

NGHIÊN CỨU CÁC ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC VÀ PHÂN LOẠI CHỦNG XẠ KHUẨN TT 8.4 TỪ ĐẤT TRỒNG TRỌT TẠI QUỐC OAI, HÀ NỘI

Nguyễn Thị Ngọc Anh, Nguyễn Thị Phương Thảo, Vũ Kim Thoa, Tạ Thị Thu Thủy

Khoa Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Mở Hà Nội

TÓM TẮT

Hiện nay, hiện tượng kháng thuốc kháng sinh ở các vi sinh vật gây bệnh ngày càng tăng. Vì vậy, việc nghiên cứu phân lập và tuyển chọn các chủng vi sinh vật tạo kháng sinh mới là vô cùng quan trọng. Nghiên cứu này tập trung vào định danh, đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định và xác định sự có mặt của gen chức năng liên quan đến khả năng sinh kháng sinh của chủng xạ khuẩn TT8.4 phân lập từ đất trồng trọt tại huyện Quốc Oai, Hà Nội. Căn cứ vào khóa phân loại Chương trình xạ khuẩn Quốc tế (ISP), kết hợp với giải trình tự 16S rDNA của chủng TT8.4 được đặt tên là *Streptomyces virginiae* TT8.4. Chủng *Streptomyces virginiae* TT8.4 kháng 3 loại vi sinh vật kiểm định (*Bacillus subtilis* (20 mm), *Staphylococcus aureus* (18 mm), *Escherichia coli* (16 mm)). Phân tích sự có mặt của gen chức năng liên quan đến sinh tổng hợp kháng sinh cho thấy, chủng *Streptomyces virginiae* TT8.4 mang gen PKS II mã hóa polyketide synthase type II và không mang gen mã hóa PKS I. Kết quả nghiên cứu trên chứng tỏ, chủng *S. virginiae* TT8.4 có tiềm năng cao trong việc sinh tổng hợp kháng sinh ở vi sinh vật.

Từ khóa: Chất kháng sinh, polyketide synthase, Streptomyces, vi sinh vật kiểm định, xạ khuẩn đất.

MỞ ĐẦU

Vi sinh vật nhân sơ vô cùng đa dạng mà cho đến nay chỉ mới một phần nhỏ (khoảng 0,1 đến 1%) trong số tất cả các vi sinh vật được nuôi cấy và mô tả nghiêm ngặt. Hơn 17.000 loại kháng sinh và các loại hợp chất sinh học khác đã được tìm thấy từ vi sinh vật nhân sơ (Glasby, 1992). Nhưng chỉ mới một phần nhỏ các vi sinh vật được mô tả, điều này có thể dự đoán được rằng phần lớn các phân tử quan trọng về dược phẩm và công nghiệp có nguồn gốc từ vi khuẩn vẫn được phát hiện.

Một số lượng lớn các phân tử có hoạt tính sinh học được sinh tổng hợp theo con đường polyketide synthase (PKS). Polyketide là các chất chuyển hóa thứ cấp đa dạng về cấu trúc đã được tìm thấy ứng dụng rộng rãi như dược phẩm (Metsa- Ketela *et al.*, 1998), đặc biệt là kháng sinh. Các polyketide đã được tổng hợp quan trọng bao gồm: rapamycin (ức chế miễn dịch), erythromycin (chất kháng sinh), lovastatin (thuốc chống rối loạn cholesterol), và epothilone B (thuốc chống ung thư).

Nhiều xạ khuẩn chứa các cụm gen PKS và nhóm vi sinh vật này từ lâu đã được công nhận là một nguồn quan trọng để sinh tổng hợp các hoạt chất sinh học. Việc sàng lọc xạ khuẩn đã tiến hành trong nhiều thập kỷ qua đã tạo ra rất nhiều các sản phẩm dược phẩm quan trọng. Tuy nhiên, tốc độ khám phá, phát hiện ra những chủng xạ khuẩn mới có khả năng sinh tổng hợp các hoạt chất sinh học đã không theo kịp với nhu cầu sử dụng các loại dược phẩm và thậm chí đã giảm trong những năm gần đây (Metsa- Ketela *et al.*, 2002). Điều này phát sinh do các chủng và các phân tử được mô tả trước đây đang được mô tả lại. Các phương pháp tốt hơn rõ ràng là cần thiết để xác định và sàng lọc hiệu quả hơn các chủng xạ khuẩn đất có khả năng sinh tổng hợp các sản phẩm trao đổi chất thứ cấp quan trọng. Các phương pháp như vậy có thể không chỉ ngăn chặn việc nghiên cứu lại các phân tử có hoạt tính sinh học đã nghiên cứu trước đây, mà còn làm giảm bớt một số sai lệch được đưa ra bằng cách sử dụng các kỹ thuật nuôi cấy cơ bản.

Mặc dù có những vai trò đặc biệt quan trọng như vậy, nhưng ở Việt Nam tình hình nghiên cứu xạ khuẩn có khả năng sinh kháng sinh nhóm polyketide còn nhiều hạn chế. Chính vì vậy, việc nghiên cứu sàng lọc các hợp chất kháng sinh nhóm polyketide từ xạ khuẩn đất là một hướng nghiên cứu khá triển vọng ở Việt Nam. Bài báo này tập trung nghiên cứu vào đặc điểm sinh học và phân loại chủng xạ khuẩn TT8.4 có khả năng sinh kháng sinh thuộc nhóm polyketide được phân lập từ đất trồng trọt tại Quốc Oai, Hà Nội

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vi khuẩn và môi trường nuôi cấy

Chủng xạ khuẩn TT8.4 có khả năng ức chế VSV kiểm định được phân lập từ đất trồng trọt tại huyện Quốc Oai, Hà Nội, bảo quản và lưu trữ tại Phòng Thí nghiệm Khoa Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Mở Hà Nội.

Các vi sinh vật kiểm định *Escherichia coli* JM109, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* 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 ISP1 (g/L): Tryptone 5, cao nấm men 3, agar 20, pH = 7. ISP2 (g/L): Cao nấm men 4, dịch chiết malt 10, glucose 4, agar 20, pH= 7,3. ISP3 (g/L): Bột yến mạch 20, agar 20, dung dịch muối vi lượng 1,0 ml, pH= 7. ISP4 (g/L): Tinh bột tan 10, K₂HPO₄ 1, MgSO₄.7H₂O 1, NaCl 1, (NH₄)₂SO₄ 2, CaCO₃ 2, dung dịch muối vi lượng 1,0 ml, agar 20, pH = 7,5. ISP5 (g/L): L- asparagine 1, glycerine 10, K₂HPO₄, dung dịch muối vi lượng 1,0 ml, agar 20, pH = 7,0. ISP6 (g/L): Petone 10, cao nấm men 1, citrate 0,5, agar 20, pH = 7,0. ISP7 (g/L): Glycerine 15, L- tyrosine 0,5, L- asparagine 1, K₂HPO₄ 0,5, MgSO₄.7H₂O 0,5, NaCl 0,5; FeSO₄.7H₂O 0,01; dung dịch muối vi lượng 1,0 ml; agar 20, pH = 7,0. R2YE (g/L): Sucrose 10,3; K₂SO₄ 0,025; MgCl₂. 6H₂O 1,012; glucose 1,0; cao nấm men 0,5. Dung dịch khoáng: KH₂PO₄ 1,0 ml; TES 10,0 ml; CaCl₂. 2H₂O 8,0 ml; trace 0,2 ml; L- proline 1,5ml; NaOH 0,5 ml trong 100 ml nước cất và đem chuẩn pH = 7,2. NDYE (g/L): Cao nấm men 0,5; NaNO₃ 0,428; maltose 1,5; glucose 2,5; HEPES 0,477; MgSO₄. 7H₂O 0,012; K₂PO₄ 0,023. Dung dịch khoáng: Trace 200 µl; NaOH 1,0ml trong 100 ml nước cất.

Phương pháp nhuộm Gram (phương pháp Hucker cải tiến)

Mẫu cần nhuộm được nhỏ trên lam kính, cố định mẫu bằng ngọn lửa đèn cồn, sau đó nhuộm bằng dung dịch tím gentian trong 1 phút, rửa nước, thấm khô. Tiếp tục cố định mẫu bằng lugol trong 30s, rửa nước, thấm khô. Nhỏ dung dịch tẩy màu ethanol 95%, giữ khoảng 30s cho đến khi vừa thấy mất màu. Nhuộm dung dịch đỏ safarin trong 1 phút, rửa nước, để khô. Cuối cùng quan sát dưới vật kính dầu với độ phóng đại 1000x.

Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học của chủng xạ khuẩn TT8.4

Đặc điểm hình thái của chủng xạ khuẩn TT8.4 được xác định dựa trên các đặc điểm nuôi cấy bao gồm: màu sắc của khuẩn ty khí sinh, màu sắc của khuẩn ty cơ chất, khả năng hình thành sắc tố tan (Tresner, Backus, 1963) và sự hình thành sắc tố melanin. 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 (Shirling, Gottlieb, 1966; Stanley, Holt, 1989).

Đặc điểm hóa sinh: Quan sát khả năng đồng hóa nguồn carbon và nitrogen của xạ khuẩn lần lượt môi trường ISP9 (g/L- (NH₄)₂SO₄ 2,64; KH₂PO₄ 2,38; K₂HPO₄.3H₂O 5,65; MgSO₄.7H₂O 1,0; dung dịch B 1,0 ml; agar 20; pH = 7,0) có bổ sung 1,0% các nguồn đường và 0,1% nguồn nitrogen tương ứng (Shirling, Gottlieb, 1966; Stanley, Holt, 1989)

Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến khả năng sinh trưởng của xạ khuẩn TT8.4 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 các nồng độ NaCl (1-10%) trên môi trường ISP2 (Stanley, Holt, 1989).

Phân loại dựa trên phân tích trình tự gen 16S rDNA

Chủng xạ khuẩn TT8.4 nuôi cấy trên môi trường R2YE lỏng, sau 72 giờ tiến hành ly tâm ở 4000 rpm/phút, trong 10 phút, ở 4°C, thu tế bào. DNA tổng số của xạ khuẩn được tách theo phương pháp của Sambrook và Russell (2001), gen 16S rDNA được khuếch đại bằng phương pháp PCR sử dụng cặp mồi 27F 5'- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG - 3' và 1492R 5'- TACGGYTACCTTGTTACGACTT - 3' (Genset). Phản ứng được thực hiện theo chu trình nhiệt như sau: 94°C: 5 phút, 25 chu kỳ (94°C: 30s, 55°C: 30s, 72°C: 1 phút), 72°C: 10 phút. Sản phẩm của phản ứng PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%. Kích thước của đoạn DNA thu được sau phản ứng PCR được so sánh với thang DNA chuẩn (1 Kb Plus DNA ladder Marker). Sản phẩm PCR được tinh sạch và 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).

Khuếch đại gen mã hóa PKS I và PKS II của chủng xạ khuẩn TT8.4

DNA tổng số của chủng xạ khuẩn TT8.4 được dùng làm khuôn cho phản ứng PCR với các cặp mồi suy biến của PKS I (K1F: 5'- TSAAGTCSAACATCGGBCA- 3' và M6R: 5'- CGCAGGTTSCSGTACCAGTA- 3') và PKS II (KSaF: 5'-TSGCSTGCTTGAYGCSATC -3' và KSaR: 5'-TGGAAANCCGCCGAABCCGCT-3') (Metsa-Ketela *et al.*, 1999) theo chu kỳ nhiệt : 94°C trong 5 phút, 25 chu kỳ (94°C trong 30s, 58°C (KSaF/KSaR) trong 30s, 72°C trong 1 phút), chu kỳ cuối ở 72°C: 10 phút và giữ mẫu ở 4°C. Sản phẩm của phản ứng PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1,0%.

Xác định hoạt tính kháng sinh

Chủng xạ khuẩn TT8.4 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 4.000 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.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Đặc điểm hình thái của chủng xạ khuẩn TT8.4

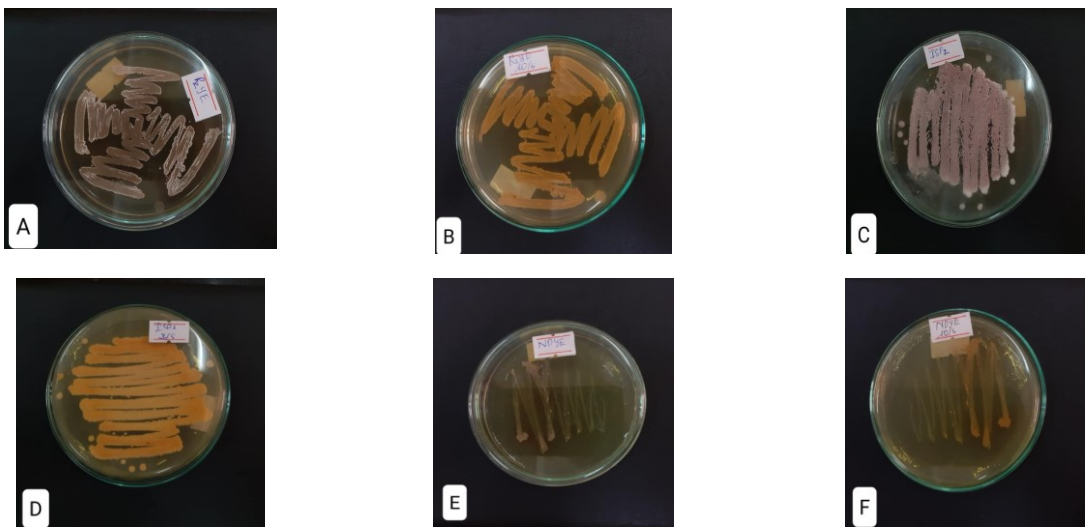
Màu sắc của một chủng xạ khuẩn khi nuôi trên môi trường ISP1 đến ISP6 thường khác nhau, đây là yếu tố đầu tiên để phân loại xạ khuẩn theo khóa định tên loài xạ khuẩn ISP (1974) và khóa phân loại Bergey (Stanley *et al.*, 1989). Khuẩn ty khí sinh và khuẩn ty cơ chất của chủng xạ khuẩn trong nghiên cứu này được so với bảng màu của Tresner và Backus (Tresner, 1963). Cùng với màu sắc của khuẩn lạc thì khả năng sinh sắc tố tan và sự hình thành melanin cũng là một trong những tiêu chuẩn cơ bản để phân biệt các chủng xạ khuẩn.

Chủng xạ khuẩn TT8.4 đều phát triển tốt trên các môi trường ISP1 đến ISP6 và trên cả 2 môi trường R2YE và NDYE. Trên môi trường ISP1 xạ khuẩn cho khuẩn ty khí sinh màu trắng, còn có màu xám nâu trên môi trường ISP2, 3, 4, 5 và R2YE, NDYE, cho màu nâu đen trên môi trường ISP6. Chủng TT8.4 có khuẩn ty cơ chất màu vàng hoặc vàng nâu trên các môi trường ISP1, 2, 3, 4,5, và R2YE, NDYE, màu nâu đen trên ISP6. Xạ khuẩn này không hình thành sắc tố tan và sắc tố melanin trên tất cả các loại môi trường nuôi cấy (Bảng 1, hình 1).

Bảng 1. Đặc điểm nuôi cấy của chủng xạ khuẩn TT8.4 trên môi trường ISP, R2YE và NDYE sau 14 ngày

Môi trường	Sinh trưởng	Khuẩn ty		Sắc tố	
		KTKS	KTCC	Sắc tố tan	Melanin
ISP1	+	Trắng	vàng nâu	-	-
ISP2	+	Xám nâu	vàng	-	-
ISP3	+	Xám nâu	Vàng	-	-
ISP4	+	Xám nâu	Vàng	-	-
ISP5	+	Xám nâu	Vàng	-	-
ISP6	+	Nâu đen	Nâu đen	-	-
R2YE	+	Xám nâu	Vàng	-	-
NDYE	+	Xám nâu	Vàng	-	-

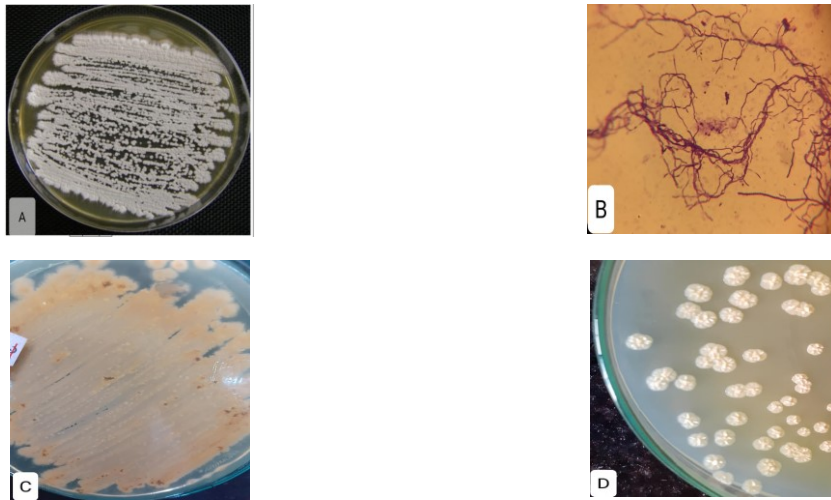
Ghi chú: KTKS: Khuẩn ty khí sinh; KTCC: Khuẩn ty cơ chất



Hình 1. Đặc điểm KTKS và KTCC chủng TT8.4 trên các môi trường khác nhau (ISP2, R2YE, NDYE)

A, C, E: Đặc điểm KTKS chủng TT8.4 lần lượt trên các môi trường R2YE, ISP2,NDYE

B, D, F: Đặc điểm KTCC chủng TT8.4 lần lượt trên các môi trường R2YE, ISP2,NDYE



Hình 2. Đặc điểm hình thái của chủng xạ khuẩn TT8.4 trên môi trường ISP4

A, B, C. Hình ảnh khuẩn lạc, khuẩn ty cơ chất và hình thái khuẩn ty dưới kính hiển vi 1000X sau 14 ngày nuôi cấy;
D. Hình ảnh khuẩn lạc pha loãng 10^{-3} sau 4 ngày nuôi cấy

Chủng xạ khuẩn TT8.4 sau 14 ngày nuôi cấy trên môi trường ISP4 lỏng được quan sát dưới kính hiển vi điện tử với độ phóng đại 1000X, cho thấy khuẩn ty dài, không đứt đoạn, từ sợi chính phân ra làm nhiều sợi nhánh, sợi mang bào tử thẳng hơi cong (RF) và bắt màu tím theo phương pháp nhuộm Gram (Hình 2). Chủng xạ khuẩn TT8.4 sau khi pha loãng 10^{-3} được cấy trang trên môi trường ISP4 cho khuẩn lạc sau 4 ngày nuôi cấy có kích thước 2- 4 mm, màu vàng kem, bề mặt xạ khuẩn lồi, bên trong có rãnh thẳng, khuẩn ty cơ chất màu vàng. Sau 4-6 ngày nuôi cấy, chủng xạ khuẩn TT8.4 trên các môi trường ISP đều sinh bào tử, còn trên môi trường R2YE và NDYE thì thời gian sinh bào tử của chủng này là 7- 9 ngày.

Một số đặc điểm hóa sinh của chủng xạ khuẩn TT8.4

Một trong những đặc điểm sinh lý, hóa sinh quan trọng của xạ khuẩn là khả năng đồng hóa các nguồn carbon và nitrogen khác nhau, đây là chỉ tiêu quan trọng để phân loại xạ khuẩn theo Nomomura trong ISP (1974). Do đó, chủng xạ khuẩn TT8.4 được nuôi cấy trên môi trường ISP9 có bổ sung nguồn đường và nguồn nitrogen khác nhau. Kết quả cho thấy chủng TT8.4 có khả năng đồng hóa đa dạng các nguồn carbon khác nhau. Chúng có khả năng đồng hóa cao nhất với nguồn carbon là glucose, fructose và sucrose, tinh bột tan; đồng hóa kém hơn với các nguồn đường như L- arabinose, galactose; không có khả năng sinh trưởng trên môi trường có raffinose và nếu môi trường không được cung cấp nguồn carbon (Bảng 2). Chủng xạ khuẩn TT8.4 cũng sử dụng được đa số các nguồn nitrogen kiểm nghiệm như: L-asparagine, L-tyrosine, glycerine, tryptone, peptone và $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Bảng 2).

Bảng 2. Một số đặc điểm sinh học của chủng TT8.4

Nguồn carbon 1,0% (w/v)	Khả năng sinh trưởng	Nguồn nitrogen 0,1% (w/v)	Khả năng sinh trưởng
Không có carbon	-	Không có nitrogen	-
D- glucose	+	L- asparagin	+
L - fructose	+	L - tyrosine	+
L- sucrose	+	Glycerine	+
Tinh bột tan	+	Tryptone	+
L - arabinose	+/-	Peptone	+
Galactose	+/-	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	+
Raffinose	-		
Nhiệt độ thích hợp:	28oC		
pH thích hợp:	7,5		
Nồng độ NaCl thích hợp:	4%		

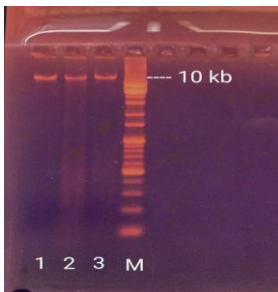
Các hoạt động trao đổi chất của vi sinh vật là kết quả của các phản ứng hóa học. Vì vậy, nhiệt độ và pH của môi trường nuôi cấy ảnh hưởng lớn đến quá trình sinh trưởng và phát triển của tế bào vi sinh vật. Chủng xạ khuẩn TT8.4 được nuôi cấy trên môi trường ISP2 với các điều kiện nhiệt độ, pH và nồng độ NaCl khác nhau. Kết quả

cho thấy, chủng xạ khuẩn TT8.4 sinh trưởng được trong dải nhiệt độ 25- 36°C và tối ưu ở 28°C, pH từ 6- 10 và tối ưu ở pH= 7,5. Chủng TT8.4 có khả năng sinh trưởng trong môi trường có nồng độ NaCl thay đổi từ 1-5% và tối ưu ở 4%. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với công bố trước đó của Sirisha và cộng sự, (2013) rằng đa số các chủng xạ khuẩn chỉ sinh trưởng được trên môi trường có nồng độ NaCl dưới 10%.

Từ các đặc điểm hình thái, sinh lý, hóa sinh của chủng xạ khuẩn TT8.4 đối chiếu với khóa phân loại ISP (Nomomura, 1974) và Bergey (Stanley *et al.*, 1989), cho thấy chủng TT8.4 có nhiều điểm tương đồng với chủng *Streptomyces virginiae* được Grundy mô tả năm 1952.

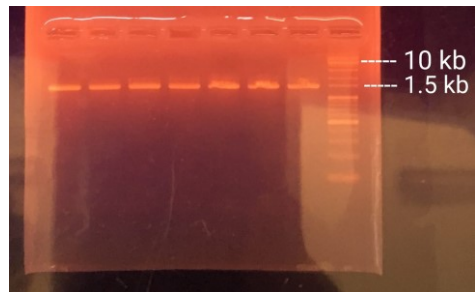
Xác định trình tự gen mã hóa 16S rDNA của chủng xạ khuẩn TT8.4

Chủng xạ khuẩn TT 8.4 sau 4 ngày nuôi cấy trên môi trường R2YE ở 28°C, với tốc độ lắc 150 vòng/phút, được đem ly tâm ở 4000 rpm/phút, ở 4°C trong 10 phút để thu tế bào. Tế bào xạ khuẩn được dùng để tách DNA tổng số theo phương pháp của Sambrook và Rusell (2001). DNA tổng số của xạ khuẩn được hòa tan trong nước deion và chạy điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8% cho kết quả như hình 3 có 1 băng DNA duy nhất, có kích thước trên 10 Kb. Điều này chứng tỏ đã tách thành công DNA tổng số của chủng xạ khuẩn TT8.4.



Hình 3. Điện di sản phẩm PCR ADN tổng số của chủng xạ khuẩn TT8.4

M: 1 kb DNA Ladde;
1, 2, 3: Sản phẩm PCR chủng TT8.4



Hình 4. Kết quả tinh sạch PCR 16S rADN của chủng xạ khuẩn TT8.4

M: 1kb ADN Ladder;
1, 2, 3, 4, 5, 6, 7: Sản phẩm PCR chủng xạ khuẩn TT8.4

DNA tổng số của chủng xạ khuẩn TT8.4 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 khoảng 1,4 kb tương ứng với kết quả mong đợi khi thiết kế mồi (Hình 4). Sản phẩm PCR được tinh sạch sau đó được gửi đi giải trình tự tại Apical Scientific sequencing, Malaysia, cho kết quả sau:

```
ATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGA
AACGGGTCTAATACCGGATACCCTCCTGCCTGCATGGCGGGGGTTGAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGGCCT
ATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGCCACACTGGGACTGA
GACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGTGGGGAAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCCGGTGAG
GGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAAC
TACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTGTGTCGGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGGAGATCGGAAT
TCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGCGGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTIONGAGCTGAG
GAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGGGAAGTAGGTGTTGGCGACATT
CCACGTCGTCGGTGCCGACGCTAACGCATTAAGTTCCTCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGAC
GGGGCCCCGACAAGCGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTACATATACCGGAAA
GCATTAGAGATAGTCCCCCTTGTGGTTCGGTATACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTA
AGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGTGGGGACTCACAGGAGACCGCCGGGGT
CAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACA
ATGAGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCATGAA
GTCCGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCCGTACAGTCAGC
AAAGTCGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGAGGGAGC
```

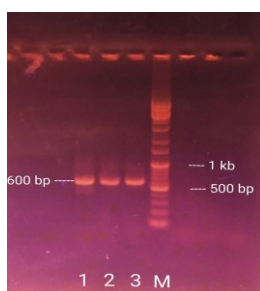
Kết quả giải trình tự gen 16S rDNA được đưa lên phần mềm BLAST và so sánh với các trình tự gen đã công bố trên Genbank (NCBI), cho thấy trình tự nucleotide đoạn 16S rDNA của chủng xạ khuẩn TT8.4 có độ tương đồng cao (100%) với trình tự 16S rDNA của loài *Streptomyces virginiae* (Bảng 3). Kết hợp với các kết quả so sánh đặc điểm hình thái, sinh lý, hóa sinh của chủng với khóa phân loại ISP (Nomomura, 1974) và Bergey (Stanley *et al.*, 1989), có thể đặt tên chủng xạ khuẩn này là *Streptomyces virginiae* TT8.4.

Bảng 3. Kết quả so sánh trình tự gen mã hóa 16S rADN của chủng xạ khuẩn TT8.4 với gen tương ứng của các chủng vi khuẩn được đăng ký trên ngân hàng cơ sở dữ liệu GenBank

Trình tự 16S rADN của chủng xạ khuẩn được so sánh	Mã số truy cập trên GenBank	Độ tương đồng (%)
<i>Streptomyces virginiae</i> strain F11 16S rARN	KU324436.1	100
<i>Streptomyces</i> sp. DR 7-03 16S Rarn	KM253031.1	99
<i>Streptomyces manipurensis</i> strain WJA3 16S rARN	KU877575.1	98
<i>Streptomyces xanthophaeus</i> strain B7 16S rARN	KX037097.1	96

Xác định gen mã hóa PKS của chủng xạ khuẩn TT8.4

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. Nhiều xạ khuẩn chứa các cụm gen PKS và nhóm vi sinh vật này từ lâu đã được công nhận là một nguồn quan trọng để sinh tổng hợp các hoạt chất sinh học. Vì vậy, việc sàng lọc và đánh giá sự có mặt của các nhóm gen này là rất cần thiết để đánh giá tiềm năng sinh tổng hợp chất kháng sinh của chủng xạ khuẩn TT8.4. Kết quả hình 5 cho thấy sản phẩm khuếch đại gen mã hóa PKS của chủng xạ khuẩn TT 8.4 bằng phản ứng PCR 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 xạ khuẩn TT8.4 mang gen mã hóa kháng sinh polyketide loại II, không mang gen mã hóa PKS I.



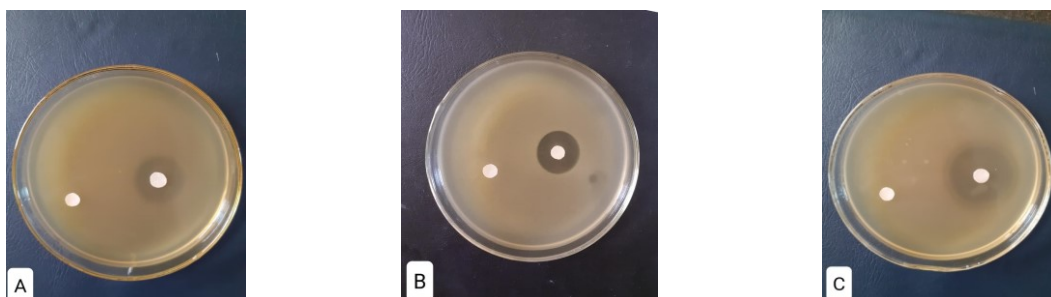
Hình 5. Kết quả điện di sản phẩm gen của chủng xạ khuẩn TT8.4
M: 1 kb DNA Ladde; 1, 2, 3: Sản phẩm PCR chủng TT8.4

Đánh giá hoạt tính kháng sinh thô được tổng hợp từ chủng xạ khuẩn TT8.4

Chủng xạ khuẩn TT8.4 được lên men trong môi trường R2YE ở 28°C, với 150 vòng/phút, trong 96 giờ. Sau đó dịch lên men lắc đều với ethyl acetate theo tỷ lệ dịch nuôi: ethyl acetate = 1:1 trong 2 - 3 giờ, sau đó thu nhận phần dịch màu trắng trong chứa dung môi và kháng sinh. Tiếp tục quay cô ở 37°C, 125 rpm/phút và thu nhận kháng sinh thô. Kháng sinh thô sau đó được hòa tan trong methanol và bảo quản ở -20°C. Thử hoạt tính kháng sinh thô bằng phương pháp khoan giấy lọc trên môi trường có chứa vi sinh vật kiểm định, cho kết quả như Hình 6.

Bảng 4. Kết quả vòng kháng khuẩn của kháng sinh tổng hợp từ chủng TT8.4

<i>Bacillus subtilis</i> (D-d, mm)	<i>E.coli</i> JM109 (D-d, mm)	<i>Staphylococcus aureus</i> (D-d, mm)
20	16	18



Hình 6. Hoạt tính kháng sinh thô

Ghi chú: A. Với *E.coli* JM109; B. Với *Staphylococcus aureus* ; C. Với *Bacillus subtilis*

KẾT LUẬN

Căn cứ vào kết quả nghiên cứu về đặc điểm hình thái, sinh lý, hóa sinh và phân tích trình tự gen 16S rDNA, chủng xạ khuẩn TT8.4 được phân lập từ đất trồng trọt tại huyện Quốc Oai, Hà Nội được đặt tên là *Streptomyces virginiae* TT8.4. Chủng có khả năng đồng hóa đa dạng các nguồn đường, trong đó tốt nhất là glucose, sucrose và fructose; sinh trưởng tốt ở 28°C, pH = 7,5 và ở nồng độ NaCl là 4%.

Chủng TT8.4 có khả năng kháng khuẩn mạnh với cả 3 chủng vi sinh vật kiểm định với đường kính vòng kháng khuẩn là 20 mm với *Bacillus subtilis*, 21 mm với *Staphylococcus aureus* và 16 mm với *E. coli*. Chủng xạ khuẩn này mang gen mã hóa PKS II và được dự đoán có tiềm năng sinh kháng sinh cao.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Borris W, Lee K, Gerben JZ, Jerome IK (2005). Identification of Unique Type II Polyketide Synthase Genes in Soil. *Am Soc Microbiol* 71: 2232-2238.
- Ignacio G, Angel AS, Annaliesa A, Olga G (2005). Actinomycetes isolated from lichens: Evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. *FEMS Microbiol Ecol* 54: 401-415.
- Li J, Zhao GZ, Huang HY, Quin S, Zhu WY, Zhao LX, Xu LH, Zhang S, Li WJ, Strobel G (2012). Isolation and characterization of culturable endophytic actinobacteria associated with *Artemisia annua* L. *A Van Leeuw* 101: 515-527.
- Mikko MK, Virpi S, Laura H, Anne H, Juha H, Pekka M, Kristiina Y (1999). An efficient approach for screening minimal PKS genes from *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Lett* 180: 1-6.
- Mikko MK, Laura H, Eveliina M, Juha H, Pekka M, Kristiina Y (2002). Molecular Evolution of Aromatic Polyketides and Comparative Sequence Analysis of Polyketide Ketosynthase and 16S Ribosomal DNA Genes from Various *Streptomyces* species. *Appl Environ Microbiol* 9: 4472-4479.
- Rogger DCA, Sumone I, Karen M, Leandro MG, Edith MBR, Gabriel P (2017). Screening of polyketide genes from Brazilian Atlantic Forest soil. *Univ sciences* 22: 87-96.
- Sambrook J, Russell D (2001). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3rd. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Stanley T, Williams MG, Sharpe JG (1989). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. *Williams and Wilkins* 4: 2452-2492.
- Tresner HD, Buckus EJ (1963). System of color wheels for *Streptomyces* taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 11: 335-338.

STUDYING ON BIOLOGICAL CHARACTERISTICS AND CLASSIFICATION BIODIVERSITY RADIATION TT8.4 ISOLATED FROM ARABLE LAND IN QUOC OAI, HA NOI

Nguyen Thi Ngoc Anh, Nguyen Thi Phương Thao, Vu Kim Thoa, Ta Thi Thu Thuy

Faculty of Biotechnology, Ha Noi Open University

SUMMARY

In fact, the therapeutic effect of many antibiotic groups is declining because the resistance of antibiotics to pathogenic microorganisms is increasing. Therefore, the research isolates and selects new strains of microorganisms that create antibiotics. This study focused on identifying, evaluating antibiotic ability of actinomycete TT8.4 isolated from arable land in Quoc Oai district, Ha Noi city. Based on the International Radiation Program (ISP) classification course, combined with the sequencing 16S rDNA of strain TT8.4, named *Streptomyces virginiae* TT8.4 are resistant to three types of testing microorganisms (*Bacillus subtilis* 20 mm, *Staphylococcus aureus* 18 mm, *Escherichia coli* 16 mm). The analysis of the presence of functional genes related to antibiotic biosynthesis showed that *Streptomyces virginiae* TT8.4 carry PKS II gene encoded polyketide synthase type II and did not carry the gene PKS I. The results demonstrated that *Streptomyces virginiae* TT8.4 be promising sources for the production of antibiotic.

Keywords: Antibiotics, polyketide synthase, soil actinomycetes, *Streptomyces*, test microorganisms.