

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ
CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Nguyễn Quang Vinh

**NGHIÊN CỨU TẠO CHỦNG *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*
TÁI TỔ HỢP NHẪM TĂNG CƯỜNG HIỆU SUẤT TỔNG HỢP
PYOCYANIN ĐỊNH HƯỚNG ỨNG DỤNG TRONG
NUÔI TRỒNG THỦY SẢN**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG

Ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 9 42 02 01

Hà Nội – 2025

Công trình được hoàn thành tại: Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Người hướng dẫn khoa học 1: TS. Nguyễn Chí Thuận

Người hướng dẫn khoa học 2: TS. Nguyễn Hoàng Uyên

Phản biện 1: PGS. TS. Nguyễn Văn Giang

Phản biện 2: PGS.TS. Vũ Thị Thu Thủy

Phản biện 3: PGS. TS. Bùi Thị Việt Hà

Luận án được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện, họp tại Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam vào hồi ... giờ ..., ngày ... tháng ... năm 202...

Có thể tìm hiểu luận án tại:

1. Thư viện Học viện Khoa học và Công nghệ
2. Thư viện Quốc gia Việt Nam

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của luận án

Pyocyanin là một hoạt chất sinh học tự nhiên được sinh ra bởi vi khuẩn Gram âm *Pseudomonas aeruginosa*. Pyocyanin với đặc tính kháng khuẩn, không gây độc trên đối tượng sử dụng và có thể phân hủy trong tự nhiên nên hoạt chất này có nhiều ứng dụng trong kiểm soát sinh học đặc biệt trong lĩnh vực nuôi trồng thủy sản. Việc sử dụng pyocyanin được tách chiết không chứa xác tế bào vi khuẩn là cách tiếp cận có thể loại bỏ rủi ro mắc bệnh do vi khuẩn *P. aeruginosa*. Do vậy, pyocyanin là hoạt chất sinh học từ vi sinh vật có tiềm năng ứng dụng như một chất kháng khuẩn nhằm hạn chế và thay thế các chất kháng sinh đang được sử dụng quá mức trong ngành nuôi trồng thủy sản. Tuy nhiên, hiệu suất tổng hợp pyocyanin từ các chủng vi khuẩn tự nhiên còn hạn chế, do đó việc tăng cường khả năng sinh tổng hợp pyocyanin, tạo ra các chủng năng suất cao là hướng nghiên cứu được quan tâm. Trong nghiên cứu này, việc tăng cường sự biểu hiện của các gen chính tham gia vào quá trình tổng hợp pyocyanin của vi khuẩn *P. aeruginosa* được sử dụng nhằm tạo chủng có hiệu suất tổng hợp pyocyanin cao. Hai gen *phzM* và *phzS* đã được tách dòng từ chủng vi khuẩn thực địa sinh pyocyanin cao và nối vào vector pUCP24 đặt dưới sự điều khiển phiên mã bởi promoter *Lac* và được chuyển trở lại chủng để tăng cường sự biểu hiện của hai gen trong chủng vi khuẩn chọn lọc. Chủng vi khuẩn tái tổ hợp được nuôi trong các điều kiện, môi trường khác nhau nhằm lựa chọn điều kiện thích hợp cho quá trình tăng sinh pyocyanin của chủng tái tổ hợp. Pyocyanin thu được từ chủng tái tổ hợp được chứng minh tiềm năng ứng dụng trong nuôi trồng thủy sản thông qua đánh giá khả năng kháng một số vi sinh vật kiểm định, *Vibrio* gây bệnh trên tôm như *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*.

Từ nhu cầu cấp thiết của thực tế và cách tiếp cận được trình bày như trên, đề tài nghiên cứu với tên “**Nghiên cứu tạo chủng *Pseudomonas aeruginosa* tái tổ hợp nhằm tăng cường hiệu suất tổng hợp pyocyanin định hướng ứng dụng trong nuôi trồng thủy sản**” đã được tiến hành với các mục tiêu và nội dung nghiên cứu cụ thể như sau:

2. Mục tiêu nghiên cứu của luận án

- Phân lập được chủng *Pseudomonas aeruginosa* có khả năng sinh pyocyanin và tạo được chủng vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* tái tổ hợp mang thêm gen *phzM* và *phzS* để tăng cường tổng hợp pyocyanin;
- Nghiên cứu được phương pháp chiết, thu hồi pyocyanin và xác định được đặc điểm của pyocyanin thu được;
- Đánh giá được hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định và kháng *Vibrio* gây bệnh trên tôm của pyocyanin định hướng ứng dụng trong nuôi trồng thủy sản.

3. Các nội dung nghiên cứu chính của luận án

- Phân lập chủng vi khuẩn có khả năng sinh pyocyanin từ thủy sản và bùn, nước ao nuôi trồng thủy sản;
- Nghiên cứu tạo chủng vi khuẩn *P. aeruginosa* PS39-phzMS tái tổ hợp mang thêm hai gen *phzS* và *phzM* để tăng cường tổng hợp pyocyanin;
- Nghiên cứu phương pháp chiết, tinh chế pyocyanin từ *P. aeruginosa* PS39-phzMS;
- Nghiên cứu đặc điểm kháng khuẩn của pyocyanin;
- Nghiên cứu lựa chọn các điều kiện nuôi cấy để sinh tổng hợp pyocyanin bởi *P. aeruginosa* PS39-phzMS.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. Vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* và pyocyanin

P. aeruginosa có thể có nhiều hình thái khuẩn lạc khác nhau. Đa số các khuẩn lạc có dạng phẳng mọc lan trên bề mặt thạch và thường tạo hai sắc tố hòa tan là pyocyanin có màu xanh lam khuẩn lạc có màu xanh tương ứng và pyoverdin hay còn gọi là chất sinh sắc tố huỳnh quang làm cho khuẩn lạc có màu vàng xanh. Khi chủng *P. aeruginosa* tạo ra cả hai sắc tố cùng một lúc làm cho khuẩn lạc có màu xanh biến ngả sang màu xanh lá. Chủng này còn có thể sinh các sắc tố tan trong nước khác như pyorubrin hoặc pyomelanin làm cho khuẩn lạc có màu đỏ hoặc màu nâu tương ứng. Pyocyanin là hợp chất tự nhiên thứ cấp, dị vòng chứa Nitơ, màu xanh lá cây được sinh ra bởi vi khuẩn gram âm *Pseudomonas aeruginosa*. Pyocyanin đã được ứng dụng dùng cho chữa trị bệnh trong thủy sản nhằm làm giảm hiện tượng kháng kháng sinh ở vi khuẩn, giảm mức độ tồn dư trong thủy sản. Nghiên cứu về tính kháng khuẩn của pyocyanin từ *P. aeruginosa* phân lập từ môi trường biển đã cho thấy gần 90-95% khả năng ức chế vi khuẩn của các chủng *P. aeruginosa* là do pyocyanin. Pyocyanin có khả năng kháng lại các loài vi khuẩn gây bệnh như *Salmonella paratyphi*, *E. coli* và *Klebsiella* gây bệnh viêm phổi.

1.2. Chuyển gen mã hóa protein tham gia vào quá trình tăng sinh pyocyanin

Các gen nằm trên locus tham gia vào chuyển hóa sinh học phenazine đã được xác định và đọc trình tự từ các chủng *P. fluorescens* và *P. aeruginosa*. Locus này gồm một operon *PhzABCDEFG* bao gồm bảy gen, đóng vai trò chính chuyển hóa axit chorismic thành PCA. Hai chủng *P. aureofaciens* và chủng *P. fluorescens* đều chứa 1 operon *PhzABCDEFG*

trong khi đó chủng *P. aeruginosa* lại có chứa 2 operon *Phz1* (*PhzA1B1C1D1E1F1G1*) và *Phz2* (*PhzA2B2C2D2E2F2G2*), cả hai operon này đều mã hóa enzyme tổng hợp PCA, dẫn đến khả năng sinh tổng hợp của PCA của chủng này hiệu quả hơn các chủng vi khuẩn khác. Điều này dẫn đến khả năng sinh pyocyanin của chủng *P. aeruginosa* hơn hẳn các chủng vi khuẩn khác do PCA là tiền chất trung tâm cuối cùng để tổng hợp ra pyocyanin. Pyocyanin được tổng hợp từ tiền chất PCA bằng hai bước tổng hợp được chịu trách nhiệm bởi hai enzyme được mã hóa từ hai gen *PhzM* và *PhzS*. Trong quá trình này, *PhzM* dường như hoạt động trước chuyển hóa PCA thành 5-methyl-PCA, tiếp nối sau đó có sự tham gia chuyển hóa của *PhzS* để tổng hợp thành pyocyanin. *P. aeruginosa* sinh tổng hợp pyocyanin với điều kiện bắt buộc phải có sự tham gia của hai enzyme nối tiếp nhau *PhzM* và *PhzS*. Đây là cơ sở để nghiên cứu tăng cường khả năng sinh tổng hợp pyocyanin bằng phương pháp chuyển gen. Việc phát triển các dòng vector mới để có thể nhân bản ổn định trong các chủng vi khuẩn khác nhau nhằm tạo công cụ cho các nghiên cứu tiếp theo đóng vai trò quan trọng trong chuyển gen. Vector plasmid pUCP24 được phát triển từ pUCP18/19 có khả năng mang gen chức năng đồng thời nhân bản trong cả hai vật chủ là *E. coli* và *P. aeruginosa*.

1.3. Các yếu tố ảnh hưởng đến sự sinh tổng hợp pyocyanin bởi *Pseudomonas aeruginosa*

Môi trường KingA là môi trường kinh điển tối ưu cho *P. aeruginosa* sinh tổng hợp pyocyanin do môi trường này ức chế *P. aeruginosa* sinh tổng hợp các chất sinh sắc tố khác. Việc bổ sung thành phần như acid amin alanine và glycerol vào môi trường KingA đã mang lại hiệu quả cao cho hiệu suất tổng hợp pyocyanin. Một số tác giả đã áp dụng các phương pháp tối ưu sử dụng các mô hình thống kê nhằm lựa chọn các yếu tố có ảnh hưởng chính

đến quá trình sinh tổng hợp pyocyanin bởi *P. aeruginosa* và tìm ra điều kiện tối ưu nhằm tăng hiệu suất của quá trình này. Việc bổ sung dung môi và chất hoạt động bề mặt đã được chứng minh có khả năng tăng sinh pyocyanin bởi *P. aeruginosa*. Phương thức lên men có bổ sung dung môi, chất hoạt động bề mặt, có thể sử dụng cho các hình thức lên men vi sinh vật thu các hoạt chất thứ cấp một cách hiệu quả. Nhiều loại chất bổ sung khác nhau được sử dụng trong quá trình nghiên cứu tối ưu quá trình sinh tổng hợp sắc tố của *P. aeruginosa*. Bên cạnh các thành phần môi trường cơ bản là nguồn cung cấp carbon và nitrogen, các chất bổ sung khác đóng vai trò như chất cảm ứng, chất kích thích cho quá trình này. Một số hợp chất đã được nghiên cứu như các loại dầu gồm dầu thực vật ví dụ như dầu ô liu, dầu thô, các chất chiết thực vật hay phụ phế phẩm của các quy trình công nghiệp

CHƯƠNG 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu và hóa chất

Các mẫu nước nuôi thủy sản, mẫu tôm và cá được thu thập từ tháng 1 đến tháng 3 năm 2017 tại Quảng Ninh, Ninh Bình và Nam Định là nguồn để phân lập chủng vi khuẩn có khả năng sinh pyocyanin). Các chủng thuộc Bộ sưu tập của phòng Công nghệ sinh học tái tạo môi trường-Viện Công nghệ sinh học: 10 chủng kí hiệu : PS5, PS8, PS9, PS10, PS12, PS39, PS40, PS41, PS42, PS43 được phân lập từ các mẫu nước, bùn ao nuôi tôm tại các tỉnh Quảng Ninh, Nam Định; Các chủng vi khuẩn *Vibrio* spp. : *V. parahaemolyticus* VpKG12T1; *V. parahaemolyticus* VpST22T; *V. parahaemolyticus* VpCMT31; *V. harveyi*harveyi Vh3; và *V. alginolyticus* Val. Tế bào *E. coli* TOP10, *E. coli* BL21 và *E. coli* Rosetta, được sử dụng trong nghiên cứu kiểm tra sự hoạt động của gen *phzS*, *phzM* trong vector pUCP24. Plasmid pUCP24 là quà tặng của Giáo sư Schweizer, Đại học Florida, Mỹ.

2.2. Phương pháp vi sinh vật

2.2.1. Phương pháp phân lập vi khuẩn sinh pyocyanin

Nước nuôi thủy sản, các xoang tiêu hóa của tôm cá được nghiền kỹ và được pha loãng và nuôi trên đĩa thạch KingA và ủ ở 30°C. Sau 24 giờ, quan sát và chọn những khuẩn lạc có màu xanh và làm đổi màu môi trường sang xanh để cấy chuyển liên tục nhằm tạo chủng thuần khiết.

2.2.2. Phương pháp nhuộm Gram và chụp ảnh kính hiển vi điện tử quét

Nhuộm Gram được tiến hành theo phương pháp Hucker cải tiến, hình thái tế bào vi khuẩn được quan sát và ghi lại hình ảnh dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM – Hitachi S-4800, Nhật)

2.2.3. Định danh vi khuẩn theo các phương pháp sinh hóa

Phương pháp được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất bộ Kit API 20NE (BioMérieux, Pháp).

2.2.4. Xác định gen đặc trưng loài PA 956 của *P. aeruginosa*

Sử dụng cặp mồi PA-F và PA-R đặc hiệu để khuếch đại đoạn gen PA có chiều dài 956 bp ở các chủng vi khuẩn phân lập, có độ đặc hiệu và độ nhạy 100% với chủng *P. aeruginosa*.

2.2.5. Xây dựng cây phát sinh loài

Cây phát sinh chủng loại được xây dựng bằng phần mềm MEGA 7 theo phương pháp Neighbor - Joining, giá trị bootstrap với số lặp lại (replicate) là 1000 lần.

2.2.6. Xác định hoạt tính enzyme ngoại bào

Môi trường nuôi cấy và đĩa thạch thử hoạt tính được chuẩn bị với các cơ chất đặc hiệu cho từng loại enzyme ngoại bào như amylase, protease, gelatinase, lipase. Cây chấm điểm vi khuẩn lên các môi trường cơ chất tương

úng, ủ đĩa ở 30°C qua đêm, sau đó quan sát kết quả thí nghiệm.

2.3. Thiết kế vector biểu hiện và biểu hiện gen

2.3.1. Tách chiết DNA tổng số của vi khuẩn

DNA tổng số được tách chiết theo hướng dẫn của bộ Kit Genomic DNA Purification (Thermo Scientific).

2.3.2. Phương pháp điện di kiểm tra DNA

DNA tổng số, sản phẩm PCR, plasmid và các sản phẩm cắt giới hạn được kiểm tra và xác định trên gel agarose với nồng độ 1-2% agarose theo phương pháp của Sambrook và đồng tác giả.

2.3.3. Phương pháp tách dòng và xác định trình tự gen *phzM* và *phzS*

Hai gen *phzM* và *phzS* của chủng vi khuẩn *P. aeruginosa* PS39 được khuếch đại với các cặp mồi lần lượt là *phzM*-F, *phzM*-R và *phzS*-F, *phzS*-R.

DNA tinh sạch của gen *phzM* và *phzS* được tạo dòng vào vector pJET1.2 theo hướng dẫn của bộ kit CloneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas). Plasmid tái tổ hợp nhận được từ tế bào *E. coli* được sử dụng để giải trình tự gen theo phương pháp Sanger. So sánh trình tự gen nhận được với các trình tự gen *phzM* và *phzS* khác trên GenBank để đánh giá mức độ tương đồng (bằng chương trình BLAST trên NCBI- <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/BlastAlign.cgi>).

2.3.4. Phương pháp tạo plasmid tái tổ hợp pUCP24-*phzMS*

Vector pUCP24 được tạo đầu bằng nhử cắt với enzyme *Sma*I. Sản phẩm sau khi nối được biến nạp vào tế bào *E. coli* Top10 theo phương pháp của Sambrook, được trải trên đĩa LB có chứa 5 µg/mL gentamycin. Vector pUCP24-*phzM* sau đó được cắt bởi hai enzyme giới hạn *Xba*I và *Sph*I. Gen *phzS* sau đó được cắt bằng enzyme hạn chế *Xba*I và *Sph*I. Sản phẩm sau

cắt được tinh sạch lại và được nối ghép để tạo thành vector pUCP24-phzMS bằng enzyme T4 DNA ligase. Sản phẩm sau khi ghép gen được chuyển biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* Top10 để tách dòng và chọn dòng plasmid. Plasmid thu nhận sau tách chiết được cắt với enzyme giới hạn *EcoRI* và *HindIII* để kiểm tra sự có mặt của *phzS* và PCR khuếch đại gen *phzM* bằng cặp mồi M13F, phzM-R. Vector pUCP24-phzMS được giải trình tự trên hệ thống giải trình tự gen thế hệ mới nhằm kiểm tra toàn bộ operon biểu hiện của gen phzMS trong vector. Vector sau giải trình tự được đăng ký trên ngân hàng gen mã số MZ399165.1.

2.3.5. Kiểm tra sự biểu hiện của *phzM*, *phzS* trong *E. coli*

Trong nghiên cứu này, để kiểm tra sự biểu hiện của gen trong vector pUCP24-phzMS chúng tôi đã chọn phương án kiểm tra gián tiếp thông qua sự biểu hiện của gen trong *E. coli*.

Plasmid tái tổ hợp pUCP24-phzMS được biến nạp vào tế bào *E. coli* BL21 (DE3), *E. coli* Rosetta và thực hiện kiểm tra biểu hiện của vector.

Điện di biến tính protein thu được trên gel polyactylamide-SDS.

2.3.6. Tạo chủng tái tổ hợp *P. aeruginosa* PS39 mang plasmid pUCP24-phzMS

Tế bào khả biến *P. aeruginosa* PS39 được chuẩn bị mới cho biến nạp bằng xung điện. Biến nạp plasmid tái tổ hợp pUCP24-phzMS vào tế bào *P. aeruginosa* PS39 bằng xung điện.

2.3.7. Kiểm tra sự có mặt của plasmid tái tổ hợp pUCP24-phzMS trong chủng tái tổ hợp

Plasmid thu nhận sau tách chiết được cắt với enzyme giới hạn *EcoRI* và *HindIII* để kiểm tra sự có mặt của *phzS* và PCR khuếch đại gen *phzM* bằng cặp mồi M13F; phzM-R.

2.3.8. Giải trình tự plasmid pUCP24-phzMS để kiểm tra cassette biểu hiện phzMS bằng hệ thống giải trình tự thế hệ mới

2.3.9. Phương pháp bảo quản và nuôi cấy chủng giống

2.4. Phương pháp nghiên cứu tách chiết, tinh chế pyocyanin

2.4.1. Nuôi cấy chủng *P. aeruginosa* PS39-phzMS để thu dịch lên men cho tách chiết pyocyanin

2.4.2. Phương pháp định lượng pyocyanin

Dịch nuôi vi khuẩn (1 mL) được bổ sung thêm chloroform theo tỷ lệ 1:1 về thể tích (1 dịch:1 chloroform). Hỗn hợp dịch nuôi và chloroform được lắc đều, ly tâm 5000 vòng/phút trong 10 phút. Pha dưới chloroform chứa pyocyanin (0,6 mL) được chuyển sang ống mới. Sau đó, 0,6 mL 0,2M HCl được bổ sung vào mẫu, lắc đều, sau đó để tĩnh để phân pha. Pha trên màu đỏ được thu lại và đo độ hấp thụ ánh sáng tại bước sóng 520 nm. Hàm lượng pyocyanin xác định theo công thức: pyocyanin ($\mu\text{g/mL}$) = OD520 x độ pha loãng x 17,072, trong đó 17,072 là hệ số hấp thụ.

2.4.3. Phương pháp tách chiết và định lượng PCA

Hàm lượng PCA trong dịch nuôi cấy tế bào vi khuẩn được xác định theo phương pháp của Mavrodi.

2.4.4. Lựa chọn dung môi tách chiết pyocyanin

Các dung môi hữu cơ khác nhau được sử dụng cho chiết xuất pyocyanin từ mẫu nuôi cấy *P. aeruginosa* PS39-phzMS bao gồm benzene, chloroform, methanol, hexane, diclometan, và ethylacetate.

2.4.5. Các phương pháp xác định độ tinh sạch của pyocyanin

Độ tinh sạch của phân đoạn chiết xuất pyocyanin được đánh giá bằng kỹ thuật sắc ký bản mỏng, sắc ký lỏng hiệu năng cao và UV-Vis.

2.5. Phương pháp xác định đặc tính kháng khuẩn của pyocyanin

2.5.1. Thử nghiệm hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định (VSVKĐ) và *Vibrio*

2.5.2. Phương pháp xác định nồng độ diệt khuẩn tối thiểu của pyocyanin

2.5.3. Phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch

2.6. Phương pháp xác định điều kiện nuôi cấy chủng tái tổ hợp sinh pyocyanin

2.6.1. Lựa chọn môi trường nuôi cấy

Trong nghiên cứu này, KingA và KingA thay đổi đã được thử nghiệm để chọn được môi trường thích hợp cho sinh tổng hợp pyocyanin bởi *P. aeruginosa* PS39-phzMS. Nồng độ của glutamic acid trong môi trường lựa chọn GM được thay đổi để kiểm tra ảnh hưởng của nó đối với việc sản xuất pyocyanin.

2.6.2. Phương pháp nghiên cứu ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy

Các yếu tố hóa lý ảnh hưởng đến sinh tổng hợp sắc tố pyocyanin như pH, nhiệt độ, thời gian và tốc độ lắc *P. aeruginosa* PS39-phzMS được nghiên cứu nhằm tăng khả năng sản sinh pyocyanin.

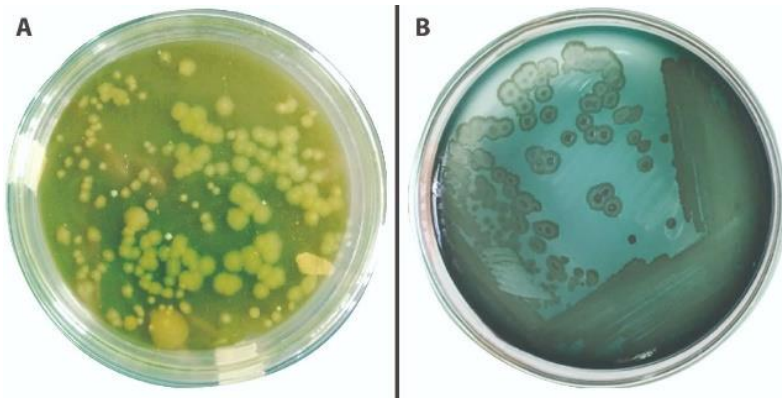
2.7. Phương pháp phân tích số liệu

Dữ liệu được phân tích bằng phần mềm GraphPad Prism 6.01, phân tích ANOVA, hoặc t-test với $p < 0,05$ được cho là có sự khác biệt mang tính thống kê. Dữ liệu được thể hiện bằng giá trị trung bình (mean) và độ lệch chuẩn (standard deviation-SD) trong biểu đồ cột, biểu đồ đường hoặc bảng.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Phân lập và sàng lọc vi khuẩn *Pseudomonas* sinh pyocyanin

Trong số 28 chủng (18 chủng mới phân lập, 10 chủng thuộc Bộ sưu tập) phân lập được chúng tôi đã chọn được 9 chủng có khuẩn lạc màu xanh trên môi trường KingA (Hình 3.1), làm đổi màu thành xanh ở môi trường KingA lỏng và định lượng pyocynin được tổng hợp. Nồng độ pyocyanin sinh ra bởi các chủng vi khuẩn trong khoảng từ $6,01 \pm 1,2$ $\mu\text{g/mL}$ đến $15,02 \pm 0,56$ $\mu\text{g/mL}$, trong đó chủng PS39 có khả năng sinh pyocyanin cao nhất đạt $15,02 \pm 0,56$ $\mu\text{g/mL}$.



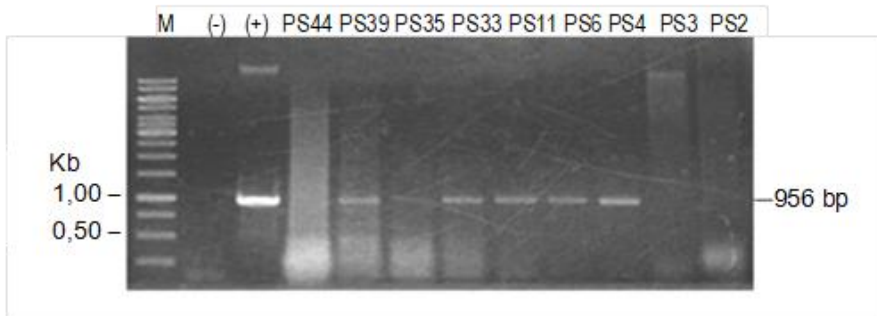
Hình 3.1. Phân lập vi khuẩn sinh pyocyanin trên môi trường KingA. A. Đĩa nuôi cấy trên môi trường King A của mẫu xoang tiêu hóa tôm thu tại Ninh Bình; B.

Chủng PS6 được phân lập, làm thuần từ mẫu xoang tiêu hóa tôm.

Kết quả cho thấy gen *PA* đã được khuếch đại từ các chủng vi khuẩn PS4, PS6, PS11, PS33, PS35, PS39 với kích thước khoảng 1000 bp đúng theo lý thuyết (Hình 3.2). Các đoạn gen này được khuếch đại đặc hiệu. Vì vậy các chủng PS4, PS6, PS11, PS33, PS35, PS39 rất có thể là chủng thuộc loài *P. aeruginosa*. Ngoài ra một số chủng phân lập không xuất hiện bằng

DNA kích thước khoảng 1 kb là PS2, PS3, PS44. Các chủng này có thể không đúng là *P. aeruginosa* cần phân lập.

Đặc điểm sinh hóa của chủng PS39 tương đồng với đặc điểm sinh hóa của chủng chuẩn *P. aeruginosa* ATCC27853. Kết quả so sánh trình tự gen 16S rRNA của chủng PS39 với các chủng vi khuẩn khác trên Genbank cho thấy độ tương đồng cao nhất đạt 99,8% với gen từ chủng *Pseudomonas aeruginosa* CNEB4 mã số MZ648186.1. Kết hợp đặc điểm hình thái, sinh hóa và gen chỉ thị PA cho loài *P. aeruginosa*, có thể khẳng định chủng PS39 thuộc chi *P. aeruginosa* và được đặt tên là *Pseudomonas aeruginosa* PS39.



Hình 3.2. Điện di đồ phân tích sản phẩm PCR đoạn gen PA 956 bp của 9 chủng sinh pyocyanin cao trên gel agarose 0,8%. M: Thang chuẩn DNA 1kb (GeneRular 1 kb DNA ladder, ThermoFisher), (-): chứng âm; (+): DNA của chủng vi khuẩn *P. aeruginosa* (Bộ sưu tập phòng CNSH tái tạo môi trường)

3.2. Nghiên cứu tạo chủng tái tổ hợp *P. aeruginosa* PS39 mang thêm bản sao gen *phzM* và *phzS* trong plasmid

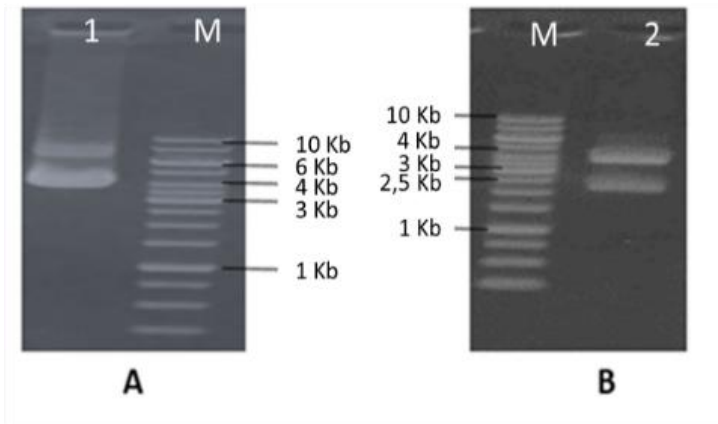
3.2.1. Phân lập, tách dòng gen *phzM* và *phzS* từ *P. aeruginosa* PS39

Sản phẩm PCR hai gen *phzM* và *phzS* được tái tổ hợp vào vector pJET1.2 tạo vector tái tổ hợp pJET1.2-*phzM* và pJET1.2-*phzS*. Gen *phzM*

được đăng ký trên ngân hàng gen với mã số MF673740. Gen *phzS* đã được đăng ký trên ngân hàng gen với mã số MF770713.

3.2.2. Thiết kế vector pUCP24-*phzMS* mang hai gen *phzM* và *phzS*

Để tạo plasmid tái tổ hợp pUCP24-*phzM*, vector pUCP24 được cắt mở vòng với enzyme giới hạn *SmaI*. Sản phẩm cắt được làm sạch và gắn với gen *phzM* đã được tạo đầu bằng. Để tạo plasmid tái tổ hợp chứa cả hai gen *phzM* và *phzS*, sản phẩm PCR gen *phzS* và plasmid pUCP24-*phzM* đều được cắt bằng hai enzyme giới hạn *XbaI* và *SphI*. Sản phẩm cắt được tinh sạch và được sử dụng trong phản ứng gắn gen *phzS* vào pUCP24-*phzM* với sự có mặt của enzyme T4 DNA ligase. Qua quá trình kiểm tra có thể khẳng định vector pUCP24-*phzMS* đã được thiết kế thành công (Hình 3.13).

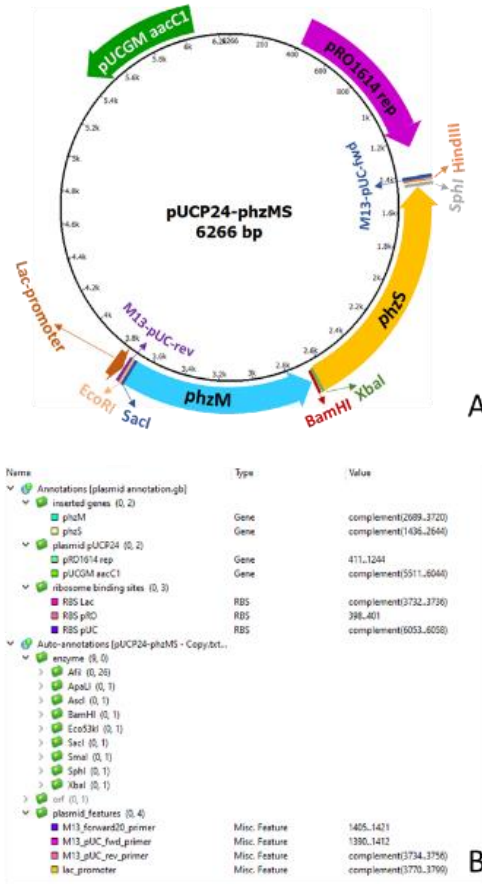


Hình 3.13. Điện di dò kiểm tra plasmid pUCP24-*phzMS* sau tách chiết (A) và cắt bằng với *EcoRI* và *HindIII* (B) trên gel agarose 0,8%.

M: thang chuẩn DNA (O'GeneRuler 1Kb DNA Ladder- ThermoScientific).

Để chắc chắn việc thiết kế không ảnh hưởng đến gen và cassette biểu hiện của gen, plasmid pUCP24-*phzMS* đã được giải trình tự trên hệ thống

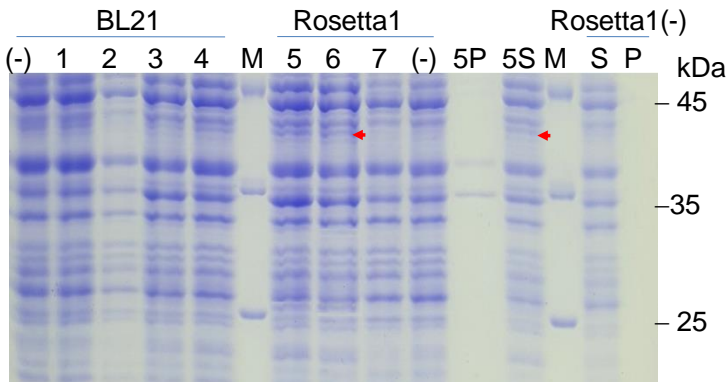
giải trình tự gen thế hệ mới. Kết quả trình tự nhận được đã xác nhận và làm rõ vị trí của gen *phzM* và *phzS* cũng như sự có mặt của các yếu tố cần thiết cho biểu hiện của 2 gen, tồn tại trong cấu trúc plasmid (Hình 3.14).



Hình 3.14. Chú giải plasmid tái tổ hợp pUCP24-phzMS. Sơ đồ plasmid pUCP24-phzMS (A) và chú giải chi tiết các thành phần của plasmid (B) (thực hiện bởi phần mềm UGENE v.39).

3.2.3. Kiểm tra khả năng biểu hiện của hai gen *phzM* và *phzS* trong vector tái tổ hợp pUCP24-*phzMS*

Trước khi plasmid được đưa vào chủng chủ *P. aeruginosa* PS39, chúng tôi đã tiến hành kiểm tra sự hoạt động của toàn bộ cassette biểu hiện thông qua việc biểu hiện gen *phzM* và *phzS* trong tế bào *E. coli*. Từ kết quả thu được (Hình 3.16) có thể cho rằng, promoter *lac* trong vector pUCP24-*phzMS* đã hoạt động và rất có thể đã sinh tổng hợp ra PhzS, PhzM. Vì vậy cấu trúc vector pUCP24-*phzMS* có thể khẳng định là hoàn thiện cho việc biến nạp vào chủng *P. aeruginosa* PS39.

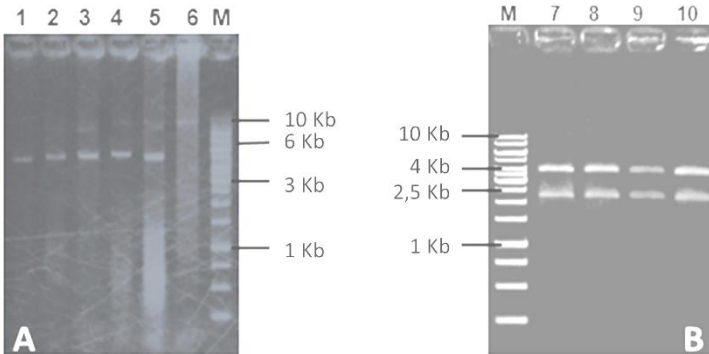


Hình 3.16. Phân tích protein tổng số, protein pha tan, không tan được biểu hiện trong hai chủng *E. coli* BL21 và Rosetta mang pUCP24-*phzMS*.

3.2.4. Tạo chủng *P. aeruginosa* PS39 tái tổ hợp mang vector pUCP24-*phzMS*

Plasmid pUCP24-*phzMS* thu nhận từ thí nghiệm trước được sử dụng để biến nạp vào tế bào chủ *P. aeruginosa* PS39 bằng kỹ thuật xung điện. Để kiểm tra sơ bộ sự có mặt của hai gen *phzM* và *phzS* trong pUCP24-*phzMS*, các plasmid tái tổ hợp được cắt đồng thời với hai enzyme giới hạn

EcoRI và *HindIII*. Điện di đồ sản phẩm cắt giới hạn (Hình 3.17B) cho thấy plasmid đã được cắt thành công tạo hai băng DNA rõ nét tương ứng với kích thước khoảng 2,2 kb và 4 kb khi so sánh với thang chuẩn DNA. Như vậy có thể khẳng định đã biến nạp thành công plasmid tái tổ hợp pUCP24-phzMS vào chủng *P. aeruginosa* PS39 và chủng biến đổi di truyền được gọi là *P. aeruginosa* PS39-phzMS.



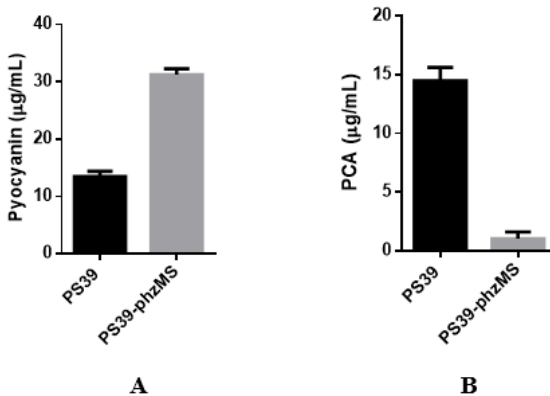
Hình 3.17. Điện di đồ kiểm tra sản phẩm cắt pUCP24-phzMS được tách từ *P. aeruginosa* PS39 tái tổ hợp trên gel agarose 0,8%. M-thang chuẩn DNA (O'GeneRuler 1Kb DNA Ladder- ThermoScientific); A) 1-5: Plasmid từ các dòng tế bào biến nạp *P. aeruginosa* PS39-phzMS; 6: DNA chủng *P. aeruginosa* PS39 gốc; B) 7-10: sản phẩm cắt plasmid pUCP24-phzMS của các dòng tế bào sau biến nạp với enzyme giới hạn *EcoRI* và *HindIII*.

Sự duy trì plasmid tái tổ hợp trong chủng vi khuẩn qua các lần nuôi cấy chuyển là yếu tố quan trọng để đánh giá độ ổn định của chủng tái tổ hợp. Trong nghiên cứu này, chủng tái tổ hợp *P. aeruginosa* PS39-phzMS được đánh giá, kiểm tra sự có mặt của plasmid pUCP24-phzMS liên tục qua 5 lần nuôi cấy chuyển. Kết quả kiểm tra sản phẩm cắt plasmid của lần nuôi cấy chuyển thứ 2 và thứ 5 cho thấy sản phẩm cắt plasmid gồm hai đoạn DNA với kích thước tương ứng.

3.3. Nghiên cứu phương pháp thu hồi, tinh sạch pyocyanin từ *P. aeruginosa* PS39-phzMS

3.3.1. Chọn dòng *P. aeruginosa* PS39-phzMS sinh pyocyanin cao

Khả năng tăng sinh pyocyanin của chủng tái tổ hợp sau khi xác định sự có mặt và tính toàn vẹn của cặp gen *phzM-phzS*, sẽ được đánh giá thông qua sự giảm hàm lượng tiền chất PCA và sự tăng hàm lượng pyocyanin thông qua việc nuôi cấy tế bào vi khuẩn chủng tự nhiên *P. aeruginosa* PS39 và chủng tái tổ hợp *P. aeruginosa* PS39-phzMS. Kết quả thể hiện, nồng độ PCA chiết xuất từ dịch nuôi cấy chủng tự nhiên *P. aeruginosa* PS39 là $14,48 \pm 1,14 \mu\text{g/mL}$, trong khi PCA chiết xuất từ dịch nuôi cấy chủng tái tổ hợp *P. aeruginosa* PS39-phzMS thấp hơn rất nhiều ($1,041 \pm 0,57 \mu\text{g/mL}$). Ngược lại, nồng độ pyocyanin được chiết xuất từ chủng tái tổ hợp tăng lên đến $31,22 \mu\text{g/mL}$, cao hơn 2 lần so với nồng độ pyocyanin được chiết xuất từ chủng tự nhiên ($13,47 \mu\text{g/mL}$) (Hình 3.21).

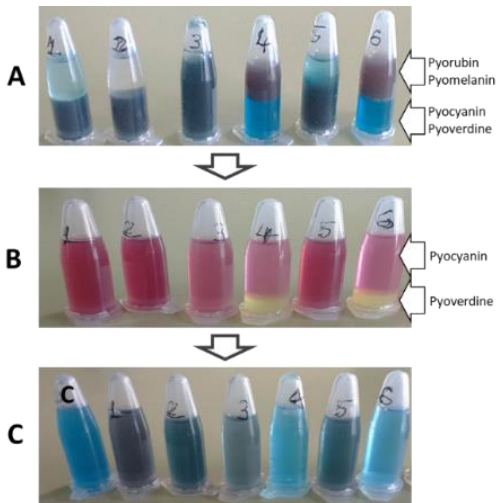


Hình 3.21. Hàm lượng pyocyanin (A) và PCA (B) được sản sinh bởi chủng tự nhiên *P. aeruginosa* PS39 và chủng tái tổ hợp *P. aeruginosa* PS39-phzMS. PS39: *P. aeruginosa* PS39; PS39-phzMS: *P. aeruginosa* PS39-phzMS. Sự khác biệt đáng kể được đánh giá bằng phân tích t-test với $p < 0,0001$.

3.3.2. Nghiên cứu tách chiết, tinh chế pyocyanin

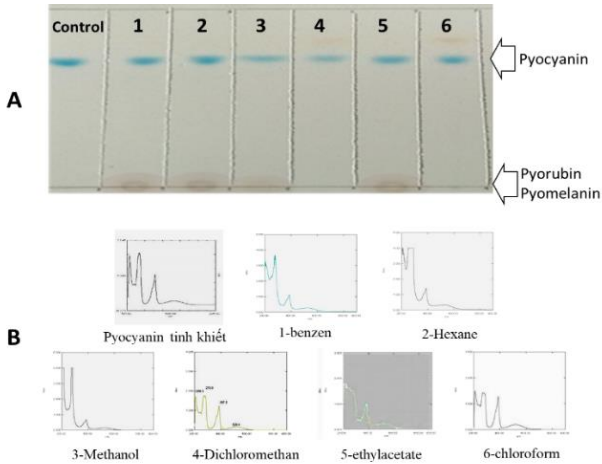
Chloroform là dung môi cho hiệu quả chiết xuất cao nhất với hàm lượng pyocyanin thu được đạt $25,27 \pm 1,02$ ($\mu\text{g/mL}$), tiếp đến là dichlometan đạt $20,26 \pm 0,87$ ($\mu\text{g/mL}$). Như vậy, chloroform là dung môi cho hiệu quả cao phù hợp để tách chiết pyocyanin từ dịch nuôi cấy vi khuẩn *P. aeruginosa* PS39-phzMS (Hình 3.22).

Kết quả phân tích đặc điểm phổ hấp thụ tử ngoại khả kiến UV-Vis của pyocyanin trong HCl 0,2N được tinh sạch từ chủng *P. aeruginosa* PS39-phzMS bởi 2 dung môi dichlometan và chloroform cho hiệu quả cao đạt độ tinh sạch tương tự pyocyanin đối chứng (Hình 3.23).



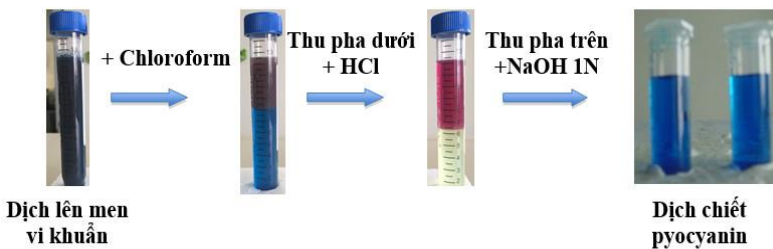
Hình 3.22. Tách chiết pyocyanin từ dịch nuôi cấy vi khuẩn *P. aeruginosa* PS39-phzMS với các dung môi khác nhau. (A) Sử dụng các dung môi khác nhau để phân tách pyocyanin (lớp màu xanh dưới cùng); (B) Acid hóa bằng HCl 0,2N; (C) Trung hoà bằng NaOH 1N. 0: PY0 đối chứng; 1: benzene; 2: hexane;

3: methanol; 4: dichloromethane; 5: ethylacetate; 6: chloroform.



Hình 3.23. Quang phổ UV-Vis của pyocyanin chiết tách sử dụng các dung môi khác nhau. A) Phổ TLC; B). DC: pyocyanin nguyên chất; 1: benzene; 2: hexane; 3: methanol; 4: dichlometan; 5: ethylacetate; 6: chloroform.

Từ kết quả khảo sát lựa chọn dung môi thích hợp cho tách chiết pyocyanin từ dịch nuôi cấy vi khuẩn, chloroform được sử dụng trong các nghiên cứu tiếp theo và trong xây dựng quy trình tách chiết và làm sạch sản phẩm pyocyanin (Hình 3.24).



Hình 3.24. Minh họa các bước chiết pyocyanin từ dịch nuôi cấy chủng *P. aeruginosa* PS39-phzMS

3.3.3. **Đánh giá độ sạch của pyocyanin**

Phân tích phổ UV-Vis của pyocyanin trong dung dịch HCl cho thấy pyocyanin được chiết bằng dichlometan và chloroform có phổ tương tự như pyocyanin tinh khiết. Thêm nữa, kết quả phân tích phổ khối lượng phân giải cao HRMS của pyocyanin chỉ ra khối lượng phân tử của hợp chất là $M = 210$ tương ứng với công thức phân tử $C_{13}H_{10}N_2O$ của pyocyanin.

3.4. **Đặc tính kháng khuẩn của pyocyanin**

3.4.1. **Khả năng kháng các vi sinh vật kiểm định của pyocyanin**

Kết quả cho thấy, sự tăng trưởng của các VSVKĐ gồm vi khuẩn Gram (+): *E. faecalis* ATCC 29212, *S. aureus* ATCC 25923, *B. cereus* ATCC 13245; vi khuẩn Gram (-): *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. enterica* ATCC 13076 bị ức chế hoàn toàn ở nồng độ ức chế tối thiểu MIC là 25 $\mu\text{g/mL}$. Đối với nấm men nồng độ ức chế tối thiểu là 6,25 $\mu\text{g/mL}$.

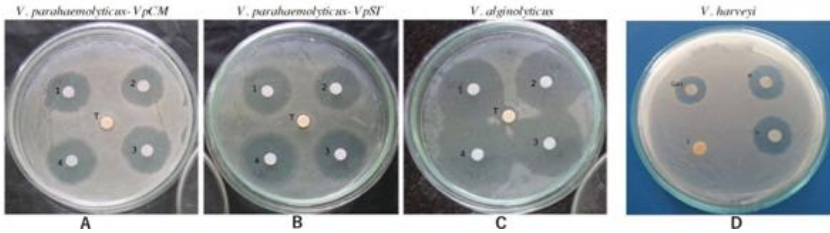
3.4.2. **Đánh giá khả năng kháng *Vibrio* spp. gây bệnh trên tôm của pyocyanin**

Các chủng gây bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm *V. parahaemolyticus* (VpKG12T1, VpST22T, VpCMT31) bị ức chế sinh trưởng hoàn toàn ở nồng độ tối thiểu ở 12,5 $\mu\text{g/mL}$, hai chủng gồm *V. harveyi* Vh3 và *V. alginolyticus* Val bị ức chế ở nồng độ 17,5 $\mu\text{g/mL}$.

Giá trị diệt khuẩn tối thiểu MBC đến 99,9% của dịch chiết pyocyanin đối với chủng VpCMT31, VpKG12T1 và VpST22T là 20 $\mu\text{g/mL}$; và đối với chủng Vh3 và Val là 25 $\mu\text{g/mL}$.

Pyocyanin có khả năng ức chế mạnh các chủng *Vibrio* spp. trong đó có các chủng *V. parahaemolyticus* VpKG12T1, VpST22T, VpCMT31 là các

chúng gây bệnh trên tôm. Trong giải nồng độ từ 6,5 – 13 $\mu\text{g}/\text{khoanh}$ giấy không có sự khác biệt nhiều trên một chủng, nhưng từ nồng độ 26 $\mu\text{g}/\text{khoanh}$ giấy đường kính vòng kháng khuẩn tăng lên rõ rệt và đạt khoảng 25 – 32 mm (Hình 3.29).



Hình 3.29. Minh họa khả năng kháng của pyocyanin với các chủng *Vibrio* spp. gây bệnh trên tôm: *V. parahaemolyticus* VpCMT3 (A), *V. parahaemolyticus* VpST22T (B), *V. alginolyticus* Val (C) và *V. harveyi* Vh3 (D). T – Tetracycline; Gen – Gentamycin; a, b, 1, 2, 3 và 4 – tương ứng các nồng độ của pyocyanin 0,406; 0,8125; 3,25; 6,5; 13; 26 $\mu\text{g}/\text{khoanh}$ giấy;

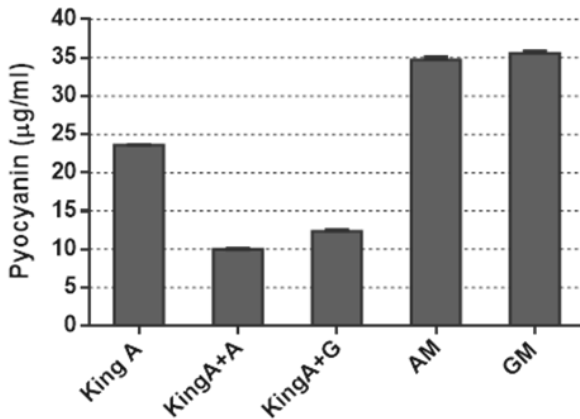
3.5. Nghiên cứu điều kiện nuôi thích hợp cho tăng sinh pyocyanin từ *P. aeruginosa* PS39-phzMS

3.5.1. Ảnh hưởng của các yếu tố hóa lý đến sinh tổng hợp pyocyanin bởi *P. aeruginosa* PS39-phzMS

Các yếu tố như nhiệt độ, pH, thời gian nuôi cấy và tốc độ lắc đã được nghiên cứu ảnh hưởng đến quá trình sinh tổng hợp pyocyanin. Kết quả cho thấy điều kiện tối ưu của chủng vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* PS39-phzMS mang hai gen *phz* tái tổ hợp để sản xuất PYO cho năng suất cao nhất là: pH 8, nhiệt độ 30°C, tốc độ lắc 200 v/phút; thời gian 120 giờ trong môi trường KingA bổ sung 1,5% axit glutamic.

3.5.2. Lựa chọn một số nguồn dinh dưỡng thích hợp cho sinh tổng hợp pyocyanin

Quan sát bình nuôi cấy trong quá trình phát triển cho thấy hai trong số năm môi trường thử nghiệm sinh sắc tố pyocyanin xanh lục đậm là AM và GM. Chúng là môi trường KingA trong đó peptone được thay thế tương ứng bằng Alanine và glutamic acid. Nồng độ pyocyanin sinh tổng hợp trên môi trường AM và GM lần lượt là $34,71 \pm 0,35 \mu\text{g}/\text{mL}$ và $35,57 \pm 0,26 \mu\text{g}/\text{mL}$; dữ liệu được trình bày trong Hình 3.34.



Hình 3.34. Ảnh hưởng của các thành phần môi trường đến sinh tổng hợp pyocyanin ở chủng *P. aeruginosa* PS39-phzMS. KingA: Môi trường KingA; KingA+A: KingA + Alanine; KingA+G: KingA + Glutamic acid; AM: KingA + Alanine không có peptone; GM: KingA + Glutamic acid không có peptone. Nồng độ pyocyanin được hiển thị bằng giá trị trung bình và độ lệch chuẩn, $t\text{-test}_{AM \text{ vs } GM}$: $p < 0,05$.

Ở nồng độ glutamic acid cao hơn 1% cho thấy khả năng tăng sinh pyocyanin tăng cao dần. Với nồng độ glutamic acid 1,5% khả năng tăng sinh pyocyanin cao nhất đạt $49,57 \pm 1,71 \mu\text{g}/\text{mL}$.

Thành phần của môi trường sinh pyocyanin phù hợp với *P. aeruginosa* PS39-phzMS là K_2SO_4 10 g/L; $MgCl_2 \cdot H_2O$ 3 g/L; glycerol 10 mL/L; gentamycin 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ và glutamic acid 15 g/L. Ở pH 8 và 30°C , sau 120 giờ nuôi cấy pyocyanin đạt mức cao nhất và cao hơn xấp xỉ 3 lần so với chủng tự nhiên *P. aeruginosa* PS39.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

1. Đã phân lập được 18 chủng và sàng lọc được 9 chủng vi khuẩn có khả năng sinh pyocyanin trong khoảng $6,01 \pm 1,2$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ đến $15,02 \pm 0,56$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ từ các mẫu thu thập và bộ sưu tập chủng của Phòng công nghệ sinh học tái tạo môi trường, Viện Công nghệ sinh học, trong đó chọn được một chủng PS39 tổng hợp pyocyanin cao nhất ($15,02 \pm 0,56$ $\mu\text{g}/\text{mL}$) được định danh thuộc loài *P. aeruginosa*.
2. Đã thiết kế thành công vector pUCP24-phzMS chứa 2 gen *phzM* (1000 bp, MF673740) và *phzS* (1200 bp, MF770713) được tách dòng từ chủng tự nhiên PS39 và được giải trình tự toàn bộ trên hệ thống giải trình tự thế hệ mới với mã số MZ399165.1. Sự hoạt động của operon lac mang hai gen *phzM* và *phzS* trong vector pUCP24-phzMS đã được kiểm tra trên dòng tế bào *E. coli*. Vector pUCP24-phzMS đã biến nạp thành công vào chủng tự nhiên PS39 tạo ra chủng tái tổ hợp *P. aeruginosa* PS39-phzMS tăng cường tổng hợp pyocyanin.
3. Pyocyanin được tách chiết thành công từ dịch nuôi cấy chủng vi khuẩn tái tổ hợp và chủng tự nhiên bằng dung môi chloroform với tỷ lệ thể tích 1 dung môi : 1 dịch nuôi cấy. Sản phẩm pyocyanin tạo ra (dạng dung dịch hoặc dạng bột) có màu xanh đặc trưng, có đặc tính phổ UV-Vis tương tự pyocyanin tinh khiết, có phổ khối lượng tương ứng công thức phân tử của pyocyanin ($C_{13}H_{10}N_2O$) và đạt độ tinh sạch 97% (HPLC).

4. Pyocyanin được chiết ra từ dịch nuôi cấy chủng tái tổ hợp *P. aeruginosa* PS39-phzMS có khả năng ức chế và diệt vi khuẩn *Vibrio* spp. gây bệnh trên tôm trong khoảng 12,5 - 17,5 $\mu\text{g/mL}$ và 20 - 25 $\mu\text{g/mL}$, tùy thuộc từng chủng. Pyocyanin cũng kháng các vi sinh vật kiểm định như *B. cereus* ATCC13245, *E. faecalis* ATCC299212, *S. aureus* ATCC25923, *E. coli* ATCC25922, *S. enterica* ATCC13076, *P. aeruginosa* ATCC27853 ở nồng độ ức chế tối thiểu 25 $\mu\text{g/mL}$ và với *C. albicans* ATCC10231 là 6,25 $\mu\text{g/mL}$.
5. Đã xác định được môi trường GM (pH 8) và các điều kiện nuôi cấy phù hợp gồm nhiệt độ thích hợp 30°C, với tốc độ lắc 200 vòng/phút trong thời gian 120 giờ cho sinh tổng hợp pyocyanin của chủng tái tổ hợp *P. aeruginosa* PS39-phzMS đạt năng suất cao nhất 49,57 \pm 1,71 $\mu\text{g/mL}$.

KIẾN NGHỊ

1. Nghiên cứu tối ưu quá trình lên men lượng lớn *P. aeruginosa* PS39-phzMS nhằm thu nhận pyocyanin với số lượng lớn nhằm thử nghiệm, ứng dụng trong thực tế;
2. Nghiên cứu mở rộng phổ kháng khuẩn của pyocyanin tập trung vào nhóm các vi sinh vật gây bệnh trên đối tượng nông nghiệp (cây trồng) và thủy hải sản.

NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

1. Đã chuyển gen vào chủng tự nhiên tạo được chủng vi khuẩn tái tổ hợp *Pseudomonas aeruginosa* PS39-phzMS mang plasmid pUCP24-phzMS tăng cường sản xuất pyocyanin cao hơn so với chủng tự nhiên;
2. Đã chọn lọc được môi trường và điều kiện nuôi cấy thích hợp để chủng tái tổ hợp sinh pyocyanin với năng suất cao.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ

- Nguyễn Quang Vinh**, Nguyễn Chí Thuận, Nguyễn Hoàng Uyên, Nguyễn Huyền Trang, Nguyễn Thị Thanh Lợi (2018). Tạo chủng tái tổ hợp *Pseudomonas aeruginosa* PS39 mang gen *phzM* và *phzS* tăng tổng hợp pyocyanin. Hội nghị khoa học Công nghệ Sinh học toàn quốc, 14-20
- Vinh, N. Q.**, Thuan, N. C., Uyen, N. H., and Loi, T. T. N (2022). Increased production of pyocyanin in recombinant *Pseudomonas aeruginosa* PS39-*phzMS* strain harboring plasmid pUCP24-*phzMS*. Tạp chí Công nghệ sinh học 20(1), 135-142.
- Vinh Quang Nguyen**, Uyen Hoang Nguyen, Thuan Chi Nguyen, Anh T.N Dao, Loi Thi Thanh Nguyen (2023). Effect of culture conditions on pyocyanin production by recombinant pyocyanin-producing strain *Pseudomonas aeruginosa* PS39-*phzMS*. Malaysian Journal of Microbiology, Vol 19(3) 2023, pp. 282-290.
- Trình tự gen đăng ký trên NCBI
 - Trình tự gen *phzM* được đăng ký trên NCBI GenBank với mã số là MF673740.
 - Trình tự gen *phzS* được đăng ký trên NCBI GenBank với mã số là MF770713.
 - Trình tự plasmid pUCP24-*phzMS* được đăng ký trên NCBI GenBank với mã số MZ399165.1.