

Phân lập xạ khuẩn nội sinh tạo hoạt chất kháng khuẩn từ cây trà *Melaleuca quinquenervia* tại Long An

Trần Đỗ Công Danh và Huỳnh Thị Ngọc Lan*
Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng

TÓM TẮT

Xạ khuẩn có khả năng sản xuất nhiều chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính sinh học như kháng sinh, enzyme,... Những hoạt chất này là các ứng viên tiềm năng của ngành công nghiệp dược phẩm. Trong nghiên cứu này, chúng tôi phân lập và sàng lọc các chủng xạ khuẩn có hoạt tính kháng khuẩn từ cây trà *Melaleuca quinquenervia* tại vườn dược liệu Mộc Hoa Trà tỉnh Long An. Các mẫu rễ, thân, lá cây được thu thập trực tiếp từ cây 2 năm tuổi. Mẫu được bảo quản lạnh và mang về phòng thí nghiệm trong 24 giờ. Xử lý mẫu cây và phân lập xạ khuẩn bằng môi trường starch casein agar (SCA). Sàng lọc hoạt tính kháng khuẩn của các chủng xạ khuẩn thu được bằng phương pháp vạch đối kháng với vi khuẩn *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922 và *Klebsiella pneumoniae* ATCC 35657 từ đó lựa chọn những chủng tiềm năng. Kết quả đã phân lập được 53 chủng xạ khuẩn tiềm năng, từ đó chọn được 16 chủng cho hoạt tính kháng khuẩn. Trong 16 chủng này đã xác định được chủng RTG21 có phổ kháng khuẩn rộng trên cả 2 chủng vi khuẩn Gram dương và Gram âm. Nuôi cấy chủng xạ khuẩn này, chiết xuất hoạt chất và đánh giá khả năng kháng khuẩn cao chiết bằng phương pháp khuếch tán (giếng khuếch tán) và xác định MIC. Kết luận: Các xạ khuẩn nội sinh từ cây trà *Melaleuca quinquenervia* khá phong phú với nhiều chủng có tiềm năng tạo chất kháng khuẩn, đặc biệt chủng RTG21. Bằng phương pháp phân tích gen 16S rARN, đã định danh chủng xạ khuẩn RTG21 là *Amycolatopsis suaedae*. Cao rắn của dịch chiết từ môi trường nuôi cấy *Amycolatopsis suaedae* RTG21 có tính kháng khuẩn tốt trên vi khuẩn *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 và *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

Từ khóa: xạ khuẩn nội sinh, *Melaleuca quinquenervia*, *Amycolatopsis suaedae*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Xạ khuẩn có khả năng tạo các chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính sinh học như kháng vi sinh vật, kháng phân bào, ức chế enzyme, ức chế miễn dịch, kháng côn trùng, diệt cỏ và các đặc tính sinh học quý khác. Hai phần ba số thuốc kháng sinh đang sử dụng hiện nay ở người và động vật có nguồn gốc từ nhóm xạ khuẩn, điều này cho thấy vai trò rất lớn của xạ khuẩn trong sản xuất các thuốc kháng khuẩn có nguồn gốc vi sinh vật [1].

Hiện nay, phần lớn các chủng xạ khuẩn được phân lập từ môi trường đất, môi trường biển, sông hồ và gần đây nhất là phân lập từ thực vật, đặc biệt từ những cây dược liệu. Các chủng vi sinh vật nội sinh, đặc biệt là xạ khuẩn chỉ mới được bắt đầu nghiên cứu mạnh trong những năm gần đây và cho

thấy có tiềm năng lớn trong lĩnh vực sản sinh các chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính sinh học. Có nhiều giả thuyết về các chất có hoạt tính sinh học đã biết của các cây thuốc có nguồn gốc từ các vi sinh vật nội sinh của cây. Có các giả thuyết cho rằng có sự trao đổi gen giữa thực vật và các vi sinh vật nội sinh trong thực vật, trong đó có những gen liên quan đến việc tổng hợp các hợp chất thiên nhiên có hoạt tính sinh học [2]. Vì vậy, một kho tàng các chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính sinh học từ các chủng vi sinh vật nội sinh nói chung và xạ khuẩn nội sinh nói riêng đang chờ được khám phá và khai thác. Nghiên cứu này nhằm cung cấp cơ sở khoa học về một chủng xạ khuẩn có khả năng tạo ra hoạt chất kháng khuẩn góp phần làm tiền đề

Tác giả liên hệ: TS. Huỳnh Thị Ngọc Lan

Email: lanhtn@hiu.vn

cho việc nghiên cứu phát triển kháng sinh mới.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Mẫu cây: Rễ, thân, lá của một số cây dược liệu thu hái tại vườn dược liệu Mộc Hoa Trà, Long an. Từ kết quả sàng lọc, cây trà *Melaleuca quinquenervia* cho nhiều kết quả khả quan nên đã sử dụng cây này trong nghiên cứu tiếp theo. Mẫu cây trà sử dụng đã được định danh bằng phương pháp giải trình tự 2 gen *matK* và ITS kết hợp phân tích đặc điểm hình thái và khảo sát vi phẫu học.

Vi khuẩn thử nghiệm: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (MSSA), *Bacillus subtilis* ATCC 6633

Escherichia coli ATCC 25922 (EC), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 35657

Môi trường thử nghiệm tính kháng khuẩn: MHB, MHA theo tiêu chuẩn của CLSI.

Môi trường nuôi cấy xạ khuẩn: Môi trường SCA được sử dụng trong phân lập xạ khuẩn, sàng lọc khả năng kháng khuẩn của xạ khuẩn phân lập được.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

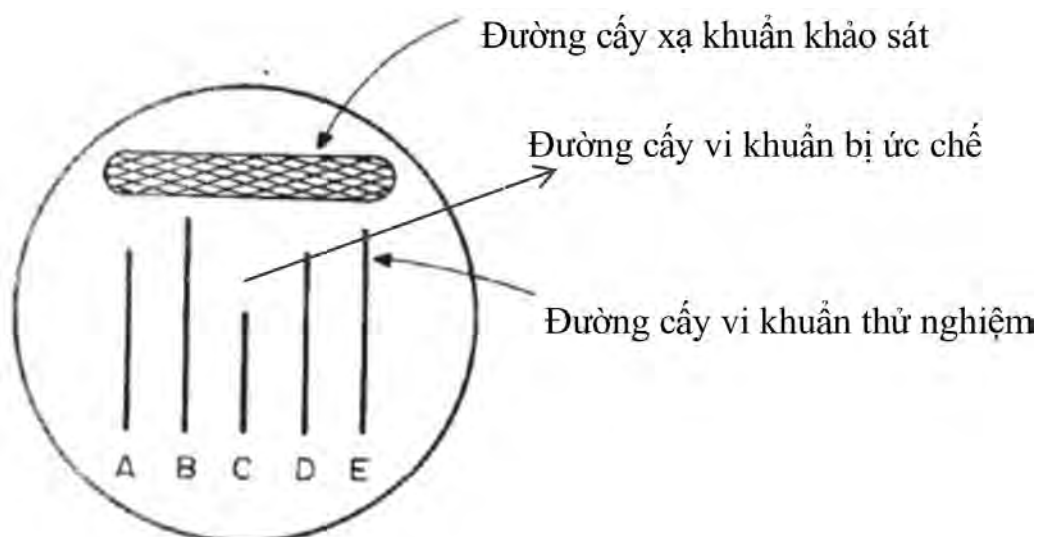
2.2.1. Phân lập xạ khuẩn từ cây trà *Melaleuca quinquenervia*

Các mẫu cây trà *Melaleuca quinquenervia* được thu hái tại vườn dược liệu bao gồm: thân,

lá, rễ. Tiến hành loại bỏ các vi sinh vật sống ngoại sinh trên mẫu cây bằng cách khử trùng bề mặt trong điều kiện vô trùng theo phương pháp của Qin và cs (2009) và có sự cải tiến [3]. Sau đó, cho 10 g mỗi loại mẫu (rễ, thân, lá) vào cối nghiền với nước vô trùng và thu dịch chiết. Sau đó, trải dịch chiết lên môi trường phân lập starch casein agar có bổ sung cycloheximid 0.5 g/L, ủ trong tủ ẩm ở nhiệt độ 28 °C/14 ngày. Thu các khuẩn lạc đặc trưng của xạ khuẩn (khuẩn ty cơ chất ăn sâu xuống mặt môi trường) và tiến hành cấy chuyển trên môi trường starch casein agar (SCA) để làm thuần chủng. Sau khi thu được khóm xạ khuẩn thuần chủng, bảo quản trong ISP2 - glycerol 25%, ở -20 °C [3].

2.2.2. Sàng lọc xạ khuẩn tiềm năng bằng phương pháp vạch đối kháng [4]

Nguyên tắc: Chất kháng khuẩn được tạo thành sau quá trình tăng trưởng và chuyển hóa của các chủng xạ khuẩn sẽ ức chế sự phát triển của các vi khuẩn thử nghiệm. Xạ khuẩn được cấy 1 đường vạch thẳng trên bề mặt bản thạch trong hộp petri chứa môi trường SCA, sau đó ủ ở 28 °C trong 14 ngày. Các vi khuẩn thử nghiệm được cấy vuông góc với đường cấy xạ khuẩn và ủ 37 °C trong 24 giờ. Hoạt tính kháng khuẩn được đánh giá bằng chiều dài vùng bị ức chế (Hình 1).



Hình 1. Phương pháp vạch đối kháng

So sánh kết quả với các hộp đối chứng chứa môi trường SCA nhưng không cấy xạ khuẩn nội sinh. Chọn những chủng xạ khuẩn có tiềm năng là những chủng có chiều dài đường ức chế lớn để tiếp tục thực hiện các thử nghiệm đánh giá khả năng tạo

hoạt chất kháng khuẩn.

2.2.3. Nuôi cấy xạ khuẩn

Sử dụng môi trường SCA để nuôi cấy các chủng xạ khuẩn tiềm năng thu hoạt chất. Dùng lượng

chủng ban đầu là 5% huyền dịch bào tử, nuôi cấy trong erlen 1000 mL với thể tích môi trường là 200mL, ở nhiệt độ 28 °C, tránh ánh sáng trực tiếp, trong 14 ngày. Chiết xuất hoạt chất từ các bình nuôi cấy với các dung môi thích hợp. Dịch chiết được cô cách thủy ở 70 °C đến khi thu được cao rắn, màu vàng.

2.2.4. Khảo sát khả năng kháng khuẩn của hoạt chất [6]

2.2.4.1. Chuẩn bị vi khuẩn thử nghiệm

Vi khuẩn thử nghiệm được phân lập trên môi trường MHA/24 giờ. Lấy 3 – 5 khóm vi khuẩn cấy vào môi trường MHB, ủ ở 37 °C trong 6 giờ. Sử dụng vi khuẩn này pha huyền濁 vi khuẩn cho các thử nghiệm về tính kháng khuẩn.

2.2.4.2. Phương pháp khuếch tán trong bản thạch [5]

Chuẩn bị huyền濁 vi khuẩn với độ đục McFarland 0.5 (tương đương 10⁸ CFU/mL). Dùng que bông vô khuẩn nhúng vào huyền濁 này và trải đều trên bề mặt bản thạch. Để khô mặt các đĩa thạch bằng cách đặt chúng vào trong tủ ẩm 15 phút trước khi đục lỗ. Pha loãng cao rắn trong dung dịch DMSO với nồng độ 150 µg/mL. Cho 100 L dịch pha loãng vào các giếng đường kính 6 mm được đục trên bản thạch MHA đã trải vi khuẩn thử nghiệm. Ủ các hộp thạch ở nhiệt độ 37 °C, đo đường kính vòng ức chế sau 18-24 giờ.

2.2.4.3. Phương pháp xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) [6]

Xác định MIC bằng phương pháp pha loãng trong bản thạch: Phân tán cao rắn trong dung dịch DMSO. Tạo những bản thạch có chứa cao với nồng độ giảm dần. Sử dụng vi khuẩn thử nghiệm đã hoạt

hóa pha một huyền濁 vi khuẩn có mật độ khoảng 2 x10⁷ CFU/mL. Chấm 1 µl vi khuẩn thử nghiệm với nồng độ trên lên các bản thạch. Ủ các bản thạch ở 37 °C/24 giờ, quan sát sự tăng trưởng của vi khuẩn bằng mắt thường. Nồng độ MIC là nồng độ thấp nhất ức chế sự tăng trưởng của vi khuẩn quan sát được bằng mắt thường.

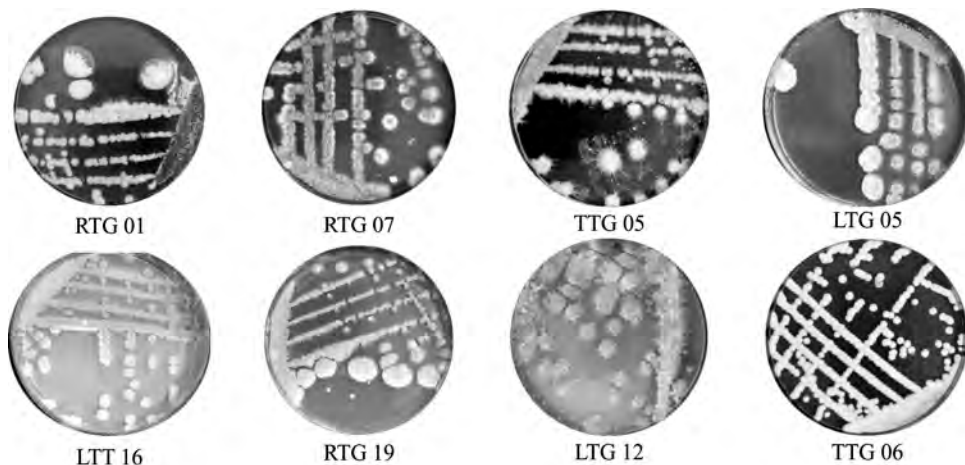
2.2.4.4. Định danh xạ khuẩn bằng phương pháp phân tích gen 16S rRNA

Phân tích gen 16S rRNA được thực hiện tại công ty Nam Khoa, kết quả thu được là trình tự gen mã hoá cho 16S rRNA, từ đó xây dựng cây phát sinh loài. Trình tự DNA được phân tích và so sánh bằng công cụ BLAST với ngân hàng gen để định danh đến loài. Mẫu có kết quả định danh với các loài khá tương đồng sẽ được giống hàng để tìm loài có mức độ tương đồng cao nhất. Cây phát sinh loài được xây dựng theo Phương pháp Neighbor-Joining của phần mềm MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis).

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Phân lập xạ khuẩn

Tính đa dạng của xạ khuẩn nội bào từ thực vật cũng được công bố trước đây bởi Golinska và cs (2015) [7]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, sau khi phân lập từ 12 mẫu trầm đã thu được 53 chủng vi sinh vật có các đặc tính hình thái giống nhóm xạ khuẩn như có sinh bào tử, có khuẩn lạc dạng tia xạ, có dạng khuẩn ty cơ chất và dạng khuẩn ty khí sinh. Hình ảnh một số chủng xạ khuẩn phân lập trên môi trường SCA được trình bày trong Hình 2. Kết quả cho thấy xạ khuẩn chủ yếu tập trung nhiều ở phần rễ cây (Bảng 1), đây là con đường xâm nhập chính của vi sinh vật.



Hình 2. Một số xạ khuẩn được phân lập từ rễ, thân, lá của cây trầm *Melaleuca quinquenervia* (RTG: Rễ trầm; TTG: Thân trầm, LTG: Lá trầm)

Bảng 1. Bảng phân bố xạ khuẩn theo vị trí mẫu thực vật

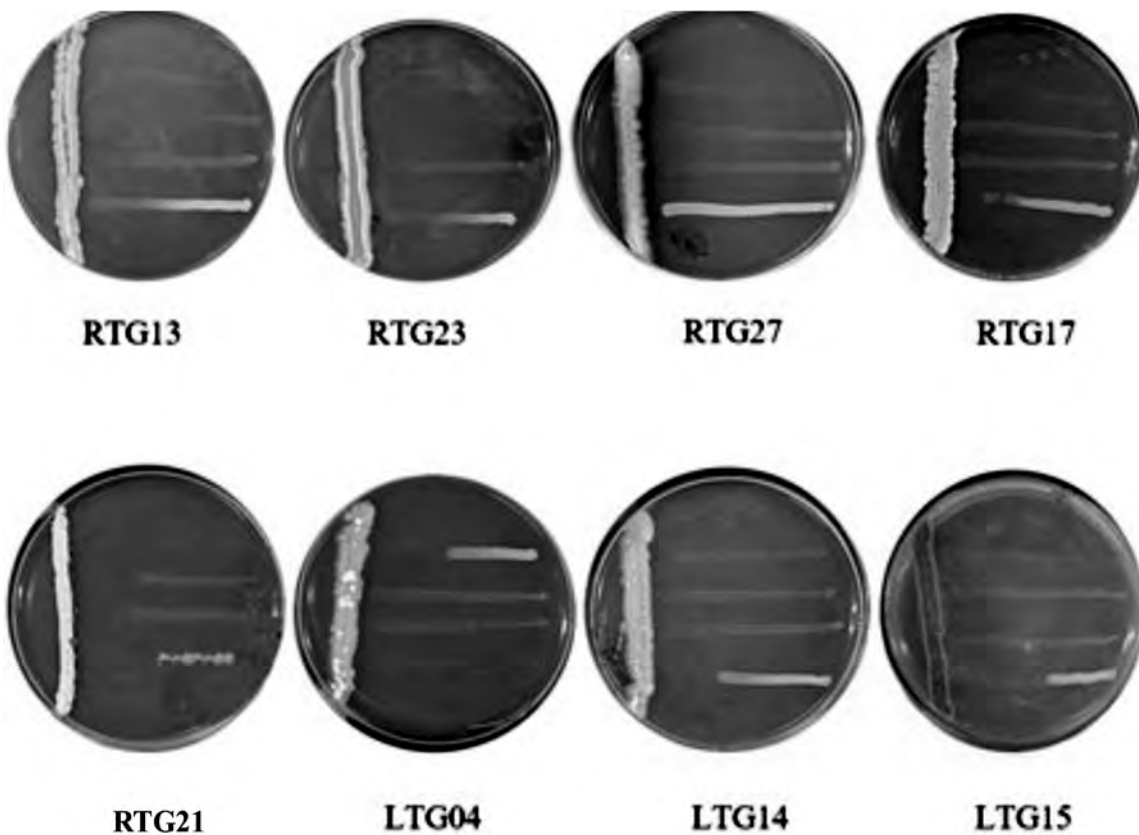
Tên mẫu cây	Bộ phận của cây	Số chủng xạ khuẩn thu được
<i>Melaleuca quinquenervia</i>	Rễ	29
	Thân	8
	Lá	16
Tổng		53

3.2. Sàng lọc xạ khuẩn tiềm năng bằng phương pháp vạch đối kháng

Kết quả sàng lọc xạ khuẩn có khả năng tạo chất kháng khuẩn được trình bày trong Bảng 2:

Bảng 2. Sàng lọc chủng xạ khuẩn có hoạt tính kháng khuẩn

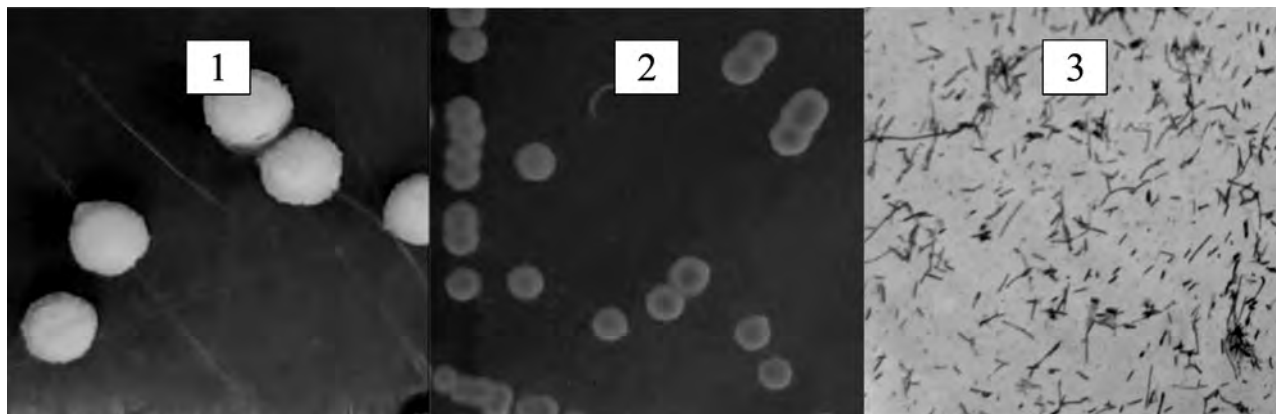
Vi khuẩn	RT	RT	RT	RT	RT	RT	RT	RT	RT	RT	LT	LT	LT	TT	TT	TT
	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
	13	23	27	17	14	02	06	06	11	21	04	14	15	04	05	08
<i>S. aureus</i>	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+
<i>K. pneumoniae</i>	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
<i>B. subtilis</i>	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-

**Hình 3.** Một số hình ảnh kết quả sàng lọc chủng xạ khuẩn có tính kháng khuẩn bằng phương pháp đường vạch đối kháng

Qua thử nghiệm sàng lọc chúng tôi ghi nhận có 16/53 chủng xạ khuẩn được phân lập từ các mẫu cây trà có khả năng kháng ít nhất 1 trong 4 vi khuẩn thử nghiệm: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*. Trong đó, chủng RTG21 (Hình 3) cho kết quả kháng tốt nhất, đã kháng gần hết các chủng vi khuẩn thử nghiệm với chiều dài đường kháng khuẩn gần 50% so với vạch đối chứng.

3.2.1. Khảo sát đặc điểm hình thái và định danh xạ khuẩn RTG 21 bằng giải trình tự gen 16S rRNA

3.2.1.1. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và hình dạng xạ khuẩn
 Chủng RTG 21 được nuôi cấy trên môi trường SCA ở 28 °C trong 14 ngày. Quan sát thấy khuẩn lạc tròn, khô, đường kính trung bình từ 2 – 3 mm. Khuẩn ty khí sinh trắng mịn, có mùi đặc trưng. Quan sát dưới kính hiển vi sau khi nhuộm Gram RTG 21 bắt màu tím, có dạng sợi ngắn, phân nhánh nhỏ, không thấy bào tử (Hình 4).



Hình 4. Một số đặc điểm hình thái RTG21. 1. Khuẩn ty khí sinh; 2. Khuẩn ty sinh chất; 3. Tế bào chủng RTG21 quan sát dưới kính hiển vi

3.2.1.2. Giải trình tự gen 16S rRNA

Kết quả giải trình tự gen 16S rRNA của chủng xạ khuẩn RTG21 như Hình 5

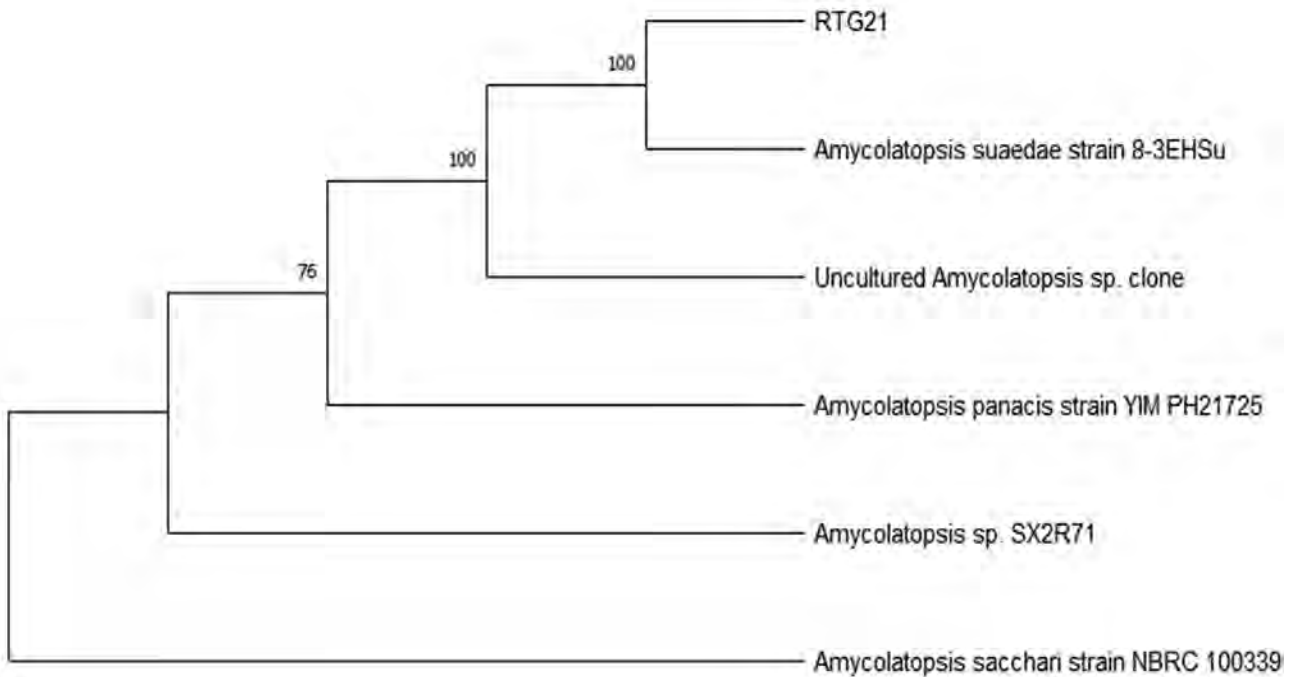
```

GTGGAAAGTTTTGGCGGTACGAGATGAGCCCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGATGGC
CTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACA
CGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGC
AGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCGCACGGGACGAAGC
GAGAGTGACGGTACCGTGAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
TAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGGTCG
ACCGTGAAACTAGAGGCTTAACCTTTAGCTTGCAGTGCATACGGGCGAGACTTGAGTTCGGTAG
GGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGC
GAAGGCGGGTCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGAT
TAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGTGACATTCCACGTTGT
CCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCA
AAGGAATTGACGGGGGCCGCAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAA
GAACCTTACCTGGGCTTGACATGCATCAGACAGCCCCAGAGATGGGGTCTCCCTTGTGGTTGGT
GTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGA
GCGCAACCCTTGTCTATGTTGCCAGCGGTTCCGGCCGGGACTCGTGGGAAACTGCCGGGGTC
AACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTCACACAT
GCTACAATGGCTGGTACAGAGGGTTGCGATATCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCCGGT
CTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATC
AGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCG
    
```

Hình 5. Kết quả trình tự gen 16S rARN của chủng RTG21

Kết quả giải trình tự gen 16S rRNA và xây dựng cây phát sinh loài của chủng RTG21 (1274 bp) cho thấy RTG21 có độ tương đồng cao (hơn 96%) với các gen tương ứng của một số xạ khuẩn thuộc chi *Amycolatopsis* (Hình 6) như: *Amycolatopsis suaedae*, *Amycolatopsis sacchari*, *Amycolatopsis*

sp. SX2R71, *Amycolatopsis panacis*. Kết quả phân loại 16S rRNA cho thấy chủng xạ khuẩn RTG21 có đặc điểm rất gần gũi và có độ tương đồng cao với loài *Amycolatopsis suaedae* nên chủng xạ khuẩn RTG21 được đặt tên là *Amycolatopsis suaedae* RT21.



Hình 6. Mức độ tương đồng di truyền giữa chủng *Amycolatopsis suaedae* RTG21 với các loài xạ khuẩn có họ hàng gần dựa vào trình tự nucleotide của gen16S rRNA

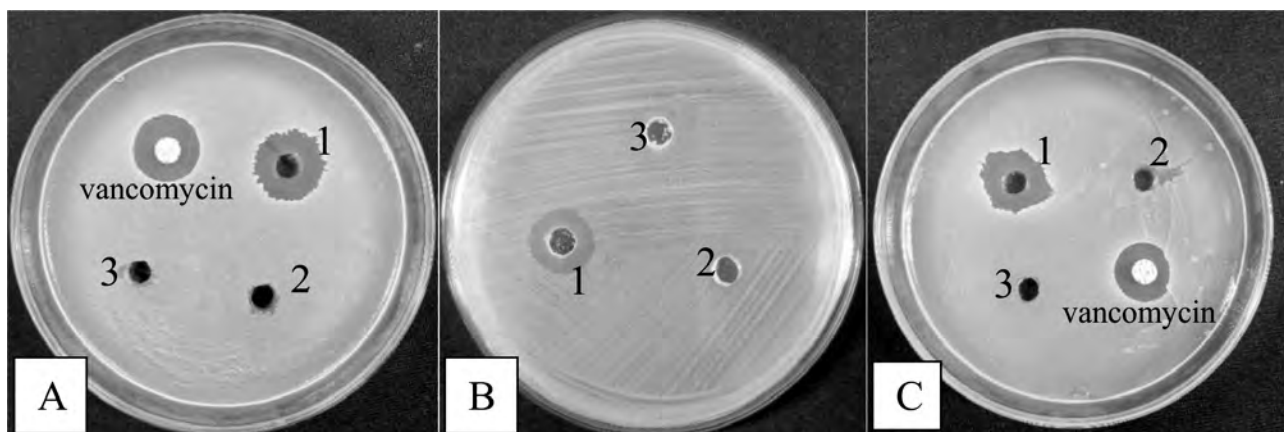
3.2.2. Kết quả khảo sát khả năng kháng khuẩn của hoạt chất

3.2.2.1. Phương pháp khuếch tán trong bản thạch
 Kết quả khảo sát cho thấy cao chiết từ môi trường nuôi cấy chủng RTG21 có phổ kháng khuẩn rộng trên vi khuẩn Gram dương (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923), Gram âm (*Escherichia coli* ATCC 25922) và cả nhóm vi khuẩn có khả năng sinh bào

tử *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Trong thử nghiệm với *Staphylococcus aureus* và *Bacillus subtilis* chúng tôi dùng kháng sinh Vancomycin là một kháng sinh có giá trị dùng trong lâm sàng để điều trị bệnh nhiễm do tụ cầu đề kháng methicillin làm chuẩn đối chiếu. Kết quả cho thấy cao chiết cho vòng kháng khuẩn 18 mm, Vancomycin (17 mm). Kết quả thể hiện trong Bảng 3 và Hình 6.

Bảng 3. Đường kính vòng kháng khuẩn của cao chiết (mm)

Vi khuẩn	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)		
	Căn dung môi sử dụng	Cao chiết	Kháng sinh chuẩn
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	18	17
<i>E. coli</i>	-	14	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	17	17
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	14	-



Hình 7. Vòng kháng khuẩn của cao chiết từ chủng RTG21; A: *Staphylococcus aureus*; B: *E. coli*; C: *Bacillus subtilis*; 1: Cao của dịch chiết; 2,3: Chứng cản dung môi

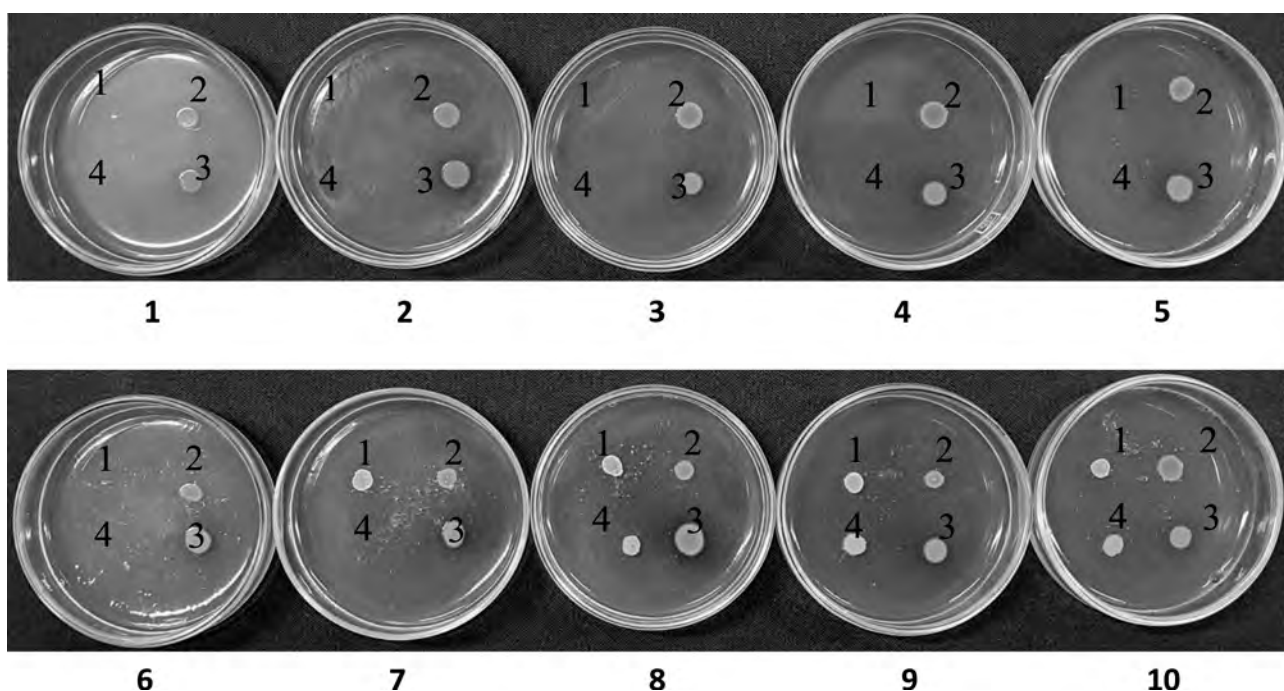
3.2.2.2. Phương pháp xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC)

Từ các kết quả khảo sát bước đầu, chúng tôi tiếp tục thực hiện xác định MIC cao chiết từ môi trường nuôi cấy xạ khuẩn. Tạo các bản thạch chứa cao chiết với các nồng độ: 500 µg/mL; 250 µg/mL; 125

µg/mL; 62.5 µg/mL; 31.25 µg/mL; 15.6 µg/mL; 7.8 µg/mL, 3.9 µg/mL; 1.95 µg/mL; 0.98 µg/mL. Nhỏ 1µL huyền濁 vi khuẩn thử nghiệm lên bề mặt các bản thạch, Ủ các bản thạch ở 37 °C/24 giờ và quan sát kết quả. Kết quả MIC được trình bày trong Bảng 4 và Hình 8.

Bảng 4. Kết quả xác định nồng độ ức chế tối thiểu MIC (µg/mL) trên vi khuẩn thử nghiệm

	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 35657
Cao chứa hoạt chất	15.6	7.8	-	-
Vancomycin	2.0	4.0	-	-



Hình 8. Kết quả MIC của cao trên các vi khuẩn thử nghiệm. 1. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; 2. *Escherichia coli* ATCC 25922; 3. *Klebsiella pneumoniae*; 4. *Bacillus subtilis* ATCC 6633

Kết quả cho thấy cao rắn chiết từ môi trường nuôi cấy xạ khuẩn RTG21 có khả năng kháng khuẩn mạnh trên vi khuẩn Gram dương. Giá trị MIC của cao chiết trên *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 là 15.6 µg/mL (hộp số 6) và *Bacillus subtilis* ATCC 6633 là 7.8 µg/mL (hộp số 7). Ở nồng độ thử nghiệm cao nhất (500 µg/mL), cao rắn vẫn chưa ức chế được các vi khuẩn Gram âm. Điều này có thể do chưa chiết được hoạt chất kháng vi khuẩn Gram âm từ môi trường nuôi cấy.

4. BÀN LUẬN

4.1. Phân lập xạ khuẩn nội sinh

Ở Việt Nam, những năm gần đây có vài nghiên cứu đã phân lập xạ khuẩn từ cây dược liệu ở các địa phương như: 297 chủng xạ khuẩn nội sinh từ 27 mẫu quế khu vực các tỉnh Tây Bắc, trong đó 111 chủng từ cây quế (*C.cassia* Presl) Hòa Bình (37.4%), 105 chủng ở Yên Bái (35.4%) và 81 chủng tại Lai Châu (27.3%) [8]. Ở Trung Quốc, từ 13 cây thuốc truyền thống của tỉnh Tứ Xuyên người ta cũng đã phân lập được 146 chủng xạ khuẩn khác nhau [9]; 256 chủng vi khuẩn xạ khuẩn cũng được phân lập từ 26 cây thuốc ở cao nguyên Panxi [10]. Các kết quả này cho thấy có sự đa dạng về chủng xạ khuẩn từ các nguồn cây dược liệu khác nhau ở các địa phương.

4.2. Sàng lọc hoạt tính kháng khuẩn

Nhiều nghiên cứu trước đây cũng chứng minh khả năng kháng khuẩn của các xạ khuẩn được phân lập từ thực vật như trong nghiên cứu của Vũ Thị Hạnh Nguyên và cs (2019) đã tuyển chọn được 40 xạ khuẩn có khả năng kháng ít nhất 01 vi sinh vật gây bệnh [8], Đỗ Tất Thịnh và cs. đã phân lập được 8 chủng xạ khuẩn nội sinh trên cây nghệ, trong đó có 2 chủng xạ khuẩn nội sinh có khả năng ức chế 9 chủng vi sinh vật thử nghiệm [11] Từ đó cho thấy vai trò quan trọng của hoạt tính kháng vi sinh vật ở xạ khuẩn. Hiện tại chúng tôi chưa tìm thấy tài liệu về phân lập xạ khuẩn nội sinh và khả năng tạo hoạt chất kháng khuẩn của *Amycolatopsis suaedae* từ cây trà.

4.3. Khảo sát đặc điểm hình thái và phân tích gen 16S rRNA của xạ khuẩn RTG21

Trong nghiên cứu này, chủng xạ khuẩn RTG 21 qua phân tích gen 16S rRNA có mức độ tương đồng cao nhất với chủng *Amycolatopsis suaedae* 8-3EHSuT được phân lập từ rễ cây *Suaeda maritima* ở Thái

Lan[12]. Chủng RTG 21 trong nghiên cứu của chúng tôi có đặc điểm hình thái tương đồng với chủng 8-3EHSuT như: là loại vi khuẩn hiếu khí, nhuộm bắt màu tím trong phương pháp Gram và không di động. Khuẩn ty sinh chất có màu trắng hơi vàng và khuẩn ty khí sinh có màu trắng. Quan sát hình thái bằng kính hiển vi nuôi cấy 14 ngày tuổi trên thạch SCA cho thấy khuẩn ty khí sinh phân nhánh, phân mảnh thành các thành phần hình que. Tuy nhiên để kết luận chính xác tên loài cần phải khảo sát thêm đặc điểm hình thái trên nhiều môi trường nuôi cấy và các đặc tính sinh hóa của loài RTG 21.

4.4. Tiềm năng tạo chất kháng khuẩn của chủng xạ khuẩn RTG 21

Chủng xạ khuẩn *Amycolatopsis suaedae* cho đến thời điểm hiện tại chưa có công bố về hoạt tính kháng khuẩn [13]. Theo nghiên cứu của T. Chantavoraki và cs thì chủng xạ khuẩn đã được các tác giả phân lập là *Amycolatopsis suaedae* 8-3EHSuT cũng chưa có công bố về hoạt tính kháng khuẩn [12]. Trong kết quả nghiên cứu này, cao chiết từ môi trường nuôi cấy chủng RTG 21 của chúng tôi phân lập được từ cây trà *Melaleuca quinquenervia* lại có hoạt tính kháng khuẩn trên *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 và *Bacillus subtilis* ATCC 6633 với giá trị MIC của cao lần lượt là 15,6 µg/mL và 7.8 µg/mL. Kết quả này chứng tỏ xạ khuẩn nội sinh *Amycolatopsis suaedae* RTG21 trên cây trà *Melaleuca quinquenervia* có tiềm năng sinh hoạt chất kháng khuẩn tốt.

5. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Trong nghiên cứu này chúng tôi đã phân lập được 53 chủng xạ khuẩn từ cây trà *Melaleuca quinquenervia* ở vườn dược liệu Mộc Hoa Trà tỉnh Long An và đã sàng lọc được 1 chủng xạ khuẩn có khả năng tạo hoạt chất có tính kháng khuẩn là chủng RTG21. Chủng RTG21 đã được định danh bằng kỹ thuật PCR và giải trình tự gen mã hoá 16S rRNA. Kết quả cho thấy chủng này có độ tương đồng cao về trình tự gen với loài *Amycolatopsis suaedae*. Về khả năng tạo hoạt chất kháng khuẩn, cao chiết từ môi trường nuôi cấy chủng RTG21 có hoạt tính kháng khuẩn mạnh trên vi khuẩn Gram dương như tụ cầu khuẩn *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 với MIC 15.6 µg/mL; *Bacillus subtilis* ATCC 6633 với MIC là 7.8 µg/mL. Mặc dù còn ở trạng thái cao thô nhưng kết quả này cho thấy hoạt chất có tính kháng khuẩn tốt, nếu được tinh chế sẽ

cho kết quả rất khả quan. Từ những kết quả này, đề tài có thể tiếp tục triển khai để nghiên cứu sâu hơn về hoạt chất kháng khuẩn của chủng RTG21 và qui trình nuôi cấy thu hoạt chất.

LỜI CẢM ƠN

Chúng tôi xin chân thành cảm ơn Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng đã tài trợ toàn bộ kinh phí nghiên cứu dưới mã số đề tài GVTC17.03.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] G.B. Mahajan and L. Balachandran, "Antibacterial agents from actinomycetes: A review", *Front Biosci* (Elite Ed), 4, 240-53, 2012.
- [2] D. I. Bernardi, F. O. das Chagas and A.F. Monteiro, "Secondary Metabolites of Endophytic Actinomycetes: Isolation, Synthesis, Biosynthesis, and Biological Activities", *Prog Chem Org Nat Prod*, 108, 207-296, 2019.
- [3] S. Qin, J. Li, H.H. Chen, G.Z. Zhao...and W.J. Li, "Isolation, diversity and antimicrobial activity of rare actinobacteria from medicinal plants of tropical rain forests in Xishuangbanna, China", *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 19, p.6176–6186, 2009.
- [4] Balouiri, M. Sadiki and S. K. Ibsouda, "Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review," *Journal of Pharmaceutical Analysis*, vol. 6, no. 2, pp. 71-79, 2016/04/01/ 2016.
- [5] CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, (2024) 14th- ed. CLSI supplement M100. *Clinical and Laboratory Standards Institute, 2024.*
- [6] S. James, II. Lewis, P. Melvin Weinstein and M. Bobenchik, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, M07- A11, 11th- ed. *Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.*
- [7] P. Golinska, M. Wypij, G. Agarkar G, *et al.*, "Endophytic actinobacteria of medicinal plants: diversity and bioactivity", *Antonie Van Leeuwenhoek*, 108(2), 267-289, 2015.
- [8] V.T.H Nguyen và cs., *Nghiên cứu sự đa dạng, khả năng sinh kháng sinh của xạ khuẩn nội sinh trên cây quế ở Việt Nam và đặc điểm sinh học của hoạt chất từ chủng Streptomyces cavourensis YBQ59*, luận án tiến sĩ sinh học. *Viện công nghệ sinh học - Viện hàn lâm khoa học và công nghệ Việt nam*, 2019
- [9] P. Qiu, Z. X. Feng, J. W. Tian, *et al.*, "Diversity, bioactivities, and metabolic potentials of endophytic actinomycetes isolated from traditional medicinal plants in Sichuan, China", *Chin J Nat Med*, 13(12), 942-53, 2015.
- [10] K. Zhao, P. Penttinen, T. Guan, *et al.*, "The diversity and anti-microbial activity of endophytic actinomycetes isolated from medicinal plants in Panxi plateau, China", *Curr Microbiol*, 62(1), 182-190, 2011.
- [11] Đ. T. Thịnh, N. C. Cường and V. X. Nam, "Đặc điểm sinh học của xạ khuẩn nội sinh trên cây nghệ ở Nam định và tiềm năng tổng hợp chất kháng khuẩn", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ nhiệt đới*, 13, tr 148-155, 2017.
- [12] T. Chantavorakit, P. Suksaard, A. Matsumoto and K. Duangmal, "Amycolatopsis suaedae sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from Suaeda maritima roots," *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 69, 06/24 2019.
- [13] O. V. Kisil, T. A. Efimenko and O. V. Efremenkova, "Looking Back to Amycolatopsis: History of the Antibiotic Discovery and Future Prospects," *Antibiotics 2021*, vol. 10, p. 1254, 2021.

Isolation of endophytic actinomycetes that create antibacterial substances from *Melaleuca quinquenervia* in Long An province

Tran Do Cong Danh and Huynh Thi Ngoc Lan

ABSTRACT

Actinomycetes are capable of producing many biologically active secondary metabolites such as antibiotics, enzymes, etc. These active substances are potential candidates for the pharmaceutical industry. In this study, we isolated and screened endophytic actinomycetes strains with antibacterial

activity from *Melaleuca quinquenervia* trees at Moc Hoa Tram medicinal herb garden in Long An province. Root, stem and leaf samples were collected directly from 2-year-old trees. The samples were refrigerated and brought to the laboratory within 24 hours. Endophytic actinomycetes were isolated from plant samples and processed on starch casein agar (SCA) medium. Screening antibacterial activity of the obtained Actinomycete strains by the cross-streak method with *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 35657. In the results, there were 53 potential endophytic actinomycete strains isolated. We have screened 16 actinomycetes strains that create antibacterial substances. Of these 16 strains, the RTG21 actinomyces strain was identified with a broad antibacterial spectrum on both Gram-positive and Gram-negative bacteria. Cultivate RTG21 actinomycetes strains, extract the antibacterial substances from culture medium and evaluate the antibacterial ability of the extract by diffusion method (diffusion well) and determine MIC. Conclusion: Endophytic actinomycetes from *Melaleuca quinquenervia* are quite abundant with many strains having the potential to create antibacterial substances, especially strain RTG21. By analyzing the 16S rRNA gene, endophytic actinomycete RTG21 was identified as *Amycolatopsis suaedae*. The solid extract from *Amycolatopsis suaedae* RTG21 culture medium has good antibacterial properties against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

Keywords: endophytic actinomycetes, *Melaleuca quinquenervia*, *Amycolatopsis suaedae*

Received: 27/08/2024

Revised: 21/09/2024

Accepted for publication: 22/09/2024