

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/337706211>

Isolation and screening antimicrobial activity of soil actinobacteria

Article · December 2019

CITATIONS

0

READS

531

7 authors, including:



Nguyen Thi Ngoc Yen

Nguyen Tat Thanh University

6 PUBLICATIONS 6 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Trinh Phan-Canh

Max Perutz Labs Vienna

10 PUBLICATIONS 16 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Tropical lichen and lichen-associated microbes [View project](#)



Actinobacteria secondary metabolites [View project](#)

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

được cho là loài sinh sản vô tính theo quan điểm của Fagerlind (1945) với chỉ các mẫu mang cụm hoa cái thu được ở Java (Indonesia). Hansen cũng cho rằng loài này có quan hệ rất gần với loài *B. fungosa* subsp. *indica* và đã chuyển loài này thành một thứ: *B. fungosa* subsp. *indica* var. *Globosa*^[9]. Tuy nhiên hiện nay theo website www.theplantlist.org, loài này được xác định *B. fungosa* var. *globosa* (Jung.) B. Hansen, bên cạnh đó loài này cũng được xác định là loài sinh sản hữu tính với cả cây mang cụm hoa đực và cây mang cụm hoa cái được mô tả. Hình thái hạt phấn tương đồng giữa *B. fungosa* subsp. *indica* và *B. fungosa* var. *globosa* cũng góp phần khẳng định thêm quan hệ rất gần giữa hai loài này.

Kết luận

Hình thái các loài thuộc chi *Balanophora* J. R. & G. Forst được tổng hợp và so sánh trong bảng giúp nhận biết và phân biệt các loài Dó đất ở Việt Nam. Một số đặc điểm quan trọng để phân biệt bao gồm: màu sắc cụm hoa, cấu trúc và bề mặt thân thoái hóa thành “củ”, số lượng và cách sắp xếp của lá, hình dáng cụm hoa, cấu trúc hoa đực, vị trí hoa cái. Hình thái hạt phấn các loài nghiên cứu cũng được nghiên cứu về kích thước, hình dáng hạt phấn. Những kết quả thu được là những cơ sở dữ liệu quan trọng giúp nhận biết và phân biệt các loài *Balanophora* ở Việt Nam.

Tài liệu tham khảo

1. Nguyễn Tiến Bản (2005), *Danh lục thực vật Việt Nam*, NXB Nông nghiệp.

2. Võ Văn Chi (2012), *Từ điển cây thuốc Việt Nam (Bộ mới)*, tập 1, NXB Y học.

3. Phạm Hoàng Hộ (1999), *Cây cỏ Việt Nam, quyển II*, NXB Trẻ.

4. Trần Công Khánh (2005), *Phương pháp nghiên cứu với kính hiển vi*, NXB Y học, Hà Nội.

5. Nguyễn Thanh Tùng, Nguyễn Việt Thân (2017), “*Balanophora subcupularis* P. C. Tam (Họ Dó đất -Balanophoraceae) - Loài bổ sung cho hệ thực vật Việt Nam”, *Tạp chí Dược học*, tập 57, số 500, tr. 6–8.

6. Bui, H. Q. et al. (2018), “*Balanophora harlandii* Hook. f. (Balanophoraceae), a new record for the flora of Viet Nam”, *Biosci. Discov.*, vol. 9, no. 4, pp. 509–514.

7. Hansen, B. (1976), “Balanophoraceae”, in *Flora malesiana, vol 7, part 4*, pp. 783–805.

8. Hansen, B. (1970), “Balanophoraceae,” in *Flora of Thailand, vol 2, part 1*, pp. 177–181.

9. Hansen, B. (1972), “The genus *Balanophora* J. R. & G. Forster - A taxonomic Monograph,” in *Dansk Botanisk Arkiv* 28, pp. 3–188.

10. Kuijt, J. and B. Hansen (2015), “Balanophorales,” in *Kuijt, J. & Hansen, B. (Eds.) The families and genera of vascular plants 12, Flowering plants: Eudicots; Santalales, Balanophorales*, vol. XII, Cham: Springer, pp. 190–208.

11. Nguyen, T., V. Nguyen, and Q. Nguyen (2018), “First record of *Balanophora tobiracola* Makino (Balanophoraceae) from Viet Nam”, *Bioscience Discovery*, vol. 9, no. 2, pp. 297–301.

12. Wu, C. (1988), *Flora of China, Science Press*.

(Ngày nhận bài: 09/8/2019 - Ngày phản biện: 06/9/2019 - Ngày duyệt đăng: 29/11/2019)

Phân lập và sàng lọc xạ khuẩn từ đất có tiềm năng sản xuất kháng sinh

Nguyễn Xuân Lộc¹, Đinh Thị Lan Linh², Trần Quốc Vượng¹

Nguyễn Thị Ngọc Yến², Lê Thị Thanh Thảo¹

Nguyễn Tú Anh¹, Phan Cảnh Trình^{1*}

¹ Khoa Dược, Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh

² Khoa Dược, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

* E-mail: phancanhtrinh@ump.edu.vn

Summary

In view that Actinobacteria produce various types of potential antibiotics and enzymes for pharmaceutical industry, some Actinobacteria strains were isolated from the soil samples collected around tree roots in Ho Chi Minh City and Binh Duong province and further screened for the desired bioactivities. After drying at 60 °C for 30 minutes, these soil samples were diluted and spreaded on Gause 1 agar. Forty-seven Actinobacteria strains were isolated. Of these 24/47 (51%) demonstrated antimicrobial activities. The potential KD33 strain was analyzed in term of morphological, biochemical, and antimicrobial characteristics. Antimicrobial activity of the isolated bacteria was identified by the agar plug diffusion method to detect the antagonism against the tested microorganisms including *Staphylococcus aureus*

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 35657 và *Candida albicans* ATCC 10231. The ethyl acetate-crude-extracts of the KD33 strain cultured in 7 days were analyzed by TLC-bioautography. Notably, KD33 strain showed a significant effect on all tested bacteria. TLC-bioautography revealed two bands of evident anti-staphylococcal activities at Rf 0.07 and 0.37.

Keywords: Actinobacteria, antimicrobial, bioautography, KD33 strain, soil.

Đặt vấn đề

Hiện nay, một vấn đề đang rất được quan tâm, đó là liên tục xuất hiện các vi khuẩn đề kháng kháng sinh; đặc biệt tại các khu vực sử dụng kháng sinh không theo chỉ định cả trên người cũng như trong chăn nuôi. Sự gia tăng các vi khuẩn đề kháng thuộc nhóm ESKAPE gồm *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, và *Enterobacter* spp. đã báo động toàn cầu. Vì vậy, nghiên cứu kháng sinh mới cần được ưu tiên phát triển [3, 4].

Xạ khuẩn là nhóm các vi khuẩn Gram dương, hiếu khí, sinh bào tử, thuộc Bộ Actinomycetales, đặc trưng bởi hai dạng khuẩn ty cơ chất và khuẩn ty khí sinh. Xạ khuẩn đóng vai trò quan trọng trong việc phân giải các vật liệu hữu cơ thành chất dinh dưỡng cho cây trồng. Trong ngành công nghiệp dược phẩm, xạ khuẩn là nguồn nguyên liệu sản xuất nhiều loại kháng sinh và chất chuyển hóa có hoạt tính sinh học như kháng ung thư, ức chế miễn dịch và enzym. Có hơn 23.000 chất chuyển hóa được sản xuất bởi vi sinh vật, trong đó khoảng 10.000 chất (chiếm 45%) có nguồn gốc từ xạ khuẩn với 7.600 chất (76%) được phân lập từ các loài thuộc chi *Streptomyces* [1]. *Streptomyces* và *Micromonospora* có khả năng sinh tổng hợp đến 80% các kháng sinh hiện nay, bao gồm các amino glycosid, anthracyclin, glycopeptid, β -lactam, macrolid, nucleosid, peptid, polyen, polyether và tetracyclin [2].

Đối với các nghiên cứu về xạ khuẩn, mẫu đất thường được sử dụng để phân lập, vì đây là môi trường sinh cư tự nhiên của nhiều chủng xạ khuẩn đa dạng, có khả năng sản xuất nhiều loại kháng sinh. Do đó, trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành thu thập mẫu đất từ một số địa điểm tại TP. Hồ Chí Minh và tỉnh Bình Dương, phân lập và sàng lọc xạ khuẩn có tiềm năng đối kháng với một số vi khuẩn, vi nấm gây bệnh.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Mẫu nghiên cứu: 3 mẫu đất được thu thập tại 3 địa điểm gồm thị xã Bến Cát, tỉnh Bình Dương (BD), Sân bay quốc tế Tân Sơn Nhất, TP. Hồ Chí Minh (SB) và Khoa Dược, Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh (KD).

Vi sinh vật thử nghiệm: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 nhạy cảm methicillin (MSSA), *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 đề kháng methicillin (MRSA), *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (EF), *Escherichia coli* ATCC 25922 (EC), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (PA), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 35657 (KP) và *Candida albicans* ATCC 10231 (CA).

Môi trường thử nghiệm: Môi trường thạch Brain heart infusion (BHI - Merck) và thạch Sabouraud dextrose (SDA - Merck) được sử dụng để nuôi cấy tăng sinh vi khuẩn hoặc vi nấm thử nghiệm. Thạch Mueller Hinton (MHA - Merck) và MHA bổ sung glucose 2% lần lượt được sử dụng cho các thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn, kháng *Candida*.

Môi trường nuôi cấy xạ khuẩn: Môi trường Gause 1 được sử dụng trong phân lập xạ khuẩn, các môi trường ISP1, ISP2, ISP4, ISP8, YIM 61, YIM 307, YIM301, YIM308 được sử dụng trong lên men thu kháng sinh theo đề xuất của Yi Jiang và CS. [5].

Phương pháp nghiên cứu

Phân lập xạ khuẩn

Thu thập và xử lý mẫu: Mẫu đất được thu thập, trong điều kiện thời tiết khô ráo, nhiệt độ trung bình 27 °C để mẫu đất không bị ướt và không quá khô. Vị trí lấy mẫu gần gốc cây để gia tăng số lượng xạ khuẩn, ở độ sâu 5-20 cm so với bề mặt, loại bỏ rễ cây, đá sỏi,... Mẫu được sấy khô ở 60 °C trong 30 phút để giảm số lượng vi nấm và các vi khuẩn không chịu nhiệt; sau đó tiến hành phân lập bằng phương pháp pha loãng [5].

Phân lập xạ khuẩn: Nghiền kỹ 1 g đất đã xử lý trong cối sứ tiệt trùng, bổ sung 10 ml nước cất vô trùng, sau đó tiến hành nghiền nhẹ để bể gãy khuẩn ty, tách bào tử xạ khuẩn. Cho mẫu sau khi nghiền vào bình nón chứa 90 ml NaCl 0,85%, khuấy đều bằng máy khuấy từ trong 30 phút. Huyền phù xạ khuẩn được pha loãng cấp 10 liên tiếp đến nồng độ thích hợp, trải 100 μ l lên môi trường thạch Gause 1 có bổ sung cycloheximid 0,5 g/L để ức chế vi nấm hoại sinh, ủ ở nhiệt độ phòng và theo dõi trong 2 tuần. Các khóm xạ khuẩn được cấy chuyển sang môi trường Gause 1, quan sát sự phát triển khuẩn lạc mỗi ngày, trong vòng 1 tháng. Cấy ria trên môi trường Gause 1 đến khi thu được khóm xạ khuẩn đồng nhất về hình thái đại thể, bảo quản trong ISP2-glycerol 25%, ở -20 °C [5].

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

Sàng lọc hoạt tính kháng vi sinh vật

Xạ khuẩn được nuôi cấy trong môi trường Gause 1 đến khi xuất hiện bào tử trên bề mặt khuẩn lạc, pha loãng bào tử trong NaCl 0,85% để đạt độ đục McFarland 0,5; dùng que bông vô trùng trải đều lên môi trường Gause 1. Sau 14 ngày, tiến hành sàng lọc hoạt tính kháng vi sinh vật của xạ khuẩn bằng phương pháp thổi thạch trên các chủng MSSA, MRSA, *S. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *C. albicans*. Sử dụng ống inox vô trùng đường kính 6 mm, đục các lỗ tròn trên khóm xạ khuẩn, chuyển phần thạch tròn đặt lên môi trường MHA hoặc MHA bổ sung 2% glucose đã trải sẵn vi sinh vật thử nghiệm. Vi sinh vật thử nghiệm được chuẩn bị bằng cách nuôi cấy 18 giờ trong môi trường BHA, điều chỉnh độ đục xấp xỉ 0,5 McFarland. Ủ các hộp thạch ở nhiệt độ 37 °C, đo đường kính vòng ức chế sau 18-24 giờ. Chủng xạ khuẩn được chọn để thực hiện nghiên cứu tiếp dựa vào đường kính vòng ức chế và số chủng vi sinh vật gây bệnh bị ức chế. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sàng lọc được chủng KD33 có phổ kháng khuẩn rộng để thực hiện các thử nghiệm tiếp theo.

Khảo sát đặc điểm sinh lý và sinh hóa của xạ khuẩn KD33

Các đặc điểm sinh hóa của xạ khuẩn KD33 được khảo sát gồm nhiệt độ sinh trưởng, khả năng chịu muối, phản ứng VP, indol, catalase, thủy phân tinh bột, cellulase, lipase, urease được thực hiện theo các hướng dẫn của Li và CS. (2016) [6].

Khảo sát môi trường nuôi cấy xạ khuẩn KD33 để thu kháng sinh

Theo Jiang và CS. (2016), kháng sinh sản xuất từ xạ khuẩn thường được thu nhận trên các môi trường YIM và ISP. Trong nghiên cứu này, chúng tôi khảo sát nuôi cấy chủng KD33 trên 9 môi trường rắn gồm Gause 1, YIM 61, YIM 307, YIM 301, YIM 308, ISP1, ISP2, ISP4, ISP8 [6]. Khảo sát khả năng sinh kháng sinh của KD33 trên các môi trường nuôi cấy khác nhau được xác định bằng phương pháp thổi thạch. Môi trường cho môi trường nuôi cấy có đường kính vòng ức chế lớn nhất sẽ được sử dụng để lên men và chiết xuất kháng sinh.

Lên men và chiết xuất kháng sinh

Sau khi xác định được môi trường lên men

Bảng 1. Số lượng xạ khuẩn phân theo các nhóm màu khác nhau

Mẫu	Vàng	Nâu	Trắng	Xám	Hồng	Tổng (%)
Khoa Dược	0	4	17	1	0	22 (46,8)
Sân bay TSN	3	0	9	3	1	16 (34,0)
Bình Dương	0	0	7	0	2	9 (19,2)
Tổng (%)	3 (6,4)	4 (8,5)	33 (70,2)	4 (8,5)	3 (6,4)	47 (100)

thu nhận kháng sinh, tiến hành 5% huyền dịch bào tử (độ đục 0,5 Mcfarland), nuôi cấy trong 5 bình 100 ml, ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng trực tiếp, trong 7 ngày. Chiết xuất hoạt chất từ 5 bình lên men với 05 dung môi: *n*-hexan, cloroform, ethyl acetat, ethanol và nước. Dịch chiết được cô cách thủy ở 50 °C đến khi thu được cao đặc, màu vàng. 50 mg cao toàn phần được pha loãng trong 1 ml DMSO 10%, cho 100 µl dịch pha loãng vào các giếng thử đường kính 6 mm được đục trên hộp thạch MHA đã trải hai đại diện vi khuẩn gram dương MRSA và vi khuẩn gram âm *P. aeruginosa*. Ủ các hộp thạch ở nhiệt độ 37 °C, đo đường kính vòng ức chế sau 18-24 giờ. Cao chiết cho đường kính vòng ức chế lớn nhất sẽ được phân tích trên sắc ký lớp mỏng và tự sinh đồ.

Sắc ký lớp mỏng, tự sinh đồ

Để phân tích hoạt chất kháng sinh có trong cao chiết do xạ khuẩn sản xuất, chúng tôi tiến hành sắc ký lớp mỏng với các hệ dung môi khai triển khác nhau và tự sinh đồ trên chủng MRSA.

Sắc ký lớp mỏng: Sử dụng bản mỏng Silica gel 60 F254, Merck. Tiến hành khảo sát hệ dung môi gồm (*n*-hexan, dicloromethan, methanol, acid acetic) với các tỷ lệ khác nhau.

Tự sinh đồ: Hòa tan cao toàn phần trong 1 ml dung môi chiết xuất, chấm lên bản mỏng và triển khai bằng hệ dung môi đã xác định. Quan sát bản mỏng dưới UV 254, UV 365 nm và thuốc thử vanilin sulfuric (VS). Đặt bản mỏng sắc ký sau khi khai triển lên môi trường MHA đã trải MRSA, để hộp thạch ở 5 °C trong 8 giờ, sau đó tiếp tục ủ ở 37 °C, trong 24 giờ. Xác định vết tương ứng trên sắc ký đồ có vòng kháng MRSA [7].

Kết quả

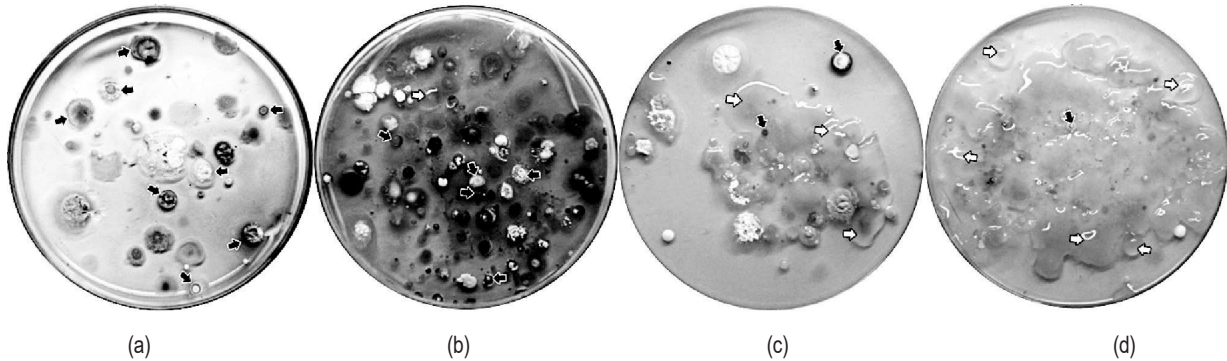
Phân lập xạ khuẩn

Từ 3 mẫu đất thu thập tại TP. Hồ Chí Minh và tỉnh Bình Dương, chúng tôi phân lập được 47 chủng xạ khuẩn với các đặc điểm hình thái khuẩn lạc khác nhau. Quan sát màu sắc khuẩn ty khí sinh trên môi trường Gause 1, phân loại dựa vào màu sắc theo mô tả của Blinov N. và Khokhlov A. (*The Actinomycetes* – Waksman) [8], xác định có 05 nhóm xạ khuẩn chính với các màu vàng, nâu, trắng, xám, hồng (bảng 1), trong đó các chủng thuộc nhóm màu trắng chiếm số lượng lớn so với các nhóm khác (33/47 chủng).

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

Quan sát hộp thạch phân lập cho thấy trong mẫu đất Bình Dương có nhiều nấm khuẩn (mũi tên màu trắng

khóm trong suốt, nhầy nhớt) hơn là các xạ khuẩn (mũi tên màu đen, khóm khô, bề mặt có bào tử) (hình 1).



Hình 1. Các chủng vi khuẩn trên môi trường phân lập Gause 1
(a) Sân bay Tân Sơn Nhất; (b) Khoa Dược; (c), (d) Bình Dương

Sàng lọc chủng xạ khuẩn có hoạt tính kháng vi sinh vật

Kết quả sàng lọc bằng phương pháp thổi thạch cho thấy, có 24/47 (51%) chủng xạ khuẩn có hoạt tính kháng ít nhất một vi sinh vật thử nghiệm. Các chủng xạ khuẩn chủ yếu có hoạt tính kháng vi khuẩn Gram dương, trong đó có 20 chủng kháng MSSA và MRSA; 12 chủng kháng EF; chỉ từ 2 đến 4 chủng kháng vi khuẩn Gram âm và có 2 chủng kháng

Candida albicans (bảng 2). Đặc biệt, chủng xạ khuẩn KD33 có hoạt tính ức chế tất cả các vi sinh vật thử nghiệm. Căn cứ kết quả sàng lọc, chủng KD33 được chọn để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo. Đặc điểm hình thái khóm của 24 chủng xạ khuẩn có hoạt tính kháng vi sinh vật sau 7 ngày nuôi cấy trên môi trường Gause 1 được ghi nhận bao gồm: (1) đường kính khuẩn lạc, (2) màu sắc khuẩn ty khí sinh, (3) rìa khóm, (4) sắc tố tan trong môi trường (bảng 2).

Bảng 2. Hoạt tính kháng vi sinh vật và đặc điểm hình thái của 24 khóm xạ khuẩn

STT	Mã chủng	Đường kính vòng ức chế (mm)							Đặc điểm hình thái khóm			
		MS	MR	EF	EC	PA	KP	CA	(1)	(2)	(3)	(4)
1	BD301	11	11	-	-	-	-	-	2-5	trắng	rc	xanh
2	BD303	11	12	-	-	-	-	-	2-6	trắng	rc	xanh
3	BD304	12,5	11	8	-	-	-	-	2-6	trắng	rc	xanh
4	BD305	12	12	-	-	-	-	-	1-3	trắng	rc	xanh
5	KD02	15	11	14	-	-	-	-	2-5	trắng	mn	-
6	KD04	9	8	-	-	-	-	-	2-5	trắng	rc	nâu
7	KD07	10	8	-	-	-	-	-	2-6	trắng	rc	xanh
8	KD08	-	-	-	-	10	12	-	2-7	trắng	rc	xanh
9	KD10	8	7	7	-	-	-	-	1-2	nâu	rc	-
10	KD11	8	8	12	-	-	-	-	1-2	trắng	mn	-
11	KD12	8	8	-	-	-	-	-	2-4	trắng	mn	-
12	KD14	11	10	10	-	-	-	-	1-4	nâu	rc	-
13	KD16A	10	10	-	-	-	-	-	1-4	trắng	mn	-
14	KD22	10	9	6	-	-	-	-	2-5	trắng	mn	nâu
15	KD2S	12	13	-	13	16	13	-	2-5	nâu	mn	-
16	KD32	10	10	-	-	12	12	13	1-3	trắng	rc	-
17	KD33	15	12	9	13	15,5	12	15	2-6	xám	mn	-
18	SB01A	17,5	15	15	-	-	-	-	1-3	trắng	mn	tím
19	SB02	-	-	15	-	-	-	-	3-5	xám	mn	-
20	SB03	-	-	19	-	-	-	-	2-7	trắng	mn	-
21	SB04	12	11	13	-	-	-	-	2-7	hồng	mn	-
22	SB06	-	-	12	-	-	-	-	2-3	trắng	mn	vàng
23	SB10	15	15	-	-	-	-	-	2-4	xám	mn	khô
24	SB25B	10	10	-	-	-	-	-	2-6	trắng	rc	xanh

(-): âm tính; rc: mép răng cưa; mn: mép nguyên; (1): kích thước khóm (mm); (2): màu sắc khuẩn ty khí sinh; (3): rìa khóm; (4): sắc tố tan trong môi trường. Các đặc điểm hình thái được ghi nhận sau 7 ngày nuôi cấy trong lần cấy chuyển đầu tiên.

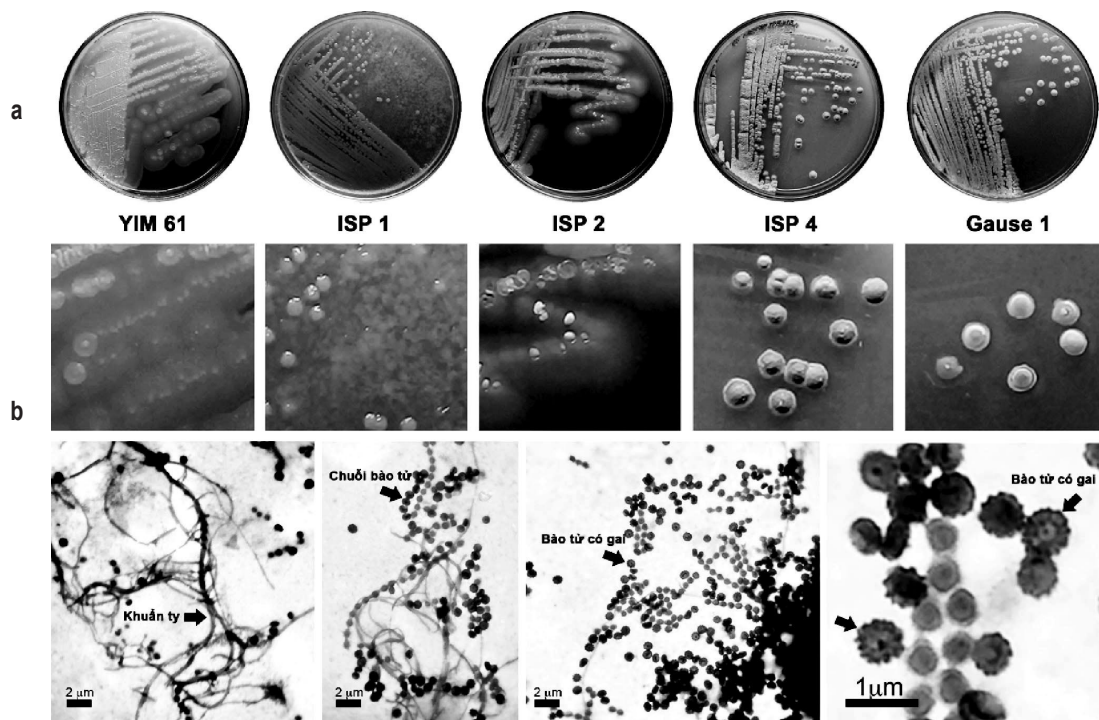
● Nghiên cứu - Kỹ thuật

Đặc điểm hình thái của chủng xạ khuẩn KD33

Đặc điểm hình thái: Trên môi trường nuôi cấy khác nhau, chủng KD33 có hình thái khóm và khả năng tạo bào tử khác nhau. Môi trường ISP4 cho khả năng tạo bào tử mạnh sau 7 ngày nuôi cấy, toàn bộ bề mặt khóm được bao phủ bởi lớp bào tử màu xám. Trên môi trường ISP2, YIM61 các khuẩn lạc KD33 ươn, mọc lan mạnh, nhưng khả năng tạo bào tử kém, sự phân hóa khuẩn ty cơ chất và khuẩn ty khí sinh không rõ rệt. Trên môi trường ISP1, khóm KD33 có kích thước tương đối nhỏ (2-3 mm), bề mặt khuẩn lạc

ươn, xuất hiện sắc tố melanin lan ra môi trường, hiện tượng này không phát hiện ở tất cả các môi trường khác. Trên môi trường Gause 1 sau 7 ngày nuôi cấy, khuẩn lạc KD33 có bìa nguyên, kích thước 2-6 mm, khuẩn ty khí sinh màu xám ngà vàng, bề mặt khuẩn lạc chuyển màu hồng nhạt, sau đó sinh lớp bào tử dạng bột màu xám.

Đặc điểm vi thể: Nhuộm Gram và quan sát dưới kính hiển vi ở vật kính x100 cho thấy KD33 là vi khuẩn Gram dương, có các khuẩn ty dạng sợi, bào tử tạo chuỗi dài, bề mặt bào tử có gai.



Hình 2. (a) Hình thái khuẩn lạc KD33 trên các môi trường
(b) hình ảnh xạ khuẩn KD33 nhuộm Gram

Khả năng sinh chất kháng vi sinh vật: Xạ khuẩn KD33 thể hiện hoạt phổ kháng khuẩn rộng trên cả vi khuẩn Gram dương, Gram âm và *Candida albicans* với đường kính vòng ức chế 9-15,5 mm (bảng 2).

Khảo sát một số đặc điểm sinh lý, sinh hóa của chủng KD33

Chủng KD33 sinh trưởng ở nhiệt độ 30-40 °C, phát triển tối ưu ở 37 °C. Khảo sát môi trường bổ sung NaCl có nồng độ từ 0 - 20%, KD33 phát triển được trong khoảng nồng độ muối từ 0 - 5%, tối ưu ở nồng độ NaCl 2,5%. Chủng xạ khuẩn này có khả năng thủy phân tinh bột và lipid. Các phản ứng sinh hóa khác gồm catalase (+), VP (-), indol (-), urease (-).

Khảo sát môi trường lên men KD33 thu kháng sinh

Khảo sát khả năng sinh kháng sinh của KD33 trên các môi trường Gause1, ISP1, ISP2, ISP8,

YIM 61-soya, YIM 61, YIM 301, YIM 307 và YIM 308 bằng phương pháp thời thạch. Chủng KD33 chỉ thể hiện vòng ức chế trên môi trường YIM 61 và Gause 1 sau 7 ngày nuôi cấy. Môi trường YIM 61 cho kết quả vòng kháng lớn hơn Gause 1, do đó chúng tôi chọn môi trường này trong các thí nghiệm tiếp theo (bảng 3).

Bảng 3. Đường kính vòng ức chế sau 7 ngày nuôi cấy trên YIM61 và Gause1 (mm)

Môi trường	MS	MR	EC	PA	EF	KP	CA
YIM 61 (mm)	21	20	15	22	13	15	15
Gause 1 (mm)	15	12	9	13	15,5	12	15

Chiết xuất kháng sinh từ môi trường nuôi cấy xạ khuẩn KD33

Lên men xạ khuẩn KD33 trên môi trường YIM61 rắn trong 7 ngày, chiết với 5 dung môi khác nhau. Kết quả cho thấy, dịch chiết với ethyl acetat (EA)

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

là dịch chiết duy nhất có hoạt tính kháng khuẩn trên cả hai vi khuẩn đại diện vi khuẩn thường đề kháng kháng sinh là cả MRSA (Gram dương) và *Pseudomonas aeruginosa* (Gram âm) với đường kính vòng ức chế

lần lượt là 10,3 mm và 7,5 mm (bảng 4). Do đó, chúng tôi chọn dung môi này để chiết xuất kháng sinh từ môi trường nuôi cấy chủng KD33, tiến hành các phân tích tiếp theo trên cao ethyl acetat.

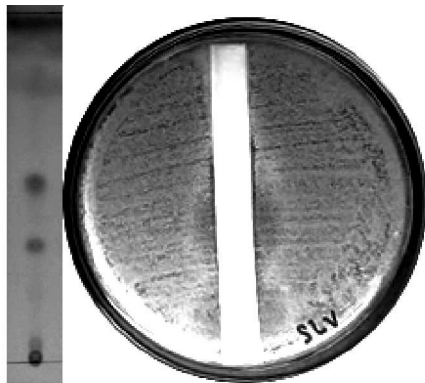
Bảng 4. Khảo sát dung môi chiết tách kháng sinh từ môi trường nuôi cấy chủng KD33

Dung môi chiết kháng sinh	<i>n</i> -hexan		$CHCl_3$		EA		EtOH		H_2O	
	MR	PA	MR	PA	MR	PA	MR	PA	MR	PA
Chủng vi khuẩn thử nghiệm										
Đường kính vòng ức chế (mm)	-	-	9,1	-	10,3	7,5	11,1	-	9,3	-

(-): không có hoạt tính

Sắc ký lớp mỏng - tự sinh đồ cao EA

Sắc ký lớp mỏng cao EA với pha động *n*-hexan: CH_2Cl_2 :MeOH:AcOH (2:8:0,5:0,05), phát hiện 3 vết chính tắt quang ở UV 254 nm với giá trị R_f lần lượt là 0,07; 0,37 và 0,51. Thực hiện tự sinh đồ với MRSA và *P. aeruginosa* để phát hiện vết sắc ký có hoạt tính kháng khuẩn. Kết quả tự sinh đồ cho thấy vết sắc ký có R_f 0,07 và 0,37 có hoạt tính kháng MRSA; *P. aeruginosa* không cho vết có hoạt tính trên tự sinh đồ, có thể do nồng độ chất kháng sinh khuếch tán từ bản mỏng không đủ ức chế vi khuẩn này.



Hình 3. Sắc ký đồ sắc ký lớp mỏng với hệ dung môi *n*-hexan: CH_2Cl_2 :MeOH:AcOH (2:8:0,5:0,05), và tự sinh đồ cao EA chiết từ môi trường nuôi cấy xạ khuẩn KD33 cho vết R_f 0,07 và 0,37 có hoạt tính kháng MRSA

Bàn luận

Từ 3 mẫu đất thu nhận tại TP. Hồ Chí Minh và tỉnh Bình Dương, chúng tôi đã phân lập được 47 chủng xạ khuẩn. Kết quả này minh chứng đất là một loại cơ chất có số lượng và chủng loại xạ khuẩn phong phú. Trong quá trình phân lập, có nhiều chủng xạ khuẩn nhanh chóng bị thoái hóa, không phát triển và rất khó phân lập. Hiện tượng này cho thấy các yếu tố tăng trưởng trong môi trường tự nhiên cũng như tương tác giữa các vi sinh vật trong hệ sinh thái đối với sự tồn tại và phát triển của xạ khuẩn đóng vai trò rất quan trọng [9].

Môi trường YIM 61 sử dụng trong nghiên cứu này chứa bột đậu nành đã ép loại bỏ dầu là nguồn nitơ

đa thành phần giúp tăng cường khả năng tổng hợp kháng sinh của xạ khuẩn trong quá trình phân giải chậm các thành phần nitơ này, sử dụng nguồn nitơ vô cơ đơn giản có thể làm giảm khả năng sản xuất kháng sinh [10].

Khi tiến hành tự sinh đồ cao ethyl acetat, vòng ức chế chỉ thể hiện trên MRSA, không thể hiện trên *P. aeruginosa*, điều này có thể do lượng chất kháng khuẩn khuếch tán từ bản mỏng chưa đạt nồng độ ức chế tối thiểu trên *P. aeruginosa*. Cao ethyl acetat cho 2 vết có vòng ức chế với R_f 0,07 và 0,37 chứng tỏ chủng KD33 có thể sản xuất nhiều chất kháng VSV khác nhau.

Các đặc điểm hình thái và sinh hóa được thực hiện nhằm nhận định chủng xạ khuẩn, tuy nhiên để định danh chính xác, chúng tôi sẽ tiến hành giải trình tự đoạn 16S rDNA.

Kết luận

Nghiên cứu đã phân lập được 24 chủng xạ khuẩn có khả năng sinh kháng sinh từ các mẫu đất thu nhận tại TP. Hồ Chí Minh và tỉnh Bình Dương. Trong đó, chủng KD33 có hoạt tính kháng tất cả các chủng vi sinh vật thử nghiệm. Cao ethyl acetat chiết từ xạ khuẩn KD33 cho 2 vết kháng MRSA ở R_f 0,07 và 0,37 trên sắc ký lớp mỏng kết hợp tự sinh đồ.

Tài liệu tham khảo

1. Bérđy J. (2012), "Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading", *The J. of Antibiotics*, 65 (8), pp. 385.
2. Şahin N. and Uğur A. (2003), "Investigation of the antimicrobial activity of some *Streptomyces* isolates", *Turkish J. of Biology.*, 27 (2), pp. 79-84.
3. Santajit S. and Indrawattana N. (2016), "Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens", *BioMed Res. Inter.*, 2475067, pp. 1-8.
4. Tacconelli E., Carrara E., Savoldi A., Harbarth S., et al. (2018), "Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis", *The Lancet Infectious Diseases*, 18 (3), pp. 318-327.

5. Jiang Y., Li Q., Chen X., and Jiang C. (2016), "Isolation and cultivation methods of *Actinobacteria*", *Actinobacteria-Basics and Biotechnological Applications*, InTech.

6. Li Q., Chen X., Jiang Y., and Jiang C. (2016), "Cultural, physiological, and biochemical identification of actinobacteria", *Actinobacteria-Basics and Biotechnological Applications*, InTechOpen.

7. Dewanjee S., Gangopadhyay M., Bhattacharya N., Khanra R., and Dua T. K. (2015), "Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry", *J. of Pharm. Analysis*, 5 (2), pp. 75-84.

8. Waksman S. A. (1967), The Actinomycetes. A summary of current knowledge. *The Actinomycetes. A summary of current knowledge*.

9. Kalakoutskii L. and Agre N. S. (1976), "Comparative aspects of development and differentiation in actinomycetes", *Bacteriological Reviews*, 40 (2), pp. 469.

10. Hasani A., Kariminik A., and Issazadeh K. (2014), Streptomycetes: characteristics and their antimicrobial activities.

(Ngày nhận bài: 10/10/2019 - Ngày phản biện: 12/11/2019 - Ngày duyệt đăng: 29/11/2019)

Tổng hợp các dẫn chất 1H-pyrazol-4-carbaldehyd và 4-phenylbut-3-en-2-on làm trung gian cho tổng hợp các chất tương đồng curcumin kiểu monocarbonyl

Đoàn Quốc Hoài Nam, Ngô Thị Lan Phương, Nguyễn Thị Khánh Ngân
Phan Tiểu Long, Trương Ngọc Tuyền*

Khoa Dược, Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh

*E-mail: truongtuyen@ump.edu.vn

Summary

For use as intermediates in synthesis of Monocarbonyl Analogues of Curcumin (MACs) containing 1H-pyrazole heterocycle, four 1H-pyrazole-4-carbaldehyde derivatives (Intermediates A.1 - A.4) were synthesized from corresponding 1H-pyrazol-5(4H)-one or hydrazone by Vilsmeier-Haack reaction, and six 4-phenylbut-3-en-2-one derivatives (Intermediates B.1 - B.6) were synthesized from acetone and corresponding aromatic aldehyde by monoaldol condensation. Their structural identification was confirmed physically by melting point, (TLC), and spectroscopically by IR, MS, ¹H-NMR and ¹³C-NMR.

Keywords: Curcumin, MACs, 1H-pyrazole, vilsmeier-haack, aldol condensation.

Đặt vấn đề

Curcumin (diferuloylmethan) là hợp chất polyphenol tự nhiên, có chủ yếu trong củ nghệ (*Curcuma longa* Linn.); với ba vùng cấu trúc chức năng chính gồm khung vòng thơm kiểu catechol, khung 1,3-diceton và khung liên kết olefin đóng góp nhiều vai trò khác nhau vào hoạt tính sinh học của curcumin [1]. Tính đa dạng cao trong cấu trúc khiến curcumin thể hiện nhiều hoạt tính sinh học đáng chú ý, phải kể đến như hoạt tính chống oxy hóa [2], kháng nấm [3] hay kháng ung thư [4], ... Bên cạnh đó, các chất tương đồng curcumin cũng rất được phát triển, phải kể đến là nhóm chất tương đồng curcumin kiểu monocarbonyl (Mono Carbonyl Analogues – MACs). Mặt khác, dị vòng 1H-pyrazol hiện diện trong cấu trúc của nhiều dược chất, một số thể hiện hoạt tính kháng khuẩn [5] hay kháng ung thư [6].

Với mục tiêu kết hợp dị vòng 1H-pyrazol vào khung cấu trúc MACs, bài báo này trình bày nghiên cứu tổng hợp các dẫn xuất 1H-pyrazol-4-carbaldehyd (A) và 4-phenylbut-3-en-2-on (B), là các chất trung gian cần thiết để tổng hợp MACs chứa dị vòng 1H-pyrazol, từ đó đánh giá hoạt tính sinh học của MACs được tổng hợp.

Nguyên liệu, thiết bị và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu và thiết bị

Hóa chất, dung môi từ các Công ty Merck, Sigma-Aldrich, Fischer Scientific và AK Scientific, được sử dụng trực tiếp không tinh chế thêm. Sắc ký lớp mỏng sử dụng bản nhôm silica gel 60 F₂₅₄, độ dày 0,2 mm từ Công ty Merck. Điểm chảy được đo bằng máy Sanyo-Gallenkamp; phổ hồng ngoại được đo bằng máy IRAffinity-1S Shimadzu. Phổ khối được đo