Verlag, NY, (1989).
- [20]. E. Shirling and G. D. Gottlieb, *Methods for characterization of Streptomyces species*, Int J Syst Bacteriol, vol. 16, pp. 313-340, (1966).
- [21]. H.D. Tresner, E.J. Buckus, *System of color wheels for Streptomyces taxonomy*, Appl Environ Microb 11: 335–338, (1963).
- [22]. Stanley T. Williams M. E. Sharpe, J. G. Holt, *Bergey's Manual of Systematic bacteriology*, Williams & Wilkins, 4: 2452-2492, (1989).
- [23]. J. Sambrook, D. Russell, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3rd. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, (2001).
- [24]. M.K. Mikko, S. Virpi, H. Laura, H. Anne, H. Juha, M. Pekka, Y. Kristiina, *An efficient approach for screening minimal PKS genes from Streptomyces*, FEMS Microbiol Lett 180: 1-6, (1999)
- [25]. B. Sirisha, R. Harith, J. Mohan, K. Siva, K. S. Kumar, and T. Ramana, *Bioactive compounds from marine actinomycetes isolated from the sediments of bay of Bengal*, IJPCBS, vol. 3, no. 2, pp. 257-264, (2013).
- [26]. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K., *MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms*. Molecular Biology and Evolution 35:1547-1549, (2018).

Địa chỉ tác giả: Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm – Trường Đại học Mở Hà Nội

Email: ngocanhcnsh@hou.edu.vn

