

## HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN VÀ KHÁNG TẾ BÀO UNG THƯ CỦA CHỦNG XẠ KHUẨN BIỂN *STREPTOMYCES VIRIDODIASTATICUS* TB5.3 PHÂN LẬP TỪ VÙNG VEN BIỂN TỈNH THÁI BÌNH

Phạm Thanh Huyền, Bạch Thị Mai Hoa,  
Nguyễn Phương Huệ, Phí Quyết Tiên, Lê Gia Hy  
Viện Công nghệ sinh học,  
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Ngày nay, nhu cầu về các loại thuốc mới trong điều trị tăng do sự phát triển đa dạng các loại bệnh, đã thúc đẩy việc tìm kiếm nguồn nguyên liệu cho sản xuất thuốc mới theo Lam (2006). Việc khai thác các chất có hoạt tính sinh học, đặc biệt là các chất có hoạt tính mới có nguồn gốc từ vi sinh vật biển đang được các nhà khoa học quan tâm. Sự khác biệt về đặc điểm khí hậu, môi trường từ các vùng biển đã tạo ra sự đa dạng về di truyền cũng như đa dạng về các chất có hoạt tính mới theo Inagaki et al. (2006). Trong đó, xạ khuẩn biển được biết đến là nhóm có khả năng sản xuất các chất có hoạt tính dược học được ứng dụng rộng rãi Berdy (2005). Hệ sinh thái ngập mặn ven biển được chứng minh là nơi có khả năng sàng lọc được các chất có hoạt tính dược học mới cao hơn so với các nơi khác do giàu chất dinh dưỡng theo Lam (2006). Theo thống kê cho thấy, các sản phẩm có nguồn gốc từ xạ khuẩn chiếm khoảng 70% các loại thuốc kháng sinh, kháng ung thư và các chất chuyển hóa khác Chavan et al. (2013). Trong đó, phần lớn là các chất có hoạt tính mới như kháng vi khuẩn kháng thuốc, kháng ung thư, kháng nấm, kháng virus,... Berdy (2005).

Với mục tiêu mở rộng nghiên cứu về các chất có hoạt tính sinh học từ xạ khuẩn biển Việt Nam nhằm ứng dụng trong y dược, chúng tôi công bố một số kết quả nghiên cứu sơ bộ về chủng xạ khuẩn TB5.3 được phân lập từ vùng ven biển tỉnh Thái Bình, có hoạt tính đối kháng với vi khuẩn kháng thuốc và có khả năng gây độc với một số dòng tế bào ung thư. Kết quả này rất có ý nghĩa cho việc tìm kiếm và phát triển các loại thuốc mới có nguồn gốc từ vi sinh vật biển Việt Nam.

### I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### Vi sinh vật kiểm định, các dòng tế bào và chủng xạ khuẩn TB5.3

Các chủng vi sinh vật kiểm định: *Actinobacter baumannii* ATCC 19606; *Bacillus subtilis* ATCC 6633; *Enterococcus faecalis* ATCC 29212; *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048; *Escherichia coli* ATCC 25922; *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883; *Salmonella typhimurium* ATCC 14028; *Staphylococcus aureus* ATCC29213; *S. epidermidis* ATCC 12228; *S. aureus* ATCC 25923 kháng methicillin (MRSA); *S. epidermidis* ATCC35984 kháng methicillin (MRSE), *Candida albicans* ATCC 10231 nhận từ bộ sưu tập giống của Phòng Công nghệ lên men, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Các dòng tế bào ung thư M14 (tế bào ung thư sắc tố da); Hela (tế bào ung thư cổ tử cung); NCIH460 (tế bào ung thư phổi) và dòng tế bào lành Hek 293 (tế bào thận) được cung cấp từ Khoa Molecular Oncology thuộc Viện Ung thư Chennai, Ấn Độ.

Chủng xạ khuẩn TB5.3 được phân lập từ vùng rừng ngập mặn ven biển thuộc tỉnh Thái Bình (tọa độ 20°18' đến 20°44' độ vĩ Bắc, 106°06' đến 106°39' độ kinh Đông). Môi trường phân lập là SCA (g/l) (Tinh bột 10,0; casein 10; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5; MgSO<sub>4</sub> 0,5 NaCl 3; 50% nước biển; thạch 18,0; pH 7,0) có bổ sung kháng sinh Nystatin 0,3% và nuôi ở 28°C trong 7 ngày.

**Phân loại xạ khuẩn**

Phương pháp truyền thống: Nghiên cứu đặc điểm hình thái, màu sắc khuẩn ty, sắc tố và đặc điểm phân loại xạ khuẩn Shirling & Gottlieb (1966), Stanley et al. (1989). Phân tích trình tự gen 16S rDNA: chủng TB5.3 được nuôi trên môi trường SCA ở 28°C trong 2 ngày, được dùng để tách DNA Sambrook et al. (1989). Sử dụng cặp môi FC27 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và RC1492 (5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') (Genset) để nhân gen 16S rDNA. Phản ứng PCR thực hiện theo chu trình nhiệt: 94°C: 5 phút; 30 chu kỳ (94 °C: 1,5 phút; 51°C: 1,5 phút; 72 °C: 2 phút); 72 °C: 10 phút. Sản phẩm của phản ứng PCR được tinh sạch bằng bộ kit PureLink™-DNA Purification (Invitrogen) và giải trình tự trên máy ABI PRISM®3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. So sánh trình tự gen tương ứng trên cơ sở dữ liệu GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov).

**Tách chiết chất có hoạt tính kháng sinh từ dịch lên men**

Chủng xạ khuẩn TB5.3 được lên men trên môi trường M1ASW (g/l): Tinh bột 10; cao nấm men 4; Pepton 2. Dịch lên men được ly tâm 8.000 vòng trong 10 phút, phần dịch sau ly tâm được tách chiết bằng dung môi ethyl acetate theo tỷ lệ: ethyl acetate: dịch lên men (2:1) (v/v), lắc 200 vòng/phút trong 2 giờ. Chiết và cô để loại bỏ dung môi ở 60°C. Hoạt chất thô thu được để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

**Thử hoạt tính kháng vi sinh vật của chất kháng sinh thô**

Xác định hoạt tính kháng khuẩn theo phương pháp khuếch tán trên thạch (Barry & Thomsberry, 1985). Môi trường sử dụng cho vi khuẩn là LB (Cao nấm men 5 g/l; Tryptone 10 g/l; NaCl 5 g/l; agar 15 g/l; pH 7), cho nấm men là YP (cao nấm men 10g/l; bacto pepton 20 g/l; agar 15 g/l). Mẫu xác định hoạt tính kháng sinh được để khuếch tán trên thạch 2h ở nhiệt độ 4°C sau đó nuôi 37°C trong 24h và đọc kết quả.

**Thử hoạt tính gây độc tế bào của chất kháng sinh thô**

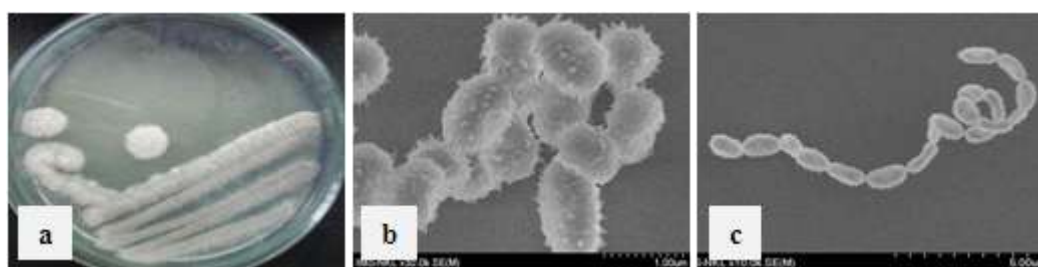
Độc tính với các dòng tế bào được xác định bằng phương pháp so màu MTT (MTT assay). Phương pháp này dựa trên phản ứng khử màu của MTT- 3-(4,5- Dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyltetrazolium bromide, 1-tetrazol) có màu vàng thành formazan có màu tím trong ty thể của tế bào sống. Do vậy, khi so màu sẽ cho biết số lượng tế bào sống sót trong các mẫu thí nghiệm Van et al. (1994). Các dòng tế bào được nuôi cấy trong đĩa 96 giếng (10<sup>4</sup> tế bào/giếng) trong 24 giờ ở 37°C và 5% CO<sub>2</sub>. Các đĩa nuôi tế bào được thử độc tính bằng cách bổ sung chất chiết từ chủng xạ khuẩn biến TB5.3 ở các nồng độ khác nhau; mẫu đối chứng không bổ sung chất mà sử dụng DMSO để xử lý tế bào. Sau đó, bổ sung 10 µl dung dịch thuốc thử MTT (5 mg/ml trong đệm muối photphat -PBS) vào 90 µl dung dịch của các giếng, các đĩa được ủ ở 37°C trong 4 giờ và sau đó đo mật độ quang (OD) ở bước sóng 540 nm bằng máy ELISA (TECAN, Thụy Sĩ). Phần trăm sống sót của tế bào được xác định như sau: [1- (OD tế bào/OD mẫu đối chứng)] x100. Giá trị IC<sub>50</sub>: dùng giá trị CS của 10 thang nồng độ, dựa vào chương trình Table curve theo thang giá trị logarit của đường cong phát triển tế bào và nồng độ chất thử để tính giá trị IC<sub>50</sub>. Công thức: 1/y=a+blnX (trong đó y: nồng độ chất thử; X: Giá trị CS (%)).

**II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN****Đặc điểm sinh học của chủng xạ khuẩn TB5.3**

Chủng xạ khuẩn TB5.3 phân lập từ vùng ven bờ biển tỉnh Thái Bình được xếp vào nhóm xám, màu sắc thay đổi từ màu xám đến màu trắng trên các môi trường ISP1:- ISP7. Chủng

không sinh sắc tố tan và sắc tố melanin trên các môi trường ISP1, ISP6 và ISP7. Bề mặt bào tử dạng gai, cuống sinh bào tử dài xoắn lò so ở đầu, có 10-20 bào tử trên một chuỗi (Hình 1b và 1c). Chủng TB5.3 thuộc nhóm ưa ẩm, nhiệt độ sinh trưởng tối ưu trong khoảng 25-37°C, pH sinh trưởng của chủng là 7-10, tối ưu ở pH 7-8, có thể chịu được nồng độ NaCl 7% và phát triển kém ở nồng độ NaCl 10%.

Chủng xạ khuẩn TB5.3 có khả năng đồng hóa một số nguồn carbon như glucose, saccarose, arabinose, D-xylose, myo-inositol, mannitol, D-fructose, L-rhamnose và mannose, không có khả năng đồng hóa cellobiose và không sinh trưởng trên môi trường không có nguồn carbon. Với nguồn nitơ hữu cơ như pepton, cao men và tryptone, chủng TB5.3 sinh trưởng tốt hơn so với bột đậu tương. Ngoài ra, chủng TB5.3 còn sinh một số enzyme ngoại bào thủy phân tinh bột, casein và cellulose, đây là điều kiện thuận lợi cho lựa chọn môi trường lên men chất kháng sinh.



Hình 1: Ảnh chụp bề mặt khuẩn lạc (a) và ảnh hiển vi điện tử quét của chủng xạ khuẩn TB5.3 với độ phóng đại 30.000 (b) và 10.000 lần (c)

So sánh đặc điểm sinh học của chủng xạ khuẩn TB5.3 với các tài liệu phân loại xạ khuẩn cho thấy, chủng này có nhiều đặc điểm giống với loài *Streptomyces viridodiastaticus*, chủng ISP 5249 do Baldacci và cs mô tả năm 1955 theo Shirling & Gottlieb (1966). Kết hợp với kết quả phân tích trình tự gen 16S rDNA của chủng TB5.3 và so sánh với các trình tự tương ứng trên cơ sở dữ liệu GenBank bằng công cụ BLAST trên NCBI cho thấy, chủng này có độ tương đồng 99% với gen tương ứng của chủng *Streptomyces viridodiastaticus* NBRC 13488 (Mã số NR\_112371.1).

#### Hoạt tính kháng vi sinh vật

Thí nghiệm được thực hiện trên cùng một thể tích dịch kháng sinh là 20 µl/lỗ thạch, chất kháng sinh thô được hòa trong nước cất với tỷ lệ 1:1 (mg/ml). Kết quả thử nghiệm cho thấy, chất thô của chủng TB5.3 có thể ức chế các chủng vi khuẩn Gram (+) tốt hơn Gram (-); có khả năng ức chế 2 chủng vi khuẩn kháng thuốc MRSA và MRSE và chủng nấm men *C. albicans* ATCC 10231 (Bảng 1).

So sánh với chủng xạ khuẩn *S.viridodiastaticus* B8005 phân lập từ vùng biển Mexico cho thấy có một số đặc điểm sinh học gần giống với chủng TB5.3. Chủng B8005 cũng có khả năng đối kháng với các vi sinh vật kiểm định như *E.coli*, *S.aureus*, *B.subtilis* và *C.albicans* Maskey et al. (2004); tuy nhiên chủng TB5.3 còn có khả năng kháng với vi khuẩn kháng thuốc MRSA và MRSE. Khả năng đối kháng của chủng xạ khuẩn *S. viridodiastaticus* IFO 13.106 trong nghiên cứu của Herberich với chủng vi khuẩn MRSA khá tốt, bên cạnh đó, chủng IFO 13.106 còn có tác dụng diệt các chủng vi khuẩn Gram (-), Gram (+). Nghiên cứu này cũng công bố chất kháng sinh xác định được là  $\alpha$ -2-bioxalomycin, chất này ức chế sự tổng hợp DNA của vi khuẩn Herberich et al. (2001).

Bảng 1

**Hoạt tính đối kháng của chất thô chủng xạ khuẩn TB5.3 với vi sinh vật**

Vi sinh vật kiểm định	Vòng kháng khuẩn (mm)	Vi sinh vật kiểm định	Vòng kháng khuẩn (mm)
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	24,6 ± 0,1	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	28,6 ± 0,1
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	32,6 ± 0,1	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	24,5 ± 0,1
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	0	<i>S. aureus</i> ATCC 25923 (MRSA)	28,5 ± 0,1
<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	24,5 ± 0,1	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	21 ± 0,1
<i>E. coli</i> ATCC 25922	22,7 ± 0,1	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	16,8 ± 0,1
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	29,1 ± 0,1	<i>S. epidermidis</i> ATCC35984 (MRSE)	21,6 ± 0,1

**Khả năng gây độc tế bào**

Các chủng xạ khuẩn phân lập được từ hệ sinh thái biển ngoài khả năng sinh chất diệt khuẩn còn có tiềm năng cho sản xuất các loại thuốc chống ung thư. Trong nhiều công bố cho thấy, các chất có hoạt tính kháng sinh khi được thử nghiệm có khả năng gây độc với các dòng tế bào ung thư khác nhau Berdy (2005), Renu et al. (2008). Trong nghiên cứu này, hoạt chất thô của chủng TB5.3 gây độc với dòng tế bào ung thư M14 và Hela với giá trị IC<sub>50</sub> lần lượt là 29,56 và 29,93 µg/ml, không gây độc với dòng tế bào ung thư NCIH460 và dòng tế bào thận Hek293, kết quả trên Bảng 2.

Bảng 2

**Hoạt tính gây độc tế bào của chất kháng sinh từ chủng TB5.3**

Ký hiệu mẫu	Giá trị IC <sub>50</sub> trên các dòng tế bào (µg/ml)			
	Hek293	M14	HeLa	NCIH460
TB5.3	-	29,56	29,93	-

*Ghi chú:* (-) không có khả năng diệt tế bào

**III. KẾT LUẬN**

Chủng xạ khuẩn TB5.3 phân lập được từ vùng ngập mặn ven biển tỉnh Thái Bình có hoạt tính kháng vi khuẩn gây bệnh kháng thuốc MRSA, MRSE và chủng nấm bệnh *C. albicans* ATCC 10231. Hoạt chất thô của TB5.3 có khả năng gây độc với 2 dòng tế bào ung thư M14 và Hela với giá trị IC<sub>50</sub> lần lượt là 29,56 và 29,93 µg/ml, không có khả năng gây độc với dòng tế bào thận Hek293 và dòng tế bào ung thư NCIH460. Các kết quả này mở ra hướng nghiên cứu triển vọng về các chất có hoạt tính kháng khuẩn kháng thuốc và kháng ung thư từ xạ khuẩn biển Việt Nam.

*Lời cảm ơn:* Công trình thuộc đề tài “Nghiên cứu tuyển chọn các chất có hoạt tính kháng sinh mới dùng cho mục đích y dược từ vi sinh vật biển Việt Nam” (Cấp Viện Hàn lâm KHCN VN) và có sự dụng trang thiết bị của PTNTĐCNG.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. **Barry A. L., Thornsberry C.**, 1985. Susceptibility tests: diffusion test procedure. In *Manual of Clinical Microbiology*, 4th edn., eds. Ballows EA, Hawsler Jr. WJ, Shadomy HI. Washington DC: Am. Soc. Microbiol., ISBN 0-914826-65-4: 978-987.
2. **Berdy J.**, 2005. Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiototechnol.* (Tokyo), 58: 1-26.
3. **ChavanDilip V., Mulaje S. S., Mohalkar R. Y.**, 2013. A review on actinomycetes and their biotechnological application. *I. J. P. S. R.*, Vol 4 (5): 1730-1742.
4. **Herberich B., Kinugawa M., Vazquez A. and Williams R. M.**, 2001. Sequential Staudinger/Picket-Spengler cyclization strategy for the construction of tetrahydroisoquinolines of the bioxalomycin and ecteinascidin family of alkaloids. *Tetrahedron Letters*, 42: 543-546.
5. **Maskey R. P., Helmke E., Kayser O., Maier A., Fiebig H. H., Busche A. & Laatsch A., 2004.** Anti-Cancer and Antibacterial Trioxacarcins with High anti-malaria activity from a marine *Streptomyces* and their absolute stereochemistry.. *J. Antibiot.*, 57(12): 771-779.
6. **Inagaki F., Nunoura T., Nakagawa S., Teske A., Lever M., Lauer A., Suzuki M., Takai K., Delwiche M., Colwell F. S., Nealson K. H., Horikoshi K., D'Hondt S., Jorgensen B. B.**, 2006. *Biogeographical distribution and diversity of microbes in methane hydrate-bearing deep marine sediments on the Pacific Ocean Margin.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 103: 2815–2820.
7. **Lam K.**, 2006. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Curr. Opin. Microbiol.*, 9: 245-251.
8. **Renu S., Moniska K., Rup L.**, 2008. Bioactive compounds from marine actinomycetes. *Indian. J. Microbiol.*, 48: 410–431
9. **Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T.**, 1989. *Molecular cloning, A laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
10. **Shirling E. B., Gottlieb D.**, 1966. *International of systematic bacteriology: Method for characterization of Streptomyces species.* Department of Botany and Bacteriology Ohio Wesleyan University, Delaware, Ohio and Department of Plant Pathology University of Illinois, Urbana, Illinois.
11. **Stanley T., Williams M., E. Sharpe, and J. G. Holt**, 1989. *Bergey's Manual of Systematic bacteriology.* Williams & Wilkins Vol. 4 pp. 2452-2492.
12. **Van De Loosdrecht A. A., Beelen R. H., Ossenkoppelle G. J., Broekhoven M. G., Langenhuusen M. M.**, 1994. A tetrazolium- based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia. *J. Immunol. Methods.*, 14: 311-320.
13. [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

**ANTIBACTERIAL AND ANTICANCER ACTIVITY OF MARINE  
ACTINOMYCETE STRAIN *STREPTOMYCES VIRIDODIASTATICUS* TB5.3  
ISOLATED FROM MARINE COAST OF THAI BINH PROVINCE**

**Pham Thanh Huyen, Bach Thi Mai Hoa,  
Nguyen Phuong Nhue, Phi Quyet Tien, Le Gia Hy**

**SUMMARY**

Among the second metabolizes of marine actinomycetes, active substances of *Streptomyces* were used for various medical applications such as antibacterial and anticancer applications. In this paper, antibacterial and anticancer activity of *S. viridodiastaticus* TB5.3 is introduced. This strain was isolated from sediments of coastal region of Thai Binh province. Antimicrobial activity of crude extract of *S. viridodiastaticus* TB5.3 was examined with test microorganisms and yeast. In addition, *invitro* anticancer activity of crude extract was determined on cancer cell lines such as M14 and Hela with IC<sub>50</sub> value of 29.56 and 29.93 µg/ml, respectively. However, the crude extract did not show toxicity on Hek293 and NCIH460. Identification of this actinomycete strain was performed polyphasic taxonomic study based on phenotypic and genomic information. The results showed that the strain TB5.3 was identified as species *S. viridodiastaticus*. The strain TB5.3 could grow well in medium containing high salt with 5-7% NaCl (w/v). The optimum temperature values were 28-30°C and optimum pH values were 7-8. The antibacterial and anticancer activities of this strain can be further researched as precursors for drug production from marine actinomycetes of Vietnam.