

NÂNG CAO KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP VALIDAMYCIN-A TỪ CHỦNG *Streptomyces hygroscopicus* 11405 BẰNG ĐỘT BIẾN TẾ BÀO TRẦN

Vũ Thị Hạnh Nguyên¹, Nguyễn Thị Thanh Thủy², Phí Quyết Tiến¹

TÓM TẮT

Validamycin A (Val-A) là chất kháng sinh thuộc nhóm aminoglycoside được sinh tổng hợp bởi chủng *Streptomyces hygroscopicus*. Mục đích nghiên cứu này là tạo tế bào trần và gây đột biến tế bào trần (TBT) chủng *S. hygroscopicus* 11405 bằng tia UV và N-metyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) để nâng cao hiệu suất chủng sản xuất. TBT *S. hygroscopicus* 11405 được tạo tốt nhất khi phát triển ở đầu pha logarit có bổ sung 0,4% glycin và xử lý với lysozyme 1 mg/ml ở 37°C, 60 phút. Đột biến TBT chủng 11405 bằng tia UV không cho kết quả tốt, tuy nhiên gây đột biến bằng MNNG với nồng độ 0,1 mg/ml trong 30 - 40 phút tạo được tỷ lệ đột biến cao nhất. Sau khi xử lý đột biến TBT đã thu được 109 biến chủng được phân thành 5 typ màu, trong đó typ 1, 5 chiếm đa số, đạt tới 38,5 - 49,6%. Áp dụng quy trình gây đột biến bằng MNNG đã tạo được biến chủng *S. hygroscopicus* 11405-115 có hoạt tính Val-A cao hơn chủng gốc 70%. Thời điểm sinh tổng hợp kháng sinh cao nhất của biến chủng này là sau 48 giờ lên men đạt 6,87 mg/ml.

Từ khóa: Đột biến, *Rhizoctonia solani*, *Streptomyces hygroscopicus*, tế bào trần, validamycin-A

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Validamycin A (Val-A) là một chất kháng sinh nhóm aminoglycoside có hoạt tính kháng nấm được sinh tổng hợp chủ yếu bởi *Streptomyces hygroscopicus* var. *limoneus* (Liao *et al.*, 2009; Iwasa *et al.*, 1971) và *S. hygroscopicus* subsp. *jinggangensis* 5008 (Shen, 1988; Zhou *et al.*, 2014). Nhờ hiệu quả phòng trừ nấm cao cũng như an toàn cho con người và động vật, nên Val-A trở thành một trong những kháng sinh quan trọng nhất và được sử dụng rộng rãi để trừ bệnh đốm vằn hại lúa, ngô, bệnh đốm lá và thân lúa, ngô do *Rhizoctonia solani*, *R. oryzae* và *Sclerotium oryzae-sativa* gây nên. Ngoài ra, val-A còn trừ bệnh thối củ, thối rễ khoai tây, bông, cà chua, nấm hồng trên cây cao su và nhiều loại rau do nấm *R. solani* gây nên (Wang *et al.*, 2001). Val-A là chất kìm hãm yếu ($IC_{50} = 10^{-3}$ M) các enzyme thủy phân đường khác như maltase, isomaltase và saccharase trong ruột lợn. Trong *R. solani*, kháng sinh được vận chuyển nhanh đến sợi nấm và được glycosidase thủy phân thành validoxylamine A, đây là chất kìm hãm trehalase của nấm mạnh cả ở *in vitro* và *in vivo* (Kameda *et al.*, 1975). Trong tế bào nấm bệnh, trehalase xúc tác chuyển hóa trehalose thành đường glucose - nguồn năng lượng cho nấm phát triển. Do đó, dưới tác động của val-A, tế bào nấm sẽ tạo nhánh bất thường, bị khô dẫn và chết do không có khả năng tổng hợp glucose để sinh trưởng (Demain, 1974). Các chủng *S. hygroscopicus* có hoạt tính tổng hợp kháng sinh rất yếu, không mang tính ổn định và bền vững cao để hạn chế hình thành các sản phẩm phụ, rút ngắn thời gian lên men và giảm chi phí sản xuất. Do vậy, nghiên cứu này trình bày kết quả gây

đột biến ở chủng *S. hygroscopicus* 11405 dưới tác động của các tác nhân như tia UV, chất gây đột biến MNNG và lựa chọn những biến chủng có hoạt tính cao cho lên men sinh tổng hợp Val-A.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Chủng xạ khuẩn *S. hygroscopicus* 11405 và chủng nấm kiểm định *Rhizoctonia solani* VP nhận được từ Bộ sưu tập giống vi sinh vật của Phòng Công nghệ lên men, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Môi trường ISP2 (g/l): Cao nấm men 4; cao malt 10; dextrose 4; thạch 20 pH 7,3, nước cất 1000 ml. Môi trường lên men cơ bản FM3 (g/l): Bột ngô 90,0; bột đậu tương 40,0; cao nấm men 5,0; KH_2PO_4 1,0; pH 7,0; nước cất 1000 ml. Môi trường xác định hoạt tính kháng sinh A1 (g/l): Saccharose 1,0; cao thịt 5,0; pepton 10,0; thạch 8,0; pH 7,0, nước cất 1000 ml.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Xác định hoạt tính kháng sinh (HTKS)

Theo phương pháp màng ngược của Iwasa và cộng tác viên (1971). Hoạt tính Val-A được xác định bằng phương pháp phân tích sắc ký lỏng cao áp (HPLC) tại Trung tâm Kỹ thuật I, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng, Bộ Khoa học và Công nghệ.

2.2.2. Đánh giá sự biến động tự nhiên về HTKS của các khuẩn lạc (KL)

Đầu tiên xác định HTKS trung bình (X) của các khuẩn lạc, rồi từ đó xác định độ lệch chuẩn:

$$\delta = \sqrt{\sum(X_i - X)^2 / (n-1)}$$

¹ Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

² Khoa Công nghệ thực phẩm, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

X_i là HTKS của 1 khuẩn lạc có HTKS lớn hơn $X+2\delta$ là những biến chủng dương, còn nhỏ hơn $X-2\delta$ là những biến chủng âm.

2.2.3. Thu nhận và phục hồi TBT từ xạ khuẩn

Theo phương pháp của Hopwood và cộng tác viên, 1985.

2.2.4. Gây đột biến bằng cách chiếu tia UV

Lấy bào tử từ môi trường nghèo dinh dưỡng, sau đó tạo TBT và hoạt hóa trên môi trường giàu để các bào tử chuyển dần sang giai đoạn tiền nảy mầm (8 - 10 giờ). Bào tử tiền nảy mầm được chiếu tia UV với công suất của đèn là 30 W, bước sóng 2537 Å (260 nm), cường độ chiếu sáng 8×10^3 ergs/cm²/giây, thời gian chiếu thay đổi từ 5 - 80 giây. Sau đó pha loãng và cấy gạt trên môi trường ISP2.

2.2.5. Gây đột biến bằng MNNG

Dịch TBT được xử lý bằng hóa chất gây đột biến MNNG (ở các nồng độ 0; 0,001; 0,01; 0,05; 0,1; 0,3; 0,5 và 1,0 mg/ml) trong đệm TM pH = 8,0 (0,05 M Tris pH 8,0; 0,05 M maleic acid) để tạo tế bào đột biến. Đem dịch có chứa tế bào đột biến ly tâm, thu tế bào và pha loãng bằng đệm TM đến nồng độ 10^{-5} và cấy gạt trên môi trường ISP2, nuôi ở 30°C trong 3-4 ngày. Đếm số khuẩn lạc, quan sát sự biến đổi màu sắc khuẩn lạc, khuẩn ty cơ chất và xác định hoạt tính kháng sinh (Kim *et al.*, 1983).

2.2.6. Xây dựng đường cong sống sót

Đồ thị sống sót biểu diễn mối quan hệ giữa tỷ lệ % tế bào sống sót với thời gian xử lý. Sau khi nuôi cấy đếm số khuẩn lạc ở các độ pha loãng, thời gian chiếu tia UV, xử lý với MNNG và đĩa kiểm chứng. Từ đó, xác định được tỷ lệ % tế bào sống sót (% SS) ở các thời gian chiếu tia UV hoặc xử lý với MNNG khác nhau theo công thức (Kim *et al.*, 1983):

$$\% \text{ SS} = \frac{Nm}{N_o} \times 100 \%$$

Trong đó Nm: số khuẩn lạc sống sót sau đột biến;
N_o: số khuẩn lạc ở mẫu kiểm chứng.

2.2.7. Xác định sự biến đổi màu sắc khuẩn ty khí sinh (KTKS) và khuẩn ty cơ chất (KTCC)

Các khuẩn lạc của các biến chủng được nuôi cấy trên môi trường ISP2 và màu sắc KTKS và KTCC được so sánh theo bảng màu của Tresner và Backus, 1963.

2.2.8. Động thái quá trình lên men

Tiến hành lên men trong bình tam giác 500 ml với pH ban đầu là 6,0, ở 37°C trong 120 giờ. Theo dõi sự biến động của sinh khối và HTKS theo thời gian, cứ 12 giờ lấy mẫu 1 lần để kiểm tra.

2.2.9. Phương pháp xử lý số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Kết quả nghiên cứu được xử lý và lấy số liệu trung bình theo lý thuyết thống kê sinh học trên phần mềm Excel.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

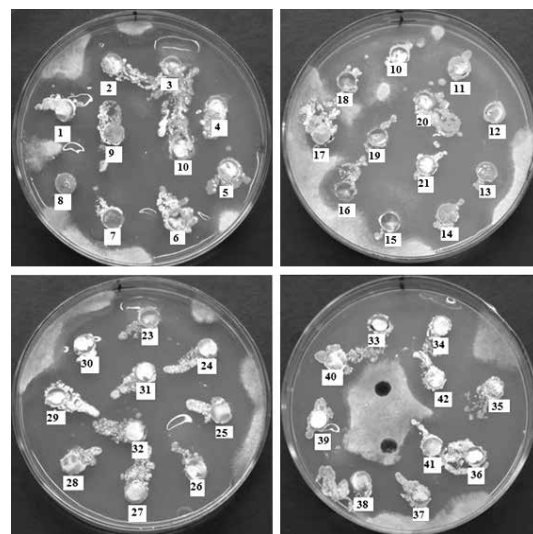
- Thời gian nghiên cứu: Từ năm 2015 đến năm 2016.

- Địa điểm nghiên cứu: Phương pháp phân tích sắc ký lỏng cao áp (HPLC) thực hiện tại Trung tâm Kỹ thuật I, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng, Bộ Khoa học và Công nghệ. Các thí nghiệm khác đều được thực hiện tại phòng Công nghệ lên men, Viện Công nghệ sinh học.

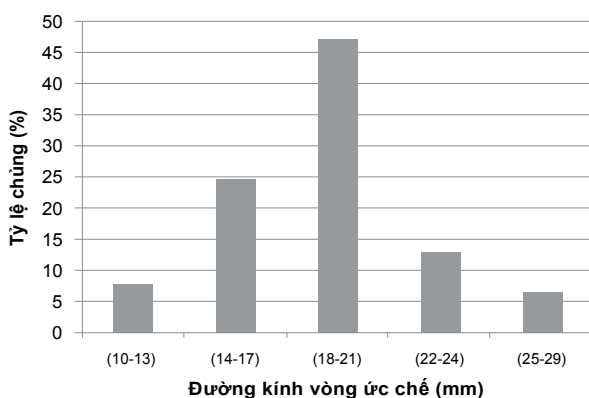
III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Biến động tự nhiên về hoạt tính kháng sinh của chủng *S. hygroscopicus* 11405

Một trong những tiêu chí chọn chủng sản xuất là chọn các khuẩn lạc có hoạt tính cao do biến động tự nhiên của chúng trong các ống giống theo chiều hướng giảm khả năng sinh kháng sinh (Lê Gia Hy, 1994). Kết quả lựa chọn ngẫu nhiên 76 khuẩn lạc của chủng *S. hygroscopicus* 11405 sau thời gian bảo quản 3 tháng và xác định hoạt tính kháng sinh của chúng được trình bày trên các hình 1 và 2. Qua tính toán cho thấy, đường kính vòng ức chế trung bình là 18,8 mm có độ lệch chuẩn: $\delta = 3,6$. Như vậy, các khuẩn lạc có đường kính vòng ức chế trên $\bar{X} + 2\delta$ (26,0 mm) là chủng có HTKS cao hơn chủng gốc và chủng có đường kính vòng ức chế nhỏ hơn $\bar{X} - 2\delta$ (11,6 mm) là chủng có HTKS thấp hơn chủng gốc *S. hygroscopicus* 11405 (Hình 1).

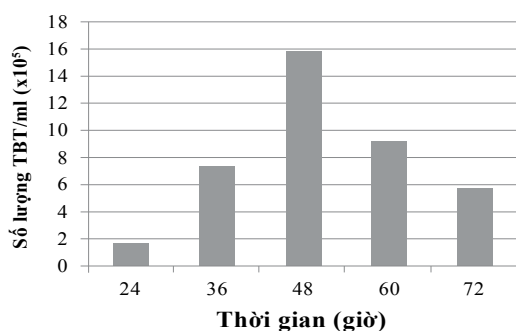


Hình 1. Kết quả sàng lọc tự nhiên về hoạt tính kháng nấm *R. solani* của chủng *S. Hygroscopicus* 11405



Hình 2. Biến động tự nhiên về hoạt tính kháng nấm *R. solani* của chủng *S. hygroscopicus* 11405 sau 3 tháng bảo quản

Chủng *S. hygroscopicus* 11405 có hoạt tính kháng sinh chưa cao và không ổn định. Chủng *S. hygroscopicus* 11405 trước khi được bảo quản có khả năng ức chế nấm *R. solani* với đường kính vòng ức chế dao động trong khoảng 18 - 21 mm. Sau 3 tháng, có 7,9% số khuẩn lạc cấy tách ra giảm hoạt tính kháng nấm và có 6,5% số khuẩn lạc có hoạt tính



Hình 3. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy tới khả năng tạo thành TBT của chủng *S. hygroscopicus* 11405

3.2.2. Ảnh hưởng của thời gian chiếu UV và hàm lượng chất MNNG lên khả năng sống sót của chủng *S. hygroscopicus* 11405

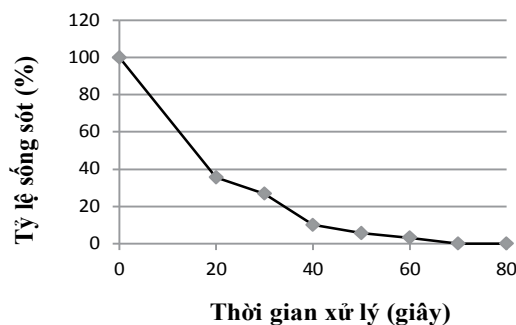
Kết quả tỷ lệ sống sót của TBT chủng *S. hygroscopicus* 11405 sau khi chiếu UV và số liệu thu được sau xử lý với MNNG cho thấy: Khi chiếu UV (Hình 4), thời gian chiếu càng lâu thì tỷ lệ sống sót càng giảm. Chiếu UV trên 70 giây thì không còn khuẩn lạc nào phát triển. Theo tài liệu được công bố (Adrio and Demain, 2008), ở độ sống sót từ 1-10% sẽ cho xác suất chủng bị đột biến cao nhất. Dựa vào đồ thị sống sót có thể xác định được thời gian chiếu UV lên TBT thích hợp nhất là 40 đến 50 giây. Tác động gây đột biến của tia UV chủ yếu là do acid nucleic và các hợp chất trong tế bào hấp thụ. Sự hấp thụ càng mạnh thì khả năng đột biến càng cao. Acid nucleic

kháng nấm cao hơn chủng gốc (Hình 2). Trong 6,5% khuẩn lạc này chọn ra một khuẩn lạc có hoạt tính mạnh nhất để gây đột biến nhân tạo.

3.2. Nâng cao khả năng sinh tổng hợp Val-A bằng kỹ thuật đột biến TBT

3.2.1. Tạo TBT từ chủng *S. hygroscopicus* 11405

Để thu được tế bào trần, chủng 11405 được nuôi trong môi trường FM3 dịch thể, sinh khối sau đó được xử lý với lysozyme. Xử lý bằng lysozyme với nồng độ 1 mg/ml từ 30 đến 120 phút cho thấy, sau 30 phút các đoạn khuẩn ty bị cắt, TBT cũng được tạo thành, sau 60 phút lượng TBT tạo thành rất nhiều, sau 90 phút số lượng TBT ít đi, có thể một số TBT đã bắt đầu bị phá hủy. Số lượng TBT từ khuẩn ty ở 48 giờ nuôi cấy tạo thành cao nhất, quá trình diễn ra khá nhanh và có hiệu quả nhất (Hình 3). Kết quả cho thấy quá trình tạo TBT hiệu quả nhất khi giống đang phát triển ở đầu pha logarit tức là khoảng 48 giờ nuôi cấy, trong môi trường có bổ sung 0,4% glycin, nồng độ lysozyme và thời gian xử lý tế bào thích hợp nhất là 1 mg/ml ở 37°C và 60 - 70 phút.



Hình 4. Đường cong sống sót của chủng *S. hygroscopicus* 11405 sau khi xử lý UV

hấp thụ bước sóng 260 nm cao nhất nên bước sóng này có hiệu quả gây đột biến nhiều nhất. Tia UV có thể gây nên các đột biến gen và các đột biến cấu trúc nhiễm sắc thể, gây biến đổi quang oxy hoá các gốc purin và pirimidin. Tác động của tia UV làm cho adenin bị biến thành hypoxanthin, dẫn đến những thay đổi hoá học của DNA.

Xử lý bào tử trần với MNNG ở nồng độ và thời gian khác nhau cho thấy, nồng độ tác động càng cao và thời gian ủ càng dài thì tỉ lệ sống sót của tế bào trần càng giảm. Bảng 1 thể hiện kết quả xử lý với MNNG trong 1 phút. Khi nồng độ MNNG càng cao thì tỷ lệ sống của TBT càng giảm, khi tăng lượng MNNG lên 0,01 và 0,05 mg/ml tỷ lệ sống sót lần lượt 35,2 và 26,1%, còn khi xử lý ở nồng độ 0,1 mg/ml MNNG tỷ lệ sống sót đạt 4,9% và TBT không thể tồn tại ở nồng độ 1 mg/ml trở lên.

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ xử lý MNNG lên khả năng sống sót TBT của chủng *S. hygroscopicus* 11405

Nồng độ MNNG (mg/ml)	Tỷ lệ sống sót của TBT (%)
0	100
0,001	69,5
0,01	35,2
0,05	26,1
0,1	4,9
0,3	0,54
0,5	0,15
1,0	0

Bảng 2. Ảnh hưởng của thời gian xử lý 0,1 mg/ml MNNG lên khả năng sống sót TBT của chủng *S. hygroscopicus* 11405

Thời gian xử lý (phút)	Tỷ lệ sống sót của TBT (%)
0	100
10	23,6
20	17,5
30	8,2
40	4,3
50	0,59
60	0,08
70	0

Do vậy, hàm lượng chất gây đột biến MNNG cần sử dụng với mức 0,1 mg/ml và sau 40 phút xử lý TBT (Bảng 2) sẽ cho số khuẩn lạc sống sót trong khoảng 1 - 10% và khả năng gây đột biến là cao nhất. Đây cũng là nồng độ thích hợp cho đột biến TBT của chủng *Micromonospora rosaria* (Kim *et al.*, 1983).

3.2.3. Sự biến động hình thái và hoạt tính kháng sinh của chủng *S. hygroscopicus* 11405 sau đột biến

Chủng *S. hygroscopicus* 11405 gốc có đặc điểm trên môi trường ISP2: bề mặt khuẩn lạc khô, xù xì, xẻ thùy, màu trắng vàng và có hoạt tính Val-A (đường kính vòng kháng *R. solani*) là 15 mm. Sau đột biến bằng tia UV và chất gây đột biến thu được 109 chủng *S. hygroscopicus* 11405 phân thành 5 typ theo màu sắc của khuẩn lạc và khuẩn ty cơ chất và phân thành 4 nhóm theo khả năng sinh tổng hợp kháng sinh. Trong đó typ 5 nhiều nhất chiếm 49,6% KTCC màu vàng và KTKS màu trắng giống với chủng gốc, sau đó là typ 1 chiếm 38,5% KTCC màu đỏ và KTKS màu trắng, nhỏ nhất là typ 4 chiếm 0,9% KTKS và KTCC đều màu vàng, cuối cùng là typ 2 và 3 có KTCC đỏ,

vàng và KTKS đều là xám, lần lượt chiếm 7,3 và 3,7% (số liệu không trình bày). Điều này đã khẳng định tác động của UV và MNNG đến quá trình hình thành màu sắc của KTCC và KTKS. Về hoạt tính kháng sinh thì nhóm 1 gồm biến chủng có hoạt tính cao hơn chủng gốc chiếm số lượng khá lớn là 23, chiếm 21,1%. Nhóm 2 gồm biến chủng có hoạt tính tương đương chủng gốc là 15, chiếm 4,58%. Còn lại là biến chủng (nhóm 3) có hoạt tính nhỏ hơn chủng gốc. Đặc biệt có hai biến chủng (nhóm 4) mất hẳn khả năng sinh kháng sinh (số liệu không trình bày).

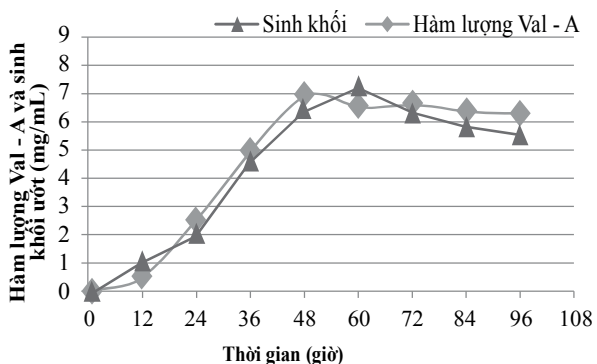
Bảng 3. Kết quả lên men các biến chủng của *S. hygroscopicus* 11405 sau khi đột biến

Chủng xạ khuẩn	HTKS theo Dimitrieva (mg/ml)	Tỷ lệ HTKS (%)
ĐC-chủng 11405	3,65	100
11405-1A	6,1	167
11405-25A	5,11	140
11405-70B	5,58	153
11405-115	6,2	170
11405-233	5,84	160
11405-232	5,18	142

Đường kính vòng kháng nấm trung bình của các lần đo $\bar{X} = 15,1$ mm. Độ lệch chuẩn $\delta = 2,34$. Các khuẩn lạc có đường kính vòng vô khuẩn lớn hơn $\bar{X} + 2\delta$ ($D > 19,8$ mm) là những biến chủng dương tính, ngược lại các khuẩn lạc có đường kính vòng vô khuẩn nhỏ hơn $\bar{X} - 2\delta$ ($D < 10,4$ mm) là những biến chủng âm tính. Theo đồ thị phân bố hoạt tính kháng sinh với các tác nhân gây đột biến khác nhau có 6 khuẩn lạc là biến chủng dương tính, nghĩa là tần suất xuất hiện đột biến không cao. Khi chiếu tia UV lên TBT đã không thu được chủng nào cho hoạt tính cao (số liệu không trình bày). Sử dụng chất gây đột biến MNNG có tác dụng nhiều hơn. So với chủng gốc 11405 (hàm lượng Val-A là 3,65 mg/ml), các biến chủng có hoạt tính kháng sinh cao hơn (Bảng 3), trong đó biến chủng *S. hygroscopicus* 11405-115 có hoạt tính cao nhất đạt 6,2 mg/ml, tăng 170%. Như vậy, gây đột biến TBT bằng chất MNNG cho kết quả tốt nhất cũng có thể là do MNNG là gây nên các đột biến khử amin đối với base của DNA. Ngoài ra, MNNG có thể tác dụng làm đứt mối liên kết hydro trong các sợi DNA đang phân chia, tạo ra một loại biến đổi khác như kiểu cấu trúc lại nhiễm sắc thể (Kim *et al.*, 1983).

3.3. Ảnh hưởng của thời gian lên men đến khả năng sinh Val-A của biến chủng *S. hygroscopicus* 11405-115

Kéo dài thời gian lên men không đồng nghĩa với tăng hoạt tính kháng sinh mà ngược lại, có thể dẫn đến hình thành các chất độc, gây ức chế quá trình sinh tổng hợp kháng sinh (Nguyễn Văn Cách, 2004). Lựa chọn thời gian lên men thích hợp không những có thể rút ngắn thời gian lên men, giảm chi phí sản xuất mà còn giúp thu hồi kháng sinh có hoạt tính cao nhất.



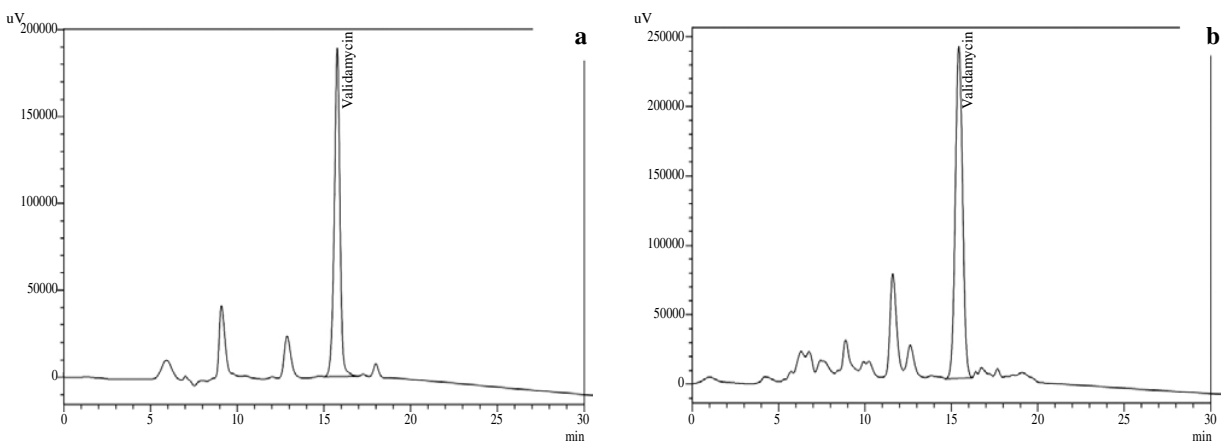
Hình 5. Động thái quá trình lên men sinh tổng hợp Val-A của biến chủng 11405-115

Biến chủng *S. hygroscopicus* 11405-115 sinh trưởng cực đại sau 60 giờ lên men (đạt 7,6 mg sinh khối ướt/ml) và sinh tổng hợp Val-A cao nhất sau 48 giờ, đạt 6,9 mg/ml. Sau thời gian này, nếu kéo dài thời gian lên men, hoạt tính Val-A không tăng mà có xu hướng giảm nhẹ (Hình 5). Ở thời điểm 96 giờ, hoạt tính kháng sinh còn lại 6,2 mg/ml. Như vậy, thời điểm thích hợp nhất để thu hồi kháng sinh là sau 48 giờ lên men. Đây là thời điểm sớm hơn so với nhiều nghiên cứu khác lựa chọn khi lên men sinh tổng hợp Val-A (Iwasa *et al.*, 1970; Liao *et al.*, 2009).

3.4. Xác định hàm lượng Val-A của dịch lên men thô bằng sắc ký lỏng cao áp (HPLC)

Dịch lên men thu được từ biến chủng *S. hygroscopicus* 11405-115 nuôi trên môi trường FM3 ở điều kiện lên men thích hợp (37°C; pH 7,0; tỷ lệ tiếp giống 10%) sau 48 giờ, được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng cao áp.

Kết quả hình 6 cho thấy, dịch lên men có chứa Val-A do thời gian lưu (retention time) của hoạt chất của dịch lên men với Val-A chuẩn có độ tương đồng là 15,4 và 15,7 phút. Căn cứ vào độ rộng của đỉnh peak cho thấy, dịch lên men thô từ chủng *S. hygroscopicus* 11405-115 chứa hàm lượng val-A là 0,687%, tương ứng với 6,87 mg/ml.



Hình 6. Sắc đồ HPLC của val-chuẩn (a) và val-A có trong dịch lên men của biến chủng *S. hygroscopicus* 11405-115 (b)

IV. KẾT LUẬN

Nâng cao hoạt tính kháng sinh bằng kỹ thuật tạo phục hồi TBT từ chủng xạ khuẩn *S. hygroscopicus* 11405 và gây đột biến bằng MNNG, đã chọn lọc được biến chủng *S. hygroscopicus* 11405-115 có hoạt tính kháng sinh cao hơn 70% so với chủng gốc. Thời điểm sinh tổng hợp kháng sinh cao nhất của biến chủng này trong môi trường lên men trên bình tam giác sau 48 giờ đạt 6,87 mg/ml. Biến chủng nhận

được đáp ứng mục tiêu nghiên cứu là có hoạt tính kháng sinh ổn định trong quá trình bảo quản và lên men validamycin, thời điểm thu nhận Val-A rút ngắn hơn so với một số công bố khác (sau 48 giờ lên men). Kết quả thu được khả quan và thuận lợi cho nghiên cứu tiếp theo để sản xuất Val-A, định hướng tạo sản phẩm thuốc bảo vệ thực vật an toàn và hiệu quả, dùng điều trị bệnh cây trồng do nấm *R. solani* gây ra, đáp ứng nhu cầu rất lớn trong nông nghiệp.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu cảm ơn sự hỗ trợ kinh phí của Công ty cổ phần Thuốc sát trùng Việt Nam - Bộ Công thương và sự hỗ trợ trang thiết bị của Phòng thí nghiệm trọng điểm công nghệ gen - Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học Công nghệ Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Nguyễn Văn Cách, 2004. *Công nghệ lên men các chất kháng sinh*. Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật. Hà Nội.

Lê Gia Hy, 1994. *Nghiên cứu xạ khuẩn thuộc chi Streptomyces sinh chất kháng sinh chống nấm gây bệnh đạo ôn và thối cổ rễ phân lập ở Việt Nam*. Luận án phó tiến sĩ sinh học. Hà Nội.

Adrio J. L., Demain A. L., 2008. *Strain improvement for production of pharmaceuticals and other microbial metabolites by fermentation, Progress in Drug Research*. Birkhauser Verlag AG, Basel, Switzerland, 65: 251-290.

Demain, A. L., 1974. How do antibiotic-producing microorganisms avoid suicide. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 235: 601-612.

Hopwood D. A., Bibb M. J., Chater K. F., Kieser T., Bruton C. J., Kieser H. M., Lydiate D. J., Smith C. P., Ward J. M., Norwich H. S., 1985. *Genetic manipulation of Streptomyces: A laboratory manual*. The John Innes Foundation, Paperback,. ISBN 07084 0036 0: 35-41.

Iwasa T., Higashide E., Yamamoto H., Shibata M., 1971. Studies on validamycins, new antibiotics. III. Bioassay methods for the determination of validamycins. *Jantibiot*, 24 (2): 114-118.

Kameda Y., Horii S., Yamano T., 1975. Microbial transformation of validamycins. *The journal of antibiotic*, 28: 298-306.

Kim K. S., Cho N. Y., Pai H. S., Ryu D. D. Y., 1983. Mutagenesis of *Micromonospora rosaria* by using protoplasts and mycelia fragments. *Applied and Environmental Microbiology*, 46(3): 689-693.

Liao Y., Wei Z. H., Bai L., Deng Z., Zhong J. J., 2009. Effect of fermentation temperature on validamycin A production by *Streptomyces hygroscopicus* 5006. *Journal of Biotechnology*, 142: 271-274.

Shen Y., 1988. Research and development of agro-antibiotic, validamycin. *Chinese journal of antibiotics*, 6: 58-61.

Tresner H. D., Backus E. J., 1963. System of color wheels for Streptomyces taxonomy. *Applied Microbiology*, 11: 335-338.

Wang S., Chen S., Yu Z., 2001. Selection of nitrogen sources and proportion of carbon and nitrogen of jinggangmycin of *Streptomyces hygroscopicus*. *Journal of Huazhong Agricultural*: 06.

Zhou T. C., Kim B. G., Zhong J. J., 2014. Enhanced production of validamycin A in *Streptomyces hygroscopicus* 5008 by engineering validamycin biosynthetic gene cluster. *Appl Microbiol Biotechnol*, 98 (18): 7911-7922.

Enhancement of Validamycin-A productivity of *Streptomyces hygroscopicus* 11405 by protoplast mutagenesis

Vu Thi Hanh Nguyen, Nguyen Thi Thanh Thuy, Phi Quyet Tien

Abstract

Validamycin A (Val-A) is an anti-fungal aminoglycoside antibiotic produced by *Streptomyces hygroscopicus*. The present work aims to enhance the antibiotic productivity of the actinomycete strain *S. Hygroscopicus* 11405 by protoplasts mutagenesis UV and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG). The obtained results showed that a maximal yield of protoplast was obtained within 60 - 70 min at 37°C after adding lysozyme at a concentration of 1 mg/ml to mycelium in the logarithmic phase of growth (48 hours cultivation) in medium containing 0.4% (w/v) glycine. The suitable conditions for MNNG treatment on the protoplasts was established as MNNG of 0.1 mg/ml and treatment time of 30-40 min. Resulting variants by this method expressed antibiotic activity higher than that by UV treatment. After mutation, 109 resulting variants with 5 types of color were collected, of which type 1 and type 5 were 38.5 - 49.6%. Among the positive variants, the Val-A productivity of the mutant strain *S. hygroscopicus* 11405-115 was highest and enhanced 70% compared to the original one. The maximal Val-A activity of the strain *S. hygroscopicus* 11405-115 reached 6.87 mg/ml after 48 hours of cultivation in shaking flasks.

Key words: Anti-fungal, mutant, protoplast, *Rhizoctonia solani*, *Streptomyces hygroscopicus*, validamycin-A

Ngày nhận bài: 06/7/2017
Ngày phản biện: 10/7/2017

Người phản biện: TS. Trần Danh Sửu
Ngày duyệt đăng: 27/7/2017

KHẢO SÁT MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM CỦA CHỦNG XẠ KHUẨN HT1 CÓ KHẢ NĂNG KHÁNG VI KHUẨN *Streptococcus agalactiae* GÂY BỆNH TRÊN CÁ RÔ PHI

Nguyễn Văn Giang¹, Chu Đức Hà², Nguyễn Thị Thu¹

TÓM TẮT

Bài báo này trình bày một số kết quả về hoạt tính kháng khuẩn *Streptococcus agalactiae* và đặc điểm sinh học của chủng xạ khuẩn HT1. Chủng xạ khuẩn HT1 có hoạt tính kháng *S. agalactiae* gây bệnh trên cá rô phi mạnh nhất với vòng kháng khuẩn đạt 21 mm sau 24 giờ nuôi. Khuẩn lạc của xạ khuẩn HT1 có kích thước từ 4 - 6 mm, hình tròn, bề mặt khô, màu xám trắng sau 21 ngày nuôi trên môi trường ISP4, cuống sinh bào tử dạng hơi lượn sóng, phân nhánh, chuỗi sinh bào tử có dạng xoắn lò xo. Chủng xạ khuẩn HT1 sinh trưởng tốt nhất khi được nuôi lỏng, lắc 200 vòng/phút, nhiệt độ là 30°C với pH 7, lượng tiếp giống ở mức 3%, thể tích môi trường lên men/thể tích bình nuôi là 10%. Nguồn cacbon và nitơ thích hợp cho sinh trưởng và sinh chất kháng khuẩn của chủng HT1 là xylose, pepton và KNO₃ với đường kính vòng kháng khuẩn tương ứng đạt 23,24 và 24,67 mm.

Từ khóa: Hoạt tính kháng khuẩn, *Streptococcus agalactiae*, xạ khuẩn, đặc điểm sinh học, cá rô phi

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Những năm gần đây, ngành nuôi cá rô phi (*Oreochromis niloticus*) trên thế giới đang gặp phải nhiều dịch bệnh do liên cầu khuẩn *Streptococcus* gây ra, trong số đó phải kể đến như bệnh Streptococcosis do *Streptococcus agalactiae* (Sun *et al.*, 2016). Để khống chế *Streptococcus* spp. trong các ao nuôi cá rất nhiều liệu pháp sử dụng thuốc kháng khuẩn (erythromycin, oxytetracyclin, doxycyclin, sulfadiazin và amoxicilin) đã được áp dụng. Việc lạm dụng thuốc kháng khuẩn không những gây ra sự tồn dư thuốc trong cơ thể cá, ảnh hưởng tới chất lượng cá, mà còn dẫn đến hiện tượng kháng chất kháng khuẩn ở *S. agalactiae*. Nhiều nghiên cứu cho thấy lạm dụng kháng sinh đã dẫn tới hiện tượng “nhờn thuốc” và chính vì thế nhiều quốc gia trên thế giới đã ban hành quy định cấm và hạn chế nhiều loại kháng sinh trong nuôi trồng thủy sản (Cabello, 2006).

Xạ khuẩn được biết đến là nhóm vi sinh vật phân bố rộng rãi trong tự nhiên và có khả năng sinh nhiều hợp chất kháng khuẩn có khả năng kháng lại các vi khuẩn, vi nấm gây bệnh. Gần 80% kháng sinh trên thế giới được biết đến có nguồn gốc từ xạ khuẩn, chủ yếu là chi *Streptomyces* và *Micromonospora* (Lima *et al.*, 2012). Nghiên cứu này được thực hiện nhằm tuyển chọn và đánh giá khả năng kháng vi khuẩn *S. agalactiae* của chủng xạ khuẩn HT1. Từ đó, chủng xạ khuẩn được tuyển chọn sẽ được sử dụng như nhân tố sinh học hữu hiệu nhằm kiểm soát và góp phần giảm thiểu dịch bệnh trên cá rô phi.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Chủng liên cầu khuẩn *S. agalactiae* và các chủng

xạ khuẩn được Khoa Thủy sản và Bộ môn Công nghệ vi sinh - Khoa Công nghệ sinh học - Học viện Nông nghiệp Việt Nam cung cấp. Các môi trường được sử dụng trong nghiên cứu: Môi trường LB, hệ thống môi trường International Streptomyces Project (ISP) từ ISP I đến ISP 7.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Hoạt tính kháng khuẩn của chủng xạ khuẩn: Các chủng xạ khuẩn được kiểm tra khả năng kháng *S. agalactiae* bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch (agar disk-diffusion) (Balouiri *et al.*, 2016). Các chủng xạ khuẩn được nuôi trong môi trường ISP4 lỏng, 7 ngày, vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* được nuôi lắc trên môi trường LB lỏng trong vòng 24 h. Hút 0.1ml dịch nuôi vi khuẩn và cấy chang trên môi trường LB đặc. Dùng dụng cụ đục thạch có đường kính 7mm đã được vô trùng đục các thoi thạch và lấy chúng ra. Hút 0.1ml dịch nuôi cấy xạ khuẩn đã được nuôi lỏng lắc trên môi trường ISP4 từ 5 - 7 ngày trước đó nhỏ vào các lỗ thạch đã được chuẩn bị. Để đĩa thử hoạt tính trong tủ lạnh ở 4°C từ 4h để chất kháng sinh khuếch tán vào môi trường, sau đó chuyển ra tủ 30°C. Sau 24h quan sát và đo vòng kháng khuẩn. Hoạt tính kháng khuẩn được tính theo công thức: D-d (mm), trong đó D - đường kính vòng vô khuẩn, d - đường kính lỗ thạch.

- Phương pháp xác định đặc điểm sinh học của xạ khuẩn: Chủng xạ khuẩn được nuôi trên hệ thống môi trường ISP (International Streptomyces Project) (Shirling and Gottlieb, 1966) để xác định đặc điểm hình thái, màu sắc khuẩn lạc, sắc tố tan và khả năng hình thành sắc tố melanin.

¹ Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

² Bộ môn Sinh học Phân tử, Viện Di truyền Nông nghiệp