

ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CỦA XẠ KHUẨN NỘI SINH TRÊN CÂY NGHỆ Ở NAM ĐỊNH VÀ TIỀM NĂNG SINH TỔNG HỢP CHẤT KHÁNG KHUẨN

ĐỖ TẤT THỊNH, NGÔ CAO CƯỜNG, VŨ XUÂN NAM

1. MỞ ĐẦU

Vi sinh vật (VSV) nội sinh là những VSV sinh trưởng trong mô tế bào thực vật, mà không gây ra những hiệu ứng có thể làm ảnh hưởng đến sự phát triển của cây chủ [2]. Trong đó xạ khuẩn nội sinh là nhóm VSV được chú ý nhiều trong thời gian gần đây, do có khả năng sinh nhiều hoạt chất sinh học như enzym, chất kích thích sinh trưởng thực vật và kháng sinh, với nhiều chi xạ khuẩn đã được phân lập điển hình như các loài thuộc chi *Streptomyces*, *Micromonospora*... Xạ khuẩn nội sinh với thực vật còn có thêm đặc tính sinh học quý mà các nhóm xạ khuẩn khác không có được như khả năng chịu áp lực, tính thích nghi cao, chống chịu tốt với nhiều loại VSV gây bệnh trên thực vật, một số chất kháng sinh mới được phát hiện gần đây đều có nguồn gốc từ xạ khuẩn nội sinh [7]. Hiện nay, vi khuẩn gây bệnh có xu hướng kháng lại nhiều loại kháng sinh, chúng là nguyên nhân trực tiếp và gián tiếp của hàng loạt các bệnh nhiễm khuẩn: thương hàn, nhiễm trùng tiết niệu, nhiễm khuẩn vết mổ... [3]. Một số nghiên cứu gần đây cho thấy, tỷ lệ phát hiện ra các kháng sinh mới trên xạ khuẩn nội sinh có tỷ lệ khá cao so với xạ khuẩn phân lập từ đất hoặc bề mặt thực vật. Ví dụ: chất ansamycin có thêm nhóm chức chlorine mới còn gọi là naphthomycin K, được tìm thấy từ *Streptomyces* sp. nội sinh trong cây thuốc *Maytenus hookeri* [8].

Việt Nam là nước nhiệt đới có điều kiện khí hậu đặc trưng, với nguồn dược liệu vô cùng phong phú trong đó có cây nghệ. Trong y học cổ truyền cây nghệ đã được sử dụng hàng ngàn năm như một phương thuốc chữa các bệnh về dạ dày, da, phổi, hệ thống tiêu hóa, đau nhức, các vết thương, bong gân và các rối loạn ở gan. Bài báo này trình bày kết quả nghiên cứu một số đặc điểm sinh học của chủng xạ khuẩn nội sinh có hoạt tính kháng khuẩn, phân lập trên cây nghệ trồng ở tỉnh Nam Định.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu và chủng giống vi sinh vật

Các mẫu Nghệ (lá, thân, rễ) trồng tại huyện Giao Thủy, Nam Định. Các VSV kiểm định: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212; *Bacillus cereus* ATCC 13061; *Listeria innocua* ATCC 33090; *Pseudomonas aeruginosa*; *Candida albican* ATCC 10231; *Salmonella typhimurium* ATCC 14028; *Escherichia coli* ATCC 25922; *Proteus vulgaris*; *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 nhận từ Bộ sưu tập giống VSV của Phòng Vi sinh, Phân viện Công nghệ sinh học, Trung tâm nhiệt đới Việt - Nga. Các đoạn môi khuếch đại gen 16S rDNA do Invitrogen (Hồng Kông) cung cấp.

2.2. Môi trường

Môi trường nuôi cấy và phân loại: Các môi trường theo ISP (International Streptomyces Project) [9] và khóa phân loại Bergay [15] được sử dụng để nuôi cấy và phân loại xạ khuẩn. Môi trường MPA được sử dụng để nuôi cấy vi khuẩn kiểm định và môi trường Hansen được sử dụng để nuôi cấy nấm men *Candida albican* ATCC 10231 kiểm định.

2.3. Phương pháp

2.3.1. Xử lý mẫu và phân lập xạ khuẩn

Mẫu thực vật sau khi được xử lý, làm sạch và phân lập theo Shutsrirung [12]. Các đĩa phân lập được ủ ở 28°C trong 15÷60 ngày. Các mẫu xạ khuẩn được thuần khiết và giữ trên môi trường ISP2 và sử dụng trong các nghiên cứu tiếp theo.

2.3.2. Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn

Các chủng xạ khuẩn phân lập được kiểm tra khả năng đối kháng với một số chủng vi khuẩn Gram (-) và Gram (+) và nấm men *Candida albican* ATCC 10231 kiểm định bằng phương pháp thổi thạch và phương pháp khuếch tán trên thạch. Khả năng đối kháng được đánh giá dựa trên vòng ức chế các VSV kiểm tra [6].

2.3.3. Khảo sát một số đặc điểm sinh học của xạ khuẩn

Nghiên cứu đặc điểm sinh học theo phương pháp ISP (1974) và khóa phân loại Bergey. Màu sắc của khuẩn ty cơ chất (KTCC), khuẩn ty khí sinh (KTKS) và sắc tố tan tiết ra môi trường được đánh giá trên bảng màu của Tresner và Backus [10, 11]. Hình dạng cuống sinh bào tử và cấu trúc bề mặt bào tử của xạ khuẩn nghiên cứu được quan sát dưới kính hiển vi quang học Olympus BX51 (Nhật Bản).

Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến khả năng sinh trưởng của xạ khuẩn gồm các yếu tố: pH ban đầu (4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0, 9,0 và 10,0); nhiệt độ (4; 10; 15; 30; 37; 45°C) và nồng độ muối NaCl (1, 2, 3, 4, 5, 7, 10%) trên môi trường ISP2 sau 96 giờ [14].

2.3.4. Xác định khả năng tổng hợp một số enzym ngoại bào: cellulase, protease, amylase bằng phương pháp khuếch tán trên thạch

Chủng xạ khuẩn được cấy trên môi trường khoáng có bổ sung các cơ chất đặc hiệu: CMC (cacboxyl methyl cellulose) để xác định hoạt tính cellulase, tinh bột để xác định hoạt tính amylase, casein để xác định hoạt tính protease. Sử dụng phương pháp cấy chấm điểm, nuôi ở 28÷30°C, kiểm tra kết quả sau 5 ngày. Khả năng sinh tổng hợp cellulase và amylase được xác định bằng việc bổ sung 2ml dung dịch lugol và đo đường kính vòng phân giải cơ chất xuất hiện trên đĩa. Dung dịch axit tricloaxetic 50% (w/v) được sử dụng để xác định khả năng sinh tổng hợp protease.

2.3.5. Phân loại xạ khuẩn bằng phương pháp giải trình tự gene mã hóa 16S rRNA

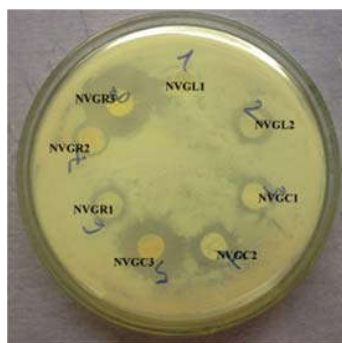
Tách chiết DNA tổng số của xạ khuẩn theo trình tự đã hướng dẫn của kit GeneJET Plant genomic DNA purification Mini Kit. DNA sau khi tách chiết được giữ ở -20°C và dùng để làm khuôn cho các phản ứng PCR. Gen 16S rRNA của xạ khuẩn được khuếch đại bằng phản ứng Polymerase Chain Reaction (PCR) sử dụng cặp mồi 27F và 1492R với trình tự như sau 27F (5'AGATTTGATCCTGGCTCAG3'); 1492R (5'GGTTACCTTGTTACGACTT3') và tiến hành theo Shutsrirung [12]. Trình tự nucleotide của gen 16S rDNA được kiểm tra bằng phần mềm phân tích DNA STAR (Lasergene), so sánh trình tự gen tương ứng trên cơ sở dữ liệu GenBank bằng công cụ BLAST trên NCBI [1].

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Lựa chọn chủng xạ khuẩn có hoạt tính kháng khuẩn cao

Từ các mẫu thân, lá và rễ cây nghệ, đã phân lập được 8 chủng xạ khuẩn. Trong đó xạ khuẩn xuất hiện ở tất cả các bộ phận của cây, số chủng phân lập được từ thân (3 chủng), rễ (3 chủng) và từ lá (2 chủng), kết quả trên có sự khác biệt với nghiên cứu đã công bố [4].

Trong số 8 chủng xạ khuẩn phân lập có 2 chủng có khả năng ức chế *E. faecalis* ATCC 29212 (chiếm 25%), 7 chủng có khả năng ức chế *S. typhimurium* ATCC 14028 (chiếm 87,5%) và 2 chủng có khả năng ức chế cả 9 chủng VSV kiểm định (chiếm 25%), đó là các chủng có kí hiệu NVGR3 và NVGC3 (hình 1). Hai chủng NVGR3 và NVGC3 được lựa chọn phục vụ cho nghiên cứu tiếp theo.



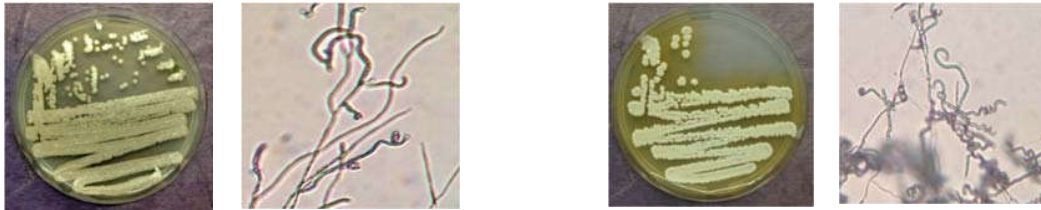
Hình 1. Hoạt tính kháng *S. typhimurium* ATCC 14028 của các chủng xạ khuẩn nội sinh cây nghệ vàng.

3.2. Đặc điểm sinh học của các chủng xạ khuẩn

Đối với xạ khuẩn, đặc điểm cuống sinh bào tử là một trong chỉ tiêu phân loại quan trọng. Chủng NVGR3 có chuỗi bào tử dạng lượn sóng (Rf) xen lẫn dạng móc câu, từ một cuống có thể sinh ra 1 đến 2 chuỗi bào tử dài, số lượng bào tử từ 10÷50 bào tử/chuỗi. Chủng NVGC3 có chuỗi bào tử dài, dạng xoắn lò xo (S). Từ một cuống bào tử có thể sinh ra 1 đến 3 chuỗi bào tử dài, Số lượng bào tử từ 30÷50 bào tử/chuỗi (hình 2).

Khuẩn ty khí sinh (KTKS) của xạ khuẩn NVGR3 trên các môi trường ISP2 và ISP4 có màu xám, khuẩn ty cơ chất (KTCC) có màu xám đậm và sắc tố tan màu vàng nhạt. Trên môi trường ISP7, KTKS và KTCC đều có màu vàng xám. Chủng NVGR3 không sinh sắc tố tan melanin.

Xạ khuẩn NVGC3 có KTKS màu vàng trên môi trường ISP2, màu vàng sáng trên môi trường ISP4 và ISP7. KTCC của xạ khuẩn này trên cả ba môi trường kiểm tra đều có màu trắng. Chủng sinh sắc tố vàng trên môi trường ISP4 và không sinh sắc tố melanine (bảng 1 và hình 2).



NVGR3

NVGC3

Hình 2. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và chuỗi bào tử (x 600) của hai chủng xạ khuẩn sau thời gian 7 ngày nuôi ở nhiệt độ 28°C.

Bảng 1. Một số đặc điểm nuôi cấy và sinh học của hai xạ khuẩn nội sinh NVGR3 và NVGC3

Đặc điểm	Chủng nghiên cứu	
	NVGR3	NVGC3
Khuẩn ty khí sinh	Màu xám	Màu vàng
Khuẩn ty cơ chất	Màu xám đậm	Màu trắng
Cấu trúc chuỗi bào tử	Lượn sóng	Xoắn lò so
Số lượng bào tử trên chuỗi	10÷50	30÷50
Sắc tố tan	Vàng nhạt trên ISP2, ISP 4	Vàng trên ISP 4
Sắc tố Melanin	Không	Không
Hoạt tính cellulase	+	+
Hoạt tính amylase	+	+
Hoạt tính Protease	+	+
Khả năng sử dụng các nguồn đường:		
D- Glucose	+	+
D-Arabinose	+	+
D-Fructose	+	+
Inositol	+	+

D-Mannitol	+	+
Rhamnose	+	+
Saccharose	+	+
Khả năng sử dụng các nguồn acid amin:		
D- alanine	+	+
L- Methionine	+	+
L-lysine	+	+
Chịu muối NaCl %	≤ 7	≤ 7
pH sinh trưởng	$5 \leq \text{pH} \leq 10$	$4 \leq \text{pH} \leq 10$
Nhiệt độ sinh trưởng	$15 \leq t \leq 37$	$10 \leq t \leq 37$

Ghi chú: “+”: Có hoạt tính hoặc có đồng hóa.

Một trong các đặc điểm sinh lý, sinh hóa quan trọng của xạ khuẩn được sử dụng trong phân loại là khả năng đồng hóa các nguồn cacbon và nitơ. Hai chủng xạ khuẩn NVGR3 và NVGC3 được nuôi cấy trên môi trường khoáng ISP9 có bổ sung nguồn đường và nguồn nitơ khác nhau. Kết quả thí nghiệm (bảng 1) cho thấy, cả hai chủng khảo sát đều phát triển tốt trên các nguồn đường kiểm tra D- Glucose, D-arabinose, D-fructose, inositol, D-mannitol, rhamnose và saccharose. Bên cạnh đó, 2 chủng cũng có khả năng sử dụng ba nguồn nitơ kiểm tra là D- alanine, L- methionine, L-lysine.

Các hoạt động trao đổi chất của VSV là kết quả của phản ứng hóa học. Vì vậy, nhiệt độ và pH môi trường là hai yếu tố có tác động lớn đến quá trình sống của tế bào. Để tiến hành nghiên cứu, chủng xạ khuẩn được cấy trên môi trường ISP2 và nuôi ở các điều kiện nhiệt độ, pH, nồng độ NaCl khác nhau. Kết quả cho thấy cả 2 chủng thuộc nhóm ưa ấm, sinh trưởng tốt ở nhiệt độ 30°C, môi trường trung tính pH=7 ÷ 8 và chịu được nồng độ muối NaCl $\leq 7\%$. Kết quả này phù hợp với tài liệu công bố [13] đa số các chủng xạ khuẩn chỉ phát triển được ở nồng độ NaCl dưới 9%. Hai chủng nghiên cứu đều có khả năng phân hủy các cơ chất như cellulose, casein và tinh bột (bảng 1).

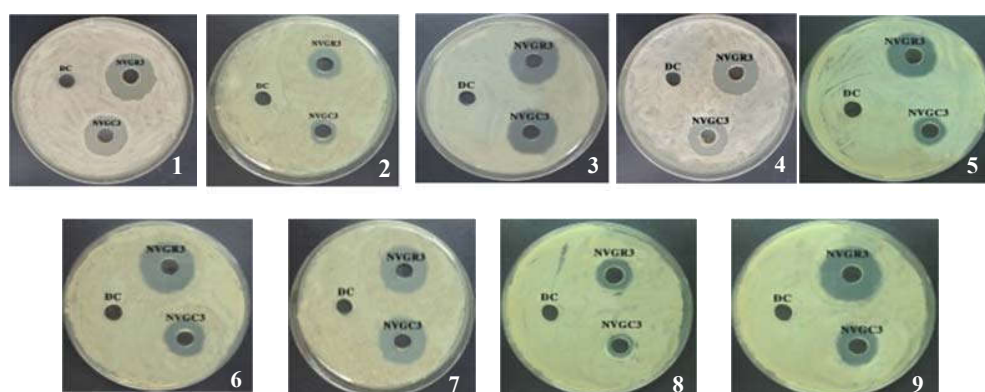
3.3. Phổ kháng khuẩn từ dịch lên men của hai chủng xạ khuẩn NVGR3 và NVGC3

Dịch chiết từ dịch sau lên men của 2 chủng đều có hoạt tính kháng khuẩn ở mức độ khác nhau đối với các chủng VSV kiểm định (bảng 2 và hình 3). Chủng NVGR3 có hoạt tính kháng khuẩn với nhiều chủng VSV kiểm định, đường kính vòng kháng đạt cao nhất với chủng *L. innocua* ATCC 33090 (19mm) và nhỏ nhất với chủng *E. faecalis* ATCC 29212 (6 mm). Đối với nấm men *C. albicans* ATCC 10231 chủng NVGR3 thể hiện vòng kháng đạt 6 mm. Điều này cho thấy, chủng NVGR3 có tiềm năng trong thu nhận hoạt chất kháng khuẩn dùng trong y dược. Do đó chủng NVGR3, đã phân loại kỹ hơn bằng phương pháp sinh học phân tử, kết quả thể hiện ở phần 3.4.

Bảng 2. Phổ kháng khuẩn dịch chiết từ môi trường lên men của hai chủng xạ khuẩn

Chủng vi sinh vật kiểm định	Đường kính vòng vô khuẩn (D-d, mm)	
	Chủng NVGC3	Chủng NVGR3
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 13061	15	18
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	3	6
<i>Escherichia coli</i> ATCC15224	15	16
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	16	19
<i>Proteus vulgaris</i>	9	17
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	12	18
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15	15
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	2	6
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	8	16

Ghi chú: “D”: Đường kính vòng kháng khuẩn; “d”: Đường kính lỗ thạch.

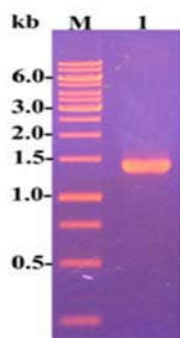


Hình 3: Hoạt tính kháng khuẩn của hai chủng xạ khuẩn tuyển chọn

1. Hoạt tính kháng *B. cereus* ATCC 13061; 2. *E. faecalis* ATCC 29212; 3. *E. coli* ATCC15224; 4. *L. innocua* ATCC 33090; 5. *P. vulgaris*; 6. *S. typhimurium* ATCC 14028; 7. *P. aeruginosa*; 8. *C. albicans* ATCC 10231; 9. *S. epidermidis* ATCC 12228.

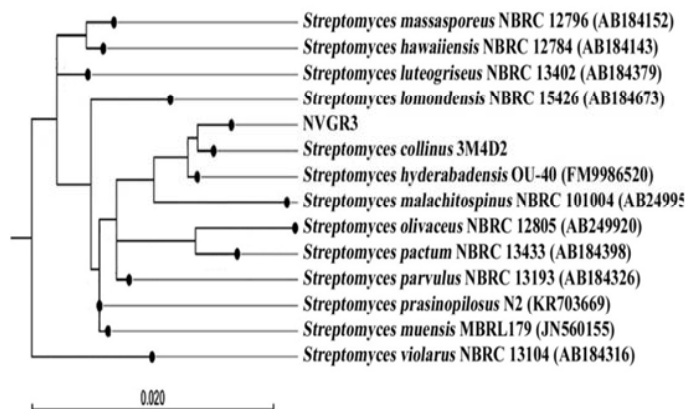
3.4. Phân loại xạ khuẩn nội sinh NVGR3 dựa trên trình tự gen 16S rRNA.

DNA tổng số của xạ khuẩn NVGR3 được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR khuếch đại gen 16S rDNA bằng cặp mồi 27F và 1492R. Sản phẩm của phản ứng PCR cho một băng duy nhất có kích thước khoảng 1,4 kb trên gel agarose 1%, tương ứng với kích thước mong đợi (hình 4). Vì vậy, sản phẩm PCR sau khi tinh sạch được sử dụng để giải trình tự hai chiều cho đoạn gen 16S rDNA.



Hình 4. Điện di đồ sản phẩm PCR của chủng NVGR 3 trên gel agarose 1%.

M: Thang DNA chuẩn;
I: Sản phẩm PCR



Hình 5. Mức độ tương đồng di truyền giữa chủng NVGR3 với các loài xạ khuẩn có họ hàng gần dựa vào trình tự nucleotide của gen 16S rRNA

Gen mã hóa 16s rRNA của chủng NVGR3 có độ tương đồng 99% so với gen tương ứng của các chủng xạ khuẩn thuộc loài *Streptomyces collinus* 3M4D2 (KC119160.1) (hình 5). Ngoài ra, khi so sánh đặc điểm hình thái, sinh lý và hóa sinh cho thấy, chủng NVGR3 có các đặc điểm giống với chủng *Streptomyces collinus* Lindenbein [5] hay như ISP 5129 [5] thuộc nhóm A-1 như: chuỗi bào tử ngắn, KTKS có màu xám trên môi trường ISP (2, 4 và 7), chủng có khả năng sử dụng các nguồn cacbon như D- glucose, L-arabinose, sucrose, inositol, D-manitol, D- fructose, rhamnose và raffinose. Đối chiếu các đặc điểm sinh học và dựa trên phân tích trình tự gen 16S rDNA có thể kết luận chủng NVGR3 thuộc loài *Streptomyces collinus* và được đặt tên là *Streptomyces collinus* NVGR3.

4. KẾT LUẬN

1. Từ các mẫu rễ, cành và lá của cây nghệ thu nhận ở huyện Giao Thủy, Nam Định, Việt Nam, đã phân lập được 8 chủng xạ khuẩn nội sinh.

2. Hai chủng xạ khuẩn nội sinh NVGR3 và NVGC3 có khả năng ức chế cả 9 chủng VSV kiểm định. Dịch chiết từ môi trường lên men của chủng xạ khuẩn nội sinh NVGR3 có hoạt tính đối kháng mạnh với các VSV kiểm định được lựa chọn cho nghiên cứu.

3. Dựa trên cơ sở phân loại theo đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa và kết hợp với kết quả phân tích trình tự gen 16S rDNA, chủng xạ khuẩn NVGR3 được định danh là *Streptomyces collinus* NVGR3.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chu Văn Mẫn, *Tin học trong Công nghệ Sinh học*, Nxb Giáo Dục Việt Nam, Hà Nội, 2011.
2. Bacon C.W., White J.F., *Microbial endophytes*, Marcel Dekker, New York, 2000, 8.
3. Barrett C.T., Barrett J.F., *Antibacterials: are the new entries enough to deal with the emerging resistance problems?*, Current Opinion in Biotechnology, 2003, **14**:621-626.
4. Chandrakar S., Gupta A. K., *Antibiotic potential of endophytic actinomycetes of medicinal herbs against human pathogenic bacteria*, Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B Biol. Sci., 2015, DOI 10.1007/s40011-015-0668-9. ISSN 1608-4217.
5. Elwood B., Shirling and David G., *Cooperative description of type cultures of streptomycetes. II. Species descriptions from first study*, International journal of systematic bacteriology, 1968, **18**(2):69-189.
6. Intra B., Mungsuntisuk I., Nihira T., Igarashi Y., Panbangred W., *Identification of actinomycetes from plant rhizospheric soils with inhibitory activity against Colletotrichum spp., the causative agent of anthracnose disease*, BMC Research Notes 4, 2011, 98.
7. Loria R., Bukhalid R.A., Fry B.A., King R.R., *Plant pathogenicity in the genus Streptomyces*, Plant Dis, 1997, **81**:836-846.
8. Lu C.H., Shen Y.M., *A novel ansamycin, naphthomycin K from Streptomyces sp.*, J Antibiot, 2007, **60**:649-653.
9. Nomomura H., *Key for classification and identification of 458 species of the Streptomyces included in ISP*, J. Ferment. Technol, 1974, **52**(2):78.
10. Shirling E.B., Gottlieb D., *Methods for characterization of Streptomyces species*, Int. J. Sys. Bacteriol, 1966, **16**(3):313.
11. Shirling E.B., Gottlieb D., *Cooperative description of type culture of Streptomyces species*, Int. J. Sys. Bacteriol, 1966, **19**(4):391.
12. Shutsrirung A., Chromkaew Y., Pathom Aree W., Choonluchanon S., Boonkerd N., *Diversity of endophytic actinomycetes in mandarin grown in northern Thailand, their phytohormone production potential and plant growth promoting activity*, Soil Science and Plant Nutrition, 2013, **59**(3):322.
13. Sirisha B., Harith R., Siva Kumar K., Ramana T., *Bioactive compounds from marine actinomycetes isolated from the sediments of bay of Bengal*, IJPCBS, 2013, **3**(2):257-264
14. Stanley J.T., Williams M. E., Sharpe M. E., Holt J. G., *Bergey's Manual of Systematic bacteriology*, Williams & Wilkins, 1989, **4**:2452-2492.
15. Wilkins W., *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Publisher Springer-Verlag, New York, 1989, Vol. 2, Vol. 3, Vol. 4.

SUMMARY

BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF ENDOPHYTIC ACTINOMYCETES ASSOCIATED FROM CURCUMA LONGA TREES AND THE POTENTIAL TO BIOSYNTHETIZE ANTIMICROBIAL SUBSTANCES

Endophytic actinomycetes associated with medicinal plants have widely reported to inhibit microbial pathogens and shown the potential applications. In traditional medicine, *Curcuma longa* has been used for thousand years. This is a precious medicinal plant, with the desire to find endophytic Actinomycetes strains with many precious properties on medicinal plants. In the paper, roots, branches and leaves of *Curcuma longa* were collected at Giao Thuy district, Nam Dinh province, Vietnam. The results showed that 8 endophytic Actinomycetes strains were isolated, in which, there are two strains named NVGR3 and NVGC3 could inhibit all tested strains (18.5%) and especially, NVGR3 strain has the best antibacterial activity. The isolated NVGR3 was selected for studying on biological characteristics. This strain reached high biomass yields as grow in several cultivation media at pH 5÷10, salinity up to 7% and growth temperature of 15÷37°C. Based on the results of morphological, physiological and biochemical characterizations and phylogenetic analysis of 16S rDNA, the isolated NVGR3 was identified as *Streptomyces collinus* species named *Streptomyces collinus* NVGR3.

Từ khóa: Xạ khuẩn nội sinh, nghệ vàng, Curcuma longa, endophytic actinomycetes.

Nhận bài ngày 16 tháng 5 năm 2017

Hoàn thiện ngày 09 tháng 10 năm 2017

Phân viện Công nghệ sinh học, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga