

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT**

QUÁCH NGỌC TÙNG

**PHÂN LẬP, ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG VÀ KHẢ NĂNG
SINH KHÁNG SINH CỦA XẠ KHUẨN NỘI CỘNG
SINH TRÊN CÂY QUẾ TẠI TỈNH HÒA BÌNH**

Chuyên ngành: Vi sinh vật học

Hà Nội - 2014

MỞ ĐẦU

Vi khuẩn gây bệnh có khả năng kháng thuốc kháng sinh là vấn đề nghiêm trọng và thu hút mối quan tâm rất lớn của cộng đồng. Vì vậy, việc nghiên cứu, lựa chọn các tác nhân kháng khuẩn mới từ tự nhiên là ưu tiên hàng đầu của các nhà khoa học và các công ty dược phẩm trên thế giới. Cho đến nay, các nhà khoa học vẫn không ngừng tìm kiếm các nguồn hợp chất tự nhiên khác nhau để phát triển các loại thuốc kháng sinh cũng như các loại thuốc khác nhằm chăm sóc sức khỏe cộng đồng, giảm thiểu những tác dụng phụ tới sức khỏe của người bệnh do một số thuốc tổng hợp hóa học gây ra [3].

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh thực vật là một nguồn tự nhiên quan trọng trong điều trị các bệnh gây ra bởi vi sinh vật và các bệnh khác. Chẳng hạn, cây quế (*Cinamomum loureiri*) chứa được chất trong tinh dầu của lá, vỏ cây và quả với 90% là cinnamaldehyde có hoạt tính kháng khuẩn cao đối với cả vi khuẩn Gram (+) và vi khuẩn Gram (-) [5]. Carvacrol trong tinh dầu bạc hà phá hủy màng ngoài của tế bào vi khuẩn Gram (-) làm tăng tính lưu động của màng tế bào, dẫn đến sự thay đổi tính thấm thấu của màng tế bào... [24]. Ngoài giá trị khoa học, thành phần của cây mang lại, cây dược liệu còn là môi trường cho các xạ khuẩn nội cộng sinh (sống trong các loại mô thực vật) có khả năng sinh tổng hợp chất kháng sinh [49]. Theo nghiên cứu của Berdy, 2005 ước tính khoảng 70% các kháng sinh có nguồn gốc tự nhiên được sử dụng trong y học lâm sàng hiện nay được sản sinh bởi xạ khuẩn [11]. Gần đây, một số công bố cho thấy các hợp chất chuyển hóa thứ cấp do xạ khuẩn nội cộng sinh tạo ra trên cây dược liệu không chỉ có số lượng phong phú mà còn có sự đa dạng về chức năng như tính kháng vi sinh vật, chống oxy hóa, chống sốt rét và kiểm soát sinh học...

Các cây dược liệu ở Việt Nam rất phong phú và đa dạng [3]. Trong số đó, cây quế là loài cây dược liệu có nhiều công dụng như kháng nấm, chống dị ứng, ung thư dạ dày, chống oxy hóa... Ngoài giá trị khoa học do thành phần của cây mang lại, qua khảo sát ban đầu cho thấy cây quế còn là môi trường cho các xạ

khuẩn nội cộng sinh có khả năng sinh tổng hợp chất kháng sinh, chất chống ung thư. Tuy nhiên, số lượng các nghiên cứu về xạ khuẩn nội cộng sinh trên cây quế nói riêng và cây dược liệu nói chung tại Việt Nam vẫn còn rất hạn chế. Xuất phát từ những định hướng trên, chúng tôi thực hiện nghiên cứu đề tài: “*Phân lập, đánh giá đa dạng và khả năng sinh kháng sinh của xạ khuẩn nội cộng sinh trên cây quế tại tỉnh Hòa Bình*”.

Đề tài được thực hiện tại phòng Công nghệ lên men, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, gồm 4 nội dung chính:

- Phân lập và đánh giá đa dạng xạ khuẩn nội cộng sinh trên các mẫu cây quế thu thập tại tỉnh Hòa Bình.
- Đánh giá khả năng kháng vi sinh vật kiểm định các chủng xạ khuẩn nội cộng sinh và xác định sự có mặt của ba gen mã hóa các enzyme tham gia vào quá trình tổng hợp kháng sinh gồm polyketide synthases (PKS-I, PKS-II) và nonribosomal peptide synthetase (NRPS).
- Tuyển chọn, nghiên cứu đặc điểm sinh học và phân loại của một chủng xạ khuẩn có khả năng sinh tổng hợp kháng sinh cao.
- Nghiên cứu tách dòng và phân tích trình tự gen mã hóa PKS-I, PKS-II của chủng xạ khuẩn được tuyển chọn.

CHƯƠNG I. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Xạ khuẩn nội cộng sinh trên thực vật và cây dược liệu

1.1.1. Khái niệm xạ khuẩn nội cộng sinh

Hiện nay, nhiều công trình nghiên cứu trên thế giới công bố về tương tác giữa thực vật và vi sinh vật (VSV), trong đó VSV đóng vai trò như tác nhân ức chế sinh vật gây bệnh, tổng hợp chất kích thích sinh trưởng thực vật, phân giải phospho khó hòa tan, cố định nitơ tự do, tăng độ phì của đất... [17, 51]. Phần lớn các VSV bao gồm vi khuẩn, nấm mốc và xạ khuẩn được phân lập từ đất, vùng rễ, bề mặt hoặc trong các mô thực vật.

Khái niệm xạ khuẩn nội cộng sinh được đưa ra khi Smith và cộng sự (1957) phân lập thành công xạ khuẩn *Micromonospora* sp. có khả năng ức chế nấm gây bệnh *Fusarium oxysporum* trong mô cây cà chua không nhiễm bệnh [57]. Từ đó, đã có nhiều định nghĩa khác nhau về VSV nội cộng sinh nhưng định nghĩa của Bacon và White (2000): “VSV nội cộng sinh là những VSV sinh trưởng trong mô tế bào thực vật, không gây ra những hiệu ứng xấu tới cây chủ” đã được các nhà VSV học thừa nhận [10]. Theo tài liệu, định nghĩa này hàm chứa một ý rất quan trọng: VSV nội cộng sinh không những không gây ảnh hưởng mà còn tăng cường khả năng trao đổi chất, kích thích sinh trưởng, miễn dịch cho vật chủ bằng cách tổng hợp các sản phẩm trao đổi chất... [8].

Trong số các VSV nội cộng sinh, xạ khuẩn được chú ý bởi khả năng tổng hợp kháng sinh ức chế VSV gây bệnh [38]. Song song với tác dụng dược lý thu nhận từ xạ khuẩn nội cộng sinh, một số nhà sinh vật học đã nghiên cứu khả năng kiểm soát sinh học (biocontrol) của xạ khuẩn nội cộng sinh trong suốt hai thập kỷ qua [59, 60]. Xạ khuẩn đã được chứng minh khả năng tăng cường, thúc đẩy tăng trưởng của cây chủ, giảm nguy cơ nhiễm mầm bệnh và tăng cường khả năng sống sót của cây chủ trong các điều kiện khác nhau [4]. Những hiểu biết về sinh lý và môi trường tương tác phân tử giữa xạ khuẩn và thực vật là những đặc tính quan trọng để khai thác những đặc tính có lợi của xạ khuẩn nội cộng sinh trong kích thích sinh trưởng thực vật và lĩnh vực khác.

Nhiều nghiên cứu trên thế giới đã khẳng định vai trò quan trọng của xạ khuẩn trong sinh tổng hợp chất kháng sinh. Sự đa dạng của xạ khuẩn cộng sinh trong mô thực vật là rất phong phú, hứa hẹn tiềm năng khai thác các hợp chất có

hoạt tính sinh học do các chủng xạ khuẩn này sinh ra trong nhiều lĩnh vực của đời sống. Các hợp chất có hoạt tính sinh học từ xạ khuẩn nội cộng sinh được chứng minh là rất đa dạng về mặt số lượng và hoạt tính sinh học như: các chất kiểm soát sinh học, chất kháng VSV, kháng ung thư, chống oxy hóa, chống sốt rét, chất diệt cỏ, chất kích thích sinh trưởng... [10, 49]. Vì vậy, nghiên cứu sàng lọc các hợp chất có hoạt tính sinh học nói chung và hoạt tính kháng sinh nói riêng từ xạ khuẩn cộng sinh trên cây dược liệu tự nhiên đang là hướng nghiên cứu triển vọng của các nhà khoa học trên thế giới.

1.1.2. Các phương pháp phân lập xạ khuẩn nội cộng sinh

Xạ khuẩn cư trú trong mô thực vật bị ảnh hưởng lớn bởi các yếu tố môi trường như: pH của đất, thành phần chất vô cơ và chất hữu cơ trong đất, lượng mưa, cường độ ánh sáng mặt trời, không khí nhiệt độ... Thêm vào đó, mật độ xạ khuẩn nội cộng sinh nhìn chung thấp và phụ thuộc vào loại mô khác nhau trên thực vật [49].

Theo các công trình công bố, quá trình phân lập xạ khuẩn nội cộng sinh cần xử lý bề mặt thực vật nhằm loại bỏ vi khuẩn, vi nấm trên bề mặt. Do đó, phải khử trùng bề mặt mẫu và cắt mẫu thành từng mảnh bằng dụng cụ đã khử trùng trước khi phân lập. Sodium hypochlorite (NaOCl) là một trong những tác nhân oxy hóa phổ biến được sử dụng để khử trùng bề mặt. Mẫu thực vật được ngâm trong ethanol 70-99% từ 1-5 phút và 1-5% NaOCl trong khoảng 3-20 phút, tiếp theo rửa nhiều lần bằng nước vô trùng nhằm loại bỏ lượng NaOCl còn dư. Ngoài ra, hydro peroxide và clorua thủy ngân cũng được sử dụng như chất khử trùng bề mặt hiệu quả [42]. Năm 1992, Sardi và cộng sự công bố sử dụng hơi của propylen oxit để khử trùng bề mặt thay vì hóa chất khử trùng dạng lỏng [60]. Qua nhiều nghiên cứu thực nghiệm cho thấy xử lý bề mặt chỉ với ethanol không hiệu quả với quá trình phân lập VSV nội cộng sinh. Nếu tăng gấp hai hoặc ba lần các bước khử trùng bề mặt bằng hỗn hợp ethanol và một số chất khử trùng khác thì không phân lập được xạ khuẩn nội sinh. Hiệu quả khử trùng bề mặt được tăng cường bằng việc sử dụng các chất hoạt hóa bề mặt như Tween 20 và Tween 80, làm tăng hiệu quả tác động của chất khử trùng với bề mặt thực vật [12].

Phần mẫu đã khử trùng được đặt vào trên môi trường thạch thạch hợp, nuôi cấy ở nhiệt độ thích hợp từ 25-30 °C. Trong quá trình phân lập, các nhà nghiên cứu thường gặp phải là VSV phát triển mạnh trong hai tuần đầu tiên là vi khuẩn hoặc nấm tạp nhiễm trên phần mẫu thực vật. Để ngăn chặn sự sinh trưởng của vi khuẩn và nấm không mong muốn cũng như tìm kiếm loài xạ khuẩn mới, một số môi trường chọn lọc đã được sử dụng như: môi trường thạch humic acid-vitamin, môi trường thạch casein tinh bột, cao nấm men, môi trường S... [14, 35, 38]. Ngoài ra, bổ sung các hợp chất kháng sinh như acid nalidixic và trimethoprim, nystatin hoặc cycloheximide để ức chế vi khuẩn, nấm nội cộng sinh và nâng cao khả năng phát triển chọn lọc của xạ khuẩn và xạ khuẩn phát triển chậm hơn so với vi khuẩn và nấm [29, 49].

1.1.3. Ứng dụng của xạ khuẩn nội cộng sinh trên thực vật

Phần lớn xạ khuẩn nội cộng sinh có thể sống trong các mô thực vật và không gây bệnh hoặc tác động bất lợi tới quá trình phát triển bình thường của cây. Ngoài ra, xạ khuẩn nội sinh còn được nhiều nhà khoa học nghiên cứu về khả năng sinh kháng sinh, chất kháng ung thư, enzyme, chất kích thích sinh trưởng thực vật, ức chế và kiểm soát bệnh thực vật...

1.1.3.1. Kháng ung thư, kháng vi khuẩn

Trong những năm gần đây, nhu cầu tìm kiếm chất có hoạt tính kháng, ức chế tế bào ung thư từ xạ khuẩn nội cộng sinh đang là hướng nghiên cứu mới của các nhà khoa học trên thế giới. Nhiều công bố khẳng định, xạ khuẩn nội cộng sinh có mối quan hệ phức tạp, chặt chẽ với cây chủ. Một số giả thuyết nhận định rằng gen liên quan tới tổng hợp các hợp chất có hoạt tính sinh học được tiếp nhận từ quá trình trao đổi chất giữa VSV và thực vật thông qua hệ thống chuyển gen ngang (horizontal gene transfer, HGT). Nhờ đó các nhà VSV học đã mở ra triển vọng sản xuất các hợp chất sinh học có nguồn gốc từ thực vật nhờ quá trình nuôi cấy VSV, ví dụ như chất kháng tế bào ung thư paclitaxel phổ biến trên cây thông đỏ (*Taxus sp.*) được tách chiết từ xạ khuẩn *Kitasatospora sp.* và một số nấm cộng sinh khác [38].

Một số nghiên cứu gần đây cho thấy, tỷ lệ phát hiện ra các kháng sinh mới trên xạ khuẩn nội cộng sinh có tỷ lệ khá cao so với xạ khuẩn phân lập từ đất hoặc bề mặt thực vật. Chẳng hạn kháng sinh mới có tên naphthomycin K (dẫn xuất của kháng sinh ansamycin có gắn thêm nhóm chức chlorine) được phát

hiện lần đầu tiên từ *Streptomyces* sp. CS nội cộng sinh trong cây mỹ đăng mộc (*Maytenus hookeri*) - loại cây thuốc có tác dụng điều trị ung thư, hoạt huyết... Kết quả kiểm tra hoạt tính sinh học của naphthomycin K cho thấy, hoạt tính gây độc ức chế dòng tế bào P388 và A-549 ở nồng độ ức chế lần lượt là 0,07 và 3,17 μ M, nhưng không có hoạt tính kháng *Staphylococcus aureus* và vi khuẩn lao [39, 68].

Ngoài ra, năm chất mới thuộc phân lớp 16 của nhóm macrolide được tách chiết và cho kết quả ức chế mạnh dòng tế bào MDA-MB-435 trong điều kiện *in vitro* [68]; hai chất mới thuộc nhóm macrolide thu nhận từ *Streptomyces* sp. ls9131 gần đây được phân lập trên cây mỹ đăng mộc (*M. hookeri*), trong đó hợp chất dimeric dinactin có tác động kháng ung thư mạnh và hoạt tính kháng nhiều loại vi khuẩn gây bệnh cao [39].

Trước đây, hai hợp chất 5, 7-dimethoxy-4-phenylcoumarin và 5, 7-dimethoxy-4-p-methoxyphenylcoumarin có hoạt tính kháng tế bào ung thư mạnh, thường thu nhận từ nhiều loài thực vật khác nhau. Nhưng gần đây, nhiều công trình công bố rằng hai hợp chất này cũng được tìm thấy trong *S. aureofaciens* CMUAc130 nội cộng sinh [61, 62]. Hoạt tính kháng ung thư của hai chất trên không chỉ hình thành nhóm nitric oxide, prostaglandin E2 và tác nhân hoại tử khối u (TNF- α), mà còn cảm ứng nitric oxide synthase và cyclooxygenase-2 trong lipopolysaccharide gây đại thực bào tế bào RAW 264,7. Tác dụng ức chế phụ thuộc vào nồng độ chất và ức chế sự hình thành TNF- α [61].

Do vậy, hiện nay xạ khuẩn nội cộng sinh là nguồn tiềm năng cần được quan tâm nhằm khai thác các chất có hoạt tính sinh học mới và thúc đẩy tìm kiếm các loại thuốc mới.

1.1.3.2. Kiểm soát sinh học

Trong những năm gần đây, xạ khuẩn nội cộng sinh đã thu hút sự chú ý của các nhà VSV bởi khả năng kiểm soát sinh học đối với mầm bệnh do đặc tính cộng sinh và tổng hợp sản phẩm trao đổi chất kháng VSV gây bệnh. Nhiều nghiên cứu chứng minh đặc tính bảo vệ cây chủ của xạ khuẩn nội cộng sinh chống lại các VSV gây bệnh từ đất như *Rhizoctonia solani*, *Verticillium dahliae*, *Plectosporium tabacinum*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *F.*

oxysporum, *Pythium aphanidermatum* và *Colletotrichum orbiculare* [12, 18, 22, 23].

Cơ chế kiểm soát sinh học tập trung chủ yếu vào các sản phẩm trao đổi chất như chất kháng sinh, enzyme thủy phân, phytohormone... Ngoài ra, các chủng xạ khuẩn giúp tăng cường hệ thống miễn dịch đối với thực vật nhờ kích thích các thụ thể tế bào. Ví dụ như chủng *S. galbus* R-5 không chỉ sinh cellulase, pectinase mà còn sản xuất actinomycin X2 và fungichromin giúp tăng cường sức đề kháng trong cây đỗ quyên, tăng cường sản sinh jasmonate kích thích hệ thống miễn dịch [55].

Conn và cộng sự (2008) công bố kết quả nghiên cứu gây nhiễm *Streptomyces* sp. EN27 và *Micromonospora* sp. EN43 trên hạt giống cây *Arabidopsis thaliana* nhằm làm tăng sức đề kháng chống lại nấm bệnh *Erwinia carotovora* và *F. oxysporum*; kích hoạt biểu hiện gen tổng hợp acid jasmonic, acid salicylic và etylen [16]. Mối liên hệ giữa xạ khuẩn nội cộng sinh với các cây chủ và các sản phẩm tự nhiên có hoạt tính sinh học được sinh ra bởi xạ khuẩn nội cộng sinh giúp tìm ra các loại thuốc đặc hiệu có tiềm năng ứng dụng trong bảo vệ và tăng năng suất cây trồng.

1.1.3.3. Một số dược chất khác từ xạ khuẩn nội cộng sinh

Ngoài đóng vai trò quan trọng trong chu trình tuần hoàn vật chất thông qua các enzyme thủy phân ngoại bào và khả năng sinh chất kháng sinh đã được khoa học biết đến từ lâu. Gần đây, các nghiên cứu trên xạ khuẩn còn phát hiện ra nhiều sản phẩm trao đổi chất của nhóm VSV này có ý nghĩa rất quan trọng đối với sức khỏe con người.

Một số chủng xạ khuẩn có khả năng sinh chất phá hủy tế bào hồng cầu của động vật (như haemolysin ở *Rhodococcus equi*). Các nhà khoa học đã phát hiện tiềm năng rất lớn của các hợp chất này trong xạ khuẩn có tác dụng làm tan những phần máu đông tụ ở những người bị bệnh tim mạch. Trong phòng thí nghiệm, việc sàng lọc các chất có hoạt tính chống đông máu (phá hủy hồng cầu) từ xạ khuẩn được tiến hành trên mẫu máu động vật như máu ngựa, máu thỏ [51].

Một ví dụ khác là việc tạo ra các hợp chất có khả năng chống lại các tác nhân gây oxy hóa, làm tăng tuổi thọ của tế bào. Nguyên lý hoạt động của các

chất chống oxy hóa tìm thấy ở xạ khuẩn cũng tương tự như axit ascorbic (vitamin C) hay tocopherol (vitamin E), tức là trung hòa thể oxy hóa rất cao của các hợp chất oxy hóa (được tạo ra trong quá trình trao đổi chất của tế bào hay dưới tác dụng của tia cực tím) và làm giảm tác dụng oxy hóa của chúng [60].

Năm 2011, nhóm nghiên cứu của Sri đã phân lập 65 xạ khuẩn nội cộng sinh trên 13 cây dược liệu chữa bệnh tiểu đường như cây lô hội (*Alloe vera*), dây ký ninh (*Tinospora crispa*), xuyên tâm liên (*Andrographis paniculata*), nghệ xanh (*Curcuma aeruginosa*), rau má (*Centela asiatica*)... Trong đó, các chủng thể hiện hoạt tính alpha glucosidase ức chế quá trình thủy phân tinh bột thành glucose thẩm thấu vào ruột non. Kết quả nghiên cứu trên đã tuyển chọn được chủng BWA65 có hoạt tính ức chế alpha glucosidase gấp hơn hai lần so với chất có hoạt tính tương tự thu được từ dịch chiết cây dây ký ninh [58].

Mặc dù ý nghĩa khoa học của các hợp chất trao đổi chất kể trên đối với sự sinh trưởng và cạnh tranh của xạ khuẩn trong môi trường tự nhiên còn chưa rõ ràng nhưng tác dụng mà chúng mang lại trong lĩnh vực y dược, dược phẩm, nông nghiệp đã được chứng minh. Chính vì lý do này, các nhà khoa học hiện nay rất quan tâm tới việc sàng lọc các hợp chất có hoạt tính sinh học cao từ xạ khuẩn nổi chung và xạ khuẩn nội cộng sinh nổi riêng.

1.1.4. Tình hình nghiên cứu xạ khuẩn nội cộng sinh

1.1.4.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới

Trong vài thập kỷ qua đã chứng kiến nhiều thành tựu trong tìm kiếm các loài xạ khuẩn và các hợp chất mới có hoạt tính sinh học từ xạ khuẩn trong môi trường thực vật. Do tiềm năng ứng dụng lớn của xạ khuẩn nội cộng sinh nên đối tượng VSV này đang được quan tâm và nghiên cứu ở nhiều nước trên thế giới như: Nhật, Mỹ, Trung Quốc, Hàn Quốc, Ấn Độ, Nhật Bản... Sơ lược về tình hình nghiên cứu xạ khuẩn nội cộng sinh trên thực vật trong hơn 10 năm gần đây được thể hiện trong bảng 1.1 [49].

Bảng 1.1. Tổng hợp một số nghiên cứu trên thế giới về các loài xạ khuẩn nội cộng sinh trên thực vật

Loài thực vật	Chi xạ khuẩn	Tài liệu tham khảo
Cây trồng		
Lúa mì (<i>Triticum aestivum</i>)	<i>Streptomyces, Microbispora, Micromonospora, Nocardioides</i>	[18]
Dưa leo (<i>Cucumis sativus</i>)	<i>Streptomyces</i>	[55]
Ngô (<i>Zea mays</i>)	<i>Microbispora, Streptomyces, Streptosporangium</i>	[9]
Cây dược liệu		
Cơ chim (<i>Sambucus adnata</i>)	<i>Glycomyces</i>	[49]
Riềng nếp (<i>Alpinia galangal</i>)	<i>Streptomyces, Nocardia, Microbispora, Micromonospora</i>	[62]
Mộc lan (<i>Kennedia nigricans</i>)	<i>Streptomyces</i>	[14]
Sầu đâu (<i>Azadirachta indica</i>)	<i>Streptomyces, Streptosporangium, Microbispora, Streptoverticillium, Saccharomonospora, Nocardia</i>	[30]

Sự đa dạng của xạ khuẩn cộng sinh trong mô thực vật rất phong phú hứa hẹn tiềm năng ứng dụng các hợp chất có hoạt tính sinh học do các chủng xạ khuẩn này sinh ra trong nhiều lĩnh vực đời sống. Tuy nhiên, so với sự đa dạng của giới thực vật, số lượng các nghiên cứu về xạ khuẩn nội cộng sinh trên thực vật vẫn còn rất hạn chế.

Trong hơn 10 năm gần đây (2001-2012), các nhà khoa học thuộc Viện VSV học Văn Nam, Trung Quốc đã không ngừng nghiên cứu, cải tiến, tối ưu hóa các điều kiện phân lập và đưa vào bảo tàng giống hơn 5.000 chủng xạ khuẩn nội cộng sinh phân lập từ hơn 100 loài thực vật [49]. Các hợp chất chuyển hóa thứ cấp do các chủng xạ khuẩn này sinh ra cũng được chứng minh là rất đa dạng về mặt số lượng và hoạt tính sinh học như các chất kiểm soát sinh