

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

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG

Hà Nội - 2025

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

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG

Ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 9 42 02 01

Xác nhận của Học viện
Khoa học và Công nghệ

Người hướng dẫn 1

Người hướng dẫn 2

TS. Nguyễn Chí Thuận

TS. Nguyễn Hoàng Uyên

Hà Nội - 2025

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan:

Đây là công trình nghiên cứu của tôi và một số kết quả cùng cộng tác với các cộng sự khác.

Các số liệu, kết quả nêu trong luận án là trung thực, một phần đã được công bố trên các tạp chí khoa học chuyên ngành với sự đồng ý và cho phép của các đồng tác giả.

Các thông tin trích dẫn trong luận án đã được ghi rõ nguồn gốc.

Hà Nội, ngày 20 tháng 01 năm 2025



NCS. Nguyễn Quang Vinh

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin gửi lời cảm ơn sâu sắc đến TS. Nguyễn Chí Thuận và TS. Nguyễn Hoàng Uyên, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tận tình hướng dẫn, tạo mọi điều kiện tốt nhất về cơ sở vật chất cũng như động viên tôi trong những lúc khó khăn nhất để tôi thực hiện và hoàn thành luận án này.

Tôi xin chân thành gửi lời cảm ơn tới Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Công nghệ sinh học đã tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi được học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận án. Tôi xin cảm ơn tập thể cán bộ Phòng Công nghệ sinh học tái tạo môi trường đã tận tình giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện luận án. Tôi cũng xin chân thành cảm ơn PGS.TS. Đỗ Thị Huyền và tập thể cán bộ Phòng Kỹ thuật di truyền đã giúp đỡ tôi hoàn thiện luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn TS. Nguyễn Thị Thanh Lợi, chủ nhiệm đề tài cấp nhà nước: “Nghiên cứu sản xuất và ứng dụng chất diệt khuẩn sinh học pyocyanin thay thế kháng sinh trong nuôi tôm nước lợ” đã dành nhiều thời gian, công sức, tâm huyết hướng dẫn tôi từ những ngày đầu cho tới khi hoàn thành luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn ThS. Bùi Thị Hải Hà, chuyên viên phụ trách đào tạo, Viện Công nghệ sinh học, đã tận tình hướng dẫn tôi hoàn thành mọi thủ tục trong suốt quá trình học tập làm nghiên cứu sinh tại Viện.

Tôi xin chân thành cảm ơn Công ty Cổ phần dịch vụ phân tích di truyền (GENTIS), cùng các đồng nghiệp đã tạo điều kiện, giúp đỡ và động viên tôi trong suốt thời gian thực hiện luận án của mình.

Cuối cùng, tôi xin gửi tới người thân trong gia đình cùng bạn bè sự biết ơn, đặc biệt là bố mẹ, vợ và các con đã dành cho tôi tình yêu thương sâu sắc và tạo điều kiện tốt nhất để tôi học tập và hoàn thành tốt nội dung luận án.

Tôi xin trân trọng cảm ơn!

Hà Nội, ngày 20...tháng...01...năm 2025



NCS. Nguyễn Quang Vinh

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC CÁC TỪ, KÝ HIỆU VIẾT TẮT.....	vi
DANH MỤC HÌNH.....	vii
DANH MỤC BẢNG	x
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN.....	4
1.1. Vi khuẩn <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
1.1.1. Đặc điểm sinh học của <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
1.1.2. Sinh tổng hợp pyocyanin bởi <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6
1.1.3. Khả năng ứng dụng <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
1.2. Pyocyanin	12
1.2.1. Cấu trúc của pyocyanin	13
1.2.2. Hoạt tính sinh học và độc tính của pyocyanin.....	14
1.2.3. Cơ chế kháng khuẩn của pyocyanin	17
1.2.4. Con đường sinh tổng hợp pyocyanin.....	18
1.2.5. Tách chiết và tinh chế pyocyanin	20
1.2.6. Ứng dụng của pyocyanin	21
1.3. Chuyển gen mã hóa protein tham gia vào quá trình tăng sinh pyocyanin .	22
1.3.1. Các gen tham gia vào quá trình chuyển hóa phenazine.....	22
1.3.2. Tổng hợp pyocyanin từ phenazine-1-carboxylic acid	23
1.3.3. Vai trò của PhzM và PhzS trong quá trình sinh tổng hợp pyocyanin	24
1.3.4. Tăng cường biểu hiện gen <i>phzM</i> và <i>phzS</i> tham gia vào con đường sinh tổng hợp pyocyanin ở <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26
1.4. Các yếu tố ảnh hưởng đến sự sinh tổng hợp pyocyanin bởi <i>P. aeruginosa</i>	30
CHƯƠNG 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	33
2.1. Vật liệu và hóa chất.....	33
2.2. Phương pháp vi sinh vật	34
2.2.1. Phương pháp phân lập vi khuẩn sinh pyocyanin	34
2.2.2. Phương pháp nhuộm Gram và chụp ảnh kính hiển vi điện tử quét	34
2.2.3. Định danh vi khuẩn theo các phương pháp sinh hóa.....	35
2.2.4. Xác định gen đặc trưng loài PA 956 của <i>P. aeruginosa</i>	35
2.2.5. Xây dựng cây phát sinh loài	35
2.2.6. Xác định hoạt tính enzyme ngoại bào.....	35

2.3. Thiết kế vector biểu hiện và biểu hiện gen.....	36
2.3.1. Tách chiết DNA tổng số của vi khuẩn.....	36
2.3.2. Phương pháp điện di kiểm tra DNA	36
2.3.3. Phương pháp tách dòng và xác định trình tự gen <i>phzM</i> và <i>phzS</i>	36
2.3.4. Phương pháp tạo plasmid tái tổ hợp pUCP24- <i>phzMS</i>	37
2.3.5. Kiểm tra sự biểu hiện của <i>phzM</i> , <i>phzS</i> trong <i>E. coli</i>	38
2.3.6. Tạo chủng tái tổ hợp <i>P. aeruginosa</i> PS39 mang plasmid pUCP24- <i>phzM</i> . 40	
2.3.7. Kiểm tra sự có mặt của plasmid tái tổ hợp pUCP24- <i>phzMS</i> trong chủng tái tổ hợp	40
2.3.8. Giải trình tự plasmid pUCP24- <i>phzMS</i> để kiểm tra cassette biểu hiện <i>phzMS</i> bằng hệ thống giải trình tự thế hệ mới.....	41
2.3.9. Phương pháp bảo quản và nuôi cấy chủng giống	41
2.4. Phương pháp nghiên cứu tách chiết, tinh chế pyocyanin.....	41
2.4.1. Nuôi cấy chủng <i>P. aeruginosa</i> PS39- <i>phzMS</i> để thu dịch lên men cho tách chiết pyocyanin	41
2.4.2. Phương pháp định lượng pyocyanin.....	41
2.4.3. Phương pháp tách chiết và định lượng PCA	42
2.4.4. Lựa chọn dung môi tách chiết pyocyanin.....	42
2.4.5. Các phương pháp xác định độ tinh sạch của pyocyanin.....	42
2.5. Phương pháp xác định đặc tính kháng khuẩn của pyocyanin.....	44
2.5.1. Thử nghiệm hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định (VSVKĐ) và <i>Vibrio</i> ..	44
2.5.2. Phương pháp xác định nồng độ diệt khuẩn tối thiểu của pyocyanin	45
2.5.3. Phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch.....	45
2.6. Phương pháp xác định điều kiện nuôi cấy chủng tái tổ hợp sinh pyocyanin .	45
2.6.1. Lựa chọn môi trường nuôi cấy.....	45
2.6.2. Phương pháp nghiên cứu ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy.....	46
2.7. Phương pháp phân tích số liệu.....	47
2.8. Sơ đồ nghiên cứu	47
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	49
3.1. Phân lập và sàng lọc vi khuẩn <i>Pseudomonas</i> sinh pyocyanin	49
3.1.1. Phân lập và sàng lọc vi khuẩn sinh pyocyanin	49
3.1.2. Định danh chủng PS39	51
3.1.3. Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học của chủng PS39	54
3.2. Nghiên cứu tạo chủng tái tổ hợp <i>P. aeruginosa</i> PS39 mang thêm bản sao gen <i>phzM</i> và <i>phzS</i> trong plasmid	55
3.2.1. Phân lập, tách dòng gen <i>phzM</i> và <i>phzS</i> từ <i>P. aeruginosa</i> PS39	55

3.2.2. Thiết kế vector pUCP24-phzMS mang hai gen <i>phzM</i> và <i>phzS</i>	61
3.2.3. Kiểm tra khả năng biểu hiện của hai gen <i>phzM</i> và <i>phzS</i> trong vector tái tổ hợp pUCP24-phzMS.....	64
3.2.4. Tạo chủng <i>P. aeruginosa</i> PS39 tái tổ hợp mang vector pUCP24-phzMS .	67
3.3. Nghiên cứu phương pháp thu hồi, tinh sạch pyocyanin từ <i>P. aeruginosa</i> PS39-phzMS.....	69
3.3.1. Chọn dòng <i>P. aeruginosa</i> PS39-phzMS sinh pyocyanin cao	69
3.3.2. Nghiên cứu tách chiết, tinh chế pyocyanin.....	71
3.3.3. Đánh giá độ sạch của pyocyanin	75
3.4. Đặc tính kháng khuẩn của pyocyanin	77
3.4.1. Khả năng kháng các vi sinh vật kiểm định của pyocyanin.....	77
3.4.2. Đánh giá khả năng kháng <i>Vibrio spp.</i> gây bệnh trên tôm của pyocyanin ..	78
3.5. Nghiên cứu điều kiện nuôi thích hợp cho tăng sinh pyocyanin từ <i>P. aeruginosa</i> PS39-phzMS	81
3.5.1. Ảnh hưởng của các yếu tố hóa lý đến sinh tổng hợp pyocyanin bởi <i>P. aeruginosa</i> PS39-phzMS	81
3.5.2. Lựa chọn một số nguồn dinh dưỡng thích hợp cho sinh tổng hợp pyocyanin	84
CHƯƠNG 4. THẢO LUẬN	86
4.1. <i>P. aeruginosa</i> PS39 sinh pyocyanin và khả năng kháng khuẩn.....	86
4.2. Chủng tái tổ hợp <i>P. aeruginosa</i> PS39-phzMS và khả năng tăng sinh pyocyanin	88
4.3. Điều kiện thích hợp cho sinh tổng hợp pyocyanin ở chủng tái tổ hợp <i>P. aeruginosa</i> PS39-phzMS	92
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	95
KẾT LUẬN	95
KIẾN NGHỊ	95
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	96
TÀI LIỆU THAM KHẢO	97
PHỤ LỤC	111

DANH MỤC CÁC TỪ, KÝ HIỆU VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Chú thích	Nghĩa tiếng Việt
1-OH-PHZ	1-hydroxyphenazine	1-hydroxyphenazine
ADIC	2-amino-2-deoxyisochorismic acid	Axit 2-amino-2-deoxyisochorismic
ADN	Deoxyribonucleic acid	Axit deoxyribonucleic
AHPND	Acute hepatopancreatic necrosis disease	Bệnh nhiễm khuẩn gan tụy cấp
CCD	Central composite design	Mô hình central composite
CDS	Coding sequence	Trình tự mã hóa
DHHA	Trans-2,3-dihydro-3 -hydroanthranilic acid	Axit trans-2,3-dihydro-3 -hydroanthranilic
FAD	Flavin adenine dinucleotide	Flavin adenine dinucleotide
HPLC	High performance liquid chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
HRMS	High-resolution mass spectrometry	Khối phổ phân giải cao
IR	Infrared spectroscopy	Phổ hồng ngoại
LB	Môi trường Luria-Bertani	Môi trường Luria-Bertani
TLC	Thin-layer chromatography	Sắc ký bản mỏng
MBC	Minimum bactericidal concentration	Nồng độ diệt khuẩn tối thiểu
MIC	Minimum inhibitory concentration	Nồng độ ức chế tối thiểu
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) hydrogen (H)	Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) hydrogen (H)
NCBI	National center for biotechnology information	Trung tâm thông tin công nghệ sinh học quốc tế
NGS	Next generation sequencing	Công nghệ giải trình tự thế hệ mới
NMR	Nuclear magnetic resonance	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân
PBD	Plackett-Burman design	Mô hình Plackett-Burman
PCA	Phenazine-1-carboxylic acid	Axit phenazine-1-carboxylic
PCN	Phenazine-1- carboxamide	Phenazine-1- carboxamide
PCR	Polymerase chain reaction	Phản ứng chuỗi polymerase
ROS	Reactive oxygen species	Các gốc oxy hóa tự do
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid	Axit ribosomal ribonucleic
UV	Ultra violet	Tia cực tím
UV-Vis	Ultra violet - Visible	Phương pháp quang phổ hấp thụ phân tử UV-Vis
VSVKĐ	Vi sinh vật kiểm định	Vi sinh vật kiểm định

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Hình thái khuẩn lạc chủng <i>P. aeruginosa</i> trên thạch dinh dưỡng (A), ảnh nhuộm Gram của <i>P. aeruginosa</i> (B) và ảnh chụp kính hiển vi SEM (C)	5
Hình 1.2. <i>P. aeruginosa</i> sinh chất sinh sắc tố pyoverdine (màu xanh lá/huỳnh quang), pyocyanin (xanh dương), và pyomelanin (nâu đậm)	7
Hình 1.3. Tổng quan cơ chế thúc đẩy tăng trưởng và kiểm soát bệnh ở thực vật của chi <i>Pseudomonas</i>	9
Hình 1.4. Phổ UV-VIS của pyocyanin chuẩn (A) và pyocyanin chiết từ môi trường KingA có bổ sung ngô (B), đậu tương (C), khoai lang (D) và dưa hấu (E).....	14
Hình 1.5. Pyocyanin ở môi trường kiềm có màu xanh và pyocyanin ở môi trường acid có màu đỏ.....	18
Hình 1.6. Con đường chuyển hóa Shikimate	19
Hình 1.7. Con đường sinh tổng hợp phenazine và pyocyanin	20
Hình 1.8. Operon <i>phzABCDEFG</i> sinh tổng hợp phenazine của chủng <i>Pseudomonas fluorescens</i> 2-79	23
Hình 1.9. Vị trí của gen <i>phzS</i> (A) và gen <i>phzM</i> (B) trên bộ gen của <i>P. aeruginosa</i> PAO1, cấu trúc không gian của một số enzyme được tổng hợp từ các gen <i>phz</i> của <i>P. aeruginosa</i> (C)	25
Hình 1.10. Cấu trúc của các plasmid được tạo thành từ pUCP18	27
Hình 2.1. Sơ đồ quá trình thiết kế vector pUCP24- <i>phzMS</i>	38
Hình 2.2. Sơ đồ nghiên cứu.....	47
Hình 3.1. Phân lập vi khuẩn sinh pyocyanin trên môi trường KingA.....	49
Hình 3.2. Điện di đồ phân tích sản phẩm PCR đoạn gen <i>PA</i> 956 bp của 9 chủng sinh pyocyanin cao trên gel agarose 0,8%	51
Hình 3.3. Đặc điểm hình thái và sinh học của chủng PS39	51
Hình 3.4. Cây phả hệ di truyền gen <i>16S rRNA</i> của chủng PS39 (KJ579953) với các gen tương ứng từ các chủng trên ngân hàng gen	54
Hình 3.5. Khả năng sinh enzyme ngoại bào của chủng <i>Pseudomonas</i> sp. PS39	55
Hình 3.6. Điện di đồ phân tích DNA hệ gen (A) và sản phẩm PCR khuếch đại gen <i>phzM</i> (B); <i>phzS</i> (C) và sản phẩm sau tinh sạch (D) trên gel agarose 0,8%	56
Hình 3.7. Điện di đồ phân tích plasmid, sản phẩm cắt plasmid pJET1.2- <i>phzM</i> và pJET1.2- <i>phzS</i> với cặp enzyme giới hạn <i>XhoI</i> và <i>XbaI</i> , sản phẩm PCR gen đích từ plasmid tái tổ hợp trên gel agarose 0,8%	57
Hình 3.8. So sánh trình tự gen <i>phzM</i> từ chủng <i>P. aeruginosa</i> PS39 với gen <i>phzM</i> tương đồng cao nhất trong ngân hàng gen, có nguồn gốc từ chủng <i>P. aeruginosa</i> H16 (Hannover, Đức)	58

Hình 3.9. Trình tự protein suy diễn từ gen <i>phzM</i> từ chủng <i>P. aeruginosa</i> PS39.	59
Vùng tô đậm: vùng hoạt tính methyltransferase.	59
Hình 3.10. So sánh trình tự gen <i>phzS</i> từ chủng <i>P. aeruginosa</i> PS39 với gen <i>phzS</i> tương đồng cao nhất trong ngân hàng gen, có nguồn gốc từ chủng <i>P. aeruginosa</i> H16 (Hannover, Đức).	60
Hình 3.11. Trình tự protein suy diễn từ gen <i>phzS</i> từ chủng <i>P. aeruginosa</i> PS39. ...	60
Hình 3.12. Điện di đồ kiểm tra plasmid pUCP24 cắt bằng <i>Sma</i> I (A), sáu dòng plasmid pUCP24- <i>phzM</i> tách từ sáu dòng khuẩn lạc (B), sản phẩm cắt hai dòng pUCP24- <i>phzM</i> bằng <i>Eco</i> RI và <i>Hind</i> III (C) và sản phẩm PCR gen <i>phzM</i> từ 6 dòng plasmid với cặp môi M13F/ <i>phzM</i> -R (D).	61
Hình 3.13. Điện di đồ kiểm tra plasmid pUCP24- <i>phzMS</i> sau tách chiết (A) và cắt bằng với <i>Eco</i> RI và <i>Hind</i> III (B) trên gel agarose 0,8%.	62
Hình 3.14. Chú giải plasmid tái tổ hợp pUCP24- <i>phzMS</i>	64
Hình 3.15. Kết quả biến nạp vector tái tổ hợp pUCP24- <i>phzMS</i> vào tế bào khả biến <i>E. coli</i> BL21 và <i>Rosetta</i>	65
Hình 3.16. Phân tích protein tổng số, protein pha tan, không tan được biểu hiện trong hai chủng <i>E. coli</i> BL21 và <i>Rosetta</i> mang pUCP24- <i>phzMS</i>	66
Hình 3.17. Điện di đồ kiểm tra sản phẩm cắt pUCP24- <i>phzMS</i> được tách từ <i>P. aeruginosa</i> PS39 tái tổ hợp trên gel agarose 0,8%.	67
Hình 3.18. Điện di đồ kiểm tra plasmid tái tổ hợp pUCP24- <i>phzMS</i> và sản phẩm cắt enzyme giới hạn (<i>Eco</i> RI và <i>Hind</i> III) từ chủng <i>P. aeruginosa</i> PS39- <i>phzMS</i> lần nuôi cấy chuyên 2 (A) và lần nuôi cấy chuyên 5 (B).	68
Hình 3.19. Khả năng sinh tổng hợp pyocyanin ở các dòng tế bào biến nạp sau 7 ngày nuôi cấy	69
Hình 3.20. Tách chiết PCA và pyocyanin từ chủng tự nhiên <i>P. aeruginosa</i> PS39 (A) và chủng tái tổ hợp <i>P. aeruginosa</i> PS39- <i>phzMS</i> (B)	70
Hình 3.21. Hàm lượng pyocyanin (A) và PCA (B) được sản sinh bởi chủng tự nhiên <i>P. aeruginosa</i> PS39 và chủng tái tổ hợp <i>P. aeruginosa</i> PS39- <i>phzMS</i>	71
Hình 3.22. Tách chiết pyocyanin từ dịch nuôi cấy vi khuẩn <i>P. aeruginosa</i> PS39- <i>phzMS</i> với các dung môi khác nhau.	72
Hình 3.23. Quang phổ UV-Vis của pyocyanin chiết tách sử dụng các dung môi khác nhau.	73
Hình 3.24. Minh họa các bước chiết pyocyanin từ dịch nuôi cấy chủng <i>P. aeruginosa</i> PS39- <i>phzMS</i>	75
Hình 3.25. Hình ảnh pyocyanin sau quá trình tách chiết và làm sạch.	76
Hình 3.26. Tinh thể pyocyanin thu nhận được sau khi tinh sạch	76

Hình 3.27. Sắc ký đồ sắc ký lỏng hiệu năng cao mẫu tách chiết pyocyanin từ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PS39-phzMS.	77
Hình 3.28. Khối phổ phân giải cao (HRMS) của pyocyanin tách chiết từ dịch nuôi cấy <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PS39-phzMS	77
Hình 3.29. Minh họa khả năng kháng của pyocyanin với các chủng <i>Vibrio</i> spp. gây bệnh trên tôm	81
Hình 3.30. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh tổng hợp pyocyanin ở chủng <i>P. aeruginosa</i> PS39-phzMS	81
Hình 3.31. Ảnh hưởng của tốc độ lắc đến quá trình sinh tổng hợp pyocyanin ở chủng <i>P. aeruginosa</i> PS39-phzMS	82
Hình 3.32. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến sinh tổng hợp pyocyanin ở chủng <i>P. aeruginosa</i> PS39-phzMS	83
Hình 3.33. Ảnh hưởng của pH đến sinh tổng hợp pyocyanin bởi <i>P. aeruginosa</i> PS39-phzMS	83
Hình 3.34. Ảnh hưởng của các thành phần môi trường đến sinh tổng hợp pyocyanin ở chủng <i>P. aeruginosa</i> PS39-phzMS	84
Hình 3.35. Ảnh hưởng của nồng độ glutamic acid đến sinh tổng hợp pyocyanin ở chủng <i>P. aeruginosa</i> PS39-phzMS.....	85

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Cấu trúc hóa học và tên gọi các dẫn xuất của phenazine	13
Bảng 1.2. Nồng độ IC ₅₀ của pyocyanin tác động lên thành phần tế bào người, cá và côn trùng	16
Bảng 1.3. Một số phương pháp nâng cao khả năng sinh pyocyanin ở <i>P. aeruginosa</i> ..	29
Bảng 2.1. Danh sách các mẫu sử dụng trong nghiên cứu.....	33
Bảng 2.2. Danh sách các cặp môi sử dụng trong nghiên cứu.....	34
Bảng 2.3. Thành phần gel polyacrylamide	39
Bảng 2.4. Thành phần của các môi trường thử nghiệm.....	46
Bảng 3.1. Khả năng sinh pyocyanin của các chủng vi khuẩn phân lập.....	49
Bảng 3.2. Đặc điểm sinh hóa chủng <i>Pseudomonas</i> sp. PS39.....	52
Bảng 3.3. Mức độ tương đồng của gen <i>16S rRNA</i> chủng PS39 với một số chủng trên ngân hàng gen (Genbank NCBI)	53
Bảng 3.4. Hoạt tính enzyme và tính kháng kháng sinh của chủng PS39	54
Bảng 3.5. Hiệu suất tách chiết pyocyanin bởi các dung môi khác nhau	72
Bảng 3.6. Quang phổ khả kiến của các dịch chiết pyocyanin bằng dung môi khác nhau.....	74
Bảng 3.7. Nồng độ ức chế tối thiểu của pyocyanin và các kháng sinh đối với vi sinh vật kiểm định.....	78
Bảng 3.8. Nồng độ ức chế tối thiểu, MIC ($\mu\text{g/mL}$), của pyocyanin đối với các chủng <i>Vibrio</i> spp.	78
Bảng 3.9. Sự sinh trưởng của các chủng <i>Vibrio</i> spp. trong môi trường APW bổ sung pyocyanin	79
Bảng 3.10. Sự sinh trưởng của các chủng <i>Vibrio</i> spp. trên môi trường thạch TCBS...	79
Bảng 3.11. Khả năng kháng các chủng <i>Vibrio</i> spp. gây bệnh trên tôm của pyocyanin	80

MỞ ĐẦU

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. Các nghiên cứu trước đây đã cho thấy pyocyanin có thể sử dụng như tác nhân kiểm soát bệnh do *Vibrio* spp. gây ra trong các hệ thống nuôi thủy sản tuần hoàn. Khả năng gây độc của pyocyanin từ các chủng phân lập từ môi trường có giá trị LC50 cao hơn rất nhiều so với nồng độ pyocyanin cần thiết để điều trị bệnh do vi khuẩn *Vibrio* spp. gây ra. Bên cạnh đó, 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. Có nhiều cách tiếp cận nhằm thu được hiệu suất tổng hợp pyocyanin cao như tối ưu điều kiện lên men, cải biến di truyền... 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. Quá trình sinh tổng hợp pyocyanin có sự tham gia của bảy gen là *phzC, D, E, F, G, M* and *S*. Trong đó hai gen *phzM* và *phzS* là hai gen chính chịu trách nhiệm chuyển hóa phenazine-1-carboxylic acid thành pyocyanin. Hai gen đích này 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 được điều kiện thích hợp cho quá trình 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*. Ngoài ra hiệu quả của chế phẩm sinh học chứa pyocyanin được thử nghiệm, đánh giá tại các ao nuôi tôm thực tế.

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:

Mục tiêu nghiên cứu:

- 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.

Nội dung nghiên cứu chính:

- 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 *phzM* và *phzS* 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

Ý nghĩa khoa học của đề tài:

Vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* đã được chứng minh có khả năng sinh pyocyanin không độc đối với tôm nhưng có phổ kháng khuẩn rộng, có thể có nhiều ứng dụng trong thực tiễn. Tuy nhiên việc sản xuất thu nhận pyocyanin gặp khó khăn do chủng tự nhiên thường có năng suất thấp. Trong luận án này, chủng *P. aeruginosa* sinh pyocyanin cao đã được lựa chọn để cải biến, mang thêm gen *phzM*, *phzS* trong plasmid biến nạp, giúp chủng sinh pyocyanin tăng gần 60% so với chủng tự nhiên. Kết quả này đã khẳng định có thể cải biến chủng tự nhiên bằng kỹ thuật gen hiệu quả để làm tăng khả năng sinh chất thứ cấp nhằm ứng dụng vào thực tế sản xuất.

Ý nghĩa thực tiễn của đề tài:

Pyocyanin sinh ra từ các chủng *Pseudomonas aeruginosa* PS39-phzMS có khả năng kháng một số loại nấm, vi sinh vật gây bệnh và *Vibrio* spp. gây bệnh trên tôm. Vì vậy, pyocyanin sinh tổng hợp từ chủng chuyển gen của đề tài này có thể

được nghiên cứu sâu thêm để ứng dụng vào thực tiễn.

Những đóng góp mới của luận án:

- 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.

- Đã chọn lọc được môi trường và điều kiện nuôi cấy thích hợp để chủng tái tổ hợp sinh pyocyanin với năng suất cao.

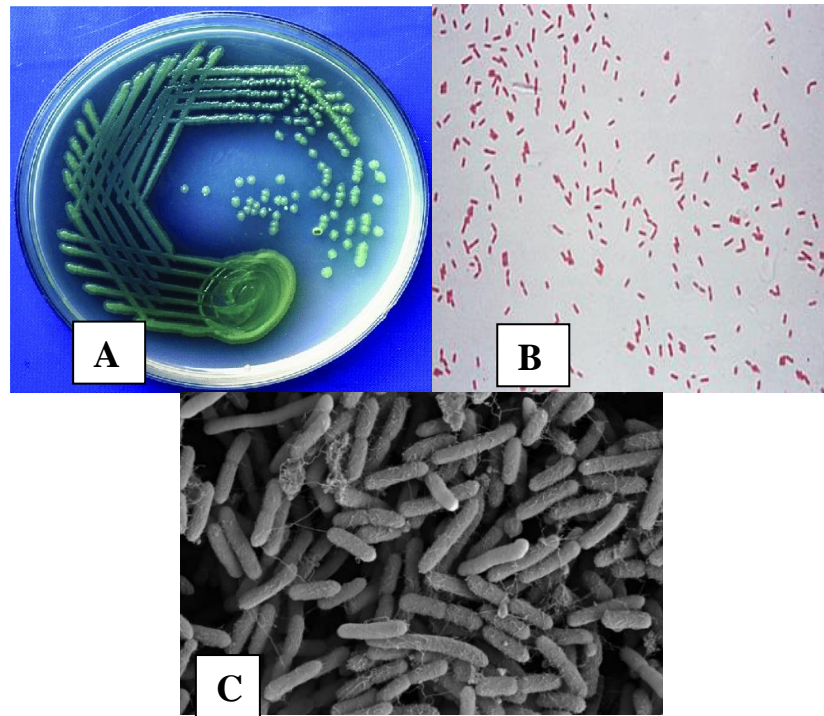
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. Vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas là một trong những chi vi khuẩn được nghiên cứu nhiều nhất. Chi này lần đầu tiên được phát hiện bởi Migula vào năm 1894 ban đầu được mô tả là vi khuẩn Gram âm, hiếu khí, hình que [1]. Các đặc điểm hình thái của vi khuẩn này khá tương đồng với các chủng vi khuẩn khác nên việc nhận biết chi *Pseudomonas* dựa vào đặc điểm hình thái gặp nhiều khó khăn. Sau đó, nhờ sự phát triển của các kỹ thuật phân loại hiện đại bằng cách kết hợp giữa sinh học phân tử, đặc điểm hình thái và sinh hóa, việc phân loại các chi của vi khuẩn nói chung và chi *Pseudomonas* trở nên dễ dàng và chính xác. *Pseudomonas* là một chi rất phổ biến vì nó có thể được tìm thấy trong nhiều môi trường như đất, nước, con người, động vật, thực vật và chúng tham gia vào nhiều quá trình chuyển hóa khác nhau. *Pseudomonas* có khả năng thích ứng tốt trong các điều kiện môi trường khắc nghiệt và chịu được các điều kiện bất lợi từ các yếu tố sống và không sống như oxy, độ ẩm, nhiệt độ cao hoặc thấp... Một số loài trong chi *Pseudomonas* được biết đến có khả năng gây bệnh ở những người có hệ thống miễn dịch kém. Tuy nhiên một số chủng thuộc loài *Pseudomonas aeruginosa* có khả năng sinh ra các hợp chất thứ cấp có thể phân hủy các hoạt chất hay ức chế vi khuẩn, từ đó mở ra khả năng ứng dụng rộng rãi trong các ngành như dược phẩm, công nghiệp, môi trường và đặc biệt trong lĩnh vực thủy sản [2].

1.1.1. Đặc điểm sinh học của *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa lần đầu tiên được mô tả năm 1882 trong bài báo với tựa đề “On the Blue and Green Coloration of Bandages” [3]. Trong đó *P. aeruginosa* được mô tả là vi khuẩn sản sinh ra sắc tố tan trong nước và phát ánh huỳnh quang xanh dưới tia UV. Chất sinh sắc tố này về sau được xác định là pyocyanin, là một dẫn xuất của phenazine. Đến năm 1900, Migula xác định chúng thuộc chi *Pseudomonas* và từ đó vi khuẩn mang tên *P. aeruginosa* (*Pseudo* là tiếng Hy Lạp có nghĩa “giả”; *monas* trong tiếng Hy Lạp nghĩa là “đơn vị”; *aeruginosa* nghĩa là “gỉ đồng”). Ở Việt Nam *P. aeruginosa* thường được gọi là trực khuẩn mũ xanh. Ban đầu chi *Pseudomonas* được phân loại thành các nhóm tương đồng về gen mã hóa rRNA. Cách phân loại này đã được công nhận rộng rãi, nhưng dẫn đến nhiều loài thuộc chi *Pseudomonas* cần được phân loại lại. Hiện nay các nghiên cứu phát sinh loài mới dựa trên sự tương đồng của trình tự gen 16S rRNA đã tạo ra nhóm liên kết của *P. aeruginosa* bao gồm *P. aeruginosa*, *P. alcaligenes*, *P. mendocina*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* và *P. flavescens* [4]



Hình 1.1. Hình thái khuẩn lạc chủng *P. aeruginosa* trên thạch dinh dưỡng (A), ảnh nhuộm Gram của *P. aeruginosa* (B) và ảnh chụp kính hiển vi SEM (C) [5].

P. aeruginosa là vi khuẩn Gram âm, hiếu khí, hình que kích thước 1-1,5 μm x 0,5-1,0 μm , di động, có pili và không tạo nội bào tử (Hình 1.1). Chúng ưa khí, phát triển dễ trên các môi trường thông thường như LB, NB với nhiệt độ tối ưu 28 – 32°C; pH 7,0 - 8,2, và có khả năng oxy hóa các chất chống oxy hóa. Tuy nhiên chúng cũng có thể phát triển ở nhiệt độ cao tới 42°C. Đây là một trong những đặc điểm để phân biệt *P. aeruginosa* với các loài vi khuẩn khác thuộc chi *Pseudomonas* [4]. Vi khuẩn có thể sinh các sắc tố hòa tan trong nước là pyocyanin và pyoverdin, có sức đề kháng cao với các yếu tố lý hóa, kháng kháng sinh cao. Trong môi trường ẩm, thoáng và không có ánh sáng mặt trời chiếu trực tiếp, *P. aeruginosa* sống được 2 tuần. Trong môi trường có dinh dưỡng tối thiểu ở 5°C, chúng sống được 6 tháng. *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 sinh hai sắc tố hòa tan là pyocyanin và pyoverdin. Pyocyanin có màu xanh làm khuẩn lạc có màu xanh pyoverdin là chất sắc tố huỳnh quang làm cho khuẩn lạc có màu vàng xanh (Hình 1.1). Khi loài *P. aeruginosa* tạo ra cả hai sắc tố cùng một lúc, khuẩn lạc *P. aeruginosa* có màu xanh biển ngả sang màu xanh lá. Loài 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 [6].

P. aeruginosa có vỏ nhầy là polysaccharide gồm nhiều tiểu phần mannuronic acid và glucuronic acid hay còn được gọi là alginate. Các dạng alginate này kết hợp với nhau tạo thành dạng cấu trúc biofilm giúp bảo vệ, che chở vi khuẩn khỏi các

yếu tố bất lợi của môi trường tự nhiên cũng như môi trường sống trong vật chủ. Hầu hết các chủng *P. aeruginosa* có khả năng tổng hợp một loại protein F trên bề mặt gắn trên màng sinh chất. Protein F vận chuyển có chọn lọc các chất qua lại màng trong giới hạn khoảng 500 Da. Vì vậy, nó làm giảm tính thấm của màng, ngăn không cho các chất có hại đi vào bên trong tế bào giúp cho *P. aeruginosa* có khả năng đề kháng cao với nhiều loại kháng sinh [7].

P. aeruginosa có một tiên mao (flagella) duy nhất ở một cực, tiên mao giúp cho vi khuẩn di động (Hình 1.1). Về cấu tạo hóa học, tiên mao được cấu tạo bởi các protein gọi là flagellin. Các flagellin mang tính kháng nguyên, được gọi là kháng nguyên lông H. Tiêm mao (pili) có cấu trúc là những sợi lông rất mảnh, dài khoảng 6 nm, mọc quanh bề mặt tế bào. Tiêm mao giúp vi khuẩn bám vào môi trường lỏng hay bề mặt biểu mô của tế bào vật chủ trong quá trình lây nhiễm [8].

DNA của *P. aeruginosa* là một phân tử DNA trần, dạng vòng, tồn tại trong nguyên sinh chất có kích thước 5,2 - 7 triệu cặp base [9]. Thành phần DNA chứa khoảng 65% là guanine và cytosine. Ngoài ra, *P. aeruginosa* còn có vật chất di truyền ngoài nhân là các plasmid. Các plasmid của chủng kháng thuốc chứa các đoạn gen *TEM*, *OXA*, *PSE* mã hóa sinh enzyme betalactamase giúp phá hủy vòng betalactam của kháng sinh giúp *P. aeruginosa* kháng lại hầu hết các kháng sinh thuộc nhóm này. Do vậy một số trường hợp có thể gây khó khăn trong việc lựa chọn thuốc điều trị nhiễm khuẩn do *P. aeruginosa*. Một trong những yếu tố để phân biệt *P. aeruginosa* với các vi khuẩn khác trong chi *Pseudomonas* là dùng các đặc tính sinh hóa, sinh lý để xác định nhanh chủng này. Dễ dàng nhận thấy một đặc điểm để nhận biết chủng *P. aeruginosa* đó là khả năng sinh trưởng ở 42°C. Ngoài ra chỉ có 65% *P. aeruginosa* là có khả năng sinh sắc tố pyoverdine [9].

1.1.2. Sinh tổng hợp pyocyanin bởi *Pseudomonas aeruginosa*

Vi khuẩn *P. aeruginosa* có khả năng tiết ra nhiều loại sắc tố trong đó có pyocyanin (sắc tố màu xanh da trời), tan trong nước và tan trong chloroform và pyoverdin (sắc tố xanh lục) tan trong nước nhưng không tan trong chloroform. Có tới 96% số chủng *P. aeruginosa* có khả năng sinh sắc tố pyocyanin. Pyocyanin sinh ra trong môi trường tiếp xúc nhiều với không khí, dễ dàng phát hiện khi nuôi vi khuẩn trên môi trường canh thang, thạch thường hoặc môi trường KingA là môi trường điển hình để phát hiện chủng sinh sắc tố pyocyanin [6]. Chỉ có *P. aeruginosa* sinh sắc tố pyocyanin (Hình 1.2). Môi trường KingB được sử dụng để phát hiện sắc tố pyoverdin. Ngoài *P. aeruginosa*, vi khuẩn *P. fluorescens*, *P. pyrida*, *P. veroni*, *P. montella* cũng có khả năng sinh sắc tố này. Pyorubin là sắc tố màu hồng nhạt, chỉ 1% số chủng *P. aeruginosa* sinh ra sắc tố này. Pyomelanin là sắc tố

màu nâu đen, chỉ 1-2% số chủng *P. aeruginosa* sinh sắc tố này (Hình 1.2) [6].



Hình 1.2. *P. aeruginosa* sinh chất sinh sắc tố pyoverdine (màu xanh lá/huỳnh quang), pyocyanin (xanh dương), và pyomelanin (nâu đậm) [6]

1.1.3. Khả năng ứng dụng *Pseudomonas aeruginosa*

1.1.3.1. Mức độ an toàn của *P. aeruginosa*

P. aeruginosa là vi khuẩn phân bố ở nhiều môi trường khác nhau như đất, nước, động vật, thực vật và được coi là mầm bệnh cơ hội ở người, có thể gây bệnh ở những bệnh nhân bị suy giảm miễn dịch, bị bỏng, bệnh xơ nang [10]. Các chủng lâm sàng như *P. aeruginosa* PAO, *P. aeruginosa* PA14 được phân lập ở bệnh nhân bị bỏng. Những đặc tính liên quan đến tính sinh bệnh của vi khuẩn được biết đó là độc tính, kháng thuốc và hình thành màng sinh học [11]. Các chủng lâm sàng được biệt hóa từ các chủng môi trường nhờ khả năng sử dụng parafin làm nguồn cac-bon [12]. Những đột biến gây thiếu hụt gen *oprD* (gen porin) thường đa dạng ở các chủng lâm sàng hơn các chủng ở phòng thí nghiệm.

Ngoài các chủng lâm sàng, được đặc biệt chú ý về tính sinh bệnh, còn có các chủng từ môi trường. Trong các nghiên cứu gần đây về hệ gen đã làm sáng tỏ chủng không độc và thể hiện đặc tính độc đáo của vi khuẩn này, đó là chúng sinh tổng hợp một loạt các chất chuyển hóa thứ cấp với nhiều ứng dụng tiềm năng trong công nghệ sinh học. Chẳng hạn, chủng *P. aeruginosa* ATCC15442 được phân lập từ môi trường, là chủng không gây độc tế bào và cũng không xâm nhiễm [13]. Một số nghiên cứu đã chỉ ra đặc tính probiotic của vi khuẩn *P. aeruginosa* được sử dụng để kiểm soát ô nhiễm môi trường hay ứng dụng trong sản xuất chế phẩm sinh học nhằm kiểm soát dịch bệnh, thúc đẩy tăng trưởng trong nuôi trồng thủy sản. Nghiên cứu của Hai và đồng tác giả (2009) đã chỉ ra chủng vi khuẩn *P. aeruginosa* khi được bổ sung trong thức ăn công thức ở liều lượng 10^5 CFU/mL đã giúp tăng cường sức khỏe và hệ miễn dịch của tôm bạc *Penaeus latisulcatus* [14]. Chủng *P. aeruginosa* YC58 được kết hợp với hệ vi sinh của ấu trùng hào *Crassostrea corteziensis*, làm tăng tỷ lệ sống của hào so với đối chứng không sử dụng [15]. Hơn

nữa, trong lĩnh vực tái tạo môi trường, sáng chế US11584913B2 đã bộc lộ tiềm năng ứng dụng của chủng *P. aeruginosa* GDUTAN1, được phân lập từ nước rỉ từ bãi rác, có đặc tính phân hủy monomethylamine cao đến 99% sau 96 giờ ở nồng độ 50-140 mg/L.

1.1.3.2. Ứng dụng *Pseudomonas aeruginosa* trong y học

P. aeruginosa sản sinh ra nhiều nhóm chất có khả năng ức chế vi khuẩn hoặc sự hoạt động của vi khuẩn, đóng vai trò thiết yếu trong kiểm soát vi khuẩn kháng thuốc. Những chất này là sản phẩm thứ cấp từ nhiều chu trình chuyển hóa khác nhau bao gồm chu trình chuyển hóa polyketide và shikimic-chorismic acid. Nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng các chất có hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm tiết ra trong quá trình trao đổi chất thứ cấp của vi khuẩn có thể áp dụng trong kiểm soát bệnh ở người, động vật và cây [16][17].

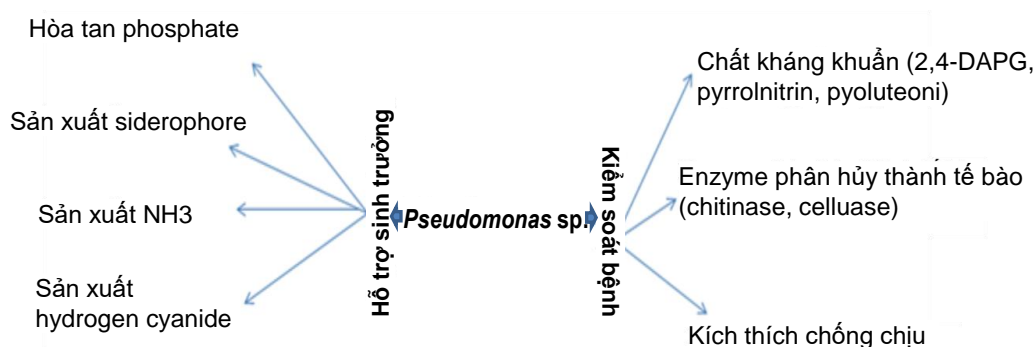
P. aeruginosa sinh ra các chất với tính kháng khuẩn cao bao gồm các nhóm peptide được gọi là pyocin và nhóm heterocyclic như quinoline, phenylpyrrole và phenazine [18]. Trong quá trình cạnh tranh môi trường sống *P. aeruginosa* tiết ra những hợp chất heterocyclic tiêu diệt vi khuẩn bằng cách phá hủy DNA của vi khuẩn thông qua quá trình khử cực tế bào. Các nghiên cứu gần đây cho thấy *P. aeruginosa* tiết ra hợp chất cơ kim ức chế hoạt động của vi khuẩn đa kháng thuốc bao gồm vi khuẩn *Klebsiella pneumoniae* sinh carbapenemase và *Staphylococcus aureus* kháng kháng sinh methicillin [19]. Chủng này còn tiết ra lượng nhỏ phenazine-1-carboxylic acid có khả năng ức chế nấm *Botrytis cinerea* [20].

Hydroxytyrosol thuộc nhóm phenylethanoid tiết ra từ *P. aeruginosa* được đặc biệt quan tâm trong ngành dược phẩm do có nhiều hoạt tính có lợi cho sức khỏe của con người như kháng khuẩn, kháng viêm, bảo vệ tế bào thần kinh, chống u và khả năng điều chỉnh con đường chuyển hóa giúp hỗ trợ điều trị bệnh tim mạch và hội chứng rối loạn chuyển hóa. Vì vậy, hydroxytyrosol đã thu hút sự chú ý của nhiều nhà khoa học. *P. aeruginosa* đã được báo cáo có khả năng tổng hợp sinh học hydroxytyrosol với hàm lượng cao, hiệu suất lên đến 86% ở nồng độ 5 g/L tyrosol [21]. Ngoài ra, chủng *P. aeruginosa* 1001 tạo ra esterase (EstA) có khả năng thủy phân este methyl raxemic của β -acetylthioisobutyrate để tạo ra (D)-enantiomer, đóng vai trò như tiền chất của captopril. Captopril là một loại thuốc quan trọng trong điều trị suy tim sung huyết, tăng huyết áp và bệnh thận do tiểu đường. Điều này đạt được thông qua việc ức chế enzym chuyển đổi angiotensin.

1.1.3.3. Ứng dụng của *Pseudomonas aeruginosa* trong nông nghiệp

An ninh lương thực là vấn đề đang được quan tâm hàng đầu để dự phòng khi dân số thế giới đạt 9 tỷ người vào năm 2050. Để đảm bảo được lương thực và sự

phát triển bền vững thân thiện với môi trường, ngành nông nghiệp phải được phát triển theo hướng giảm sử dụng các chất hóa học như phân bón hóa học hay các chất diệt cỏ, diệt côn trùng [22]. Việc sử dụng vi sinh vật để thúc đẩy tăng trưởng của cây trồng và kiểm soát bệnh trong nông nghiệp là hướng tiếp cận bền vững thân thiện với môi trường [22]. Ngày nay chi *Pseudomonas* đang được chú ý do sự phổ biến của chúng trong môi trường và các hoạt tính đặc biệt của chi này đối với cây trồng như thúc đẩy tăng trưởng thực vật, kiểm soát các tác nhân sinh học nhằm cải thiện môi trường cho sự tăng trưởng, tăng sản lượng cây trồng và kiểm soát dịch bệnh ở cây (Hình 1.3) [23].



Hình 1.3. Tổng quan cơ chế thúc đẩy tăng trưởng và kiểm soát bệnh ở thực vật của chi *Pseudomonas* [24]

Pseudomonas thúc đẩy tăng trưởng thực vật bằng cách hòa tan nitơ, phosphate, sắt vào trong đất làm cải thiện dinh dưỡng của đất. Nhiều nghiên cứu gần đây cho thấy sử dụng *Pseudomonas* tăng cường sự phát triển, tăng sản lượng và tổng hợp hoạt chất thứ cấp của cây. Ví dụ, Kumar và cộng sự đã cấy *Pseudomonas fluorescens* để tăng năng suất và hàm lượng curcumin ở nghệ [25]. Hammami và cộng sự đã sử dụng chủng *Pseudomonas* sp. Psf5, để kiểm soát bệnh chết héo trên cây giống cà chua do *Sclerotinia sclerotiorum* gây ra. Kết quả chủng vi khuẩn này không những giúp cà chua kháng bệnh mà còn giúp làm bộ rễ cà chua phát triển mạnh, tăng chất lượng cây giống. Việc cấy vi khuẩn *Pseudomonas* vào đất xung quanh rễ cũng giúp cây đậu xanh tăng trưởng tốt [26].

Chủng *P. aeruginosa* LES4 được phân lập từ đất gần rễ cây cà chua được xác định có khả năng thúc đẩy tăng trưởng của cây nhờ sản sinh indole acetic acid, hydrogen cyanide (HCN), siderophore, hòa tan chất vô cơ như phosphate và tăng hòa tan ure. Chủng này còn có khả năng ức chế mạnh chống lại nấm *Macrophomina phaseolina* và *Fusarium oxysporum*. Khi cấy chủng *P. aeruginosa* LES4 vào đất xung quanh rễ cây vừng đã giúp giảm một nửa lượng phân bón cho cây nhưng lượng protein của vừng tăng 47,5% và lượng dầu tăng 33,3% so với nhóm cây đối chứng [27].

Trong môi trường đất khắc nghiệt và hạn chế về chất dinh dưỡng, rễ cây là nơi sinh sống của các vi sinh vật có ích và có hại trong đất. Các loài *Pseudomonas* có lợi tiếp cận bề mặt rễ nhờ khả năng di chuyển của roi. Người ta thấy rằng *Pseudomonas* tạo ra một hệ sinh thái nhỏ ở rễ và cũng thúc đẩy sự phát triển của thực vật [24]. Sự tương tác của *P. aeruginosa* với thực vật mang lại mối liên kết có lợi khá phổ biến. *P. aeruginosa* tạo ra pyocyanin có trong đất đã giúp thúc đẩy cây chủ phát triển cũng như bảo vệ cây khỏi các bệnh có nguyên nhân từ vi sinh vật gây bệnh [24][28].

Siddiqui và cộng sự đã nghiên cứu vi khuẩn rhizobacteria trong việc kiểm soát bệnh thối rễ và bệnh rễ nốt trên cây đậu xanh và phát hiện thấy *P. aeruginosa* hoạt động như một tác nhân kiểm soát sinh học trong việc ức chế sự phát triển của *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium solani* và *Rhizoctonia solani*. *Pseudomonas* cũng có hoạt tính tác động lên hệ thần kinh của ấu trùng *Meloidogyne javanica* dẫn đến tiêu diệt ấu trùng này trong giai đoạn hai của ấu trùng [29].

Chủng *P. aeruginosa* 7NSK2 đã được sử dụng để làm tác nhân phòng trừ sinh học chống lại bệnh đạo ôn lá (*Magnaporthe grisea*) và bệnh khô vằn (*Rhizoctonia solani*) trên cây lúa một lá mầm. Kết quả chủng này đã giúp lúa chống bệnh đạo ôn lá tuy nhiên không kiểm soát được bệnh khô vằn [30].

Ở Việt Nam, cũng có một số nghiên cứu về vi khuẩn *Pseudomonas* có khả năng ứng dụng trong nông nghiệp, cải thiện khả năng chống chịu của cây. Chủng *Pseudomonas putida* PS01 từ vùng rễ cây ngô có khả năng nâng cao sức chống chịu trong điều kiện mặn như giúp nâng cao khả năng nảy mầm và sống sót của hạt cây cải xoong ở nồng độ muối 150 mM đến nồng độ muối cao nhất 225 mM trong khi ở mẫu đối chứng thì hạt cải đã bị chết ở nồng độ 200 mM [31]. Trần Thị Thu Hà và cộng sự đã nghiên cứu chế phẩm sinh học từ *Pseudomonas putida* để kiểm soát bệnh chết nhanh trên cây hồ tiêu ở Gia Lai. *Pseudomonas putida* còn giúp cây hồ tiêu đen phát triển nhanh tăng khả năng kết hạt, kết quả cho thấy ở nhóm có xử lý chế phẩm sản lượng tăng 1,6 lần so với nhóm đối chứng không sử dụng chế phẩm [32]. Tác giả Chu Nguyên Thanh và cộng sự đã phân lập được ba chủng *Pseudomonas* từ vùng rễ cây, vùng đất nhiễm mặn xung quanh rễ cây. Các chủng này đều có đặc tính thúc đẩy tăng trưởng thực vật như sản sinh indole-3-acetic acid (IAA), hòa tan phosphate, cố định đạm. Đặc biệt chủng *Pseudomonas* sp. BT00P03 đã cải thiện các chỉ số tăng trưởng của cây lạc trong điều kiện bình thường và đặc biệt trong điều kiện đất nhiễm mặn [33].

1.1.3.4. Ứng dụng của *Pseudomonas aeruginosa* trong công nghiệp

P. aeruginosa được ứng dụng hữu ích trong nhiều lĩnh vực khác nhau trong

công nghiệp và thương mại. Những ứng dụng này bao gồm phân hủy chất thải, trong lọc dầu, trong sản xuất dệt may, trong ngành giấy và sản xuất bột giấy, khai thác mỏ và ngành sản xuất chất nổ. Các sản phẩm như vanillin, rhamnolipid, protease, lipase thu được từ *P. aeruginosa* đóng vai trò thiết yếu trong hoạt động sản xuất.

Vanillin là một trong những thành phần quan trọng nhất của hương vị tự nhiên. Vanillin được sử dụng rộng rãi trong các ngành công nghiệp thực phẩm, mỹ phẩm và dược phẩm. Nghiên cứu gần đây đã báo cáo sản xuất vanillin bằng chủng *P. aeruginosa* ISPC2 phân lập từ đất, được biến đổi gen sử dụng isoeugenol làm tiền chất trong quá trình sinh tổng hợp vanillin [34].

Rhamnolipid là một loại glycolipid được sinh bởi *P. aeruginosa* và một số sinh vật khác. Rhamnolipid có nhóm đầu glycosyl, trong trường hợp này là gốc rhamnose và đuôi acid béo 3 - (hydroxyalkanoyloxy) alkanolic acid (HAA), ví dụ như 3-hydroxydecanoic acid. Hiện nay, rhamnolipid được sản xuất bởi *P. aeruginosa* là loại chất hoạt động bề mặt sinh học thiết yếu nhất kể từ khi Cơ quan Bảo vệ Môi trường Hoa Kỳ cho phép sử dụng chúng trong các sản phẩm thực phẩm và các ứng dụng công nghiệp khác [35]. Rhamnolipid đã được ngành công nghiệp thực phẩm đặc biệt khai thác như một chất bảo quản thay thế để tăng thời hạn sử dụng thực phẩm, do hoạt tính kháng khuẩn cao và đặc tính hóa lý của chúng, đồng thời để ổn định nhũ tương, kéo dài thời hạn sử dụng và ức chế bào tử *mesophilic* trong quá trình chế biến sữa đậu nành ở nhiệt độ cực cao (Ultra-high temperature processing) kết hợp với niacin. Sự kết hợp của niacin với rhamnolipid trong salad giúp kéo dài thời hạn sử dụng của sản phẩm và ức chế sự phát triển của nấm mốc. Khi sử dụng hỗn hợp natamycin, nisin và rhamnolipid trong quá trình chế biến phô mai làm tăng thời hạn sử dụng phô mai tươi thông qua việc ức chế sự phát triển của nấm mốc và vi khuẩn, đặc biệt là vi khuẩn Gram dương và vi khuẩn hình thành bào tử [35][36].

P. aeruginosa còn được biết đến với khả năng sản xuất enzyme protease rất tốt. Enzyme này được dùng trong các ngành công nghiệp để phân hủy protein. Enzyme phân giải protein phần lớn được tìm thấy trong tất cả các sinh vật sống và cần thiết cho sự phát triển của tế bào và sự biệt hóa của tế bào. *P. aeruginosa* sinh tổng hợp protease ngoại bào và sử dụng maltose làm nguồn cacbon chính cho quá trình sinh trưởng. Hoạt tính protease đạt tối đa ở pH 9,5, nhiệt độ 37°C và thời gian ủ là 48 giờ [37].

Lipase là enzym tan trong nước, xúc tác phản ứng thủy phân triacylglycerol không tan trong nước tạo thành các glyceril và các acid béo tương ứng nhờ hoạt

động của nó trên bề mặt phân pha nước-dầu. Nghiên cứu gần đây cho thấy *P. aeruginosa* là một trong những chủng vi khuẩn có khả năng sản xuất lipase với hiệu suất cao, có tiềm năng ứng dụng trong các lĩnh vực và các ngành công nghiệp khác nhau [38]. Do cấu trúc phân tử và tính chất xúc tác của lipase, các enzym này có các ứng dụng trong công nghệ sinh học cụ thể trong các lĩnh vực công nghiệp khác nhau như trong thẩm mỹ, quản lý chất thải môi trường và thực phẩm. Đặc biệt lipase hoạt động như chất xúc tác để tổng hợp các este và chuyển hóa dầu để sản xuất diesel sinh học [39].

1.1.3.5. Ứng dụng của *Pseudomonas aeruginosa* trong thủy sản

Trong nuôi tôm nước lợ, các loài thuộc chi *Vibrio* luôn là mối đe dọa nguy hiểm cho nghề nuôi tôm, ảnh hưởng đến sản lượng tôm nuôi [40]. Trong nhóm *Vibrio* gây bệnh ở tôm, thường gặp một số loài điển hình như *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. anguillarum* gây bệnh phát sáng trên ấu trùng tôm, bệnh nhiễm khuẩn gan tụy cấp (Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease – AHPND).

Nhiều nghiên cứu đã cho thấy việc sử dụng quá mức các loại thuốc kháng sinh để phòng và trị bệnh trong nuôi tôm gây một hệ quả tất yếu là tồn dư dư lượng kháng sinh; hình thành hệ vi sinh vật kháng thuốc kháng sinh, dẫn đến làm giảm hiệu quả của kháng sinh dùng để kiểm soát bệnh dịch ở tôm. Ví dụ như vi khuẩn *V. harveyi* và *V. splendidus* gây bệnh phát sáng trên ấu trùng tôm, có khả năng kháng với nhiều loại kháng sinh như erythromycin, kanamycin, pencicillin G và streptomycin. Manjusha và cộng sự đã nghiên cứu đánh giá khả năng kháng lại 20 loại thuốc kháng sinh khác nhau của vi khuẩn *Vibrio*, kết quả cho thấy trong tổng số 119 mẫu *Vibrio* phân lập được có 16,8% chủng nhạy cảm với tất cả các loại thuốc kháng sinh, nhưng có tới 83,19% các chủng *Vibrio* kháng lại với thuốc kháng sinh [40]. Tác giả Huỳnh Ngọc Tường đã phân lập được 8 loài *Vibrio*, nhiều nhất là *V. parahaemolyticus*, *V. mimicus* và *V. alginolyticus* từ 161 mẫu nước và 82 mẫu thủy sản. Có đến 96,7% số chủng phát hiện kháng với ít nhất 1 loại kháng sinh khảo sát và 18,1% số chủng có hiện tượng đa kháng. Pyocyanin đã được ứng dụng để trị bệnh trong thủy sản nhằm làm giảm hiện tượng kháng kháng sinh ở vi khuẩn, giảm mức độ tồn dư kháng sinh trong thủy sản.

1.2. Pyocyanin

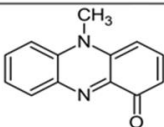
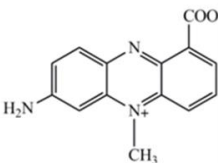
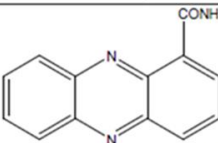
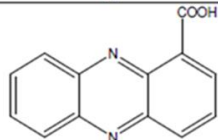
Pyocyanin là hợp chất tự nhiên thứ cấp, dị vòng chứa nitơ, màu xanh dương, được sinh ra bởi vi khuẩn Gram âm *P. aeruginosa* [41]. Sắc tố này là một dẫn xuất chính trong số các phenazine gồm pyocyanin, phenazine-1-carboxylic acid (PCA), 1-hydroxyphenazine (1-OH-PHZ) và phenazine-1-carboxamide (PCN) và được

ngiên cứu nhiều nhất [42]. Pyocyanin với đặc tính kháng khuẩn đặc biệt của mình, không gây độc trên đối tượng sử dụng tùy thuộc theo nồng độ và có thể phân hủy trong tự nhiên nên pyocyanin có nhiều ứng dụng trong kiểm soát sinh học đặc biệt trong lĩnh vực thủy sản [43].

1.2.1. Cấu trúc của pyocyanin

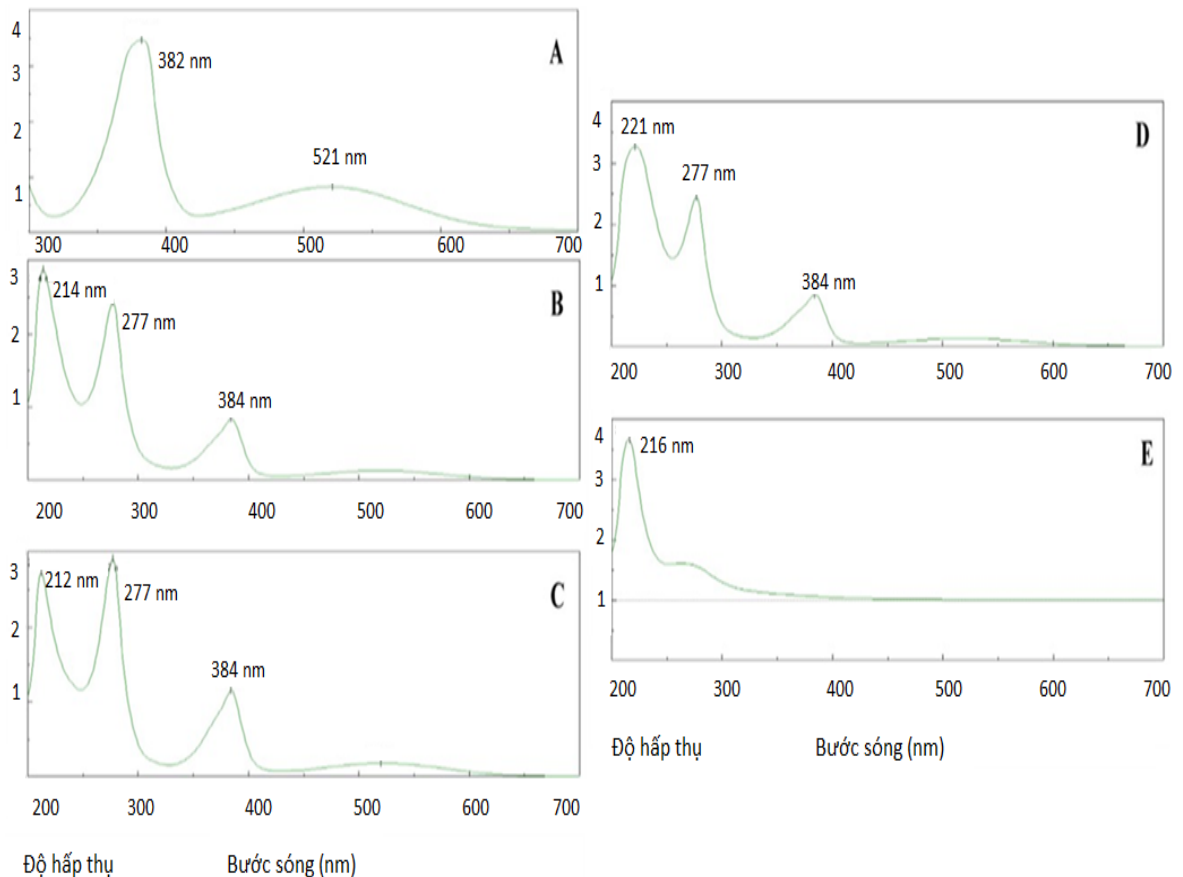
Pyocyanin là một dẫn xuất chính trong số các phenazine. Cấu trúc hóa học và tên gọi các dẫn xuất chính của phenazine được thể hiện ở Bảng 1.1 [44][24].

Bảng 1.1. Cấu trúc hóa học và tên gọi các dẫn xuất của phenazine [45].

Tên gọi chung	Tên hóa học	Cấu trúc hóa học
Pyocyanin	1-Hydroxy-5-Methyl Phenazinium betaine	
Pyorubin	7-imino-5-methylphenazine-1-carboxylate	
Oxychloraphin	Phenazine-1-Carboxamide	
Tubermysin B	Phenazine-1-Carboxylic acid	

Pyocyanin có công thức hóa học $C_{13}H_{10}N_2O$ và phổ UV của pyocyanin chuẩn được quan sát ở bước sóng 382 và 521 nm với HCl 0,2M là ống trắng. Tuy nhiên phổ UV của pyocyanin cũng có thay đổi khi thu trên các môi trường nuôi khác nhau. Ví dụ ở môi trường King A có bổ sung thêm ngô, pyocyanin có phổ hấp thụ ở bước sóng 214, 277 và 384 nm, môi trường bổ sung đậu tương thì pyocyanin có phổ hấp thụ ở bước sóng 212, 277 và 384 nm, môi trường bổ sung khoai lang thì pyocyanin có phổ hấp thụ ở bước sóng 221, 277 và 384 nm, trong khi với môi trường bổ sung dưa hấu thì phổ đo được ở bước sóng 216 nm [46] (Hình 1.4).

Pyocyanin được tạo thành từ hai tiểu đơn vị của N-methyl-1-hydroxyphenazine. Pyocyanin được phân loại thuộc dẫn xuất của nhóm phenazine. Con đường sinh tổng hợp phenazine của chi *Pseudomonas* được nghiên cứu sâu. Phenazine là một hợp chất dị vòng được tổng hợp tự nhiên đầu tiên dưới dạng 5-methyl-7-amino-1-carboxyphenazinium betaine có màu đỏ đậm sau đó chất này được chuyển thành phenazine-1-carboxylic (PCA) có màu vàng chanh, và cuối cùng là chuyển hóa thành 1-hydroxy-5-methyl phenazine (pyocyanin) [47].



Hình 1.4. Phổ UV-VIS của pyocyanin chuẩn (A) và pyocyanin chiết từ môi trường KingA có bổ sung ngô (B), đậu tương (C), khoai lang (D) và dưa hấu (E) [46].

1.2.2. Hoạt tính sinh học và độc tính của pyocyanin

1.2.2.1. Hoạt tính kháng khuẩn

Pyocyanin có tính kháng khuẩn mạnh. Tính kháng khuẩn *Escherichia coli* của pyocyanin được báo cáo lần đầu tiên vào năm 1940. 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 [48]. Pyocyanin có khả năng kháng lại các loài vi khuẩn gây bệnh như *Salmonella paratyphi*, *E. coli* và *Klebsiella* gây bệnh viêm phổi [49]. Pyocyanin phân lập từ *P. aeruginosa* 4B có khả năng chống lại tác nhân gây bệnh khác nhau và vi khuẩn gây hư hỏng thực phẩm như *Bacillus cereus*. Ngoài ra, pyocyanin còn được biết đến với hoạt tính kháng nấm và khả năng kiểm soát sinh học hiệu quả. Sắc tố do vi khuẩn sản sinh đã được xác định là kháng sinh phổ rộng, chống lại có hiệu quả nấm bệnh và các chủng *Vibrio* spp. gây bệnh trong nuôi trồng thủy sản [50].

Pyocyanin kháng *Escherichia coli* được đặt tên là colicin. Hoạt tính kháng khuẩn của pyocyanin tinh khiết phụ thuộc vào nồng độ chất. Những nghiên cứu về cơ chế kháng khuẩn của pyocyanin đã cho thấy, pyocyanin tương tác với chuỗi hô hấp màng tế bào dẫn đến ức chế hoạt động trao đổi chất của các tế bào vi khuẩn.

Đối với *E. coli*, pyocyanin là nguyên nhân gây cạn kiệt nguồn cung cấp oxy cho các tế bào, sản sinh H_2O_2 và làm chuyển hướng dòng điện tử, gây ra độc tính đối với tế bào *E. coli* [51]. Pyocyanin từ *Pseudomonas* cũng có hoạt tính ức chế mạnh vi khuẩn *E. coli* phân lập từ mật củ cải đường [52].

Tính kháng khuẩn của pyocyanin từ *P. aeruginosa* phân lập từ trầm tích đại dương thuộc quần đảo Hawaii đã được nghiên cứu bởi Angell và cộng sự (2006) [48]. Ngoài ra, sắc tố được sinh ra từ *P. aeruginosa* còn có khả năng chống lại các vi sinh vật như *Acinetobacter*, *S. aureus* và *Streptococcus* gây bệnh viêm phổi rất hiệu quả [50].

1.2.2.2. Hoạt tính kháng nấm

Pyocyanin ức chế sự phát triển của nhiều loài nấm men *Candida* như *C. albicans* và nấm sợi như *Aspergillus*. Pyocyanin được tách chiết từ *P. aeruginosa* phân lập từ đờm của bệnh nhân xơ nang có thể ức chế sự phát triển của nấm như *A. fumigatus* và *C. albicans*. Tín hiệu tương tác qua trung gian giữa *P. aeruginosa* và *C. albicans* ở bệnh nhân xơ nang đã được tìm thấy [53]. Pyocyanin từ *P. aeruginosa* WS1 có nồng độ ức chế tối thiểu –MIC- đối với *Aspergillus flavus* và *Aspergillus* tương ứng là 64 và 128 $\mu\text{g/mL}$ [54]. Nhiều bằng chứng lâm sàng cho thấy pyocyanin kìm hãm sự phát triển của các *C. albicans* khác nhau ở bệnh nhân bị nhiễm trùng phổi. Các chất như pyocyanin, pyrrolnitrin và pseudomonic acid được sinh bởi *P. aeruginosa* có khả năng kháng các loài *Candida* được nuôi trên môi trường thạch Sabouraud dextrose [55].

1.2.2.3. Hoạt tính chống oxy hóa và chống ung thư

Tác giả Rada đã chỉ ra rằng pyocyanin có khả năng gây độc lên tế bào chủ bị vi khuẩn xâm nhiễm, làm suy giảm NADH, glutathione, phân hủy H_2O_2 và hoạt động chống oxy hóa khác như thay đổi trạng thái oxy hóa khử và tạo ra các gốc oxy. Pyocyanin thu được từ chủng *P. aeruginosa* BTRY1 có khả năng chống oxy hóa cao hơn hẳn so với vitamin C nhưng nồng độ pyocyanin sử dụng lại thấp hơn so với nồng độ chất chuẩn vitamin C [56].

Hassani và cộng sự đã phân lập được chủng *P. aeruginosa* PHA-1 và sàng lọc các chủng đột biến thích ứng tự nhiên có nguồn gốc từ chủng vi khuẩn này. Kết quả nhóm nghiên cứu đã sàng lọc được dòng đột biến S300-8 có khả năng sinh pyocyanin cao hơn chủng tự nhiên PHA-1. Pyocyanin được sinh ra bởi dòng đột biến S300-8 thể hiện hiệu quả mạnh chống lại sự phát triển của dòng tế bào ung thư cơ vân: ở nồng độ thấp của các sắc tố này gây chết 65% tế bào sau 72 giờ ủ, độ độc tế bào được cải thiện bằng cách tăng nồng độ của các chất màu và thời gian phơi sáng. Hơn nữa, pyocyanin từ dòng đột biến S300-8 gây ra apoptosis loại bỏ những

tế bào không còn cần thiết, hoặc các tế bào bị tổn thương; phân mảnh DNA trong tế bào ung thư cơ vân tương ứng là 80% và 73,3% [57].

Zhao và cộng sự đã công bố pyocyanin ức chế đáng kể sự tăng sinh của dòng tế bào ung thư HePG2 và kích hoạt sản xuất một lượng lớn các gốc tự do (ROS), từ đó điều chỉnh enzyme superoxide dismutase (SOD) và enzyme catalase, và làm suy giảm glutathione (GSH), giảm tỷ lệ oxy hóa GSH/GSH [58]. Pyocyanin ức chế sự tăng sinh của dòng tế bào nguyên bào sợi ở da người, ngoài ra, Laxmi và Bhat đã chỉ ra rằng pyocyanin được phân lập từ *P. aeruginosa* BTRY1 đã làm giảm hoạt tính tán huyết ngay cả ở nồng độ thấp 1 µg/mL. Tác giả cũng cho thấy pyocyanin không gây độc tế bào đối với dòng tế bào bình thường ở nồng độ dao động từ 6,25 đến 100 µg/mL với tỷ lệ sống sót của tế bào lên đến 90% khi xử lý với pyocyanin ở nồng độ 6,25 µg/mL. Khả năng sống của tế bào khoảng 80% ngay cả ở nồng độ pyocyanin cao [59].

1.2.2.4. Độc tính của pyocyanin

Priyaja và cộng sự đã nghiên cứu về độc tính của pyocyanin với các dòng tế bào như dòng tế bào phôi thai người (L-132), dòng tế bào cá hồi vân (RTG-2), dòng tế bào buồng trứng nhộng côn trùng (Sf9). Khi đánh giá chỉ số IC₅₀ cho thấy dòng tế bào người có độ nhạy cảm hơn với pyocyanin so với các dòng tế bào khác với IC₅₀ là 21,79 mg/L đã gây tổn thương màng sinh chất nồng độ này thấp hơn 5 lần so với dòng tế bào cá hồi vân (Bảng 1.2) [60].

Bảng 1.2. Nồng độ IC₅₀ của pyocyanin tác động lên thành phần tế bào người, cá và côn trùng [60]

	Dòng tế bào	IC ₅₀ (mg/L)	Tác động lên thành phần tế bào
1	Tế bào côn trùng Sf9	106,39 ± 13,92	Ức chế enzyme dehydrogenase ở ty thể
		107,77 ± 28,14	Gây tổn thương màng sinh chất
		133,67 ± 23,6	Ức chế quá trình tổng hợp protein
2	Dòng tế bào cá hồi RTG-2	146,19 ± 28,78	ức chế enzyme dehydrogenase ở ty thể
		109,83 ± 11,28	Gây tổn thương màng sinh chất
		76,64 ± 9,99	Ức chế quá trình tổng hợp protein
3	Dòng tế bào người L-132	112,01 ± 23,73	Ức chế enzyme dehydrogenase ở ty thể
		21,79 ± 14,23	Gây tổn thương màng sinh chất
		32,57 ± 16,52	Ức chế quá trình tổng hợp protein

Ở nồng độ cao 200 mg/L thì pyocyanin gây biến đổi hình thái tế bào so với trạng thái bình thường. Tuy nhiên trong nghiên cứu này ở nồng độ 6,25 mg/L, pyocyanin không gây độc đối với tế bào và các thành phần của tế bào. Tác giả đã

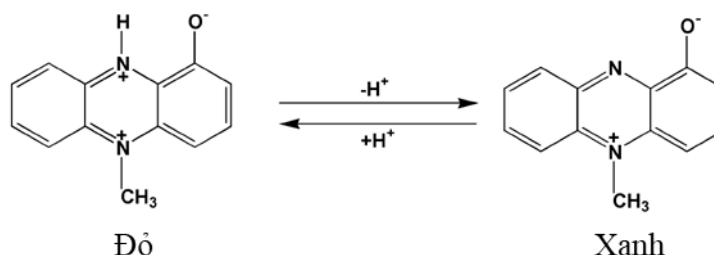
đưa ra kết luận ở nồng độ pyocyanin từ 5 đến 10 mg/L là nồng độ an toàn để ứng dụng pyocyanin. Trong một nghiên cứu khác sử dụng chuột và tôm làm thử nghiệm sinh học đánh giá độc tính của pyocyanin. Kết quả cho thấy xử lý pyocyanin ở tôm lên đến nồng độ 50 mg/L không gây độc trên tôm. Thử nghiệm sinh học với chuột ở nồng độ 750 mg/L pyocyanin không gây độc với chuột, tuy nhiên khi tăng nồng độ lên 1000 mg/L thì đã gây chết 3,83 đơn vị chuột (1 đơn vị chuột tương đương 1 con chuột nặng 20 g) [61].

Pyocyanin dễ bị phân hủy trong tự nhiên. Khả năng suy thoái của phenazin và tiền chất của nó đã được chứng minh qua các tài liệu của các tác giả khác nhau như Chen (2008) [62] và Reszka (2004) [63]. Hoạt chất pyocyanin dễ dàng bị phân hủy bởi vi khuẩn *Sphingomonas* sp. DP58 trong đất trong vòng 40 giờ. Nhóm phenol trong pyocyanin rất dễ bị phân hủy bởi enzyme peroxidase có sẵn trong một số vi sinh vật trong đất. Pyocyanin là hoạt chất trung gian thứ cấp, quá trình oxy hóa của pyocyanin dẫn đến ngừng hoạt động của nó và trở nên không độc hại và các phản ứng này là không thể đảo ngược [62]. Các chất chuyển hóa trung gian có khả năng tự phân hủy theo thời gian và không có khả năng tích lũy về nồng độ vì vậy sử dụng cho tôm nuôi là an toàn [62]. Thực tế trên thị trường, vi khuẩn *Pseudomonas* và các hợp chất sản xuất bởi *Pseudomonas* đã được chấp nhận như là chế phẩm sinh học, được dùng làm chất đối kháng chống lại vi khuẩn gây bệnh trong các hệ thống tuần hoàn nuôi thủy sản [64]. Nghiên cứu độc tính của pyocyanin trên các hệ thống sinh học khác nhau, cho biết khả năng gây độc của pyocyanin từ các chủng phân lập ở môi trường có giá trị LC50 cao hơn rất nhiều so với nồng độ pyocyanin cần thiết để điều trị bệnh do vi khuẩn *Vibrio* gây ra. Hoàn toàn có thể sử dụng pyocyanin để loại trừ *Vibrio* trong các hệ thống nuôi thủy sản. Trong nghiên cứu này nồng độ ức chế tối thiểu (Minimum Inhibitory Concentration – MIC) của pyocyanin ức chế *V. harveyi* là 5 mg/L, ở 10 mg/L nó thể hiện khả năng diệt khuẩn. Nghiên cứu này đã chứng minh pyocyanin tiêu diệt được các chủng *Vibrio* và không ảnh hưởng đối với các tập đoàn vi khuẩn nitrat hóa tích hợp trong hệ thống tuần hoàn nuôi thủy sản. Mặc dù các chủng phân lập từ các mẫu lâm sàng gây ra độc tính, nhưng pyocyanin từ các chủng phân lập ở môi trường có thể được sử dụng như là tác nhân dự phòng để kiểm soát bệnh *Vibrio* trong các hệ thống tuần hoàn nuôi thủy sản [64].

1.2.3. Cơ chế kháng khuẩn của pyocyanin

Ban đầu pyocyanin được dùng trong công nghiệp nhuộm nhờ có thể oxy hóa khử tương tự menaquinone. Nhờ cấu trúc hóa học đặc biệt của mình (5-methyl-1-hydroxyphenazine), pyocyanin có khả năng cho nhận điện tử tạo ra nhiều hình thái khác nhau đồng thời cũng mang lại cho pyocyanin có hoạt tính oxy hóa phức tạp.

Pyocyanin có thể tồn tại ở hai dạng một là dạng oxy hóa ở môi trường kiềm pyocyanin có màu xanh biển và dạng không oxy hóa ở môi trường acid thì pyocyanin có màu đỏ (Hình 1.5) [65].



Hình 1.5. Pyocyanin ở môi trường kiềm có màu xanh và pyocyanin ở môi trường acid có màu đỏ.

Đặc tính sinh học đặc biệt được quan tâm chính của pyocyanin là hoạt tính oxy hóa khử nhờ khả năng nhận điện tử tạo ra một gốc anion tương đối ổn định và dễ dàng tham gia chu trình oxy hóa khử. Pyocyanin tạo ra các gốc oxy hóa tự do (reactive oxygen species; ROS) từ đó tạo ra stress oxy hóa cho tế bào vật chủ hoặc vi sinh dẫn đến làm tổn thương các thành phần tế bào như DNA. Do đó cơ chế kháng khuẩn của pyocyanin có thể thông qua sự tăng nồng độ của các nhóm ROS như O_2^- và của H_2O_2 dẫn đến gây độc cho tế bào. Khả năng kháng lại pyocyanin của các vi khuẩn phụ thuộc vào mức độ hoạt động của hai enzyme superoxide dismutase và catalase, ngoài ra nó còn phụ thuộc vào nồng độ oxy [66].

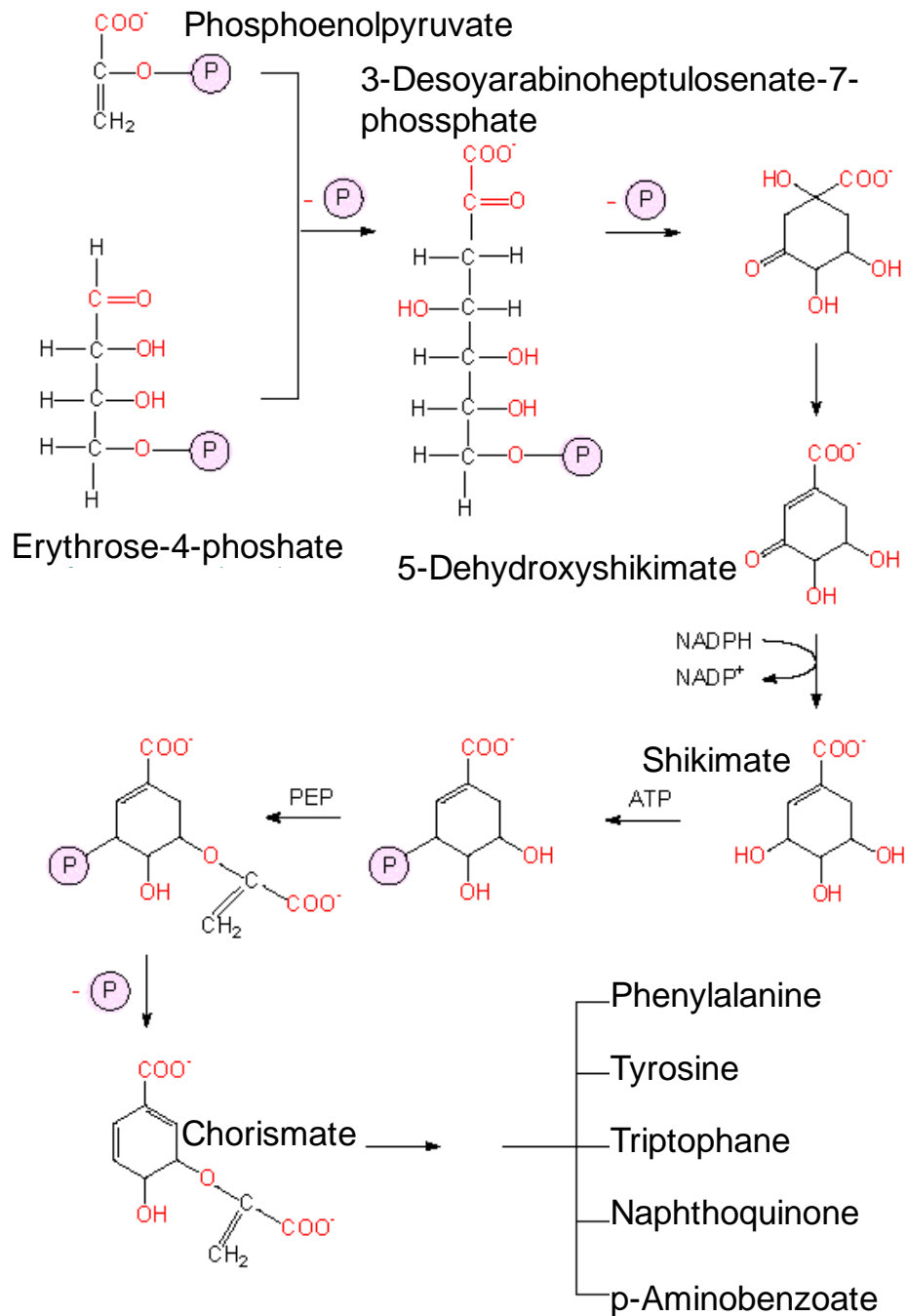
Pyocyanin của *P. aeruginosa* có tính oxy hóa khử cao nên dễ dàng xuyên qua màng sinh học của tế bào. Chính chất này đã giúp *P. aeruginosa* nhận và vận chuyển các điện tử trong quá trình hô hấp của vi khuẩn giúp vi khuẩn tồn tại trong môi trường nghèo oxy [66].

1.2.4. Con đường sinh tổng hợp pyocyanin

Quá trình sinh tổng hợp pyocyanin bắt nguồn từ chorismic acide được tổng hợp trong con đường chuyển hóa shikimic acid.

Con đường chuyển hóa Shikimate là con đường chuyển hóa cần thiết của vi khuẩn và cây để tổng hợp amino acid vòng thơm như phenylalanine, tyrosine and tryptophan và các hợp chất vòng thơm khác (Hình 1.6). Các hợp chất này tối cần thiết cho các chức năng chính của quá trình sinh trưởng. Quá trình này kết nối chuyển hóa carbohydrate sinh tổng hợp thành các hợp chất có vòng thơm [67]. Điều đáng lưu ý là con đường chuyển hóa Shikimate chỉ có mặt ở vi sinh vật và thực vật chứ không có mặt ở động vật. Do đó các hợp chất thứ cấp được tổng hợp từ con đường này dành được sự quan tâm lớn do tính ứng dụng và tầm quan trọng của chúng cho các sinh vật khác như các chất tryptophane hay tyrosine là các amino acid thiết yếu [68]. Trong con đường này, tiền chất chorismate đã được tạo ra là chất tham gia vào tổng

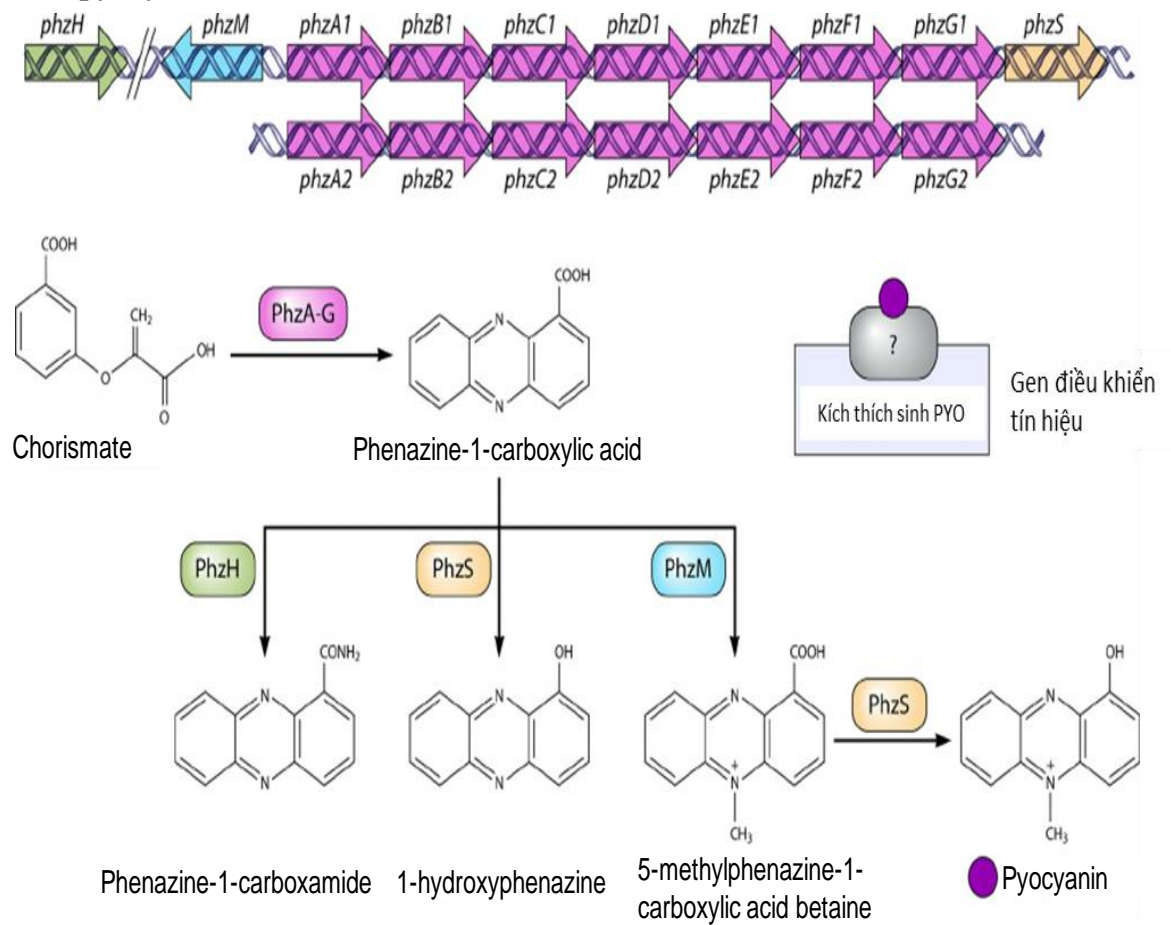
hợp phenazine và nhóm amino acid khác (Hình 1.6) [68].



Hình 1.6. Con đường chuyển hóa Shikimate [67]

Quá trình sinh tổng hợp pyocyanin có sự tham gia của bảy gen là *phzC*, *D*, *E*, *F*, *G*, *M* and *S* nằm trên con đường sinh tổng hợp chuyển hóa shikimic acid. Chorismate được enzyme *phzA-G* xúc tác, chuyển hóa thành phenazine-1-carboxylic acid (PCA). Sau đó PCA được chuyển hóa thành ba loại phenazine khác nhau nhờ ba enzyme *PhzH*, *PhzS* và *PhzM*. Enzyme *PhzM* và *PhzS* là hai enzyme chính chịu trách nhiệm chuyển hóa PCA thành pyocyanin theo hai bước chính: Bước 1: PCA được enzyme *PhzM* xúc tác chuyển một nhóm methyl vào nguyên tử

nitor của vòng phenazine để tạo thành 5-methylphenazine-1-carboxylic acid betaine; Bước hai: 5-methylphenazine-1-carboxylic acid betaine được enzyme PhzS oxy hóa thành pyocyanin (Hình 1.7) [69][70].



Hình 1.7. Con đường sinh tổng hợp phenazine và pyocyanin [69]

1.2.5. Tách chiết và tinh chế pyocyanin

Pyocyanin đã được nghiên cứu tách chiết bằng cách sử dụng chloroform hòa tan pyocyanin trong môi trường nuôi cấy. Hỗn hợp chiết được tinh sạch bằng cột oxit nhôm sử dụng hỗn hợp dung môi chloroform và ethanol là dung môi rửa giải [71]. Một số tác giả khác đã sử dụng các phương pháp khác để tách pyocyanin như sử dụng kết tủa với nhôm sulphate, sử dụng màng lọc gel hay dùng sắc ký trao đổi ion. Hassanein, Raouf và các cộng sự đã sử dụng chín loại dung môi khác nhau để tách pyocyanin kết quả cho thấy chloroform có hiệu suất tách chiết cao nhất trong các dung môi được sử dụng. Trong nghiên cứu này, pyocyanin của mẫu được chiết hai lần bằng hai dung môi là chloroform và HCl 0,2N [72]. Tác giả Saosoong đã tinh sạch pyocyanin từ *P. aeruginosa* bằng cách sử dụng cột Amberlite XDA-4, sau đó cô pyocyanin bằng cột silicagel và cuối cùng dùng HPLC để thu phân đoạn pyocyanin tinh khiết. Độ tinh sạch của pyocyanin trong nghiên cứu này được xác định bằng HPLC, phổ UV và phổ IR [73].

1.2.6. Ứng dụng của pyocyanin

1.2.6.1. Kiểm soát sinh học

Trước đây pyocyanin được ứng dụng trong ngành dệt nhuộm để thay thế chất nhuộm màu hóa học. Nhưng với đặc tính kháng khuẩn và kháng nấm mạnh của mình, hiện nay pyocyanin đang được chú ý như là một chất có khả năng kiểm soát sinh học trong nông nghiệp bằng cách ức chế tiêu diệt các vi sinh vật gây bệnh cho cây trồng [28].

1.2.6.2. Ứng dụng trong thủy sản

Pyocyanin, một hợp chất trao đổi thứ cấp do *Pseudomonas aeruginosa* sản xuất, có tiềm năng ứng dụng quan trọng trong nuôi trồng thủy sản nhờ hoạt tính kháng khuẩn mạnh mẽ và các đặc tính sinh học đa dạng. Pyocyanin có khả năng ức chế sự phát triển của nhiều vi khuẩn gây bệnh phổ biến như *Vibrio spp.* (*V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *V. alginolyticus*), giúp phòng ngừa các bệnh nghiêm trọng như hoại tử gan tụy cấp tính (AHPND) và bệnh phát sáng ở tôm, cá. Sử dụng pyocyanin làm giải pháp thay thế kháng sinh không chỉ giúp kiểm soát bệnh hiệu quả mà còn giảm thiểu nguy cơ kháng kháng sinh và tồn dư kháng sinh trong sản phẩm thủy sản, đáp ứng các tiêu chuẩn xuất khẩu. Ngoài ra, pyocyanin có thể kích thích hệ miễn dịch của vật nuôi thông qua việc điều chỉnh các loại oxy phản ứng (ROS), hỗ trợ vật nuôi chống lại tác nhân gây bệnh. Trong môi trường nuôi, pyocyanin có thể kiểm soát sự phát triển của vi sinh vật có hại, cải thiện chất lượng nước và cân bằng hệ sinh thái vi sinh. Hợp chất này cũng có tiềm năng tích hợp vào thức ăn như một phụ gia sinh học, giúp cải thiện sức khỏe và tăng trưởng của vật nuôi. Tuy nhiên, để tối ưu hóa hiệu quả, cần đánh giá kỹ lưỡng nồng độ sử dụng nhằm tránh tác động tiêu cực đến vật nuôi hoặc vi sinh vật có lợi, đồng thời đảm bảo sản xuất pyocyanin an toàn và không chứa tạp chất. Việc ứng dụng pyocyanin trong nuôi trồng thủy sản không chỉ nâng cao năng suất và chất lượng sản phẩm mà còn góp phần phát triển bền vững cho ngành.

Nghiên cứu ứng dụng của pyocyanin được tiến hành ở nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới như Mỹ (2006); Đức (2012); Iran (2012); Ấn Độ (2010) và Thái Lan (2010). Sắc tố do vi khuẩn sản sinh đã được xác định là kháng sinh phổ rộng, chống lại có hiệu quả nấm bệnh và các chủng *Vibrio sp.* gây bệnh trong nuôi trồng thủy sản. Priyaja đã thông báo rằng, tính kháng của pyocyanin với 7 loài *Vibrio*: *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. mediterrani* và *V. nereis* với vòng kháng khuẩn từ 13,5 đến 31,0 mm [51]. Khi dùng dịch nuôi của *P. aeruginosa* có hàm lượng pyocyanin là 30 mg/L cho vòng ức chế đạt 17,50 – 38,06 mm. Nồng độ ức chế tối thiểu của pyocyanin chống lại các vi

khuẩn và nấm dao động ở 20-120 $\mu\text{g/mL}$. Mức độ ảnh hưởng đối với một số chủng không gây bệnh như LA5, *Bacillus clausii* tương tự như khi sử dụng kháng sinh tetracycline.

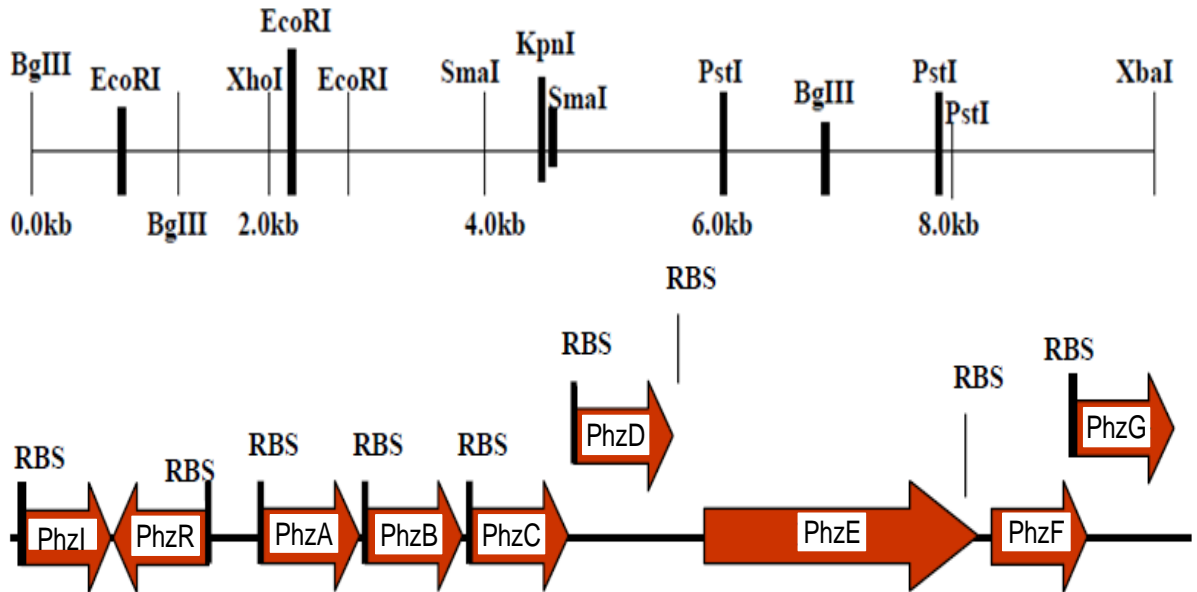
Nghiên cứu độc tính của pyocyanin trên các hệ thống sinh học khác nhau cho biết khả năng gây độc của pyocyanin từ các chủng phân lập ở môi trường có giá trị LC50 cao hơn rất nhiều so với nồng độ pyocyanin cần thiết để điều trị bệnh do vi khuẩn *Vibrio* gây ra [64]. Hoàn toàn có thể sử dụng pyocyanin để loại trừ *Vibrio* trong các hệ thống nuôi thủy sản. Trong nghiên cứu này nồng độ ức chế tối thiểu (Minimum Inhibitory Concentration – MIC) của pyocyanin ức chế *V. harveyi* là 5 mg/L, ở 10 mg/L nó thể hiện khả năng diệt khuẩn. Nghiên cứu này đã chứng minh pyocyanin tiêu diệt được các chủng *Vibrio* và không ảnh hưởng đối với các tập đoàn vi khuẩn nitrat hóa tích hợp trong hệ thống tuần hoàn nuôi thủy sản. Mặc dù các chủng phân lập từ các mẫu lâm sàng gây ra độc tính, nhưng pyocyanin từ các chủng phân lập ở môi trường có thể được sử dụng như là tác nhân dự phòng để kiểm soát bệnh *Vibrio* trong các hệ thống tuần hoàn nuôi thủy sản.

Khảo nghiệm tính an toàn trên tôm nuôi đã xác định nồng độ gây chết 50% của pyocyanin trên ấu trùng tôm biển tiếp xúc sau 12 giờ là 321,45 mg/L và 24 giờ là 217 mg/L. Đây là nồng độ cao hơn gấp hàng trăm lần so với nồng độ cần thiết để sử dụng trong điều trị bệnh [74].

1.3. Chuyển gen mã hóa protein tham gia vào quá trình tổng hợp pyocyanin

1.3.1. Các gen tham gia vào quá trình chuyển hóa phenazine

Các gen nằm trên locus tham gia vào chuyển hóa tổng hợp phenazine từ *P. fluorescens* và *P. aeruginosa* đã được xác định và giải trình tự [75]. Locus này gồm một operon *phzABCDEFG* bao gồm bảy gen, đóng vai trò chính chuyển hóa chorismic acid thành PCA (Hình 1.8) [76][70]. Hai loài *P. aureofaciens* và *P. fluorescens* đều chứa 1 operon *phzABCDEFG* trong khi đó loài *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 PCA của chúng này hiệu quả hơn các nhóm vi khuẩn khác. Điều này dẫn đến khả năng sinh pyocyanin của *P. aeruginosa* hơn hẳn các vi khuẩn khác do PCA là tiền chất trung tâm cuối cùng để tổng hợp ra pyocyanin [76][70][77].



Hình 1.8. Operon *phzABCDEFG* sinh tổng hợp phenazine của chủng *Pseudomonas fluorescens* 2-79 [75]

Quá trình sinh tổng hợp tổng hợp phenazine bắt đầu với gen *phzE* tham gia vào quá trình amin hóa chorismic acid thành ADIC (2-amino-2-deoxyisochorismic acid) nhờ enzyme tổng hợp aminodeoxy isochorismate ADIC vừa được tạo thành sẽ được chuyển hóa thành DHHA (trans-2,3-dihydro-3-hydroanthranilic acid) nhờ gen *phzD*. Các sản phẩm của *phzF* và *phzG* tổng hợp nên các hệ vòng đầu tiên phenazine-1, 6-dicarboxylic acid thông qua phản ứng trùng ngưng của 2 phân tử DHHA giống nhau, sau đó thành PCA (phenazine-1-carboxylic acid) nhờ các gen *phzA* và *phzB*. Sự biểu hiện muộn của gen *phzC* tạo điều kiện thuận lợi cho các chất chuyển hóa carbon đi vào con đường shikimate.

1.3.2. Tổng hợp pyocyanin từ phenazine-1-carboxylic acid

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 *phzS* và *phzM*. Quá trình tổng hợp này liên quan đến quá trình methyl hóa phân tử bởi PhzM và hydroxyl hóa phân tử bởi 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 [70].

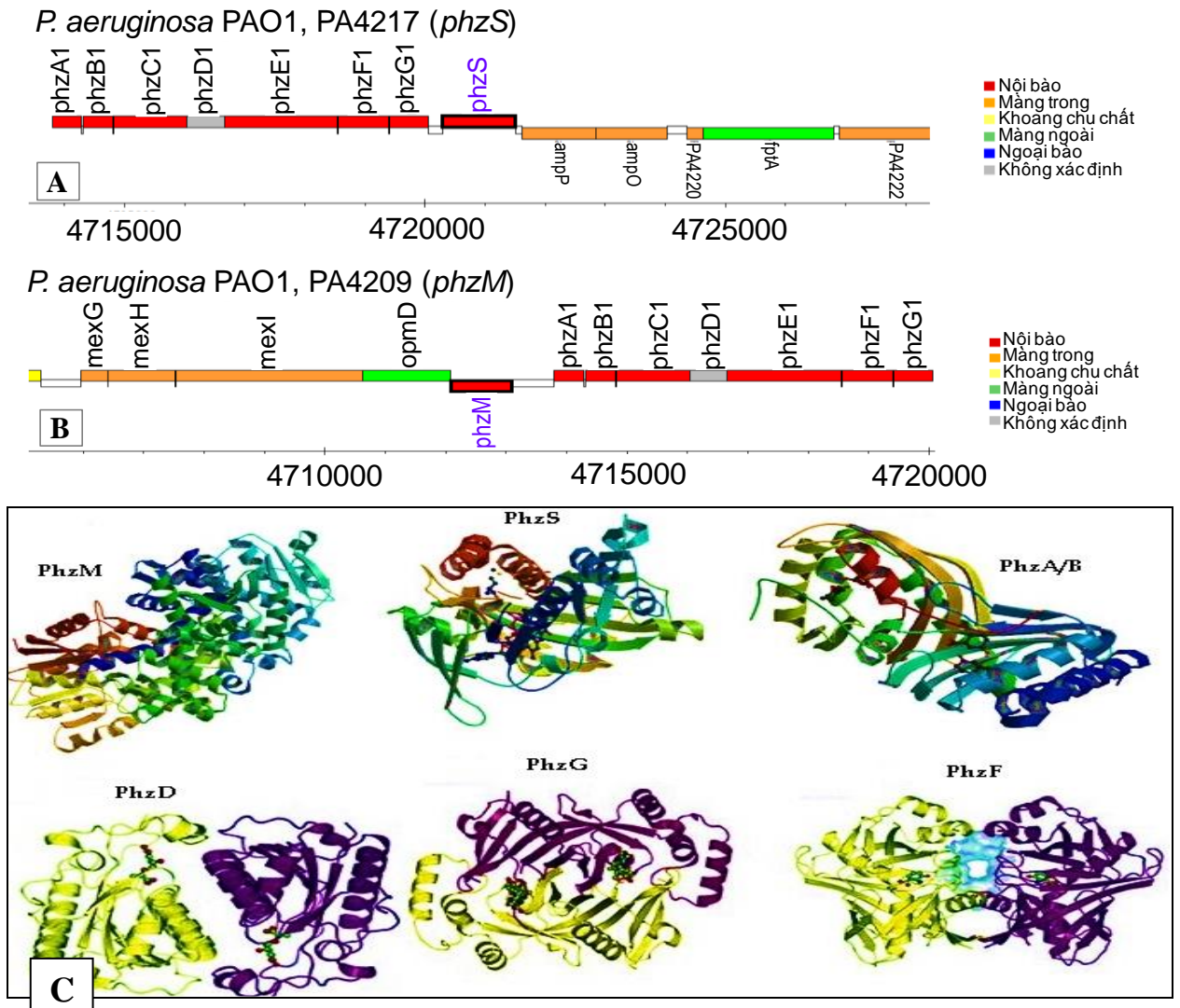
Con đường sinh tổng hợp pyocyanin được nghiên cứu sâu với chủng *P. aeruginosa* PAO1. Nghiên cứu của tác giả Dimitri và cộng sự đã cho thấy *P. aeruginosa* PAO1 có khả năng tổng hợp các chất khác nhau thuộc nhóm phenazine như pyocyanin, PCN và 1-OHPHZ. Quá trình tổng hợp pyocyanin của chủng này gồm hai bước: bước 1 enzyme SAM-dependent methyltransferase PhzM xúc tác tổng hợp PCA thành 5-methylphenazine-1-carboxylic betaine acid. Bước thứ hai nhờ sự hoạt động xúc tác của enzyme NADH-dependent flavoprotein

monooxygenase PhzS, quá trình hydro hóa và quá trình decarboxy chuyển 5-methylphenazine-1-carboxylic betaine acid thành pyocyanin. Trong một nghiên cứu khác ở *E. coli* biểu hiện gen *phzS* và nuôi cấy trong dịch nuôi của chủng vi khuẩn biểu hiện gen *phzM* thì phát hiện sự có mặt của pyocyanin. Nhưng ngược lại nếu nuôi chủng biểu hiện gen *phzM* bằng dịch nuôi vi khuẩn biểu hiện *phzS* thì chỉ phát hiện sự có mặt của PCA, 1-OHPHZ mà không thấy sự có mặt của pyocyanin. Điều này khẳng định khả năng PhzS có thể chuyển hóa PCA thành 1-OHPHZ [75]. Ngoài ra *P. aeruginosa* còn có khả năng tổng hợp PCN bằng enzyme được mã hóa bởi gen *phzH*. Enzyme glutamine-dependent, phenazine-specific amidotransferase xúc tác chuyển hóa PCA thành PCN. Như vậy để *P. aeruginosa* sinh tổng hợp pyocyanin điều kiện bắt buộc phải có sự tham gia liên tiếp của hai enzyme PhzM và PhzS. Đây là cơ sở để nghiên cứu tăng cường khả năng sinh tổng hợp pyocyanin bằng phương pháp chuyển gen [75][70].

1.3.3. Vai trò của PhzM và PhzS trong quá trình sinh tổng hợp pyocyanin

Các gen *phzM* và *phzS* của *Pseudomonas aeruginosa* nằm trong cụm gen phenazine (phz cluster), cụm gen chịu trách nhiệm sinh tổng hợp các hợp chất phenazine, bao gồm pyocyanin. Trong hệ gene của *P. aeruginosa* PAO1 (NCBI Accession: NC_002516.2), cụm gen này thường nằm trong vùng từ 4.9 đến 5.1 Mb trên nhiễm sắc thể. Gen *phzM* có độ dài khoảng 888 bp, mã hóa enzyme methyltransferase (~35 kDa), xúc tác quá trình chuyển đổi phenazine-1-carboxylic acid (PCA) thành 5-methylphenazine-1-carboxylic acid (5-MPCA). Gen *phzS* dài khoảng 1,245 bp, mã hóa enzyme monooxygenase (~44 kDa), chịu trách nhiệm chuyển hóa 5-MPCA thành pyocyanin. Các gen này được điều hòa bởi hệ thống quorum sensing và các tín hiệu môi trường, đảm bảo pyocyanin được tổng hợp dưới các điều kiện thích hợp. Sự phối hợp chặt chẽ giữa *phzM* và *phzS* đóng vai trò quan trọng trong khả năng kháng khuẩn và tạo sắc tố xanh đặc trưng của *P. aeruginosa*.

Tổng hợp pyocyanin từ chorismate bởi các operon *phz* tạo thành PCA, bước cuối cùng tổng hợp pyocyanin từ PCA được xúc tác bởi hai enzyme tổng hợp từ *phzM* và *phzS* [75]. Các nghiên cứu gần đây cho thấy quá trình tổng hợp pyocyanin cần có sự tham gia của hai enzyme PhzM và PhzS. Dimitri và cộng sự đã thực hiện nghiên cứu chứng minh vai trò của hai enzyme này trong quá trình sinh tổng hợp pyocyanin của chủng *P. aeruginosa* PAO1 bằng cách tạo ra chủng đột biến chỉ mang gen *phzM* (chủng PAOmxM) và chủng chỉ mang gen *phzS* (chủng PAOmxS). Hai chủng này cho sinh ra các sắc tố đặc biệt khi chúng được nuôi trên đĩa PIA.



Hình 1.9. Vị trí của gen *phzS* (A) và gen *phzM* (B) trên bộ gen của *P. aeruginosa* PAO1, cấu trúc không gian của một số enzyme được tổng hợp từ các gen *phz* của *P. aeruginosa* (C) [75]

Chủng tự nhiên PAO1 có màu xanh đặc trưng do có khả năng tổng hợp pyocyanin nhưng chủng PAOmxM thì lại có khuẩn lạc màu vàng trong khi đó chủng PAOmxS thì lại sản sinh ra sắc tố đỏ đậm tan trong nước. Sử dụng phân tích trên máy HPLC và MS cho thấy cả hai chủng đột biến này đều tổng hợp PCA và PCN nhưng không phát hiện thấy sự có mặt của pyocyanin. Chủng PAOmxM có khả năng tổng hợp PCN và 1-OHPHZ với nồng độ cao hơn so với chủng tự nhiên. Tuy nhiên khi phân tích dịch chiết sắc tố từ chủng PAOmxS lại không phát hiện ra sự có mặt của 1-OHPHZ. Trong thí nghiệm khác khi trộn PAOmxM và PAOmxS với sự có mặt của pUCP-M và pUCP-S thì đã phục hồi được khả năng sinh tổng hợp pyocyanin [75]. Điều này cho thấy vai trò không thể tách rời của PhzM và PhzS trong quá trình sinh tổng hợp pyocyanin, nó cũng là cơ sở để tăng cường khả

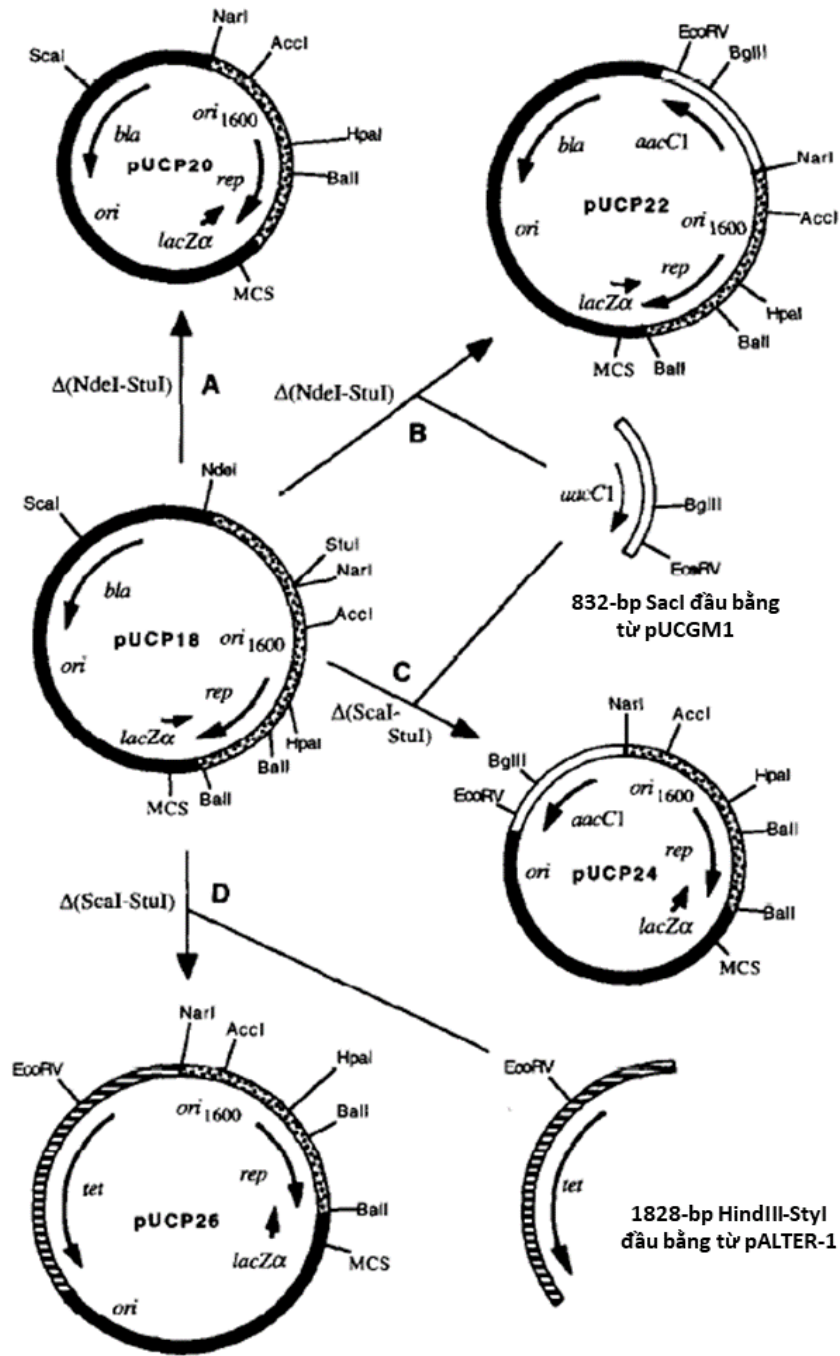
năng sinh tổng hợp pyocyanin trong sản xuất bằng cách tăng cường biểu hiện gen (Hình 1.9).

Quá trình tổng hợp pyocyanin từ sản phẩm PCA từ con đường chuyển hóa Shikimate được tiếp nối bằng hai enzyme mã hóa từ hai gen *phzM* và *phzS*. Hai gen *phzM* và *phzS* mã hóa enzyme đóng vai trò cần thiết cho quá trình sinh tổng hợp pyocyanin [75].

1.3.4. Tăng cường biểu hiện gen *phzM* và *phzS* tham gia vào con đường sinh tổng hợp pyocyanin ở *Pseudomonas aeruginosa*

1.3.4.1. Vector pUCP24, vector biểu hiện gen trong *Pseudomonas*

Vector pUC18/19 vừa là vector tạo dòng vừa có khả năng biểu hiện gen ngoại lai, mang tính ưu việt cao như có khả năng nhân bản nhiều, mang nhiều điểm cắt cho enzyme giới hạn và có kích thước nhỏ. Plasmid này lại có hạn chế bởi chỉ có khả năng nhân bản trong tế bào chủ *E. coli*. Một dòng vector mới pUCP18/19 được phát triển từ vector pUC18/19 giúp plasmid có thể tồn tại và nhân trong tế bào chủ *P. aeruginosa*. Tuy nhiên, hệ vector pUC18/19 có khả năng nhân bản không cao trong chủng *P. aeruginosa*. Vì vậy, West và cộng sự đã đưa đoạn gen dài 1200 bp kiểm soát nhân bản của plasmid trong vi khuẩn *P. aeruginosa* vào plasmid pUCP18 để cải tiến khả năng nhân bản của plasmid trong *P. aeruginosa* (Hình 1.10). Vì các chủng *P. aeruginosa* kháng lại nhiều loại kháng sinh khác nhau trong đó có ampicillin, do vậy vùng gen chỉ thị kháng ampicillin *-bla* (mã hóa β -lactamase) trong pUCP18 đã được thay bằng gen *gm* (từ vector pRO1600) mã hóa cho chỉ thị kháng gentamycin để giúp nhận biết dòng *P. aeruginosa* mang plasmid tái tổ hợp [78]. Vector mới thiết kế được đặt tên là pUPC24.



Hình 1.10. Cấu trúc của các plasmid được tạo thành từ pUCP18 [78]

Cấu trúc vector được cấu tạo từ DNA của pUCP18 (phần màu đen), từ pUCPGM (phần để trống), pRO1614 (phần chấm đen) và pALTER-1 (phần gạch đen). Vector có chứa các vị trí cắt của enzyme: *EcoRI*, *SacI*, *KpnI*, *SmaI*, *BamHI*, *XbaI*, *SacI*, *PstI*, *SphI* và *HindIII*

Vector pUCP24 có cấu trúc được tổ chức hợp lý để hỗ trợ nhân bản và biểu hiện gen trong các vi khuẩn Gram âm như *Pseudomonas aeruginosa* và *Escherichia coli*. Các vị trí chức năng chính và chiều hoạt động của các gen được sắp xếp như sau:

Nguồn gốc sao chép pUC ori: Nằm gần điểm khởi đầu của plasmid, hoạt động theo chiều kim đồng hồ, hỗ trợ tái bản hiệu quả trong *E. coli*.

Nguồn gốc sao chép RSF1010 ori: Nằm sau pUC ori, hoạt động theo chiều ngược kim đồng hồ, cho phép plasmid tái bản trong các vi khuẩn Gram âm khác như *Pseudomonas aeruginosa*.

Gen kháng gentamicin (aada): Được định vị giữa pUC ori và *lacZa*, hoạt động theo chiều kim đồng hồ. Gen này mã hóa protein kháng gentamicin, cho phép chọn lọc các vi khuẩn mang plasmid trong môi trường chứa gentamicin.

Promoter lac và vùng lacZa: Nằm liền kề vùng MCS, hoạt động theo chiều kim đồng hồ. Promoter này điều khiển sự biểu hiện của các gen chèn vào MCS, và hệ thống *lacZa* hỗ trợ kiểm tra sự chèn gen qua phương pháp xanh/trắng.

Vùng MCS (Multiple Cloning Site): Được bố trí sau promoter *lacZa*, bao gồm nhiều vị trí nhận biết của enzyme cắt giới hạn như EcoRI, HindIII, BamHI, XhoI, giúp dễ dàng chèn gen mục tiêu.

Ngoài vector pUPC24, 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 chuyên gen. Lee và cộng sự đã tạo ra vector mới có kích thước 4,87 kb có khả năng nhân bản ổn định khi biến nạp vào vi khuẩn *P. putida* HK-6 và *E. coli* bằng cách chèn đoạn gen chịu trách nhiệm nhân bản plasmid của chủng *Pseudomonas* pRO1614 vào plasmid của *E. coli* pBGS18 tạo thành vector mới pJH1. Vector này chứa vùng tạo dòng có các vị trí cắt của nhiều loại enzyme *EcoRI*, *SacI*, *KpnI*, *SmaI*, *BamHI*, *XbaI*, *SacI*, *PstI*, *SphI* và *HindIII* như vector pUCP24 nhưng pJH1 được thay đổi chứa gen kháng kháng sinh kanamicin. Vector mới có khả năng nhân bản ổn định ở chủng *P. putida* HK-6 (Lee et al., 2006). Syringomycin một là một chất kháng nấm tự nhiên được sinh ra bởi gen *syr* và gen *syp* của chủng *Pseudomonas syringae*. Nếu sử dụng vi sinh vật chủ như *E. coli* để sản sinh syringomycin có thể dẫn tới protein thu được bị mất hoạt tính. Tác giả Shi-En Lu và cộng sự đã tạo dòng vector mới chứa các gen tổng hợp syringomycin như *syr* và gen *syp* kết hợp với MBP (maltose-binding protein) của *E. coli* và đoạn gen plasmid pRO1600 của chủng *Pseudomonas* tạo ra vector mới pMEKm12. Nhóm tác giả đã đưa plasmid vào tế bào chủ là chủng *Pseudomonas syringae* để tăng cường biểu hiện gen liên quan đến sinh tổng hợp syringomycin. Kết quả cho thấy vector pMEKm12 nhân bản ổn định trong tế bào chủ, protein thu được từ thí nghiệm này vẫn giữ được hoạt tính sinh học điều này đóng vai trò quan trọng trong nghiên cứu xác định chức năng hóa sinh liên quan đến quá trình tổng hợp peptide trong sinh tổng hợp syringomycin và syringopept [80].

1.3.4.2. Tăng cường biểu hiện gen nâng cao hiệu suất tổng hợp pyocyanin ở *P. aeruginosa*

P. aeruginosa có hai operon *phz* tổng hợp PCA vì vậy, chúng có khả năng tổng hợp pyocyanin với hiệu suất cao. Do đó, việc tăng lượng enzyme sinh ra bởi *phzM* và *phzS* có thể dẫn đến hiệu quả trong tổng hợp pyocyanin cao hơn chúng tự nhiên. Tuy nhiên, hàm lượng hai enzyme mã hóa từ hai gen cũng cần ở tỷ lệ nhất định, cân bằng thì mới có khả năng thu được pyocyanin với hàm lượng cao. Như đã được mô tả trên con đường chuyển hóa sinh tổng hợp pyocyanin, nếu tăng cường biểu hiện *PhzS* mà thiếu hụt *PhzM* thì chúng sẽ ưu tiên sinh tổng hợp 1-hydroxyphenazine. Nếu tăng cường biểu hiện *PhzM* mà thiếu hụt *PhzA* thì chỉ thu được 5-methylphenazine-1-carboxylic acid betaine. *PhzS* tham gia vào cả hai đường, trong đó con đường sinh ra 1-hydroxyphenazine là con đường ngắn nhất, dễ được chúng ưu tiên nhất. Trong khi đó, con đường sinh pyocyanin lại là con đường phức tạp hơn, phụ thuộc vào lượng 5-methylphenazine-1-carboxylic acid betaine tổng hợp dựa trên PCA do sự xúc tác của *PhzM*. Do vậy, việc tăng cường biểu hiện hai enzyme này để làm tăng sinh tổng hợp pyocyanin là vấn đề cần được nghiên cứu. Các nghiên cứu liên quan đến chuyển gen làm tăng sinh tổng hợp pyocyanin được liệt kê ở Bảng 1.3.

Bảng 1.3. Một số phương pháp nâng cao khả năng sinh pyocyanin ở *P. aeruginosa*

Tên chủng	Giải pháp	Năng suất tăng pyocyanin
Nâng cao khả năng sinh pyocyanin bằng phương pháp chuyển gen trong operon <i>phz</i>		
<i>P. aeruginosa</i> PA-pUCP- <i>Phz</i> ++ [81]	Sử dụng vector pUCP24 chuyển cụm gen <i>phz</i> vào chủng vi khuẩn <i>P. aeruginosa</i> MCCB117	Tăng từ 20 mg/L ở chủng tự nhiên lên 48,15 mg/L ở chủng chuyển gen
<i>P. aeruginosa</i> YTΔ <i>rpoS</i> [82]	Chủng <i>P. aeruginosa</i> đột biến loại bỏ gen <i>rpoS</i> dẫn đến gen <i>phzM</i> tăng cường biểu hiện.	Nồng độ pyocyanin thu được từ chủng đột biến tăng 4 lần so với chủng tự nhiên.
Nâng cao khả năng sinh pyocyanin bằng thay đổi nguồn cơ chất, điều kiện phương pháp nuôi cấy		
<i>P. aeruginosa</i> OG1 [83]	Sử dụng vector oxygen là n-hexane ở nồng độ tối ưu 3,48%	Từ 11,96 mg/L lên 21,2 mg/L
<i>P. aeruginosa</i> OG1 [84]	Sử dụng vector oxygen là toluen ở nồng độ 0,2%	Từ 8 mg/L lên 33 mg/L
<i>P. aeruginosa</i> JY21 [85]	Nuôi bổ sung môi trường liên tục (Fed-batch cultivation)	365 μg/mL lên 676 μg/mL
<i>P. aeruginosa</i> KU_BIO2 [46]	KingA +đậu nành	2,56 μg/mL

Tác giả Priyaja đã tiến hành chuyển gen tổng hợp pyocyanin bao gồm operon có chứa *phz*, gen *phzM* và *phzS* của chủng *P. aeruginosa* MCCB117 dài khoảng hơn 10 kb vào vector pUCP24 sau đó chuyển vector này vào chính chủng này và đặt tên

là *P. aeruginosa* PA-pUCP-*Phz*++. Kết quả nồng độ pyocyanin thu được cao gấp đôi chủng tự nhiên (Bảng 1.3). Đây là một trong những nghiên cứu đầu tiên về chuyển gen tăng sinh pyocyanin. Tác giả Wang và cộng sự đã nghiên cứu tạo ra chủng *P. aeruginosa* đột biến thiếu vắng gen *rpoS* là gen điều hòa mật độ tế bào của *P. aeruginosa* [82]. Kết quả cho thấy chủng *P. aeruginosa* Y Δ rpoS (chủng đột biến thiếu gen *rpoS*) có khả năng tăng sinh gấp đôi lượng PCA so với chủng tự nhiên, hơn nữa hàm lượng pyocyanin thu được đã tăng gấp 4 lần so với chủng tự nhiên (Bảng 1.3). Tác giả đã tìm ra sự thiếu vắng gen *rpoS* đã làm cho gen *phzM* tăng cường biểu hiện và hoạt động dẫn đến tăng sinh pyocyanin, nhưng về cơ chế tại sao dẫn đến hiện tượng này thì cần phải có các nghiên cứu tiếp theo [82]. Trong một nghiên cứu khác chủng *P. aeruginosa* OM13 được tạo đột biến bằng nitrosoguanidine (MNNG), kết quả cho thấy chủng đột biến có vòng kháng nấm gấp đôi so với chủng tự nhiên. Nhóm tác giả cho rằng khả năng kháng nấm của chủng này tăng lên sau đột biến có liên quan đến khả năng sinh pyocyanin của chủng này do pyocyanin là chất có khả năng kháng nấm chính của *P. aeruginosa* [86]. Các nghiên cứu này cho thấy khả năng ứng dụng chuyển gen vào sản xuất pyocyanin ở quy mô lớn là điều có thể. Chủng đột biến tạo thành có thể đóng vai trò là chủng gốc trong các nghiên cứu tiếp theo như tối ưu hóa quá trình lên men để phục vụ cho sản xuất pyocyanin trên quy mô công nghiệp.

1.4. Các yếu tố ảnh hưởng đến sự sinh tổng hợp pyocyanin bởi *P. 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 [87]. Có rất nhiều nghiên cứu về tối ưu khả năng sinh pyocyanin bằng cách tối ưu thành phần môi trường nuôi cấy như bổ sung các amino acid như alanine và leucine vào môi trường nuôi cấy hoặc bổ sung thêm glycerol, sắt và sulphur [54]. Việc bổ sung thành phần như amino acid alanine và glycerol vào môi trường KingA đã mang lại hiệu quả cao cho hiệu suất tổng hợp pyocyanin. Việc bổ sung thêm nalidixic acid vào môi trường KingA đã làm giảm nồng độ cetrimide, ức chế nhiễm khuẩn do đó tăng cường sinh trưởng của *P. aeruginosa* đồng thời tăng khả năng tổng hợp pyocyanin của chủng này [41]. Ngoài ra còn một số yếu tố khác cũng góp phần quyết định khả năng sinh pyocyanin từ chủng tự nhiên và chủng đột biến đã cho thấy sự cạn kiệt phosphate trong môi trường nuôi cấy cũng tăng cường sản sinh chất sinh sắc tố. Cox đã tìm thấy bằng chứng về giảm nồng độ sắt trong môi trường nuôi cấy tạo điều kiện cho quá trình sinh tổng hợp pyocyanin [41]. Khả năng sinh pyocyanin cũng phụ thuộc vào mật độ tế bào nuôi cấy do sử dụng các thành phần dinh dưỡng nhanh dẫn đến thiếu dinh dưỡng trong môi trường nuôi cấy nhưng điều

này lại có thể mang lại hiệu quả sinh pyocyanin cao hơn bình thường [41].

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. Mô hình Plackett-Burman (PBD) là mô hình phổ biến được sử dụng nhằm loại bỏ các hạn chế của quá trình tối ưu một yếu tố, mô hình này cho phép xác định một cách nhanh chóng các yếu tố có ảnh hưởng đáng kể đến quá trình sinh tổng hợp các hoạt chất thứ cấp. Trong khi đó, phương pháp đáp ứng bề mặt cho phép đánh giá được tác động của các yếu tố, các tác động qua lại giữa các biến từ đó chọn lựa được điều kiện tối ưu cho quá trình mong muốn. Hai mô hình phổ biến của phương pháp đáp ứng bề mặt bao gồm Central composite (CCD) và Box-Behnken. Tuy nhiên các nghiên cứu tối ưu quá trình sinh tổng hợp pyocyanin sử dụng mô hình thống kê hiện nay còn ít. Mô hình PBD và CCD đã được áp dụng đối với chủng *Pseudomonas* sp. M-18Q, hiệu suất sinh phenazine đã tăng 65,3% so với môi trường gốc [88]. Hai nghiên cứu của Patil và cộng sự (2017), Gahlout và cộng sự (2021) đều cho thấy peptone là biến có ảnh hưởng đáng kể đến hiệu suất sinh pyocyanin, nghiên cứu đc tiến hành trên hai đối tượng khác nhau, Patil nghiên cứu chủng *Pseudomonas* sp. MCC 3145 trong khi Gahlout tập trung vào *P. aeruginosa* DN9 là chủng sinh pyocyanin được phân lập từ mẫu [89][90][91]. *P. aeruginosa* JY21 sinh pyocyanin lên đến 311,1 $\mu\text{g/mL}$ và *Pseudomonas* MCCB 103 sau quá trình tối ưu hiệu suất sinh tổng hợp pyocyanin lên gấp năm lần so với môi trường chưa tối ưu [85].

Việc bổ sung dung môi và chất hoạt động bề mặt đã được chứng minh có khả năng tăng sinh pyocyanin bởi *P. aeruginosa* [83]. Khi bổ sung toluene với nồng độ 0,2%, hàm lượng pyocyanin thu được tăng lên đến 312% so với điều kiện không bổ sung toluene. 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 [92][93]. Một số dung môi đóng vai trò như các chất dẫn truyền oxy đến vi sinh vật (oxygen vector), các chất này như hexane, n-dodecane các hydrocarbon hay chất phá bọt được sử dụng như một chất bổ sung nhằm tăng lượng oxy hòa tan trong dung dịch lên men. Các chất này thường không gây độc đối với vi sinh vật, chúng có thể là nguồn carbon và năng lượng bổ sung. Ngoài vector oxygen được sử dụng, thời gian bổ sung các chất này trong quá trình lên men thu hoạt chất thứ cấp cũng rất quan trọng để đạt được hiệu suất cao (Bảng 1.3). Ozdal (2019) lên men chủng *P. aeruginosa* OG1 dưới điều kiện tối ưu có bổ sung n-hexane 3,48% sau 33,93 giờ nuôi cấy đã tăng hiệu suất sinh pyocyanin lên gấp 2 lần [83].

Vật liệu nano có ảnh hưởng lớn đến quá trình hình thành màng sinh học và hô hấp tế bào của *P. aeruginosa* [94][95], ngoài ra chúng còn có tác dụng trong kích thích tăng hoạt tính sinh tổng hợp các sắc tố trong đó có pyocyanin. Các vật liệu nano thường được sử dụng gồm nano bạc, nano kẽm, các dạng silica nanotube... [96][97]. Tuy nhiên, nồng độ của các vật liệu nano bổ sung có tác dụng tăng sinh pyocyanin thường khá cao, đặc biệt là các vật liệu nano oxit kim loại. Jablonska đã nghiên cứu ảnh hưởng của các loại vật liệu khác nhau lên khả năng sinh pyocyanin bởi *P. aeruginosa*, kết quả cho thấy đối với vật liệu nanotube dưới dạng phân tán cho kết quả tăng sinh tốt hơn khi chỉ cần bổ sung với nồng độ thấp so với cùng vật liệu ở dạng không phân tán. Trong khi đó, nồng độ cao của nano kẽm lại ức chế quá trình sinh pyocyanin, với nồng độ thấp thì có khả năng làm tăng hiệu suất tổng hợp pyocyanin [94].

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 [98][99]. 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. Ví dụ như bã malt của quá trình sản xuất bia thủ công khi bổ sung vào môi trường King A đã giúp cho lượng pyocyanin thu được tăng lên 70% so với đối chứng [100][43][98].

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 (Bảng 2.1).

Bảng 2.1. Danh sách các mẫu sử dụng trong nghiên cứu

TT	Ký hiệu mẫu	Địa điểm phân lập	Nguồn phân lập	Số mẫu
1	NT1 –NT3	Tiên Yên - Quảng Ninh	Nước nuôi tôm	3
2	BT1 – BT3	Tiên Yên - Quảng Ninh	Bùn ao nuôi tôm	3
3	XT1 - XT3	Tiên Yên - Quảng Ninh	Xoang tiêu hóa tôm	3
4	XT4-XT6	Uông Bí - Quảng Ninh	Xoang tiêu hóa tôm	3
5	NT 1	Kim Sơn - Ninh Bình	Nước ao tôm	1
6	Bc1	Kim Sơn - Ninh Bình	Bùn ao cá	1
7	XT7 –XT8	Kim Sơn - Ninh Bình	Xoang tiêu hóa tôm	2
8	Rt1-Rt3	Kim Sơn - Ninh Bình	Ruột tôm thẻ	3
9	Bc2 –Bc3	Giao Thủy - Nam Định	Bùn ao cá	2
10	Bc5- Bc6	Giao Thủy - Nam Định	Nước ao cá	2
11	Tc1	Giao Thủy - Nam Định	Thận cá	1
12	Gc1	Giao Thủy - Nam Định	Gan cá	1

Các chủng thuộc Bộ sưu tập của phòng Công nghệ sinh học tái tạo môi trường-Viện Công nghệ sinh học: 10 chủng ký 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. được phân lập từ tôm bệnh bao gồm *V. parahaemolyticus* VpKG12T1; *V. parahaemolyticus* VpST22T; *V. parahaemolyticus* VpCMT31; *V. harveyiharveyi* 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.

Thành phần và các môi trường nuôi cấy vi khuẩn được sử dụng của các hãng như Merck và Himedia bao gồm NB (Merck 1.05443); BHI (Merck 1.10493); LB (Merck 71753); marine agar MRS (2216E); and KingA (Himedia M1543); TCBS (Merck 86348).

Các hóa chất dùng cho sinh học phân tử đạt tiêu chuẩn dùng cho nghiên cứu với xuất xứ từ các hãng ThermoScience, Invitrogen và máy PCR (Eppendorf - Mỹ), bộ điện di (Mupid R 2plus – Nhật), máy soi gel (UV Transilluminator, Wealtec, Đài Loan). Các cặp môi sử dụng trong nghiên cứu được liệt kê tại Bảng 2.2.

Bảng 2.2. Danh sách các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu

Mục đích	Tên mồi	Trình tự	Vị trí mồi
Khuếch đại gen đặc trưng loài PA 956 (Spilker, 2004)	PA-F	5'-GGGGATCTTCGGACCTCA-3'	189-206
	PA-R	5'-TCCTTAGAGTGCCC ACCCG - 3'	1124-1144
Khuếch đại gen <i>phzM</i> (Mavrodi, 2001)	phzM-F	5'-ATGAATAATTTCGAATCTTGCTG-3'	3670-3693 (Plasmid pUCP24-phzMS)
	phzM-R	5'-CCGTTGAAAGTTCCGATTCA-3'	2672-2691 (Plasmid pUCP24-phzMS)
Khuếch đại gen <i>phzS</i> (Mavrodi, 2001)	phzS-F	5'-CTCTAGAAAAGGAAGCACC-3'	2646-2663 (Plasmid pUCP24-phzMS)
	phzS-R	5'-TTGCATGCTAGCGTGGCCGTTCC-3'	1429-1451 (Plasmid pUCP24-phzMS)
Giải trình tự plasmid (Universal primer)	M13F	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'	1390-1412 (Plasmid pUCP24-phzMS)

Chú thích: ATG: codon khởi đầu, TCA, CTA: codon kết thúc (TGA và TAG trên mạch bổ sung); TCTAGA: vị trí nhận biết *Xba*I, GCATGC: vị trí nhận biết của *Sph*I.

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 nghiên kỹ và được pha loãng về các nồng độ 10^{-3} , 10^{-4} và 10^{-5} , cấy trải 0,1 mL dịch pha loãng lên 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. Những chủng này được cấy trong môi trường lỏng KingA để kiểm tra khả năng tiết pyocyanin và trên đĩa thạch KingB để quan sát khả năng phát huỳnh quang [87].

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 [101], 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). Mẫu vi khuẩn được chuẩn bị để quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét: Thu tế bào từ đĩa nuôi cấy, rửa trong dung dịch cacodylate 0,1M, ly tâm 3000 vòng/phút trong 5 phút (2-3 lần) thu tủa; Cố định mẫu bằng 2,5-3% glutaraldehyde/cacodylate 0,1M, pH 7,2 (1 giờ hoặc qua đêm ở 4°C); Rửa mẫu bằng dung dịch cacodylate 0,1M trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng và cố định mẫu bằng OsO₄ 1% trong cacodylate 0,1M trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng; Sau đó, rửa mẫu bằng dung dịch cacodylate 0,1M (2 lần x 5 phút/lần); Hòa loãng mẫu trong cồn tuyệt đối với nồng độ khác nhau (từ 50°, 70°, 80°, 90° đến 100°), nhỏ mẫu lên giấy bạc gắn sẵn trên đế, để mẫu khô hoàn toàn rồi phủ mẫu bằng một lớp dẫn điện Pt-Pd

và soi mẫu.

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), tóm tắt như sau: lấy 2 khuẩn lạc từ đĩa thạch nuôi sau 18-24 giờ cho vào 4 mL dung dịch muối sinh lý 0,9% đã khử trùng; trộn đều, tránh phá hủy tiên mao, tiêm mao và không tạo bọt. Dung dịch này được nhỏ vào các giếng phản ứng có sẵn cơ chất, trong đó các phản ứng vi hiếu khí GLU, ADH và URE cần bổ sung dầu khoáng, các phản ứng hiếu khí GLU, ARA, MNE, MAN, NAG, MAL, GNT, CAP, ADI, MLT, CIT và PAC nhỏ dịch vi khuẩn dưới miệng giếng (không cho dịch đầy). Ủ mẫu trong khay ảm ở 30°C trong 24 giờ và đọc kết quả.

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

DNA tổng số được tách chiết theo hướng dẫn của bộ Kit Genomic DNA Purification (Thermo Scientific). Hàm lượng DNA sau tách chiết được đo trên hệ thống máy Nanodrop Implen2000. Sử dụng cặp mồi PA-F và PA-R đặc hiệu [102] (Bảng 2.2) 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*. Thành phần phản ứng gồm: 12,5 µL 2X Master Mix (Invitrogen), 1 µL mồi PA-F (10 µM), 1 µL mồi PA-R (10 µM), 2 µL DNA tổng số (80-100 ng/µL) tách chiết từ các chủng phân lập và thêm H₂O đến 25 µL. Chu trình nhiệt cho phản ứng: 94°C-5 phút; 35 chu kỳ (94°C-30 giây; 58°C-30 giây; 72°C-45 giây) và kết thúc phản ứng ở 4°C. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 1,5%, đệm TAE 1X.

2.2.5. Xây dựng cây phát sinh loài

Trình tự vùng gen 16S rRNA được sử dụng để định danh vi khuẩn nghiên cứu bằng cách so sánh với cơ sở dữ liệu trên GenBank bằng công cụ BLAST trên NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), 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 (Phụ lục 1). Cây chấm điểm vi khuẩn lên các môi trường cơ chất tương ứng, ủ đĩa ở 30°C qua đêm, sau đó quan sát kết quả thí nghiệm.

Kiểm tra hoạt tính amylase bằng cách nhuộm dung dịch Lugol 1% vào đĩa thạch. Quan sát kết quả nếu thấy xuất hiện vùng trong suốt xung quanh khuẩn lạc thì xác định chủng vi khuẩn đó có hoạt tính enzym amylase, ngược lại sẽ không có hoạt tính.

Kiểm tra hoạt tính protease, gelatinase bằng cách nhuộm đĩa thạch với trichloroacetic acid 5% (TCA). Nếu xuất hiện vùng trong suốt xung quanh khuẩn lạc thì ta kết luận chủng vi khuẩn có hoạt tính của enzym protease, gelatinase và ngược lại nếu ta không thấy xuất hiện vùng trong suốt thì kết luận chủng vi khuẩn đó không có hoạt tính enzym đó.

Kiểm tra hoạt tính lipase, nếu ta thấy xung quanh khuẩn lạc đục lên thì kết luận chủng vi khuẩn có hoạt tính enzym đó.

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) và điện di kiểm tra trên gel agarose 1%, đệm TAE 1X, sử dụng bộ điện di nằm ngang (Hãng Major – Mỹ). Hàm lượng DNA được đo bằng máy Nanodrop Implen2000.

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 [103]. Quá trình điện di sử dụng đệm TAE 1X, hiệu điện thế 100 volt, thời gian điện di trong khoảng 20-40 phút. DNA được quan sát dưới đèn UV sau khi nhuộm với ethidium bromide 0,5 µg/mL.

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. Cặp mồi cho khuếch đại gen *phzS* được thiết kế có chứa trình tự cắt của enzyme giới hạn *Xba*I và *Sph*I. Thành phần phản ứng gồm: 12,5 µL 2X Master Mix (Invitrogen), 1 µL mồi mỗi loại (2 µM), 2 µL DNA tổng số của *P. aeruginosa* PS39 và thêm H₂O cho đến 25 µL. Chu trình nhiệt: 94°C- 5 phút; 35 chu kỳ (94°C -30 giây, 50°C cho gen *phzM* và 60°C cho gen *phzS* -30 giây, 72°C-1 phút); 72°C-5 phút và 4°C. Đoạn DNA được khuếch đại có chiều dài theo lý thuyết, lần lượt khoảng 1000 bp và 1200 bp.

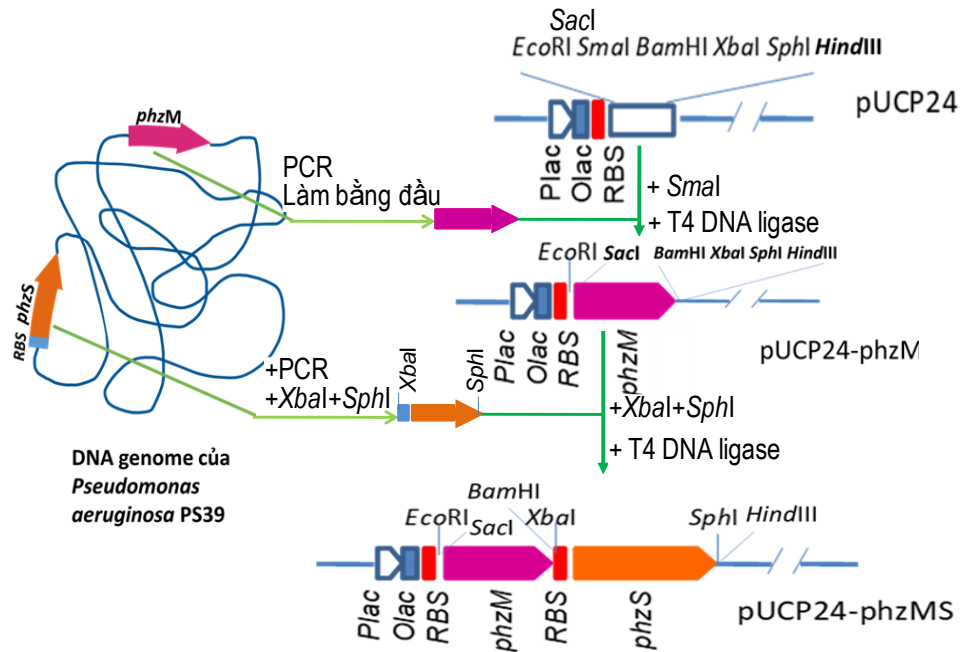
Sản phẩm PCR (50 µL) sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1%. Cắt phần gel tương ứng với các băng DNA đúng với kích thước mong đợi (*phzM* và *phzS* có kích thước lần lượt là 1005 và 1209 bp) và tinh sạch theo hướng dẫn của bộ Kit QIAquick Gel Extracion (QIAGEN). DNA tinh sạch của gen *phzM* và *phzS* được tạo dòng vào vector pJET1.2 theo hướng dẫn của bộ kit CloneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas), sau đó được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* TOP10 theo phương pháp của Sambrook và đồng tác giả (2001) [103]. Plasmid từ khuẩn lạc mọc trên đĩa được tách chiết và kiểm tra sự có mặt của gen *phzM* và *phzS* được chèn

bằng cắt với enzyme giới hạn *XhoI* and *XbaI* và PCR với cặp mồi (pJET1.2F; phzM-R). 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 nhờ cắt với enzyme *SmaI*. Gen *phzM* (1005 bp) được khuếch đại bằng phương pháp PCR từ hệ gen của chủng vi khuẩn *P. aeruginosa* PS39 như đã trình bày ở trên, sử dụng Taq polymerase. Sản phẩm PCR sau đó được làm bằng đầu bằng enzyme blunting trong bộ kit CloneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas) sau đó được nối vào vector pUCP24 nhờ T4 DNA ligase (Fermentas), ở 22°C trong 10 phút để tạo thành vector pUCP24-phzM. Sản phẩm sau khi nối được biến nạp vào tế bào *E. coli* Top10 theo phương pháp của Sambrook và đồng tác giả (2001) [103] và được trải trên đĩa LB có chứa 5 µg/mL gentamycin. Plasmid từ các dòng biến nạp được tách chiết và kiểm tra sự có mặt của gen *phzM* bằng PCR với cặp mồi M13F, phzM-R (Bảng 2.2) trong đó mồi M13F bắt cặp bổ sung với trình tự của vector pUCP24 và cắt bằng cặp enzyme giới hạn *EcoRI* và *HindIII* nằm trên vector ở hai đầu của gen.

Vector pUCP24-phzM sau đó được cắt bởi hai enzyme giới hạn *XbaI* và *SphI*. Gen *phzS* mang cả trình tự nhận biết bởi ribosome (kích thước 1222 nucleotide từ vị trí -13 đến +1209) được khuếch đại từ chủng vi khuẩn *P. aeruginosa* PS39 như đã trình bày ở trên sau đó được cắt bằng enzyme hạn chế *XbaI* và *SphI*. Sản phẩm sau cắt được tinh sạch lại bằng bộ Kit QIAquick Gel Extracion (QIAGEN) và được nối ghép để tạo thành vector pUCP24-phzMS bằng enzyme T4 DNA ligase (Hình 2.1). 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 từ các chủng tái tổ hợp được tách chiết bằng kit AccuPrep plasmid Mini Extraction Kit (BIONEER). 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 (Bảng 2.2). 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.



Hình 2.1. Sơ đồ quá trình thiết kế vector pUCP24-phzMS

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

2.3.5.1. Biểu hiện gen

Theo lý thuyết, việc kiểm tra khả năng biểu hiện của gen ngoại lai phải được tiến hành trực tiếp trên chủng tái tổ hợp mang gen. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, việc kiểm tra sự biểu hiện của gen trong chủng tái tổ hợp *P. aeruginosa* PS39 gặp khó khăn do hai nguyên nhân: (1) promoter *Lac* trong vector pUCP24 có nguồn gốc từ pUC18 không phải là promoter hoạt động mạnh để dùng cho biểu hiện gen. Vì vậy, gen được đặt dưới sự kiểm soát của promoter này thường có mức độ biểu hiện thấp; (2) Gen *phzM*, *phzS* trong pUCP24-phzMS có cùng nguồn gốc, mã hóa cho cùng loại enzyme và mức độ biểu hiện lại không cao nên khó có khả năng đánh giá, phân biệt enzyme tổng hợp từ chủng chủ và từ plasmid đưa vào. Do vậy, 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 được trải trên đĩa thạch LB có 5 $\mu\text{g/mL}$ gentamycin (LBG). Dòng khuẩn lạc mọc trên đĩa được cấy chuyển vào 5 ml môi trường LBG và lắc 200 vòng/phút ở 37°C qua đêm. Dịch tế bào nuôi cấy qua đêm được chuyển sang môi trường LBG mới sao cho chỉ số OD₆₀₀ tại thời điểm bắt đầu nuôi cấy đạt khoảng 0,1. Dịch nuôi cấy tiếp tục lắc ở 37°C, 200 vòng/phút cho đến khi OD₆₀₀ đạt 0,6-1,0 thì bổ sung thêm IPTG ở nồng độ cuối cùng 0,5 mM để cảm ứng promoter *Lac* phiên mã gen *phzM*, *phzS*. Tế bào được nuôi tiếp trong thời gian 6 giờ ở

cùng điều kiện. Sau đó, tế bào được thu lại bằng ly tâm 10000 rpm trong 5 phút và hòa vào nước sao cho $OD_{600} = 10$. Protein tổng số trong chủng tái tổ hợp được kiểm tra bằng cách, bổ sung 10 μ l đệm xử lý mẫu vào 50 μ l tế bào có $OD_{600} = 10$, lắc đều, sau đó xử lý ở 100°C trong 5 phút. Mẫu được đặt ngay trên đá trong 2 phút, ly tâm nhẹ. Dịch nổi chứa protein tổng số được kiểm tra bằng điện di SDS-PAGE theo phương pháp của Laemmli trên gel polyacrylamid 12,6% [104].

Để đánh giá protein tái tổ hợp được tổng hợp ở pha protein tan hay không tan, tế bào biểu hiện được phá vỡ bằng siêu âm với chu kỳ 10 giây siêu âm và 20 giây nghỉ trong tổng thời gian 10 phút ở tần số 20 khz. Sau đó, dịch siêu âm được ly tâm 13000 vòng/phút trong 10 phút để tách protein pha tan và pha không tan. Pha tan là phần dịch nổi được thu lại, còn phần cặn là pha không tan được hòa trở lại trong nước cất vô trùng để điện di kiểm tra.

2.3.5.2. Điện di biến tính protein trên gel polyactylamide-SDS

Chuẩn bị gel: Gel điện di polyacrylamide gồm có hai phần là gel tách và gel cô, được chuẩn bị theo các thành phần ghi trong Bảng 2.3.

Bảng 2.3. Thành phần gel polyacrylamide

Thành phần	Gel tách 12,5%	Gel cô 5%
ddH ₂ O	0,55ml	0,45 ml
Tris 0,5 M pH 6,8	-	0,2 ml
Tris 1,5 M pH 8,8	1,125 ml	-
Glycerol 50%	0,9 ml	-
Acrylamid 30%	1,89 ml	0,14 ml
SDS 10%	45 μ l	4 μ l
APS 10%	30 μ l	8 μ l
TEMED	3 μ l	1 μ l
Tổng	4,543 ml	0,803 ml

Quy trình điện di: Dịch tế bào hoặc dịch protein ở pha tan và pha tủa được xử lý bằng đệm xử lý mẫu 6X (7 ml Tris-HCl 1 M, pH, 6,8; 3 ml glycerol 100%; 1 g SDS; 0,6 ml 2-mercapto-ethanol; 1,2 mg bromophenol G-250) và ủ ở 100°C trong 5-10 phút. Sau đó, mẫu được cho vào giếng và điện di trong đệm Tris glycine (0,05 M Tris; 0,192 M glycine; 0,1% SDS) với cường độ dòng điện 10 mA cho mỗi bản gel cho đến khi mẫu qua hết lớp gel cô. Tiếp theo, cường độ dòng điện được tăng lên 20 mA cho mỗi bản gel khi mẫu đến lớp gel có nồng độ polyacrylamide cao hơn (12,6%). Kết thúc điện di, gel được nhuộm coomassie brilliant blue R250 (0.1% coomassie R250, 10% acetic acid, 40% methanol). Sau khi ủ với thuốc nhuộm, gel

được rửa sạch bằng dung dịch tẩy nhuộm (10% acetic acid, 40% methanol) cho đến khi quan sát được rõ ràng các băng protein.

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

2.3.6.1. Chuẩn bị tế bào khả biến *P. aeruginosa* PS39

Tế bào khả biến *P. aeruginosa* PS39 được chuẩn bị mới cho biến nạp bằng xung điện. Cấy vi khuẩn vào môi trường NB lỏng (g/L: D(+)-glucose 1 g, peptone 15 g, sodium chloride 6 g, yeast extract 3 g) và nuôi để đạt $OD_{600} = 0,3-0,4$. Rửa tế bào 3 lần với dung dịch sucrose 300 mM lạnh và thu giữ tế bào trong sucrose 300 mM lạnh, bảo quản ở -80°C [105].

2.3.6.2. Biến nạp plasmid tái tổ hợp vào tế bào *P. aeruginosa* PS39

Plasmid pUCP24-phzMS (1 μL , nồng độ 50 ng/ μL) được trộn vào tế bào khả biến *P. aeruginosa* PS39 và chuyển vào cuvet 0,2 cm (Bio-Rad). Tiến hành xung điện ở các hiệu điện thế khác nhau $U = 1500, 2000$ và 2500 (V) và thời gian hằng định $t = 3$ ms. Thêm ngay 500 μL môi trường SOC ((g/L): yeast extract 5 g, tryptone 20 g, NaCl 0,584 g, KCl 0,186 g, MgSO₄ 2,4 g, glucose 4 g) vào cuvet, đảo đều. Mẫu được hút chuyển sang ống Eppendorf 1,5 ml và nuôi phục hồi vi khuẩn ở 30°C trong 2 giờ. Sau đó vi khuẩn được cấy trải lên đĩa thạch NB có chứa gentamicin 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (NBG). Sau 24 giờ, làm giàu các khuẩn lạc trong NB lỏng để tách plasmid và kiểm tra sự tồn tại của plasmid tái tổ hợp.

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

Nuôi cấy các khuẩn lạc *P. aeruginosa* PS39 sau biến nạp trong môi trường NB có gentamicin 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Plasmid từ các mẫu được tách chiết bằng bộ Kit AccuPrep plasmid Mini Extraction Kit (BIONEER) và điện di kiểm tra trên gel agarose 1%. Quy trình tách chiết được tóm tắt như sau: sinh khối vi khuẩn được thu bằng ly tâm 8000 vòng/phút trong hai phút. Sau đó tế bào được phá vỡ bằng dung dịch kiềm. Plasmid được tách khỏi phức hợp của DNA nhiễm sắc thể và xác tế bào bằng ly tâm ở 13000 vòng/phút, 4°C trong 10 phút. Dung dịch chứa plasmid được bổ sung vào cột tách chiết, plasmid sẽ liên kết với màng silica của cột. Tạp chất sẽ được loại bỏ bằng đệm rửa ở bước tiếp theo. Cuối cùng, plasmid được rửa giải bằng cách sử dụng đệm rửa giải là Tris-HCl 10 mM (pH 8,0).

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 (Bảng 2.2). Chu trình nhiệt: 94°C - 5 phút; 35 chu kỳ (94°C - 30 giây, 52°C -30 giây, 72°C -1 phút); 72°C -5 phút, 4°C . Chủng *P. aeruginosa* PS39 làm đối chứng.

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

Sau khi tách chiết, plasmid tái tổ hợp pUCP24-phzMS được sử dụng làm đầu vào để tạo ra một thư viện paired-end bằng cách sử dụng *Nextera XT DNA Library Prep Kit* (Illumina, USA). Quy trình được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Kích thước trung bình của amplicon là 300 bp. Việc giải trình tự được thực hiện từ cả hai đầu (150 chu kỳ x2) bởi hệ thống Miseq (Illumina Inc.) tại Công ty cổ phần dịch vụ phân tích di truyền Gentis. Dữ liệu thô được so sánh với trình tự plasmid pUCP24-phzMS trên lý thuyết (Mã số genbank U07167) bằng cách sử dụng chương trình BWA. Kết quả so sánh được trực quan hóa bởi IGV [106].

Sau 16 giờ tiến hành đo OD và thu sinh khối bằng ly tâm ở nhiệt độ thường 5.500 vòng/phút trong 5 phút để thực hiện bước tiếp theo.

2.3.9. Phương pháp bảo quản và nuôi cấy chủng giống

Các chủng vi khuẩn được bảo quản trong môi trường NBG có chứa và 30% glycerol và giữ ở -80°C. Hoạt hóa và nuôi cấy các chủng vi khuẩn trong 20 mL môi trường NBG, KingA có chứa gentamycin 200 µg/mL cho các thí nghiệm tiếp theo.

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

P. aeruginosa PS39-phzMS được cấy vào 50 mL môi trường KingA có chứa gentamycin 200 µg/mL (được viết tắt là KingA-G), lắc 200 vòng/phút trong 24 giờ ở 30°C. Sau đó, chuyển giống (10%) sang môi trường KingA-G và nuôi cấy lắc 200 vòng/phút đến khi OD đạt khoảng 0,6-0,8 thì bổ sung IPTG đến nồng độ cuối cùng là 0,5 mM và tiếp tục nuôi trong cùng điều kiện trong 72 giờ ở 30°C. Dịch nổi chứa pyocyanin được thu bằng ly tâm 5000 vòng/phút trong 10 phút và bảo quản ở -20°C hoặc 4°C cho các thí nghiệm nghiên cứu điều kiện tách chiết, tinh chế 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 (µg/mL) = OD520 x độ pha loãng x 17,072, trong đó 17,072 là hệ số hấp thụ [107].

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 [75]. Cụ thể, dịch nuôi cấy tế bào (10 mL) của các chủng *P. aeruginosa* PS39 và *P. aeruginosa* PS39-phzMS được acid hóa bằng clohydric acid đậm đặc để đạt được pH 2. Dung dịch acid hóa được chiết với benzene tỷ lệ 1:1. Pha hữu cơ được làm khô bằng cách để bay hơi. Phần cặn khô màu vàng nhạt được hòa tan trong 1 mL NaOH 0,1M. Dịch chiết benzene của môi trường KingA đã acid hóa được sử dụng làm mẫu trắng [75].

Nồng độ PCA được xác định dựa vào đường chuẩn được xây dựng dựa trên PCA tinh khiết. Độ hấp thụ quang được xác định tại bước sóng 367 nm. Đường chuẩn PCA được thiết lập như sau: hòa tan 10 mg PCA trong 1 mL NaOH 0,1 M được dung dịch gốc có màu vàng chanh; hòa loãng PCA đến giải nồng độ 20; 10; 5; 2,5; 1,25 và 0,6 $\mu\text{g/mL}$; Đo giải nồng độ ở OD 367nm trên máy đo quang phổ. Ghi lại các giá trị hấp thụ. Mỗi nồng độ được đo lặp lại 3 lần. Căn cứ vào giá trị OD 367nm thu được, vẽ đồ thị ở giải nồng độ trên với trục tung là giá trị hấp thụ tại OD 367nm, trục hoành là giải nồng độ được đo bằng phần mềm Excel (Win 10) (Phụ lục 2).

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, cloroform, methanol, hexane, diclometan, và ethylacetate. Dịch nuôi cấy được bổ sung thêm dung môi theo tỷ lệ thể tích 1 dung môi: 2 dịch nuôi cấy và trộn đều cho đến khi xuất hiện màu xanh lam. Sự có mặt của pyocyanin được xác định bằng cách thêm thêm 1 mL HCl 0,2 N vào dung dịch, dung dịch có pyocyanin sẽ chuyển màu từ màu xanh lam sang màu hồng đỏ [14], sau đó dung dịch được trung hòa bằng NaOH 1N. Hiệu quả của dung môi chiết xuất được xác định thông qua lượng pyocyanin thu được. Pyocyanin được định tính và định lượng bằng phương pháp định lượng pyocyanin, TLC và UV-Vis được mô tả ở phần dưới.

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.

2.4.5.1. Phương pháp đo quang phổ UV-Vis

Pyocyanin được chiết xuất bằng các dung môi khác nhau được phân tích bằng máy quang phổ UV-Vis. Phổ hấp thụ giữa bước sóng 200 và 900 nm được xác định. Pyocyanin tinh khiết được sử dụng làm đối chứng chuẩn và các đỉnh của mỗi dung dịch chiết bằng các dung môi khác nhau được ghi lại.

2.4.5.2. Phương pháp sắc ký bản mỏng

Sắc ký bản mỏng (TLC) silica được tiến hành theo Cheluvappa R (2014) sử dụng bản sắc kí Merck silica gel, 0,2 mm, aluminum kích thước 20×20 cm (HPTLC Pre-coated Silica Gel 60 59 Plates). Chuẩn bị dung dịch pyocyanin trong chloroform 10 mg/mL. Hoạt hóa giấy sắc kí bằng chloroform : methanol (12,5 mL: 12,5 mL). Gel được làm khô và sấy ở 100°C trong 10 phút, để nguội đến nhiệt độ phòng. Mẫu được tra lên bản sắc kí cách mép dưới của giấy sắc kí khoảng 2 cm sau đó đặt giấy vào bình thủy tinh có chứa dung môi chloroform : methanol (12,5 mL: 12,5 mL) cho đến khi dung môi còn cách mép trên của bản sắc kí 1 cm thì lấy giấy ra khỏi bình. Để khô, quan sát dưới ánh sáng cực tím ở bước sóng 254 và 366 nm và xác định giá trị hệ số lưu R_f .

2.4.5.3. Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

Mẫu được phân tích trên hệ thống HPLC, Agilent 1260 series single quadrupole LC/MS system với cột sắc ký VertiSep GES C18. Pha động sử dụng hệ dung môi kênh A H₂O (0,05% TFA) – kênh B MeOH được thiết lập gradient biến thiên từ tỉ lệ 90/10 đến tỉ lệ 0/100 trong 40 phút. Tốc độ dòng: 0,5 mL/phút; lượng bơm mẫu: 5 μ L. Thời gian phân tích: 25 phút. Nhiệt độ cột: 25°C.

a. Chuẩn bị mẫu:

Chuẩn bị chất tham chiếu: mẫu chất tham chiếu được pha trong dung môi thành nồng độ 2 mg/mL, sau đó tiến hành pha loãng thành dãy các nồng độ khác nhau để thiết lập đường chuẩn định lượng.

Chuẩn bị mẫu thử nghiệm: mẫu được trộn đều, cân lấy khối lượng xác định rồi pha trong dung môi MeOH thu được dung dịch mẫu có nồng độ chính xác.

Các dung dịch chất tham chiếu và mẫu phân tích đều được lọc qua màng lọc 0,45 μ m trước khi bơm vào hệ thống HPLC.

b. Thiết lập đường chuẩn định lượng pyocyanin

Trên hệ thống LC, đỉnh tín hiệu được lựa chọn của pyocyanin được phát hiện một cách ổn định tại thời gian lưu R_t 12,0 – 12,1 min đối với các mẫu chất tham chiếu dùng trong thang định lượng. Đường chuẩn được tính toán xây dựng bằng phần mềm Chemstation dựa trên diện tích đỉnh UV 280 nm tại thời gian lưu R_t 12,0 – 12,1 min.

Đường chuẩn định lượng có dạng $y = ax + b$ được xây dựng dựa trên mối quan hệ giữa diện tích đỉnh UV được chọn (y) và nồng độ tương ứng của chất tham chiếu (x). Đường chuẩn định lượng thu được đạt độ tuyến tính cao với hệ số tương quan $R^2 \geq 0,999$ đối với phương pháp định lượng bằng DAD.

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 (VSVKD) và *Vibrio*

Danh sách các chủng vi sinh vật kiểm định được sử dụng trong nghiên cứu:

- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212: Cầu khuẩn gây nhiễm trùng như viêm nội tâm mạc, đường tiết niệu, nhiễm khuẩn vết mổ.

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923: cầu khuẩn Gram dương, gây mũ các vết thương, vết bỏng, gây viêm họng, nhiễm trùng có mũ trên da và các cơ quan nội tạng.

- *Bacillus cereus* ATCC 13245: Trục khuẩn Gram dương gây ngộ độc thực phẩm.

- *Escherichia coli* ATCC 25922: vi khuẩn Gram âm, gây một số bệnh về đường tiêu hóa như viêm dạ dày, viêm đại tràng, viêm ruột, bệnh lỵ.

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853: vi khuẩn Gram âm, trục khuẩn mũ xanh, gây nhiễm trùng huyết, các nhiễm trùng ở da và niêm mạc, gây viêm đường tiết niệu, viêm màng não, màng trong tim, viêm ruột.

- *Salmonella enterica* ATCC 13076: vi khuẩn Gram âm, gây bệnh thương hàn, nhiễm trùng đường ruột ở người và động vật.

- *Candida albicans* ATCC 10231: nấm men, thường gây bệnh tưa lưỡi ở trẻ em và các bệnh phụ khoa.

a) Nuôi cấy chủng vi sinh vật kiểm định

Chuẩn bị dung dịch vi khuẩn hoặc nấm với nồng độ 2×10^4 CFU/mL: Hút 50 μ L dịch vi khuẩn hoặc nấm trong ống giữ chủng được lấy từ -80°C cho vào bình tam giác chứa 25 mL môi trường LB lỏng với vi khuẩn hoặc YPD (0,5% yeast extract, 1% pepton, 1% glucose) với nấm ủ trong 37°C qua đêm cho đến khi đạt $\text{OD}_{600}=2,0$. Sau đó hút 2 mL dịch $\text{OD}= 2,0$ vào ống chứa 15 mL môi trường LB lỏng với vi khuẩn hoặc YPD với nấm đặt tại nhiệt độ phòng cho tới khi $\text{OD} = 1,0$. Tiếp đó hút 2 mL dịch từ $\text{OD} = 1,0$ vào ống chứa 6 mL môi trường LB lỏng với vi khuẩn hoặc YPD với nấm sao cho đạt được nồng độ như ống mẫu chuẩn (mẫu 0,5 McF chuẩn của hãng BBL). Từ đây hút 100 μ L vào ống chứa 10 mL môi trường LB lỏng với vi khuẩn hoặc YPD với nấm thì được dịch vi khuẩn hoặc nấm 2×10^4 CFU/mL.

b) Thử nghiệm hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định

Hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định được thực hiện dựa trên phương pháp pha loãng đa nồng độ theo Hadacek (2000) [108]. Đây là phương pháp nhằm đánh giá mức độ kháng khuẩn mạnh yếu của các mẫu thử thông qua các giá trị thể hiện hoạt tính là MIC (Minimum Inhibitory Concentration - nồng độ ức chế tối thiểu). Thêm 100 μ L môi trường LB (đối với vi khuẩn) và YPD (nấm) vào các giếng của đĩa 96 giếng. Bổ sung dung dịch pyocyanin, các kháng sinh để đạt dải nồng độ ($\mu\text{g/mL}$) giảm dần $\frac{1}{2}$ lần lượt là: 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56, 0,78 và 0,4; 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4 và 2 với số thí

thử nghiệm lặp lại $n=3$. Thêm 50 μL dung dịch vi khuẩn và nấm ở nồng độ 2×10^4 CFU/mL vào các giếng tương ứng, ủ ở 37°C (đối với vi khuẩn), 28°C (đối với nấm). Sau 24 giờ, xác định giá trị MIC bằng cách đo độ đục tế bào ở 620 nm trên máy quang phổ Bioteck và phần mềm Raw data. Giá trị MIC được xác định tại giếng có nồng độ chất thử thấp nhất gây ức chế hoàn toàn sự phát triển của vi sinh vật sau 24 giờ nuôi cấy. Các đối chứng là kháng sinh streptomycin, tetracycline và kanamycin dành cho các chủng vi khuẩn; và chất kháng nấm nystatin và cycloheximide dành cho nấm.

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

Nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (Minimum Bactericidal Concentration - MBC) là nồng độ thấp nhất của dịch chiết hay hợp chất tinh khiết mà diệt 99,9% vi khuẩn. Thí nghiệm được thực hiện theo phương pháp pha loãng dung dịch của Hadacek có thay đổi cho phù hợp với đối tượng nghiên cứu [108]. Thêm vào các ống thí nghiệm 1 mL dịch chiết pyocyanin, 1 mL dịch vi khuẩn của các chủng *Vibrio* sp. 2.10^5 CFU/mL để đạt giải nồng độ pyocyanin cuối cùng là 4; 8; 12; 15; 20; 25; 30; 35; 40 và 50 $\mu\text{g/mL}$. Nuôi lắc 200 vòng/phút ở 30°C . Sau 18 - 24 giờ, quan sát dịch nuôi cấy và cấy trang 100 μL dịch vi khuẩn từ các ống này lên đĩa thạch TCBS để xác định nồng độ diệt khuẩn tối thiểu. Sau 24 giờ, quan sát các đĩa thạch TCBS và xác định MBC. Thành phần cho 1 lít môi trường TCBS (g/L): Yeast extract 5 g, Proteose Peptone 10 g, Sodium thiosulfate 10 g, Sodium citrate 10 g, Ox gall 5 g, Sodium cholate 3 g, Saccharose 20 g, Sodium chloride 10 g, Ferric citrate 1 g, Bromothymol blue 0,04 g, Thymol blue 0,04 g, Agar 15g, pH $8,6 \pm 0,2$)

2.5.3. Phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch

Phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch được sử dụng để xác định khả năng kháng khuẩn theo Bauer (1966) có thay đổi cho phù hợp với hoạt chất nghiên cứu. Làm giàu các chủng vi khuẩn *Vibrio* spp. trong môi trường APW, lắc ở 30°C , 24 giờ. Cấy trải dịch vi khuẩn *Vibrio* lên đĩa thạch 2216E. Đặt khoanh giấy thấm pyocyanin với các nồng độ khác nhau 0,2; 0,4; 0,8; 1,62; 3,25; 6,5; 13 và 26 μg và kháng sinh đối chứng gentamycin 10 μg lên các đĩa petri đã cấy vi khuẩn và ủ ở 30°C . Đo đường kính vùng ức chế sau 24 giờ [109].

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

Môi trường KingA là môi trường điển hình để tiết pyocyanin và ở đó peptone là nguồn nitơ [46][110]. 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. Môi trường KingA thay đổi bao gồm KingA + A, KingA + G, AM và GM như được nêu chi tiết trong Bảng 2.4. Các

môi trường này đã được thay đổi bằng cách thay thế một phần hoặc toàn bộ peptone bằng glutamic acid hoặc alanine làm nguồn nitơ. *P. aeruginosa* PS39-phzMS từ tủ -80°C được cấy trong môi trường KingA có 200 µg/mL gentamycin qua đêm, ở 30°C, 200 vòng/phút. Dịch nuôi cấy qua đêm được pha 10% (thể tích) vào các môi trường (50 mL môi trường trong bình tam giác 250 mL) và nuôi cấy đến OD600 đạt khoảng 0,6 – 0,8 thì bổ sung IPTG đến nồng độ cuối cùng là 0,5 mM và tiếp tục nuôi ở cùng điều kiện trong thời gian 72 giờ ở 30°C, 200 vòng/phút. Nồng độ pyocyanin tiết ra được sử dụng để đánh giá tác dụng của các thành phần được thay thế.

Bảng 2.4. Thành phần của các môi trường thử nghiệm

Thành phần (g/L)	KingA	KingA+A	KingA +G	AM	GM
Peptone	20	20	20	-	-
K ₂ SO ₄	10	10	10	10	10
MgCl ₂ .H ₂ O	3	3	3	3	3
Glycerol	10	10	10	10	10
Glutamic acid	-	-	0.5	-	10
Alanine	-	0.5	-	10	-
Gentamycin (µg/mL)	200	200	200	200	200
pH	7±0.2	7±0.2	7±0.2	7±0.2	7±0.2

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. Glutamic acid được bổ sung ở các mức 0,75%, 1%, 1,25% và 1,5% (tương đương 7,5; 10; 12,5 và 15 g/L); tỷ lệ giống được bổ sung bằng nhau là 10%. Nồng độ pyocyanin tiết ra sau 72 giờ nuôi cấy được sử dụng để đánh giá ảnh hưởng của nồng độ glutamic acid.

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, như sau:

- Ảnh hưởng của pH của môi trường: pH của môi trường chọn lọc được điều chỉnh trong khoảng pH 6-9. Độ pH của môi trường được điều chỉnh bằng cách sử dụng HCl 1N và NaOH 1N. Nồng độ pyocyanin được định lượng sau 72, 96 và 120 giờ nuôi cấy.
- Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh tổng hợp pyocyanin được khảo sát bằng cách nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường đã chọn trong dải 20°C - 45°C.
- Điều kiện lắc được kiểm tra ở các tốc độ khác nhau 50, 100, 150, 200

vòng/phút.

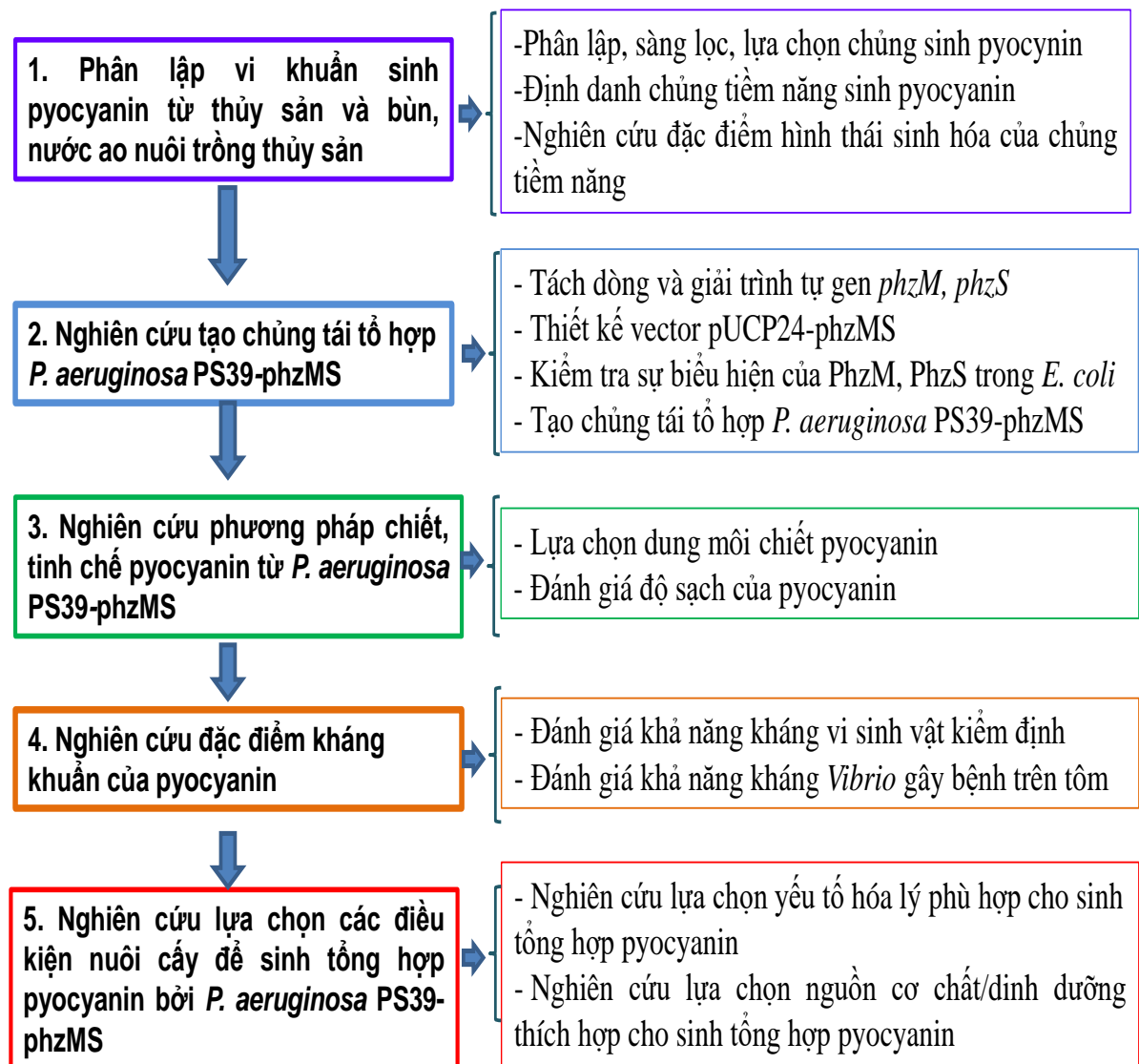
- Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy được xác định bằng cách kiểm tra nồng độ pyocyanin trong nuôi cấy sau mỗi 24 giờ trong 5 ngày liên tiếp.

Dịch nuôi cấy được thu lại bằng phương pháp ly tâm trong 20 phút với tốc độ 5000 vòng/phút để xác định nồng độ pyocyanin. Các thí nghiệm sau lần lượt được kế thừa kế tiếp kết quả của các thí nghiệm trước.

2.7. Phương pháp phân tích số liệu

Tất cả các thí nghiệm được lặp lại ba lần hoặc sáu lần. 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 biểu.

2.8. Sơ đồ nghiên cứu



Hình 2.2. Sơ đồ nghiên cứu

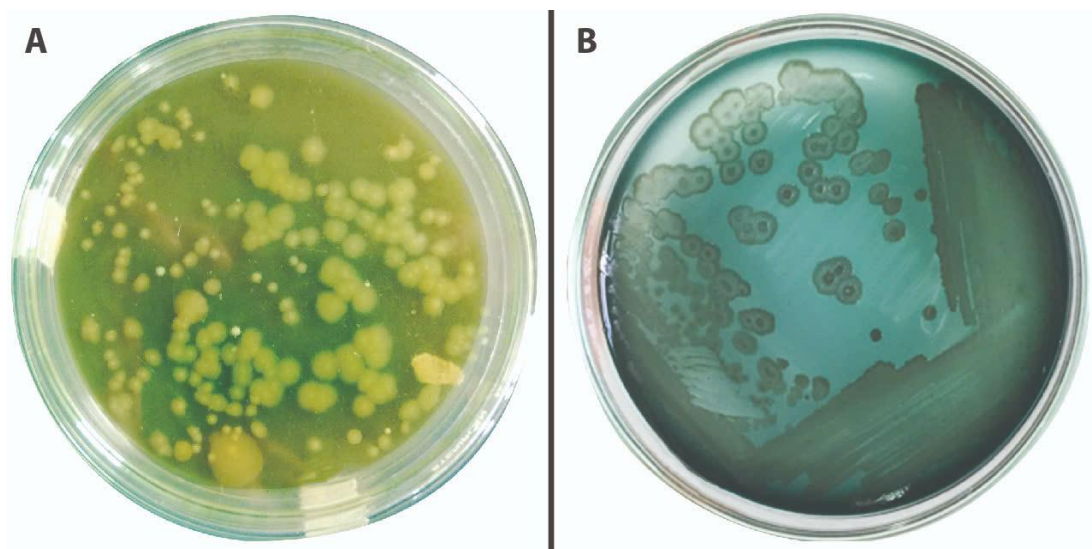
Nhằm đạt được mục tiêu nghiên cứu của đề tài, các bước chính trong quá trình nghiên cứu được thực hiện và sơ đồ hóa tại Hình 2.2. Đầu tiên, các chủng có khả năng sinh pyocyanin được phân lập và chọn lọc trên môi trường đặc hiệu, chủng có hoạt tính cao được nghiên cứu chi tiết các đặc điểm về phân loài, hình thái, đặc tính sinh hóa. Sau khi chọn được chủng vi khuẩn sinh pyocyanin cao, được sử dụng làm nguồn khai thác, phân lập hai gen tham gia vào quá trình sinh tổng hợp pyocyanin là *phzM* và *phzS*. Hai gen này được gắn vào vector biểu hiện tạo vector tái tổ hợp mang đồng thời hai gen, khả năng biểu hiện của hai gen *phzM* và *phzS* trên vector tái tổ hợp được kiểm tra trong vi khuẩn *E. coli*. Vector tái tổ hợp mang hai gen trên được biến nạp vào chính chủng vi khuẩn sinh pyocyanin được lựa chọn ban đầu tạo chủng tái tổ hợp. Các điều kiện nuôi cấy chủng tái tổ hợp nhằm tăng sinh pyocyanin được xác định và pyocyanin thu được từ chủng này đã được tinh sạch và nghiên cứu các đặc tính như khả năng kháng khuẩn, ức chế các vi sinh vật gây bệnh trong nuôi trồng thủy sản.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

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

3.1.1. Phân lập và sàng lọc vi khuẩn sinh pyocyanin

Từ các mẫu nước, bùn ao nuôi thủy sản và dịch nghiền xoang tiêu hóa của tôm, cá, vi khuẩn được phân lập trên môi trường đặc hiệu KingA theo mô tả tại mục phương pháp nghiên cứu. Vi khuẩn sinh pyocyanin sinh sắc tố có màu xanh đặc trưng (Hình 3.1). Ngoài việc phân lập các chủng vi khuẩn mới từ mẫu môi trường, chúng tôi cũng đã sàng lọc các chủng trong Bộ sưu tập chủng giống của Phòng Công nghệ sinh học tái tạo môi trường. Trong số 28 chủng (18 chủng mới phân lập, 10 chủng thuộc Bộ sưu tập, chi tiết tại phụ lục 3) phân lập được chúng tôi đã chọn được 9 chủng có khuẩn lạc màu xanh trên môi trường KingA, làm đổi màu thành xanh ở môi trường KingA lỏng và định lượng pyocynin được tổng hợp ra (Phụ lục 3).



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 trong số 28 chủng vi khuẩn có khuẩn lạc màu xanh, có 9 chủng có khả năng sinh pyocyanin cao được thống kê trong Bảng 3.1. 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 $15,02 \pm 0,56 \mu\text{g/mL}$ (Bảng 3.1). Chủng này có trong Bộ sưu tập chủng giống của

phòng Công nghệ tái tạo môi trường, bộ chủng giống được phân lập từ các mẫu nước, bùn ao nuôi thủy sản và bảo quản tại -80 °C trong glycerol.

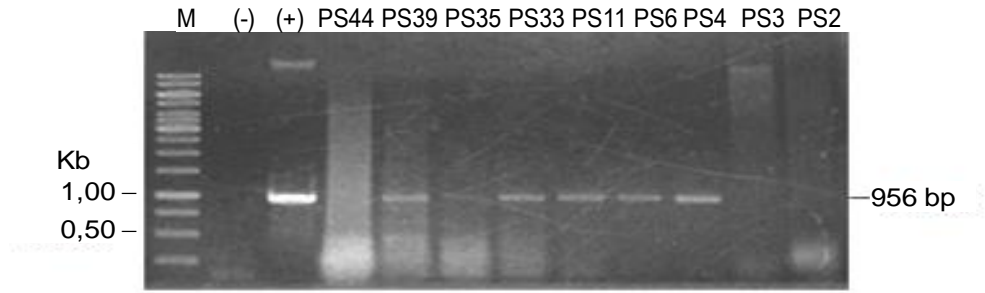
Bảng 3.1. Khả năng sinh pyocyanin của các chủng vi khuẩn phân lập

STT	Kí hiệu chủng	Khả năng sinh pyocyanin ($\mu\text{g/mL}$)	Nguồn, địa điểm phân lập
1	PS2	11,04 \pm 0,79	Bùn ao tôm - Tiên Yên, Quảng Ninh
2	PS3	12,06 \pm 0,56	Bùn ao tôm - Tiên Yên, Quảng Ninh
3	PS4	6,01 \pm 1,2	Nước nuôi cá - Ninh Bình
4	PS6	10,03 \pm 0,7	Xoang tiêu hóa tôm - Ninh Bình
5	PS11	11,05 \pm 0,46	Ruột tôm - Ninh Bình
6	PS33	9,07 \pm 0,89	Bùn đáy ao nuôi cá- Nam Định
7	PS35	12,09 \pm 0,7	Nước ao nuôi cá - Nam Định
8	PS39	15,02\pm0,56	Bộ sưu tập Phòng CNSH Tái tạo môi trường
9	PS44	7,06 \pm 0,62	Ruột Ruột cá, Nam Định - Nam Định

Theo các tài liệu công bố, khả năng sinh pyocyanin chỉ duy nhất được thấy ở loài *P. aeruginosa* [41]. Nghiên cứu của Spilker và cộng sự (2004) đã chỉ ra cặp mồi (PA-F; PA-R) có độ đặc hiệu và độ nhạy 100% với loài *P. aeruginosa* [102]. Vì vậy, để sơ bộ xác định xem 9 chủng trên có phải là *P. aeruginosa* không, chúng tôi đã tiến hành khuếch đại đoạn gen PA có chiều dài 956 bp từ hệ gen của các chủng thông qua PCR trực tiếp từ khuẩn lạc.

Kết quả (Hình 3.2) 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. 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 băng DNA kích thước khoảng 1 kb là PS2, PS3, PS44. Các chủng này có thể không đúng là *P. aeruginosa* cần phân lập.

Chủng PS39 mang gen *PA* và có khả năng sinh pyocyanin cao sẽ được định danh và sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

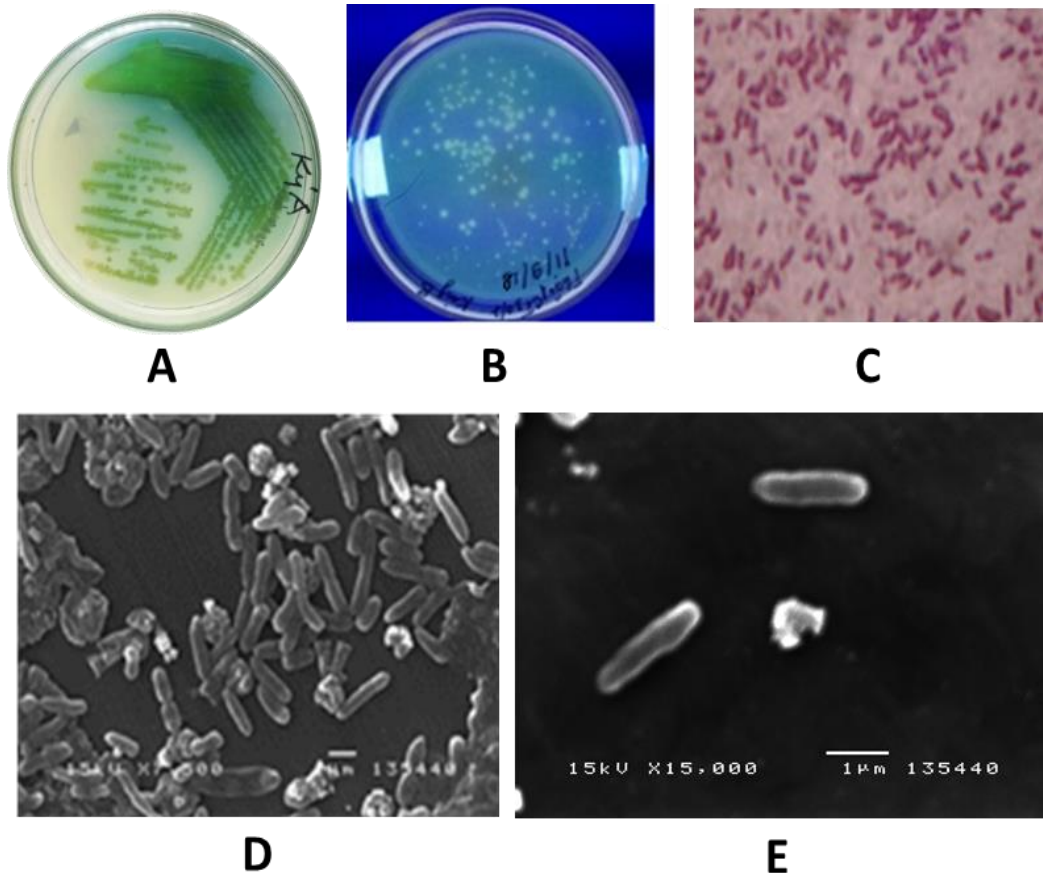


Hình 3.2. Điện di đồ phân tích sản phẩm PCR đoạn gen *PA* 956 bp của 9 chủng sinh pyocyanin cao trên gel agarose 0,8%.

M: Thang chuẩn DNA 1kb (GeneRular 1 kb DNA ladder, ThermoFisher), (+) chứng dương: chủng vi khuẩn *P. aeruginosa* ATCC27853; (-) chứng âm: *Edwrdsella ictaluri* (Bộ sưu tập phòng CNSH tái tạo môi trường)

3.1.2. Định danh chủng *PS39*

3.1.2.1. Định danh chủng *PS39* bằng đặc điểm hình thái và sinh hóa



Hình 3.3. Đặc điểm hình thái và sinh học của chủng *PS39*

A-Khuẩn lạc trên KingA sau 48 giờ; B-Vi khuẩn phát quang dưới ánh sáng UV 360 nm; C-Ảnh nhuộm Gram; D, E-Tế bào vi khuẩn dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM) độ phóng đại 7500X(D) và 15000X(E).

Các đặc điểm hình thái khuẩn lạc, tế bào và sinh hóa của chủng vi khuẩn *PS39* được tập trung nghiên cứu. Trên môi trường thạch KingA, khuẩn lạc dạng

tròn, trơn, nhẵn và có màu xanh (Hình 3.3A), phát huỳnh quang trên môi trường KingB (Hình 3.3B). Kết quả nhuộm Gram (Hình 3.3C) và chụp kính hiển vi điện tử quét (Hình 3.3D) cho thấy chủng PS39 là trực khuẩn Gram âm bắt màu đỏ, hình que, hai đầu tròn, chiều dài khoảng 1 - 1,5 μm , chiều rộng khoảng 0,5 - 1 μm , đứng một mình hoặc thành đôi. Các đặc điểm hình thái của chủng PS39 tương tự các chủng thuộc loài *P. aeruginosa*.

Chủng PS39 được định danh bằng đặc điểm sinh hóa bằng Kit 20NE (Biomerieux, Pháp). Kết quả phân tích chỉ ra, chủng PS39 âm tính với các phản ứng indole (TRP), urease (URE), arabinose (ARA), mannose (MNE) và penylacetic acid (PAC); dương tính với các phản ứng khử NO_3 (NO_3), chuyển hóa arginine dihydrolase (ADH), thủy phân esculin (ESC), gelatin (GEL), β -galactosidase (PNPG), chuyển hóa glucose (GLU), mannitol (MAN), nacytylglucosamine (NAG), potassium gluconate (GNT), capric acid (CAP) và trisodium citrate (CIT) (Bảng 3.2).

Bảng 3.2. Đặc điểm sinh hóa chủng *Pseudomonas* sp. PS39

	NO3	TRP	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	CIT	PAC
<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
PS39	+	-	V	-	+	-	+	V	-	-	+	+	-	+	+	+	-

V: tùy theo chủng. (-) âm tính; (+) dương tính

Như vậy, đặc điểm sinh hóa của chủng PS39 tương đồng với đặc điểm sinh hóa của chủng chuẩn *P. aeruginosa* ATCC27853.

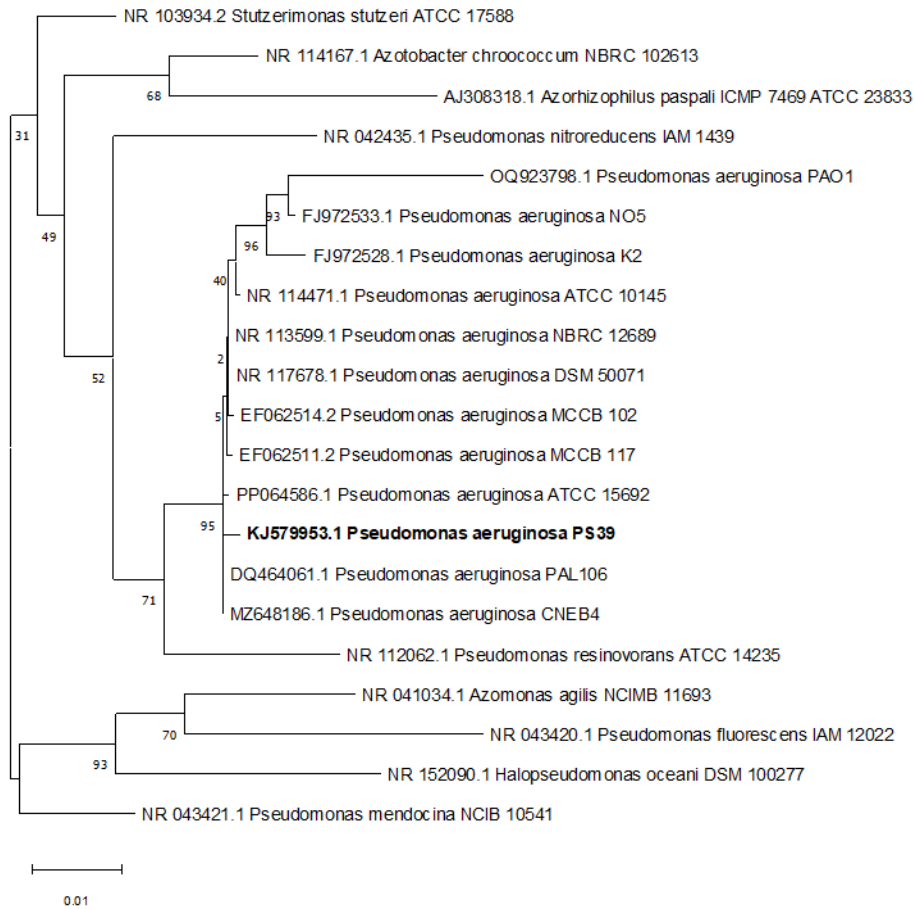
3.1.2.2. Nghiên cứu phát sinh loài chủng PS39 bằng sinh học phân tử

Theo lý thuyết, trình tự đoạn gen 16S rRNA được sử dụng làm chỉ thị phân tử cho nghiên cứu phát sinh loài của chủng chọn lọc PS39. Đoạn gen 16S rRNA được khuếch đại bằng cách PCR sử dụng cặp mồi 27F (5' GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') và 1492R (5'CTACGGCTACCTTGTACGA 3') của chủng PS39 đã được giải trình tự bằng phương pháp Sanger trước đây trong nghiên cứu khác tại Phòng Công nghệ sinh học tái tạo môi trường, Viện Công nghệ sinh học với mã số được đăng kí trên Ngân hàng gen (GenBank NCBI) KJ579953. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng trình tự 16S rRNA đã có sẵn này để thực hiện việc nghiên cứu phát sinh loài chủng PS39. Trình tự 16S rRNA được so sánh song hàng với các trình tự trên Ngân hàng gen sử dụng công cụ Blast trên NCBI, các thông số được sử dụng để so sánh là mức độ tương đồng, độ bao phủ của các trình tự với nhau và giá trị E-value của mỗi hit. Các đại diện với mức độ tương đồng khác nhau được lựa chọn và sử dụng trong xây dựng cây phát sinh loài của PS39, ngoài ra trình tự 16S rRNA của các đại diện gần gũi thuộc các bộ chủng giống chuẩn cũng được sử dụng để so sánh đánh giá mức độ tương đồng và quan hệ phát sinh loài với chủng PS39.

Bảng 3.3. Mức độ tương đồng của gen *16S rRNA* chủng PS39 với một số chủng trên ngân hàng gen (Genbank NCBI)

Mã số	Chủng so sánh	Độ bao phủ	E value	Mức độ tương đồng
MZ648186.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CNEB4	100%	0.0	99,80%
NR_117678.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 50071	99%	0.0	99,80%
DQ464061.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAL106	100%	0.0	99,80%
NR_114471.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	97%	0.0	99,73%
EF062511.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MCCB 117	97%	0.0	99,73%
PP064586.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15692	97%	0.0	99,73%
EF062514.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MCCB 102	97%	0.0	99,73%
FJ972533.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NO5	93%	0.0	99,44%
FJ972528.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> K2	93%	0.0	99,44%
OQ923798.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	91%	0.0	98,50%
NR_112062.1	<i>Pseudomonas resinovorans</i> ATCC 14235	98%	0.0	97,35%
NR_043421.1	<i>Pseudomonas mendocina</i> NCIB 10541	99%	0.0	96,66%
NR_042435.1	<i>Pseudomonas nitroreducens</i> IAM 1439	99%	0.0	96,92%
NR_114167.1	<i>Azotobacter chroococcum</i> NBRC 102613	95%	0.0	96,51
NR_043420.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> IAM 12022	99%	0.0	94,12%

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 (Bảng 3.3, Hình 3.4). Chủng vi khuẩn PS39 có độ tương đồng 99,73% với chủng *P. aeruginosa* MCCB117 được phân lập từ nước biển của Ấn Độ và chủng *P. aeruginosa* MCCB102 có nguồn gốc từ nước lợ của Ấn Độ. Đây là các mẫu được các nhà khoa học Ấn Độ dùng để nghiên cứu thu nhận pyocyanin có khả năng ức chế vi khuẩn *Vibrio* gây bệnh ở tôm sú [51][111]. Kết hợp đặc điểm hình thái, sinh hóa và gen chi thị PA cho loài *P. aeruginosa*, có thể khẳng định chủng PS39 thuộc loài *P. aeruginosa* và được đặt tên là *Pseudomonas aeruginosa* PS39.



Hình 3.4. Cây phả hệ di truyền gen *16S rRNA* của chủng PS39 (KJ579953) với các gen tương ứng từ các chủng trên ngân hàng gen

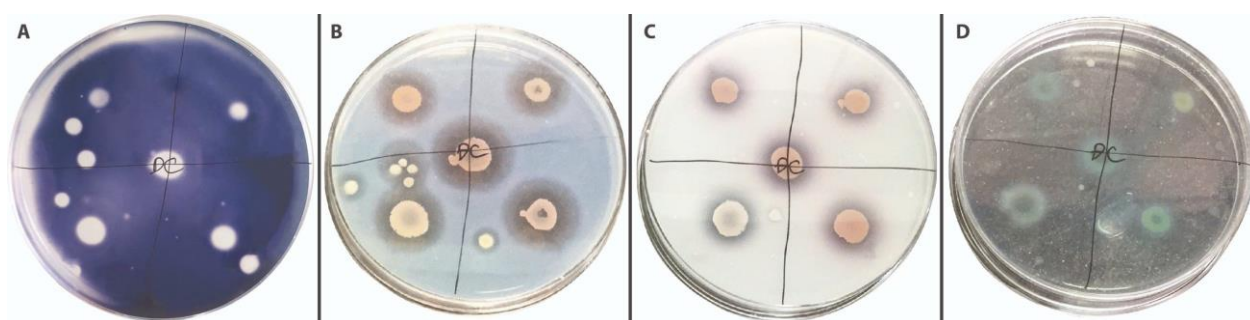
3.1.3. Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học của chủng PS39

Bảng 3.4. Hoạt tính enzyme và tính kháng kháng sinh của chủng PS39

TT	Enzyme/Kháng sinh	<i>P.aeruginosa</i> PS39	
1	Hoạt tính enzyme	Amylase	+
2		Protease	+++
3		Gelatinase	++
4		Lipase	+
5	Kháng sinh	Tetracyclin (TE)	R
6		Ampicillin (AM)	R
7		Penicillin (PG)	R
8		Kanamycin (KM)	R
9		Gentamicin (GM)	S
10		Gentamicin 200 µg/mL	S

Ghi chú: +: dương tính; -: âm tính; R (Resistance): Kháng kháng sinh; S (Sensitive): nhạy cảm với kháng sinh

Khả năng kháng kháng sinh của chủng PS39 cũng đã được kiểm tra. Kết quả cho thấy chủng vi khuẩn đề kháng với các loại kháng sinh được thử nghiệm gồm tetracyclin, ampicillin, penicillin, kanamycin, nhưng nhạy cảm với gentamicin với liều lượng được khuyến cáo (Bảng 3.4) (Phụ lục 13). Đặc điểm sinh enzyme ngoại bào gồm amylase, gelatinase, lipase, protease của chủng PS39 cũng được xác định. Kết quả cho thấy chủng PS39 sinh enzyme amylase và lipase với hoạt tính thấp, nhưng các hoạt tính gelatinase và protease tương đối tốt được thể hiện trong Hình 3.5.



Hình 3.5. Khả năng sinh enzyme ngoại bào của chủng *Pseudomonas* sp. PS39

A: Amylase; B: Protease; C: Gelatinase; D: Lipase

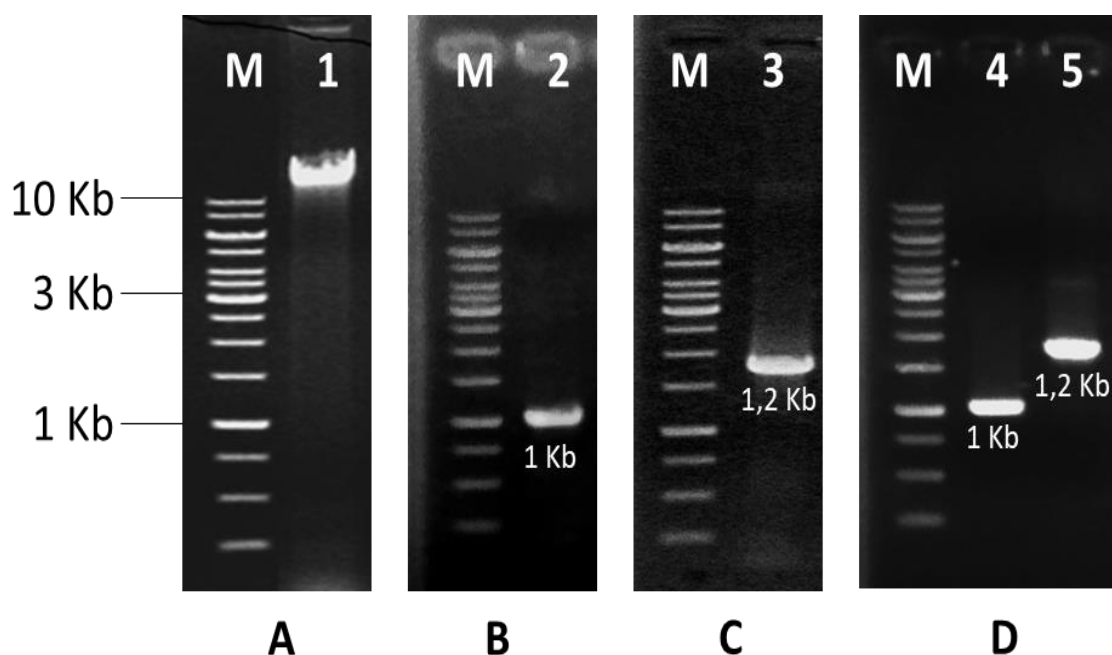
3.2. Nghiên cứu tạo chủng tái tổ hợp *P. aeruginosa* PS39 mang thêm bản sao gen *phzM* và *phzS* trong plasmid

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

3.2.1.1. Tách chiết DNA hệ gen, khuếch đại gen *phzM* và *phzS* bằng PCR

DNA tổng số của chủng *P. aeruginosa* PS39 được tách chiết và kiểm tra bằng điện di trên gel agarose (Hình 3.6). Sản phẩm PCR thể hiện trên điện di đồ là một băng đậm duy nhất, có kích thước lớn hơn kích thước băng chuẩn 10 Kb, không bị đứt gãy, không bị lẫn ARN. Kết quả nhận được cho thấy sản phẩm DNA hệ gen đảm bảo tốt để sử dụng làm khuôn cho PCR khuếch đại gen *phzM* và *phzS*.

Gen *phzM* được định vị trước gen *phzA1* từ nucleotide 4.713.098 đến nucleotide 4.712.094 (1005 bp) và gen *phzS* từ nucleotide 4.720.300 đến nucleotide 4.721.508 (1209 bp) nằm tiếp phía sau gen *phzG1* trên genome của vi khuẩn *P. aeruginosa* [75]. Sản phẩm PCR khuếch đại hai gen *phzM* và *phzS* được chỉ ra ở Hình 3.6 B, C với một băng DNA duy nhất, đậm nét. Kích thước gen nhận được có chiều dài lần lượt khoảng 1,0 kb và 1,2 kb, đúng với kích thước được mong đợi theo tính toán lí thuyết gồm kích thước gen và đoạn nối tương ứng.

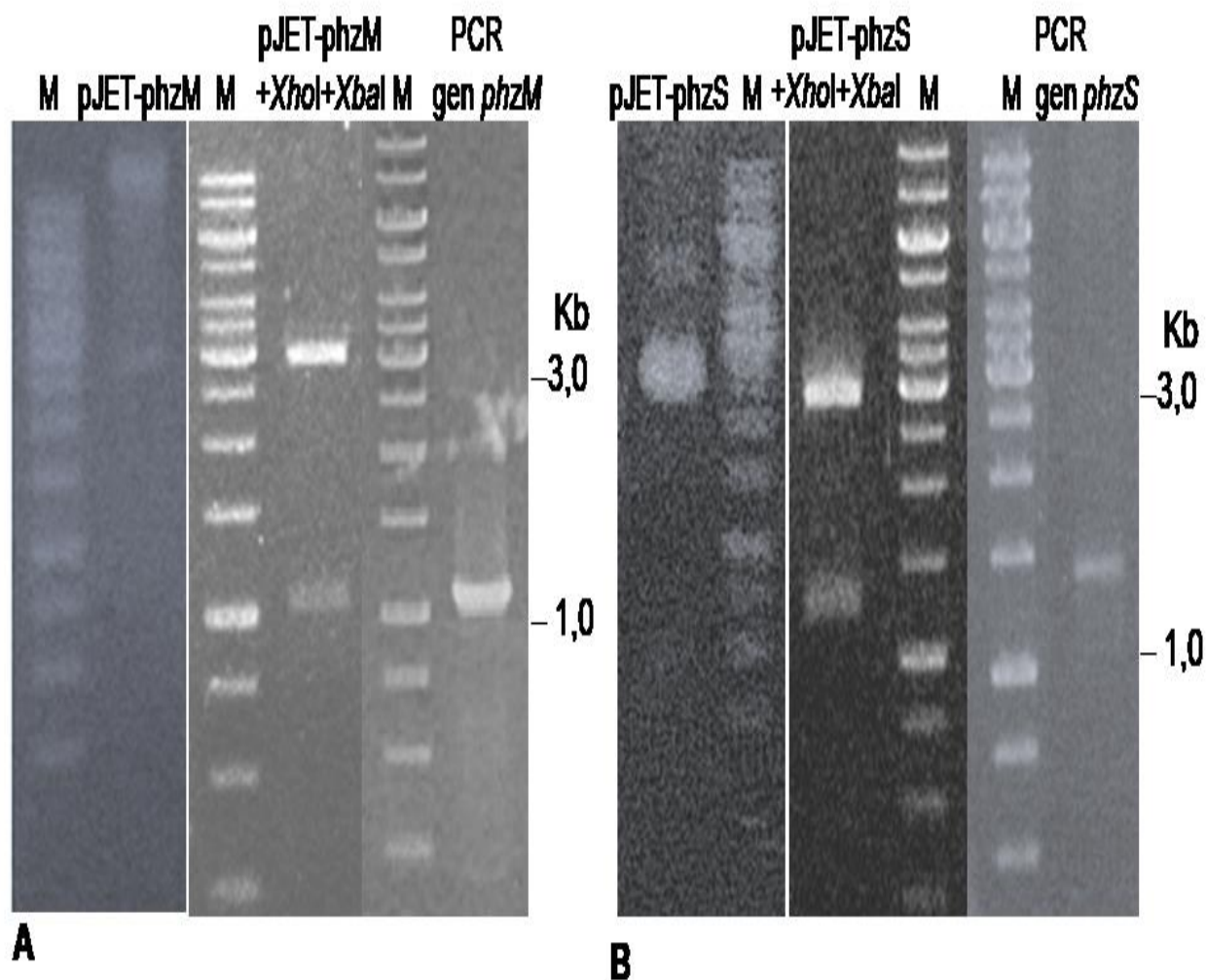


Hình 3.6. Điện di đồ phân tích DNA hệ gen (A) và sản phẩm PCR khuếch đại gen *phzM* (B); *phzS* (C) và sản phẩm sau tinh sạch (D) trên gel agarose 0,8%.

M: thang chuẩn DNA (O'GeneRuler 1Kb DNA Ladder- ThermoScientific); 1: DNA hệ gen chủng *P. aeruginosa* PS39 (A); 2: sản phẩm PCR gen *phzM* (B); 3: sản phẩm PCR gen *phzS* (C); 4: sản phẩm PCR đã tinh sạch gen *phzM* và 5: sản phẩm PCR đã tinh sạch của gen *phzS* (D).

3.2.1.2. Tách dòng và xác định trình tự gen *phzM* và *phzS*

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*. Các chủng biến nạp chứa vector pJET1.2-*phzM* và pJET1.2-*phzS* được kiểm tra, xác định sự có mặt của hai dòng gen *phzM* và *phzS* thông qua hai phương pháp: 1) cắt plasmid tái tổ hợp với cặp enzyme giới hạn *XhoI* và *XbaI* có mặt ở vùng tách dòng gen nằm về hai phía của gen được chèn vào trên vector và 2) PCR với cặp môi đặc hiệu cho từng gen đích. Theo lý thuyết, trên cả hai gen đều không có vị trí nhận biết của enzyme giới hạn *XhoI*, gen *phzS* có trình tự *XbaI* ở tận cùng đầu 5' nằm trên trình tự môi, gen *phzM* không có vị trí nhận biết bởi enzyme *XbaI*. Vì vậy, hai plasmid được cắt bằng cặp enzyme này sẽ tạo các đoạn gen có kích thước khoảng 3,0 kb (vector pJET1.2) và 1,0 kb (đối với gen *phzM*) và 1,2 kb (đối với gen *phzS*). Kết quả trên điện di đồ cho thấy, các đoạn gen đã được cắt và được PCR có kích thước đúng như mong đợi. (Hình 3.7). Để chắc chắn hai gen được chèn vào là *phzM* và *phzS*, cả hai dòng plasmid đã được sử dụng để giải trình tự gen bằng môi M13 nằm trên plasmid.



Hình 3.7. Điện di đồ phân tích plasmid, sản phẩm cắt plasmid pJET1.2-phzM và pJET1.2-phzS với cặp enzyme giới hạn *XhoI* và *XbaI*, sản phẩm PCR gen đích từ plasmid tái tổ hợp trên gel agarose 0,8%.

M: thang chuẩn DNA (O'GeneRuler 1Kb DNA Ladder- ThermoScientific); A: Phân tích plasmid pJET1.2-phzM; B: 3: Phân tích plasmid pJET1.2-phzS.

Trình tự nucleotide của hai gen được giải có chất lượng cao (Phụ lục 4) các đỉnh rõ ràng. Kết quả so sánh với các gen cùng nhóm trên GenBank bằng chương trình BLAST đã chỉ ra gen *phzM* tương đồng 99,61% so với gen tương ứng mã số CP093015 trên ngân hàng gen (Hình 3.8). Gen này được đăng ký trên ngân hàng gen với mã số MF673740 (Phụ lục 5,6). Gen *phzM* mã hóa cho protein gồm 334 amino acid, có kích thước ước đoán khoảng 35 kDa. Kết quả phân tích trình tự amino acid suy diễn từ trình tự nucleotide của gen *phzM* cho thấy protein có chứa domain chính nằm ở các gốc amino acid 67-176 đảm nhận chức năng methyltransferase [75] (Hình 3.9).

PhzM-PS39 1	ATGAATAATTCGAATCTTGCTGCTGCGCGTAATTTGATACAAGTTGTTACCGGGGAATGG	60
CP093015 817288	ATGAATAATTCGAATCTTGCTGCTGCGCGTAATTTGATACAAGTTGTTACCGGGGAATGG	817347
PhzM-PS39 61	AAGTCCCCTTGCGTCTACGTGCTACGCGCCTCGGGCTGGCCGATCTGATCGAGAGCGGG	120
CP093015 817348	AAGTCCCCTTGCGTCTACGTGCTACGCGCCTCGGGCTGGCCGATCTGATCGAGAGCGGG	817407
PhzM-PS39 121	ATCGACAGCGACGAGACGCTGGCCGCCGCGGTCCGATGCCGAGCGCATCCATCGA	180
CP093015 817408	ATCGACAGCGACGAGACGCTGGCCGCCGCGGTCCGATGCCGAGCGCATCCATCGA	817467
PhzM-PS39 181	CTGATGCGCCTGCTGGTGGCCTTCGAGATCTTCCAGGGCGATACCCGCGACGGCTACGCC	240
CP093015 817468	CTGATGCGCCTGCTGGTGGCCTTCGAGATCTTCCAGGGCGATACCCGCGACGGCTACGCC	817527
PhzM-PS39 241	AATACCCCCACCAGCCACCTGCTGAGGGATGTCGAGGGCTCCTTCCGCGACATGGTGTG	300
CP093015 817528	AATACCCCCACCAGCCACCTGCTGAGGGATGTCGAGGGCTCCTTCCGCGACATGGTGTG	817587
PhzM-PS39 301	TTCTACGGCGAGGAGTTCACGCCCGCTGGACGCCCGCTGCGAGGCGCTACTCAGCGGT	360
CP093015 817588	TTCTACGGCGAGGAGTTCACGCCCGCTGGACGCCCGCTGCGAGGCGCTACTCAGCGGT	817647
PhzM-PS39 361	ACCCAGGCTTCGAGCTGGCGTTCGGCGAAGACTTCTACAGCTACCTGAAGCGCTGCCCG	420
CP093015 817648	ACCCAGGCTTCGAGCTGGCGTTCGGCGAAGACTTCTACAGCTACCTGAAGCGCTGCCCG	817707
PhzM-PS39 421	GATGCAGGCCGGCGCTTCTGCTGGCGATGAAGGCAAGCAACCTGGCCTTCCATGAGATC	480
CP093015 817708	GATGCAGGCCGGCGCTTCTGCTGGCGATGAAGGCAAGCAACCTGGCCTTCCATGAGATC	817767
PhzM-PS39 481	CCCAGGCTCCTGGATTTCCGCGGGCGTAGCTTCGTCGACGTCGGTGGCGGTTCCGGCGAA	540
CP093015 817768	CCCAGGCTCCTGGATTTCCGCGGGCGTAGCTTCGTCGACGTCGGTGGCGGTTCCGGCGAA	817827
PhzM-PS39 541	TTGACCAAGGCCATCCTGCAGGCCGAGCCAGCGCCCGGGGCGTGATGCTCGACCGCGAG	600
CP093015 817828	TTGACCAAGGCCATCCTGCAGGCCGAGCCAGCGCCCGGGGCGTGATGCTCGACCGCGAG	817887
PhzM-PS39 601	GGTTCCCTCGGCGTGGCCCGCGACAACCTTCCAGCCTGTTGGCAGGGGAGCGCGTCAGC	660
CP093015 817888	GGTTCCCTCGGCGTGGCCCGCGACAACCTTCCAGCCTGTTGGCAGGGGAGCGCGTCAGC	817947
PhzM-PS39 661	CTGGTGGGCGGCGACATGCTGCAAGAGGTGCCGTCCAACGGCGATATCTACCTGCTGTG	720
CP093015 817948	CTGGTGGGCGGCGACATGCTGCAAGAGGTGCCGTCCAACGGCGATATCTACCTGCTGTG	818007
PhzM-PS39 721	CGGATCATCGGCGATCTGGACGAAGCCGCCAGCCTGAGGTTGCTCGGCAATTGCCGCGAG	780
CP093015 818008	CGGATCATCGGCGATCTGGACGAAGCCGCCAGCCTGAGGTTGCTCGGCAATTGCCGCGAG	818067
PhzM-PS39 781	GCGATGGCCGGCGACGGCCGGGTGGCGGTGATCGAGCGAACCATCTCGGCCAGCGAGCCG	840
CP093015 818068	GCGATGGCCGGCGACGGCCGGGTGGCGGTGATCGAGCGAACCATCTCGGCCAGCGAGCCG	818127
PhzM-PS39 841	TCGCCGATGTCGGTCTCTGGGACGTGCACCTGTTTCATGGCCTGCGCTGGCCGCCACCGC	900
CP093015 818128	TCGCCGATGTCGGTCTCTGGGACGTGCACCTGTTTCATGGCCTGCGCTGGCCGCCACCGC	818187
PhzM-PS39 901	ACCACCGAGGAGGTGGTTCGACCTGCTCGGGCGCGGGCTTCGCGGTGGAGCGGATCGTC	960
CP093015 818188	ACCACCGAGGAGGTGGTTCGACCTGCTCGGGCGCGGGCTTCGCGGTGGAGCGGATCGTC	818247
PhzM-PS39 961	GACCTGCCGATGGAAACCCGCATGATCGTCGCTGCCAGGGCCTGAATCGGAACTTCAAC	1020
CP093015 818248	GACCTGCCGATGGAAACCCGCATGATCGTCGCTGCCAGGGCCTGAATCGGAACTTCAAC	818307
PhzM-PS39 1021	GG 1022	
CP093015 818308	GG 818309	

Hình 3.8. So sánh trình tự gen *phzM* từ chủng *P. aeruginosa* PS39 với gen *phzM* tương đồng cao nhất trong ngân hàng gen, có nguồn gốc từ chủng *P. aeruginosa* H16 (Hannover, Đức).

1 MNNSNLAAARNLIQVVTGEWKSRVYVATRLGLADLIESGIDSDETLAAAVGSDAERIHR 60
 61 LMRLLV **AFEIFQGDTRDGYANTPTSHLLRDVEGSFRDMVLFYGEEFHAAWTPACEALLSG** 120
 121 **TPGFELAFGEDFYSLKRCPDAGRFRLLAMKASNLAHFHEIPRLLDFRGRSFVDVGG**GSGE 180
 181 LTKAILQAEPSARGVMLDREGSLGVARDNLSLLAGERVSLVGGDMLQEVPSNGDIYLLS 240
 241 RIIGDLDEAASLRLGNCREAMAGDGRVAVIERTISASEPSPMSVLWDVHLFMACAGRHR 300
 301 TTEEVVDLLGRGGFAVERIVDLPMETRMIVAARA 334

Hình 3.9. Trình tự protein suy diễn từ gen *phzM* từ chủng *P. aeruginosa* PS39.

Vùng tô đậm: vùng hoạt tính methyltransferase.

Gen *phzS* tương đồng cao nhất (99,68%) so với trình tự gen *phzS* của chủng vi khuẩn *P. aeruginosa* H16 (Hannover, Đức) (Hình 3.10). Gen đã được đăng ký trên ngân hàng gen với mã số MF770713 (*phzS*) (Phụ lục 7,8). Kết quả dịch mã gen ra protein cho thấy, gen mã hóa cho protein có 402 amino acid, có kích thước ước đoán khoảng 44 kDa (Hình 3.11). Trên chuỗi amino acid có mặt vùng liên kết NADH (159-DVLVGADGIHSAVR-172), vùng liên kết flavin ADP (11-GAGIGG-16) và vị trí hoạt hóa cơ chất (303-GRITLLGDA AHLMYPMGANGA-323) (Hình 3.11). Như vậy gen *phzM* và *phzS* của chủng *P. aeruginosa* PS39 đã được tách dòng và giải trình tự thành công.

PhzS-PS39 1	TCGAACACTCTAGAAAAGGAAGCACCCATGGGCGAACCCATCGATATCCTCATTGCCGGC	60
CP093015 810159	TCGAACACTCGAGAAAAGGAAGCACCCATGAGCGAACCCATCGATATCCTCATTGCCGGC	810100
PhzS-PS39 61	GCCGGCATCGGCGGCCTCAGTTGCGCCCTGGCCCTGCACCAGGCCGGCATCGGCAAGGTC	120
CP093015 810099	GCCGGCATCGGCGGCCTCAGTTGCGCCCTGGCCCTGCACCAGGCCGGCATCGGCAAGGTC	810040
PhzS-PS39 121	ACGCTGCTGGAAAGCAGCAGCGAGATACGCCCCCTTGGCGTCGGCATCAATATCCAGCCG	180
CP093015 810039	ACGCTGCTGGAAAGCAGCAGCGAGATACGCCCCCTTGGCGTCGGCATCAATATCCAGCCG	809980
PhzS-PS39 181	GCGGGGTTCGAGGCCCTCGCCGAACCTGGCCCTCGGCCGGGCTGGCGGCCACCGCCATC	240
CP093015 809979	GCGGGGTTCGAGGCCCTCGCCGAACCTGGCCCTCGGCCGGGCTGGCGGCCACCGCCATC	809920
PhzS-PS39 241	CCCACCCATGAGCTGCGCTACATCGACCAGAGCGGCGCCACGGTATGGTCCGAGCCGCGC	300
CP093015 809919	CCCACCCATGAGCTGCGCTACATCGACCAGAGCGGCGCCACGGTATGGTCCGAGCCGCGC	809860
PhzS-PS39 301	GGGGTGAAGCCGGCAACGCCTATCCGCAGTACTCGATCCATCGCGGCGAACTGCAGATG	360
CP093015 809859	GGGGTGAAGCCGGCAACGCCTATCCGCAGTACTCGATCCATCGCGGCGAACTGCAGATG	809800
PhzS-PS39 361	ATCCTGCTCGCCGCGGTGCGCGAGCGTCTCGGCCAACAGGCGGTTTCGCACCGGTCTCGGC	420
CP093015 809799	ATCCTGCTCGCCGCGGTGCGCGAGCGTCTCGGCCAACAGGCGGTACGCACCGGTCTCGGC	809740
PhzS-PS39 421	GTGGAGCGCACCGAAGAGCGCGACGGCCGCGTACTGATCGGCGCCCGCGACGGACACGGC	480
CP093015 809739	GTGGAGCGCATCGAAGAGCGCGACGGCCGCGTACTGATCGGCGCCCGCGACGGACACGGC	809680
PhzS-PS39 481	AAGCCCTGGCGCTCGGTGCCGATGTGCTGGTCGGCGCCGACGGCATCCACTCGGCGGTC	540
CP093015 809679	AAGCCCTGGCGCTCGGTGCCGATGTGCTGGTCGGCGCCGACGGCATCCACTCGGCGGTC	809620
PhzS-PS39 541	CGCGCGACCTGCATCCCGACCAGGGGCGCGTGTCCACGGTGGGATCACCATGTGGCGC	600

CP093015	809619	 CGCGCGCACCTGCATCCCGACCAGGGGCCGTGTCCACGGTGGGATCACCATGTGGCGC	809560
PhzS-PS39	601	GGCGTCACCGAGTTCGACCGCTTCCTCGACGGCAAGACCATGATCGTCGCCAACGACGAG	660
CP093015	809559	 GGCGTCACCGAGTTCGACCGCTTCCTCGACGGCAAGACCATGATCGTCGCCAACGACGAG	809500
PhzS-PS39	661	CACTGGTCGCGCCTGGTCGCCTATCCGATCTCGGCGGCCACGCGGCCGAAGGCAAGTCG	720
CP093015	809499	 CACTGGTCGCGCCTGGTCGCCTATCCGATCTCGGCGGCCACGCGGCCGAAGGCAAGTCG	809440
PhzS-PS39	721	CTGGTGAAC TGGGTGTGCATGGTGCCGAGCGCCGCGCTCGGCCAGCTCGACAACGAAGCC	780
CP093015	809439	 CTGGTGAAC TGGGTGTGCATGGTGCCGAGCGCCGCGCTCGGCCAGCTCGACAACGAAGCC	809380
PhzS-PS39	781	GACTGGAACCGCAACGGACGCCTGGAAGACGTGTTGCCGTTCTTCGCCGACTGGGACCTG	840
CP093015	809379	 GACTGGAACCGCAACGGACGCCTGGAAGACGTGTTGCCGTTCTTCGCCGACTGGGACCTG	809320
PhzS-PS39	841	GGCTGGTTCGACATCCGCGACCTGCTGACCCGCAACCAGTTGATCCTGCAGTACCCGATG	900
CP093015	809319	 GGCTGGTTCGACATCCGCGACCTGCTGACCCGCAACCAGTTGATCCTGCAGTACCCGATG	809260
PhzS-PS39	901	GTCGACCGCGATCCGCTGCCGCACTGGGGCCGGGACGCATCACGCTGCTCGGCGACGCC	960
CP093015	809259	 GTCGACCGCGATCCGCTGCCGCACTGGGGCCGGGACGCATCACGCTGCTCGGCGACGCC	809200
PhzS-PS39	961	GCCCACCTGATGTATCCGATGGGCGCCAACGGCGCTTCGCAGGCGATCCTCGACGGCATC	1020
CP093015	809199	 GCCCACCTGATGTATCCGATGGGCGCCAACGGCGCTTCGCAGGCGATCCTCGACGGCATC	809140
PhzS-PS39	1021	GAGCTGGCCCGCGCTGGCGCGCAACGCCGACGTGGCCGAGCCCTGCGCGAATACGAA	1080
CP093015	809139	 GAGCTGGCCCGCGCTGGCGCGCAACGCCGACGTGGCCGAGCCCTGCGCGAATACGAA	809080
PhzS-PS39	1081	GAAGCGGGCGGCCGACCGCCAACAAGATCATCCTGGCCAACCGCGAACGGGAAAAAGAG	1140
CP093015	809079	 GAAGCGGGCGGCCGACCGCCAACAAGATCATCCTGGCCAACCGCGAACGGGAAAAAGAG	809020
PhzS-PS39	1141	GAATGGGCCGCGCTTCGCGACCGAAGACCGAGAAGAGCGCGGCGCTGGAAGCGATCACC	1200
CP093015	809019	 GAATGGGCCGCGCTTCGCGACCGAAGACCGAGAAGAGCGCGGCGCTGGAAGCGATCACC	808960
PhzS-PS39	1201	GGCAGCTACCGCAACCAGGTGGAACGGCCACGCTAGCA 1238	
CP093015	808959	 GGCAGCTACCGCAACCAGGTGGAACGGCCACGCTAGCA 808922	

Hình 3.10. So sánh trình tự gen *phzS* từ chủng *P. aeruginosa* PS39 với gen *phzS* tương đồng cao nhất trong ngân hàng gen, có nguồn gốc từ chủng *P. aeruginosa* H16 (Hannover, Đức).

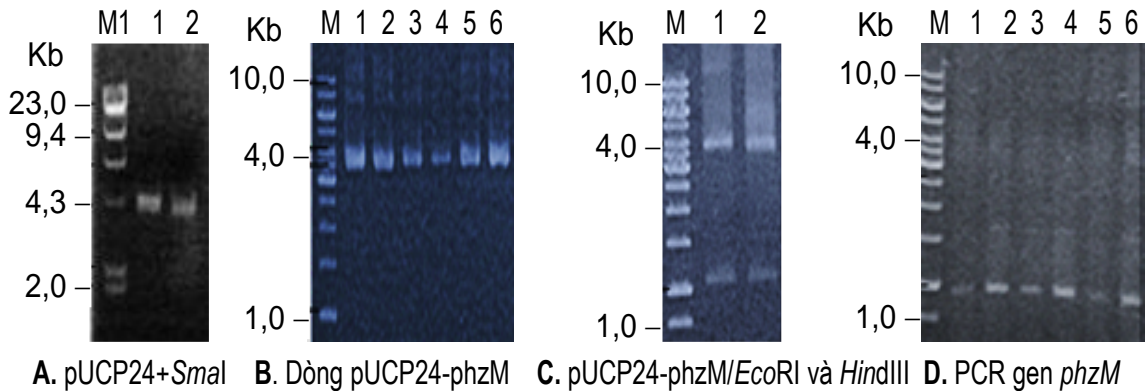
Query	1	MGEPIDILIA GAGTGG LSCALALHQAGIGKVTLLESSEIRPLGVGINIQPAAVEALAEI	60
Query	61	GLGPALAATAIPTHELRYIDQSGATVWSEPRGVEAGNAYPQYSIHRGELQMILLAAVRER	120
Query	121	LGQQAVRTGLGVERTEERDGRVLI GARDGHGKPLALG ADVLVGADGIHSAVR AHLHPDQG	180
Query	181	PLSHGGITMWRGVTEFDRFLDGMTIVANDEHWSRLVAYPISARHAAEGKSLVNWVCMVP	240
Query	241	SAAVGQLDNEADWNRNGRLEDVLPFFADWDLGWFDIRDLLTRNQLILQYPMVDRDPLPHW	300
Query	301	GR GRITLLGDAAHLMYPMGANGA SQAILDGIELAAALARNADVAAALREYEEARRPTANK	360
Query	361	IILANREREKEEWAAASRPKTEKSAALEAITGSYRNQVERPR	402

Hình 3.11. Trình tự protein suy diễn từ gen *phzS* từ chủng *P. aeruginosa* PS39. Vùng chữ đậm gạch chân: vùng liên kết NADH; Vùng chữ đậm không gạch chân: vùng liên kết flavin ADP; Vùng chữ đậm, nghiêng, gạch chân: vị trí hoạt hóa cơ chất.

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

3.2.2.1. Thiết kế vector pUCP24-phzM

Để tạo plasmid tái tổ hợp pUCP24-phzM, vector pUCP24 được cắt mở vòng với enzyme giới hạn *SmaI*. Như kết quả được trình bày ở Hình 3.12A, plasmid có kích thước khoảng 4 kb đúng với kích thước chuẩn của plasmid pUCP24 (4035 bp). Sản phẩm cắt được làm sạch và gắn với gen *phzM* đã được tạo đầu bằng. Bởi vì sản phẩm PCR gen *phzM* được khuếch đại nhờ Taq DNA polymerase có đầu nhô 3'-A nên cần loại adenine trước khi thực hiện phản ứng gắn nối gen vào plasmid. Sau biến nạp bằng sốc nhiệt, sáu dòng khuẩn lạc trắng được chọn để nuôi cấy và tách plasmid. Kết quả điện di kiểm tra plasmid nhận được như trên Hình 3.12B.



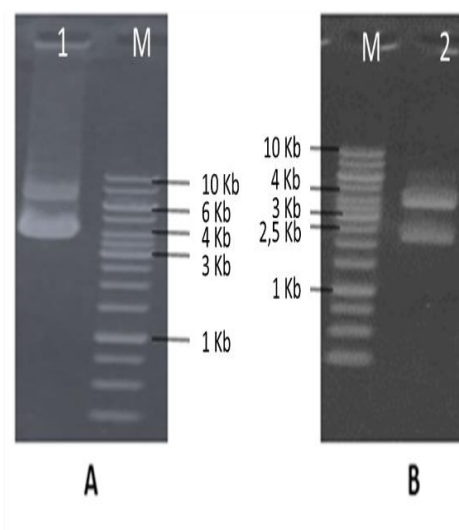
Hình 3.12. Điện di đồ kiểm tra plasmid pUCP24 cắt bằng *SmaI* (A), sáu dòng plasmid pUCP24-phzM tách từ sáu dòng khuẩn lạc (B), sản phẩm cắt hai dòng pUCP24-phzM bằng *EcoRI* và *HindIII* (C) và sản phẩm PCR gen *phzM* từ 6 dòng plasmid với cặp môi M13F/phzM-R (D). M1: DNA lambda cắt bằng *HindIII*; M: thang chuẩn DN (O'GeneRuler 1Kb DNA Ladder-ThermoScientific)

Việc kiểm tra sự có mặt của gen *phzM* và chiều gắn của gen với vector được thực hiện bằng cách cắt plasmid tách từ các dòng biến nạp, với *EcoRI* và *HindIII* và PCR khuếch đại gen *phzM* với cặp môi (M13F; phzM-R). Kết quả điện di sản phẩm cắt cho thấy cả hai dòng plasmid đều được cắt thành hai đoạn DNA có kích thước tương ứng với gen *phzM* (1 kb) và vector pUCP24 (4 kb) xuất hiện trên bản gel (Hình 3.12C). Điều này phù hợp với khảo sát lý thuyết, vì *EcoRI* và *HindIII* không có vị trí cắt trên trình tự gen *phzM* mà chỉ có một vị trí cắt ở vùng cắt đa trị của vector [78]. Thêm nữa, sản phẩm PCR khuếch đại gen *phzM* cũng chỉ ra một băng DNA có kích thước khoảng 1 kb tương ứng với kích thước gen *phzM* (Hình 3.12D). Như vậy có thể khẳng định gen *phzM* đã được gắn đúng chiều với promoter Lac của pUCP24 và plasmid tái tổ hợp pUCP24-phzM đã được thiết kế thành công.

3.2.2.2. Thiết kế vector pUCP24-phzMS

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. Sau khi biến nạp sản phẩm gắn gen vào tế bào *E. coli* Top10, khuẩn lạc phát triển trên môi trường chứa kháng sinh gentamycin được nuôi cấy và tách plasmid kiểm tra. Kết quả điện di plasmid được chỉ ra trên Hình 3.13A. Việc kiểm tra sự có mặt của gen *phzS* và *phzM* được thực hiện bằng cách cắt plasmid này, với *EcoRI* và *HindIII*. Kết quả điện di sản phẩm cắt cho thấy, có 2 vạch DNA tương ứng kích thước hai gen *phzM* và *phzS* với tổng chiều dài là khoảng 2,2 kb và vector pUCP24 (4 kb) xuất hiện trên bản gel (Hình 3.13B). Điều này phù hợp với tính toán lý thuyết, vì cả hai 2 gen không tồn tại vị trí cắt của hai enzyme giới hạn mà chỉ có một vị trí cắt ở vùng cắt đa nối của vector [78]. Như vậy có thể khẳng định vector pUCP24-*phzMS* đã được thiết kế thành công. 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.

Thư viện DNA plasmid được tạo bởi Nextera XT DNA Library Prep Kit, sau đó được giải trình tự bằng hệ thống giải trình tự thế hệ mới Miseq - Illumina. Dữ liệu trình tự đủ điều kiện và được phân tích bằng phần mềm Miseq Reporter và IGV (Phụ lục 9). Trình tự plasmid pUCP24-*phzMS* được đăng ký trên NCBI GenBank với mã số MZ399165.1 (Phụ lục 10).



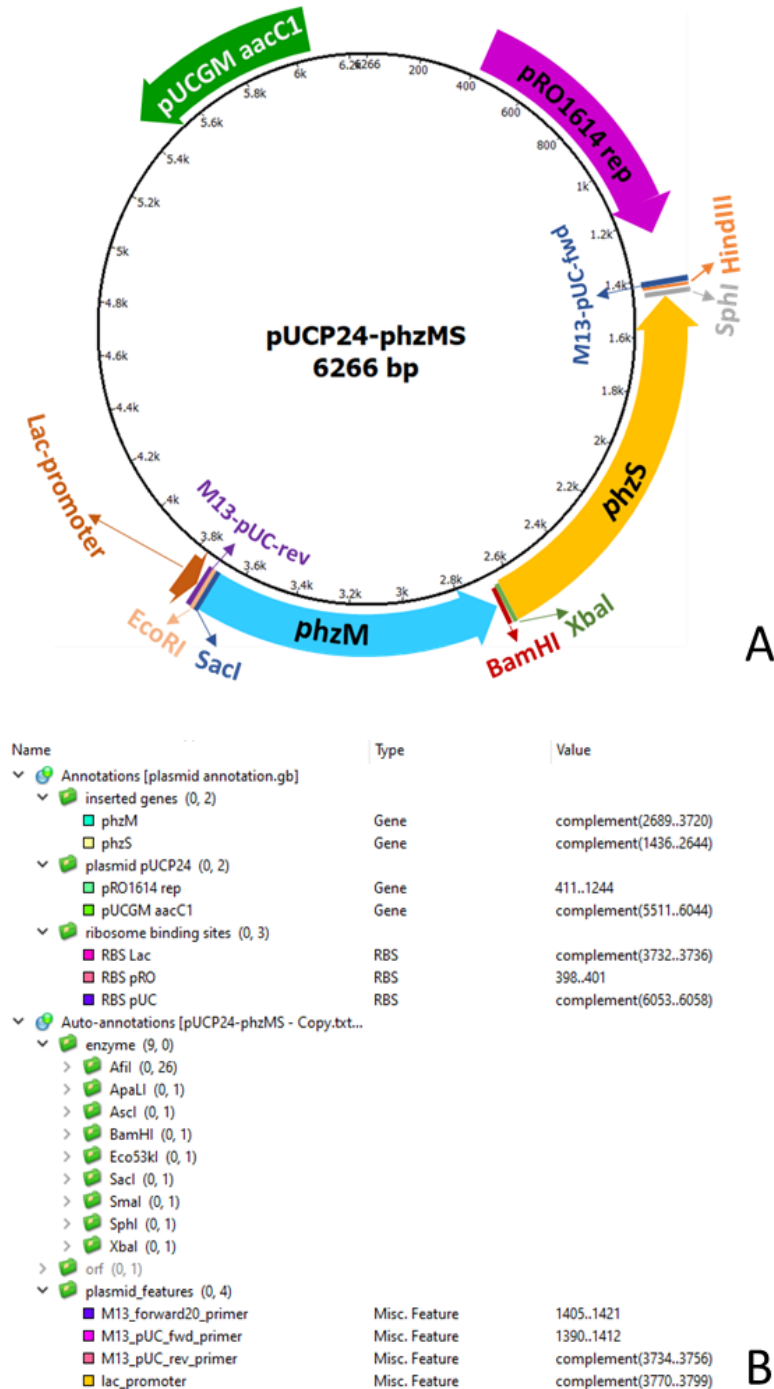
Hình 3.13. Điện di dò kiểm tra plasmid pUCP24-*phzMS* sau tách chiết (A) và cắt bằng với *EcoRI* và *HindIII* (B) trên gel agarose 0,8%.

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

Theo lý thuyết, plasmid pUCP24 là một vector phổ rộng hay vector con thoi, được xây dựng dựa trên thông tin di truyền của vector pMB1 (ColE1), với chiều dài 4035 bp, nhằm mục đích sao chép ở cả *Pseudomonas* và *E. coli* [78]. Cấu trúc vec-tơ chứa 2 điểm khởi đầu sao chép (*ori*) ở cả *Pseudomonas* và *E. coli*, chứa gen *aacC1* kháng gentamicin và vùng cắt đa trị - MCS của các enzyme giới hạn *EcoRI*, *SacI*, *KpnI*, *SmaI*, *BamHI*, *XbaI*, *SacI*, *PstI*, *SphI* và *HindIII* nằm trong vùng gen *lacZ α* (Mã số genbank U07167).

Plasmid tái tổ hợp pUCP24-phzMS có chiều dài là 6266 bp, được chú thích đầy đủ tại Hình 3.14 và Phụ lục 10. Phân tích trình tự cho thấy các gen *phzM* và *phzS* đã được chèn vào đúng hướng của operon lac. Trong đó, gen *phzM* chứa một trình tự hoàn chỉnh gồm 1005 bp, trải dài từ nucleotide 2672 đến 3693, với CDS (trình tự mã hóa) là 1005 bp bao gồm các mã mở đầu và kết thúc ở nucleotide tương ứng số 3691-3693 và 2689-2691. Vị trí liên kết của ribosome đối với gen này nằm ở các nucleotide 3732-3736 có nguồn gốc từ pUCP24. Tiếp theo, chiều dài của gen *phzS* được xác định là 1209 bp với các nucleotide từ 1436 đến 2644, với vùng CDS là 1209 bp bao gồm các mã mở đầu và kết thúc ở các nucleotide số 2642-2644 và 1434-1436. Vị trí liên kết của ribosome đối với gen này nằm ở các nucleotide 2652-2655 có nguồn gốc từ gen *phzS* của *P. aeruginosa* PS39. Trình tự plasmid pUCP24-phzMS được đăng ký trên NCBI GenBank với mã số MZ399165.1.

Như vậy, nhờ việc giải trình tự gen thể hệ mới, toàn bộ plasmid tái tổ hợp pUCP24-phzMS đã được đọc trình tự và chỉ ra sự có mặt của 2 gen được tạo dòng *phzM* và *phzS*. Ở đó, cả 2 gen đều tương đồng hoàn toàn với trình tự 2 gen đã được xác định trong nghiên cứu trước đó và được đăng ký trên ngân hàng dữ liệu gen GenBank NCBI với mã số là MF673740 (*phzM*) và MF770713 (*phzS*). 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. Như vậy đã tạo được chủng tái tổ hợp *P. aeruginosa* PS39-phzMS mang plasmid chứa đầy đủ 2 gen *phzM* và *phzS*.

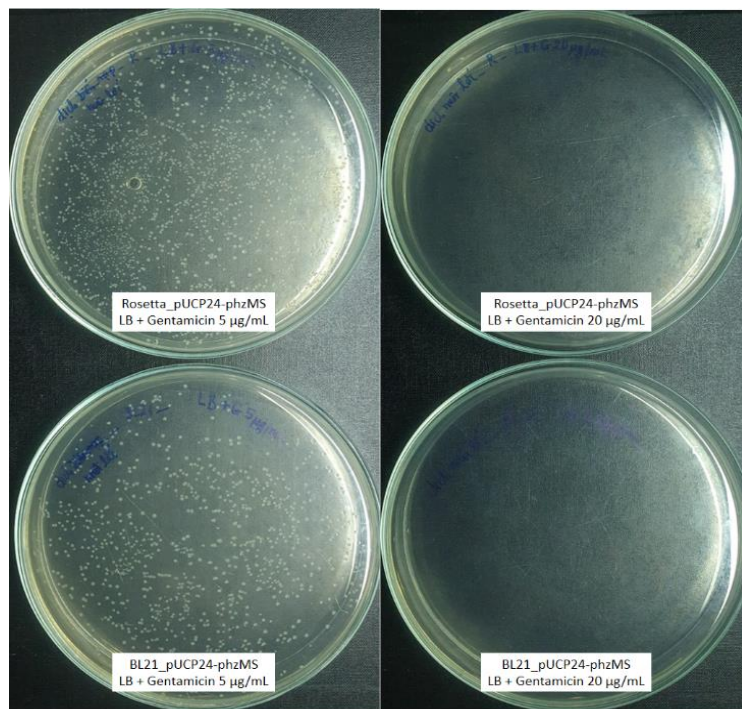


Hình 3.14. Chú giải plasmid tái tổ hợp pUCP24-phzMS. Sơ đồ plasmid pUCP24-phzMS (A) và chú giải chi tiết các thành phần của plasmid (B) (thực hiện bởi phần mềm UGENE v.39).

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 pUCP24-phzMS được đưa vào chủng *Pseudomonas aeruginosa* PS39, chúng tôi đã kiểm tra hoạt động của cassette biểu hiện bằng cách đánh giá sự biểu hiện của các gen *phzM* và *phzS* trong tế bào *E. coli*. Thông thường, việc kiểm tra biểu hiện gen sẽ được thực hiện trên các chủng tái tổ hợp *P.*

aeruginosa mang gen mục tiêu. Tuy nhiên, do chủng *P. aeruginosa* PS39 vốn đã mang hai gen nội sinh *phzM* và *phzS* chịu trách nhiệm tổng hợp pyocyanin, việc phân biệt giữa protein PhzM và PhzS được tổng hợp từ plasmid và từ gen nội sinh gặp nhiều khó khăn. Hai nguyên nhân chính được xác định gồm (1) kích thước protein dịch mã từ hai nguồn gen là như nhau nên chúng nằm trên cùng vị trí trên điện di đồ; (2) sự biểu hiện của protein từ gen trong plasmid có xu hướng rất thấp do promoter *lac* trong pUCP24 không phải là promoter mạnh chuyên dùng cho biểu hiện gen. Do đó, để xác nhận hoạt động và khả năng tổng hợp protein PhzM và PhzS từ plasmid, chúng tôi đã biến nạp plasmid pUCP24-*phzMS* vào các tế bào *E. coli* BL21 và Rosetta để đánh giá sự biểu hiện của hai gen này.



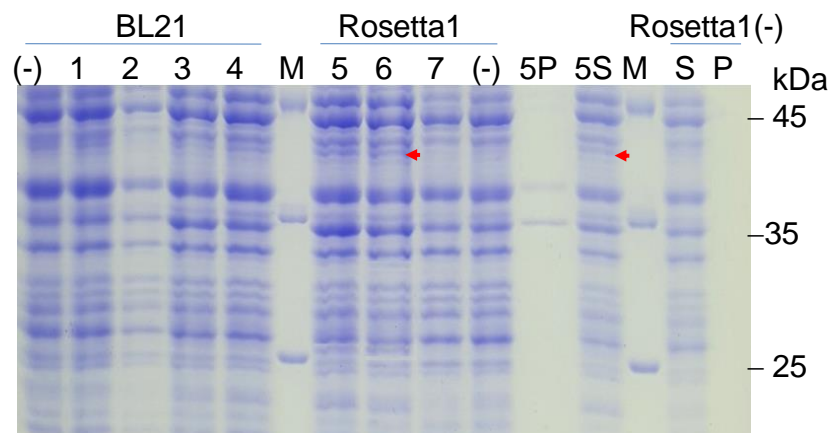
Hình 3.15. Kết quả biến nạp vector tái tổ hợp pUCP24-*phzMS* vào tế bào khả biến *E. coli* BL21 và Rosetta

Kết quả thu được (Hình 3.15) cho thấy ở nồng độ gentamycin 5 µg/mL, cả hai dòng *E. coli* BL21 và Rosetta mang plasmid pUCP24-*phzMS* đều phát triển mạnh, với mật độ khuẩn lạc dày. Đặc biệt, dòng Rosetta xuất hiện số lượng khuẩn lạc nhiều hơn so với dòng *E. coli* BL21, điều này có thể do sự khác biệt trong đặc tính của hai dòng tế bào khả biến. Quan sát bằng mắt thường cho thấy các khuẩn lạc có hình dạng tròn, bề mặt trơn, mọc riêng rẽ và không có khuẩn lạc vệ tinh. Những khuẩn lạc này có thể được chọn để nuôi cấy tiếp phục vụ các thử nghiệm sau. Tuy nhiên, ở nồng độ gentamycin 20 µg/mL, không xuất hiện khuẩn lạc ở cả hai dòng. Điều này cho thấy ở nồng độ này, gentamycin đã ức chế hoàn toàn sự phát triển của các tế bào mang plasmid pUCP24-*phzMS* trong cả hai dòng *E. coli* BL21 và Rosetta.

Sau khi nuôi cấy hai chủng trong môi trường biểu hiện chứa gentamycin và 0,5 M IPTG trong thời gian 10 giờ, tốc độ phát triển của tế bào không cao. Kết quả đo sinh khối cho thấy dòng đối chứng không bổ sung IPTG có sinh khối tăng gấp đôi so với dòng tái tổ hợp. Phân tích kết quả điện di (Hình 3.16) cho thấy, dù lượng tế bào được hiệu chỉnh bằng nhau trên mỗi giếng, các băng protein có kích thước khoảng trên 30 kDa ở dòng Rosetta cảm ứng IPTG thể hiện độ đậm cao hơn so với dòng không cảm ứng. Trong khi đó, độ đậm của các băng protein dưới 30 kDa không có sự khác biệt giữa các dòng.

Khi xem xét các băng protein có kích thước tương ứng với PhzS (44 kDa) và PhzM (35 kDa), kết quả cho thấy sự khác biệt rõ rệt giữa dòng cảm ứng và dòng không cảm ứng. Cụ thể, một băng protein có kích thước nhỏ hơn 45 kDa đã được tổng hợp trong dòng Rosetta số 5 và số 6 sau cảm ứng IPTG, trong khi dòng không cảm ứng không biểu hiện băng này. Đối với dòng BL21, sự biểu hiện protein rất thấp, các băng protein trên gel điện di mờ và khó phân biệt, dẫn đến không thể xác nhận rõ sự khác biệt. Kiểm tra phân bố protein giữa pha tan và pha tủa cho thấy băng protein thấp hơn 45 kDa được biểu hiện trong pha tan của dòng Rosetta số 5, gợi ý rằng đây có thể là protein PhzS đã được biểu hiện. Đối với vùng protein kích thước 35 kDa (tương ứng PhzM), sự xuất hiện của nhiều protein kích thước tương tự từ chủng chủng chủ, với lượng tổng hợp lớn, gây khó khăn trong việc xác định PhzM.

Tuy nhiên, khi so sánh protein giữa pha tan của chủng tái tổ hợp và đối chứng, hai băng protein có kích thước xấp xỉ 35 kDa và 38 kDa được phát hiện trong pha không tan của dòng Rosetta số 5 nhưng không xuất hiện ở dòng đối chứng. Điều này cho thấy khả năng protein PhzM đã được biểu hiện, với một phần tồn tại trong pha không tan (Hình 3.16).



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.

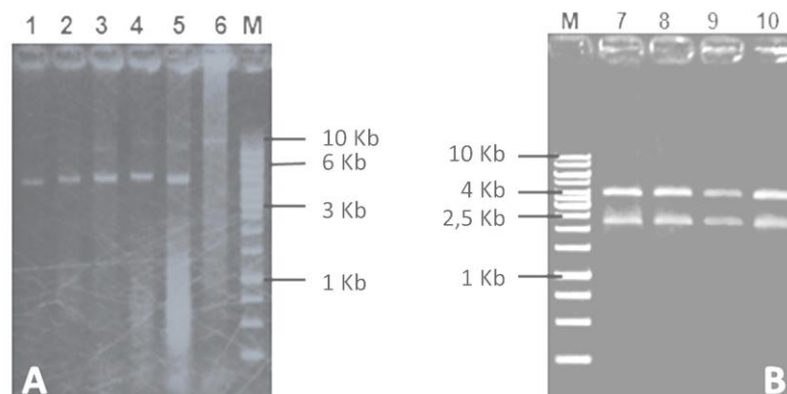
1-7: Các dòng tế bào khác nhau; (-): Các dòng vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường không có IPTG; 5S, 5P: Protein tương ứng trong pha tan, pha tủa từ chủng Rosetta số 5, Rosetta1(-) S, P: Protein tương ứng trong pha tan, pha tủa từ chủng Rosetta không cảm ứng; M: Protein chuẩn (Fermentas).

Từ kết quả này 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.

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

3.2.4.1. Tạo chủng *P. aeruginosa* PS39 tái tổ hợp

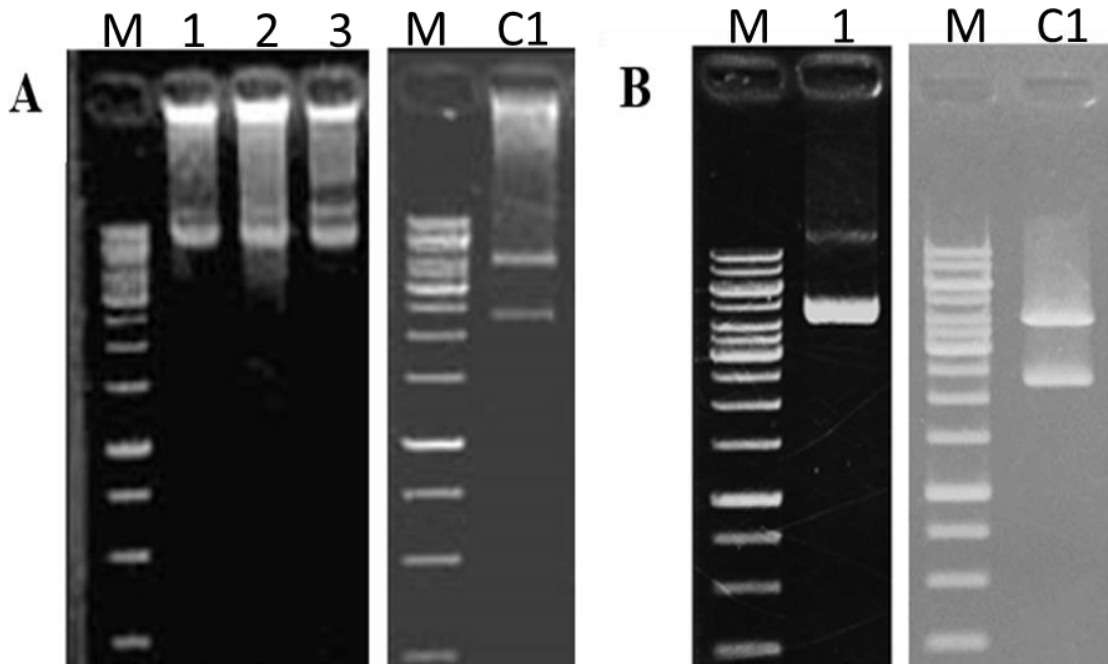
Plasmid pUCP24-phzMS thu nhận từ thí nghiệm trước được sử dụng để biến nạp vào tế bào chủ *P. aeruginosa* PS39 bằng kỹ thuật xung điện. Các khuẩn lạc trắng xuất hiện trên đĩa thạch LB+gentamicin 200 µg/mL được chọn lựa để kiểm tra sự có mặt của pUCP24-phzMS trong tế bào. Plasmid từ các khuẩn lạc này được tách chiết và điện di kiểm tra trên gel agarose (Hình 3.17A). 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. Kết quả này tương tự được quan sát khi cắt plasmid từ các dòng *E. coli* nhận được sau biến nạp với pUCP24-phzMS (Hình 3.13). 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*.

3.2.4.2. Kiểm tra sự tồn tại của plasmid pUCP24-phzMS ở chủng tái tổ hợp qua các lần nuôi cấy chuyển khác nhau

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 (sau mỗi lần nuôi cấy chủng được giữ, bảo quản cho lần cấy chuyển tiếp theo). Sau mỗi lần nuôi cấy, plasmid được tách chiết và cắt với cặp enzyme giới hạn *EcoRI* và *HindIII*, nếu sản phẩm cắt plasmid tạo thành 2 đoạn DNA có kích thước tương ứng khoảng 4 kb và 2,2 kb thì chủng tở plasmid pUCP24-phzMS mang 2 gen *phzM* và *phzS* vẫn tồn tại trong tế bào chủng tái tổ hợp. Kết quả kiểm tra sản phẩm cắt plasmid của lần nuôi cấy chuyển thứ 2 và thứ 5 được trình bày tại Hình 3.18 cho thấy sản phẩm cắt plasmid gồm hai đoạn DNA với kích thước tương ứng. Do đó có thể khẳng định sự ổn định của chủng tái tổ hợp *P. aeruginosa* PS39-phzMS và cấu trúc plasmid tái tổ hợp pUCP24-phzMS vẫn được duy trì qua nhiều lần nuôi cấy chuyển.

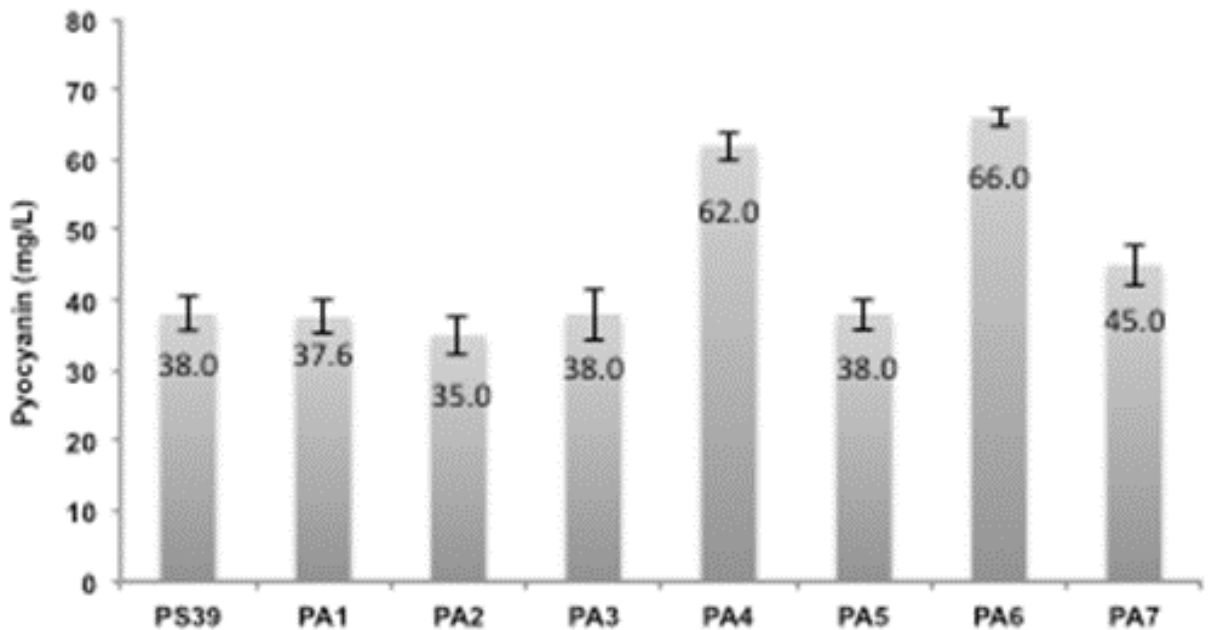


Hình 3.18. Điện di đồ kiểm tra plasmid tái tổ hợp pUCP24-phzMS và sản phẩm cắt enzyme giới hạn (*EcoRI* và *HindIII*) từ chủng *P. aeruginosa* PS39-phzMS lần nuôi cấy chuyển 2 (A) và lần nuôi cấy chuyển 5 (B). M-thang chuẩn ADN (O'GeneRuler 1Kb ADN Ladder- ThermoScientific); 1, 2, 3 – plasmid được tách từ chủng *P. aeruginosa* PS39-phzMS (lần nuôi cấy chuyển thứ 2 và 5); C1-sản phẩm cắt plasmid pUCP24-phzMS với enzyme giới hạn

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

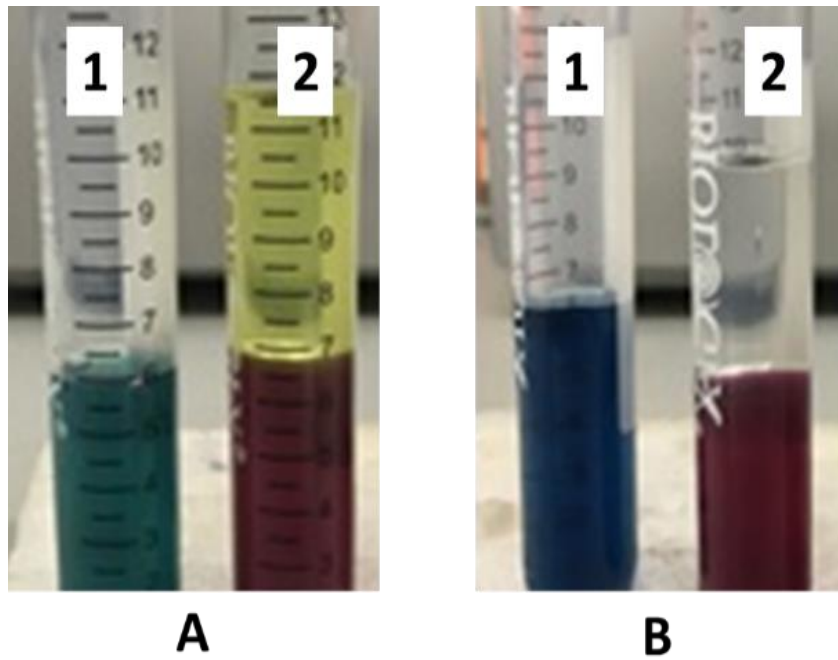
3.3.1. Chọn dòng *P. aeruginosa* PS39-phzMS sinh pyocyanin cao

Sự biểu hiện của gen *phzM* và *phzS* ở các dòng biến nạp *P. aeruginosa* PS39-phzMS được đánh giá bởi khả năng tổng hợp pyocyanin so với chủng gốc theo thời gian. Trong số 15 dòng tế bào được sàng lọc, 7 dòng có khả năng tiết pyocyanin xấp xỉ bằng và cao hơn chủng gốc trong cùng điều kiện nuôi cấy (Hình 3.19). Hai trong số bảy dòng tế bào được sàng lọc, PA4 và PA6 đã tiết pyocyanin cao nhất lần lượt là 62 mg/L và 66 mg/L gấp gần hai lần chủng gốc (38 mg/L) sau 7 ngày nuôi cấy. Dòng sinh pyocyanin cao nhất được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 3.19. Khả năng sinh tổng hợp pyocyanin ở các dòng tế bào biến nạp sau 7 ngày nuôi cấy

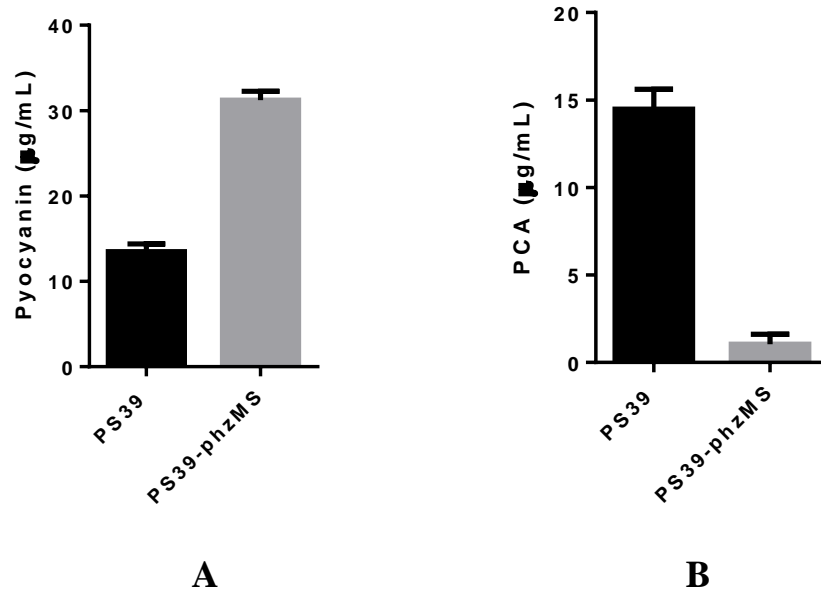
Khả năng tăng sinh pyocyanin của chủng tái tổ hợp sau khi xác định sự có mặt và tính toàn vẹn của cặp gen *phzM-phzS*, sẽ được đánh giá thông qua sự giảm hàm lượng tiền chất PCA và sự tăng hàm lượng pyocyanin thông qua việc nuôi cấy tế bào vi khuẩn chủng tự nhiên *P. aeruginosa* PS39 và chủng tái tổ hợp *P. aeruginosa* PS39-phzMS. Dịch nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường KingA sau 2 ngày, của chủng tái tổ hợp *P. aeruginosa* PS39-phzMS và chủng tự nhiên *P. aeruginosa* PS39, có và không có plasmid pUCP24-phzMS, được sử dụng để tách chiết và xác định hàm lượng pyocyanin và PCA.



Hình 3.20. Tách chiết PCA và pyocyanin từ chủng tự nhiên *P. aeruginosa* PS39 (A) và chủng tái tổ hợp *P. aeruginosa* PS39-phzMS (B). Ống 1: Pyocyanin (xanh lam); ống 2: lớp dung môi màu vàng trên cùng chứa PCA.

Quan sát hình ảnh các ống tách chiết bằng mắt thường, có thể nhận thấy pyocyanin ở chủng tự nhiên (Hình 3.20A ống 1) có màu xanh lam, nhạt hơn so với pyocyanin của chủng tái tổ hợp (Hình 3.20B ống 1). Thêm nữa, lớp dung môi phía trên ống chiết xuất PCA của chủng tự nhiên (Hình 3.20A ống 2) có màu vàng xuất hiện, trong khi ở ống chiết xuất PCA của chủng tái tổ hợp (Hình 3.20B ống 2) là lớp dung môi trong suốt.

Các dịch chiết này được tiếp tục định lượng nồng độ pyocyanin và PCA theo phương pháp đã được mô tả trong phần phương pháp nghiên cứu và dựa theo phương trình đường chuẩn trình bày tại Phụ lục 2. 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 ($1,041 \pm 0,57$ $\mu\text{g/mL}$) (Hình 3.21). 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). Như vậy, ở chủng tự nhiên đã tổng hợp đồng thời cả hai sắc tố PCA và pyocyanin trong đó hàm lượng pyocyanin thấp hơn chủng tái tổ hợp, còn hàm lượng PCA lại cao hơn rất nhiều so với chủng tái tổ hợp.



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

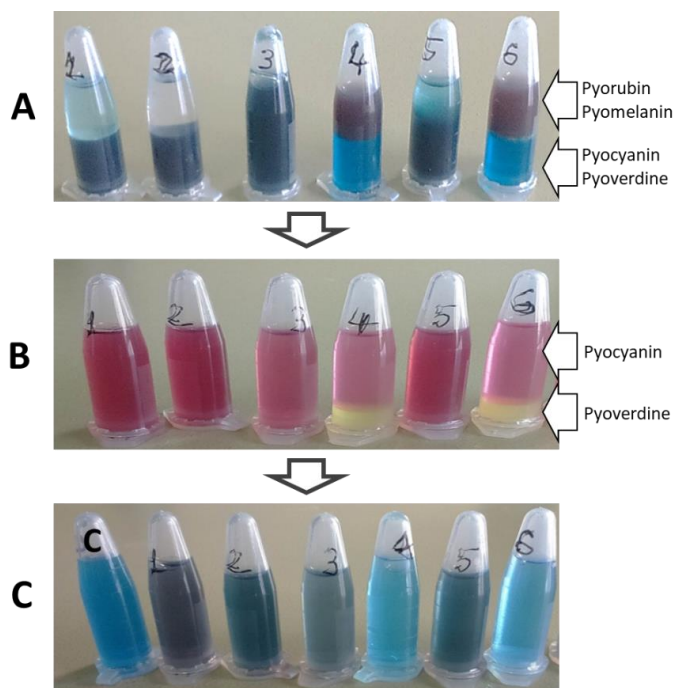
Pyocyanin là sản phẩm tiết ra môi trường được sinh ra trong quá trình nuôi cấy chủng *P. aeruginosa* PS39-phzMS trong môi trường GM pH 8 (môi trường KingA có chút thay đổi bởi glutamic acid thay thế peptone) bổ sung gentamycin, ở nhiệt độ 28-30°C, nuôi lắc 200 vòng/phút; sản phẩm sau nuôi cấy có cơ chất dư thừa, xác vi khuẩn, protein, chất màu và các sản phẩm khác. Để thu nhận pyocyanin cần sử dụng dung môi để tách chiết, các dung môi đã được sử dụng trong nghiên cứu tách chiết pyocyanin từ dịch nuôi cấy vi khuẩn, bao gồm benzene, hexane, methanol, dichloromethane, ethylacetate và chloroform.

Quan sát hình ảnh chiết pyocyanin với các dung môi benzene, hexane và ethylacetate (ống 1, 2 và 5 Hình 3.22A) thấy dung dịch tạo thành 2 lớp riêng biệt nhưng không loại bỏ được pyorubin (đỏ) và pyomelanin (nâu) khỏi dịch nuôi cấy chứa pyocyanin. Ngược lại, dung dịch không phân pha khi sử dụng methanol (ống 3 Hình 3.22A). Trong khi đó, dichloromethane và chloroform tạo ra sự phân tách lớp tốt, trong đó lớp trên bao gồm pyorubin và pyomelanin, và lớp dưới là hỗn hợp pyocyanin (xanh lam) và pyoverdine (vàng) (ống 4, 6 Hình 3.22A).

Pha dung môi chứa pyocyanin được thu nhận và acid hóa bằng HCl 0,2N. Tại đó, pyocyanin được hòa tan trong HCl và tạo ra dung dịch màu hồng, trong khi pyoverdine giữ lại trong pha dung môi. Dichloromethane và chloroform đã loại được pyoverdine khỏi pyocyanin (ống 4, 6 Hình 3.22B), với các dung môi còn lại đã không tách riêng được pyoverdine (ống 1, 2, 3 và 5 Hình 3.22B). Các pha acid

sau khi được trung hòa bằng NaOH 1N đến pH trung tính sẽ hình thành dung dịch chiết chứa pyocyanin màu xanh. Pyocyanin được tách chiết bằng dichloromethane và chloroform cho màu xanh điển hình (ống 4, 6 Hình 3.22C) tương tự như pyocyanin tinh khiết làm đối chứng (ống C Hình 3.22C).

Pyocyanin trong dung dịch chiết với các dung môi khác nhau được định lượng theo phương pháp định lượng pyocyanin ở bước sóng 520 nm và được trình bày trong Bảng 3.5.



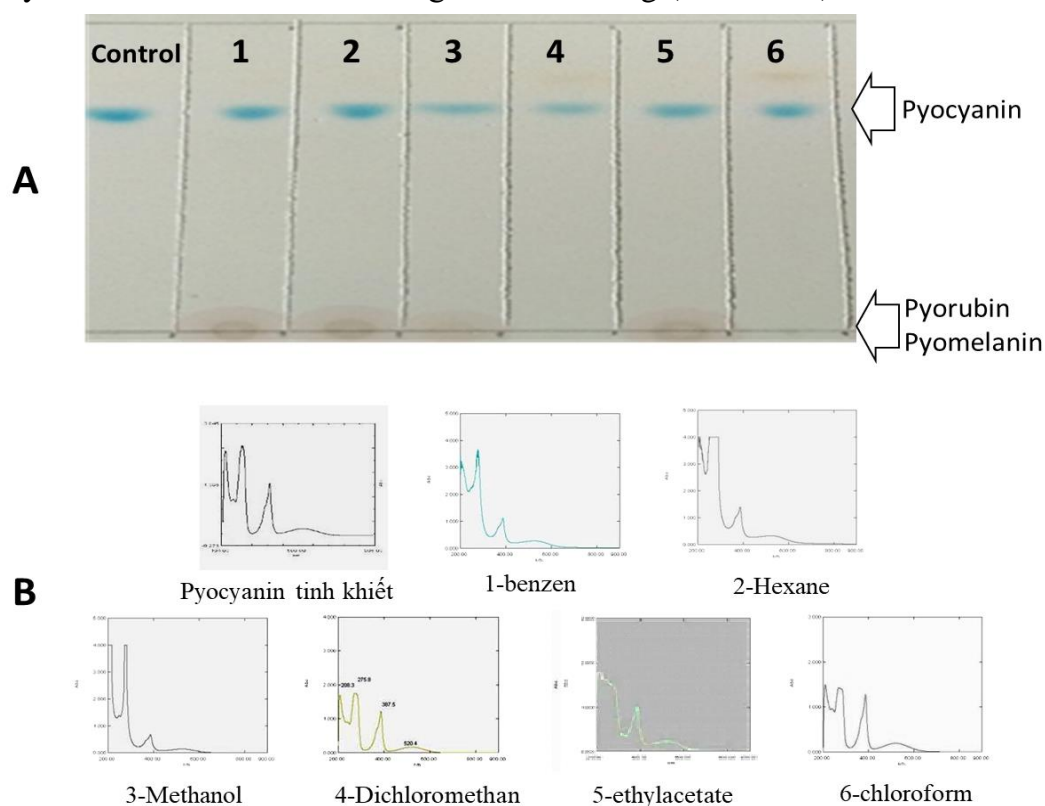
Hình 3.22. Tách chiết pyocyanin từ dịch nuôi cấy vi khuẩn *P. aeruginosa* PS39-phzMS với các dung môi khác nhau. (A) Sử dụng các dung môi khác nhau để phân tách pyocyanin (lớp màu xanh dưới cùng); (B) Acid hóa bằng HCl 0,2N; (C) Trung hòa bằng NaOH 1N. 0: PY0 đối chứng; 1: benzene; 2: hexane; 3: methanol; 4: dichloromethane; 5: ethylacetate; 6: chloroform.

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 dichloromethane 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.

Bảng 3.5. Hiệu suất tách chiết pyocyanin bởi các dung môi khác nhau

TT	Dung môi	Nồng độ pyocyanin ($\mu\text{g/mL}$)
1	Benzene	$10,50 \pm 1,02$
2	Hexane	$11,24 \pm 1,24$
3	Methanol	$12,42 \pm 1,08$
4	Dichloromethane	$20,26 \pm 0,876$
5	Ethylacetate	$4,20 \pm 0,64$
6	Chloroform	$25,27 \pm 1,024$

Pyocyanin được tách chiết từ sáu dung môi khác nhau đã được kiểm tra độ tinh khiết bằng kỹ thuật TLC và phân tích phổ ánh sáng tử ngoại khả kiến UV-Vis, pyocyanin tinh khiết được sử dụng làm đối chứng (Hình 3.23).



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.

Kết quả sắc ký đồ TLC (Hình 3.23A) chỉ ra, các đường chạy 1, 2, 3 và 5 tương ứng với các dung môi được sử dụng để tách chiết pyocyanin benzene, hexane, methanol và ethylacetate, vẫn có các đốm nâu ở chân bản sắc ký, ngược lại, ở các đường chạy 4 và 6 tương ứng với hai dung môi dichlometan và chloroform, không còn thấy vạch nâu ở dưới chân bản sắc ký và giống với đường chạy của mẫu đối chứng. Giá trị Rf của pyocyanin được xác định trên bản sắc ký là 0,72, tương tự như các công bố pyocyanin trước đây [112][113].

Hình ảnh đo phổ tử ngoại khả kiến UV-Vis của các dịch chiết pyocyanin bởi các dung môi khác nhau được thể hiện trên Hình 3.23B và tổng hợp các đỉnh hấp phụ và đỉnh hấp phụ cực đại được thể hiện trong Bảng 3.6. Quan sát hình ảnh phổ UV-Vis của 2 mẫu pyocyanin được tách chiết từ hai dung môi dichlometan và chloroform cho thấy sự tương đồng cao với mẫu pyocyanin đối chứng (Hình 3.23B), đều có đỉnh hấp phụ ở bước sóng 520 nm của sắc tố pyocyanin và đạt đỉnh hấp phụ cực đại 274 nm tương tự pyocyanin đối chứng (Bảng 3.6). Như vậy, 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 dichlormethan và chloroform cho hiệu quả cao đạt độ tinh sạch tương tự pyocyanin đối chứng.

Bảng 3.6. Quang phổ khả kiến của các dịch chiết pyocyanin bằng dung môi khác nhau

TT	Dung môi chiết	Bước sóng hấp phụ 0,2N HCl (nm)	Bước sóng PYO	Bước sóng cao nhất (nm)
1	PYO tinh sạch	220; 280; 380, 520	520	280
2	Benzene	203; 278; 387; 523		278
3	Hexane	206; 251, 387, 521		251
4	Methanol	239; 272, 387; 525		272
5	Dichloromethane	208; 274; 387; 520	520	274
6	Ethylacetate	222; 387; 525		387
7	Chloroform	274; 387; 520	520	274
8	Dịch nuôi vi khuẩn không chiết	224; 387; 521		387

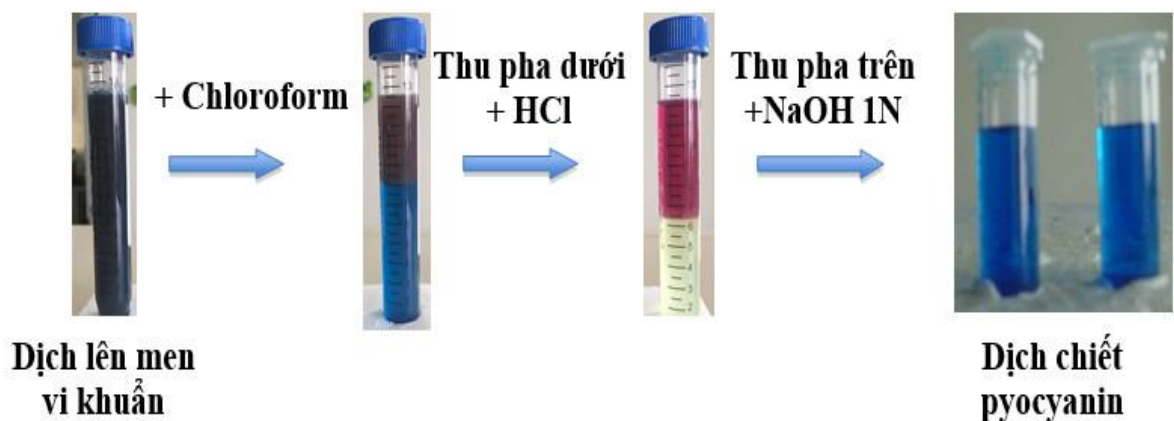
Từ kết quả khảo sát lựa chọn dung môi thích hợp cho tách chiết pyocyanin từ dịch nuôi cấy vi khuẩn, chloroform được sử dụng trong các nghiên cứu tiếp theo và trong xây dựng quy trình tách chiết và làm sạch sản phẩm pyocyanin (Hình 3.24).

Tổng hợp các bước tách chiết pyocyanin từ dịch nuôi vi khuẩn:

- Thu dịch lên men sinh khối khi pyocyanin đạt nồng độ tối đa được xác định theo phương pháp Essar (1990);
- Thêm chloroform theo tỷ lệ 1:1 về thể tích (dịch lên men : chloroform), lắc đều trong 15 phút, sau đó chuyển toàn bộ dung dịch vào phễu chiết, để lắng đến khi dung dịch phân thành 2 lớp;
- Thu pha dung môi chloroform màu xanh chứa pyocyanin; Loại bỏ xác tế bào và dung dịch sau nuôi cấy;
- Thêm chlorohydric acid 0,2N theo tỉ lệ thể tích 1:1, lắc đều đến khi lớp dung dịch phía trên có màu đỏ chứa pyocyanin và lớp dung dịch bên dưới không còn màu xanh (nếu pha dưới còn màu xanh thì thêm HCl lắc tiếp, đến khi dung dịch hết màu xanh). Loại pha dưới chloroform không còn chứa pyocyanin. Thu pha acid màu đỏ và trung hòa bằng NaOH 1M đến pH trung tính; Lọc dung dịch qua giấy lọc để thu được dung dịch

pyocyanin trong suốt màu xanh;

- Bổ sung chloroform theo tỷ lệ 1:1 (thể tích) và cô đặc dung dịch bằng máy cô quay chân không ở 80°C (Rotodex) đến thể tích nhỏ nhất;
- Bổ sung hexane theo tỷ lệ 5:1 (thể tích) (không hòa tan pyocyanin), để 4-8°C trong 4 giờ, sau đó -20°C trong 24 giờ;
- Lọc thu phần tủa bột và làm khô trong chân không, thu được pyocyanin dạng bột màu xanh;
- Định lượng (theo phương pháp Essar) và kiểm nghiệm sản phẩm pyocyanin thu được bằng các phương pháp HPLC; MIC và MBC.



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

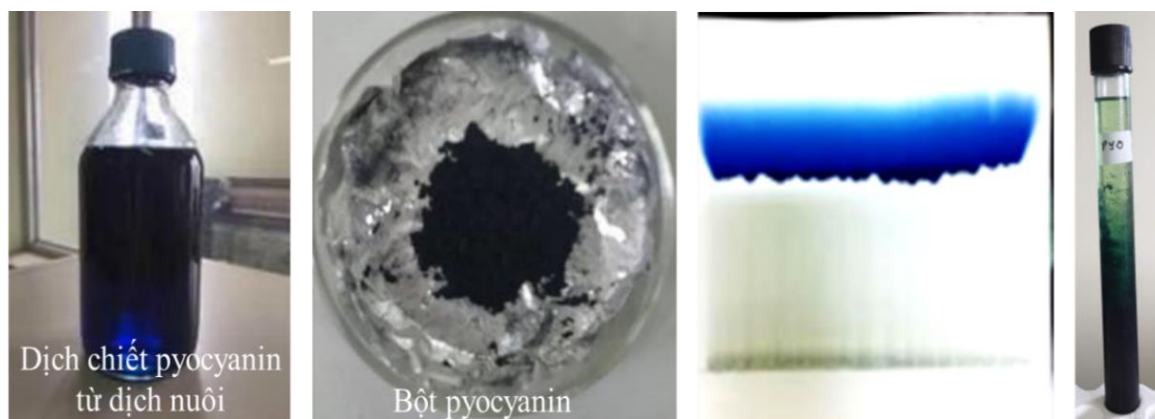
3.3.3. Đánh giá độ sạch của pyocyanin

Chế phẩm dạng bột pyocyanin thu được từ chủng *P. aeruginosa* PS39-phzMS được phân tích các đặc điểm hóa, lý và đánh giá chất lượng bằng các kỹ thuật như phổ UV-Vis, sắc ký bản mỏng, sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) và khối phổ phân giải cao.

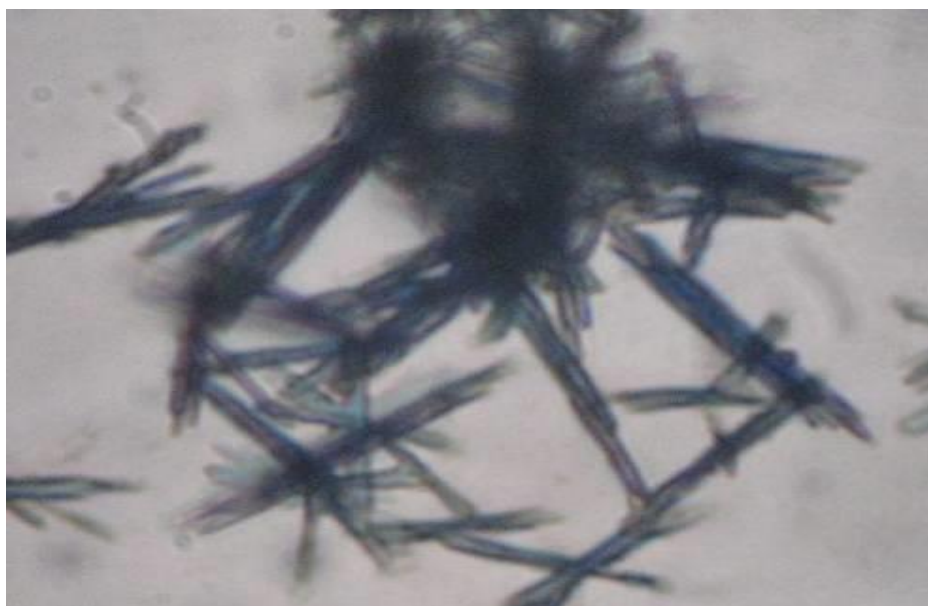
Phân tích phổ UV-Vis của pyocyanin trong dung dịch HCl cho thấy pyocyanin được chiết bằng dichlometan và chloroform có phổ tương tự như pyocyanin tinh khiết. Pyocyanin tinh khiết và pyocyanin được chiết bằng dichlometan và chloroform đều có đỉnh hấp phụ ở bước sóng 520 nm được sử dụng để định lượng pyocyanin (Hình 3.23). Đỉnh cao nhất trong phổ của pyocyanin được chiết xuất bằng chloroform là 274 nm. Bước sóng hấp thụ này thuộc phạm vi của pyocyanin mà được thấy trong nhiều công bố trước đây [113].

Hình ảnh sản phẩm pyocyanin được tách chiết dưới dạng dung dịch và dạng bột được thể hiện tại Hình 3.25. Bột sau khi thu được làm sạch bằng sắc ký bản mỏng sau đó kết tủa trong n-Hexane. Thu tủa pyocyanin và làm khô trong chân

không đến khối lượng không đổi. Chất lượng pyocyanin được đánh giá về hàm lượng, độ tinh sạch bằng kỹ thuật HPLC và khối lượng phân tử của hoạt chất thu được. Pyocyanin dạng tinh thể được quan sát dưới kính hiển vi điện tử và thể hiện tại Hình 3.26.

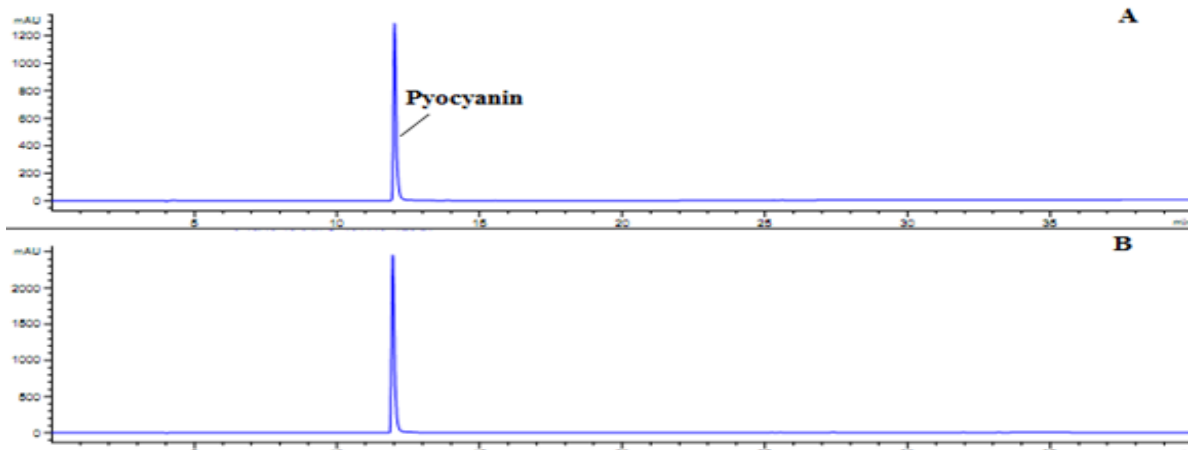


Hình 3.25. Hình ảnh pyocyanin sau quá trình tách chiết và làm sạch. Thứ tự từ trái sang: Dịch chiết pyocyanin từ dịch nuôi, bột pyocyanin, bản sắc ký bản mỏng pyocyanin, ống kết tủa pyocyanin trong n-Hexan.

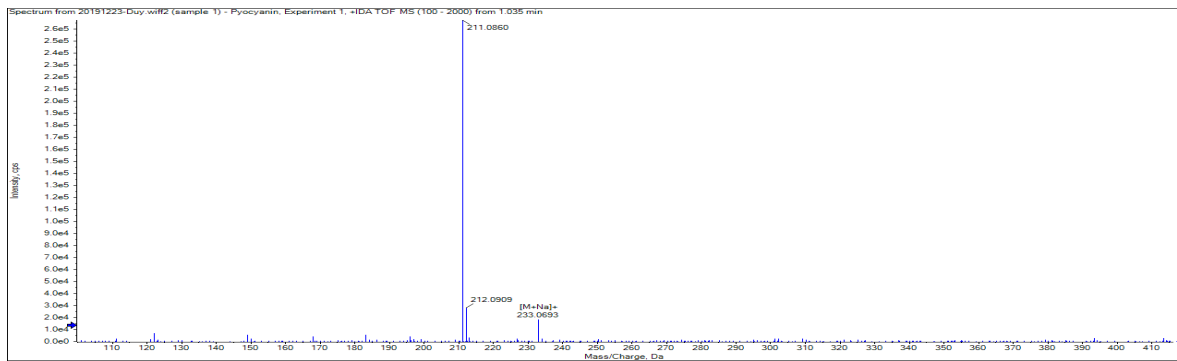


Hình 3.26. Tinh thể pyocyanin thu nhận được sau khi tinh sạch

Hàm lượng và độ sạch của pyocyanin được xác định bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC, Agilent 1260 series single quadrupole LC/MS system) với phương trình đường chuẩn $y = 91,185x - 100,638$ và hệ số tương quan $R^2 = 0,9999$, chỉ ra hàm lượng pyocyanin trong mẫu dạng dung dịch đạt 278,97 $\mu\text{g/mL}$; trong mẫu dạng bột đạt 951,27 mg/g (chiếm 95,13%) và tinh thể có độ tinh khiết đạt 97% (Hình 3.27, Phụ lục 11).



Hình 3.27. Sắc ký đồ sắc ký lỏng hiệu năng cao mẫu tách chiết pyocyanin từ *Pseudomonas aeruginosa* PS39-phzMS. Bước sóng hấp phụ 280 nm; A: Chất tham chiếu pyocyanin chuẩn; B: Mẫu pyocyanin tách chiết từ dịch nuôi cấy vi khuẩn.



Hình 3.28. Khối phổ phân giải cao (HRMS) của pyocyanin tách chiết từ dịch nuôi cấy *Pseudomonas aeruginosa* PS39-phzMS

Thêm nữa, kết quả phân tích phổ khối lượng phân giải cao HRMS (Hình 3.28) 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. Pyocyanin từ chủng tái tổ hợp có các đặc tính giống như pyocyanin của các nghiên cứu tham khảo.

3.4. Đặc tính kháng khuẩn của pyocyanin

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

Nhằm nghiên cứu phổ kháng khuẩn, dịch chiết pyocyanin thu được từ chủng *P. aeruginosa* PS39-phzMS được kiểm tra hoạt tính ức chế trên các vi sinh vật kiểm định (VSVKĐ). Kết quả được trình bày ở Bảng 3.7 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 $6,25 \mu\text{g/mL}$. Có thể thấy rằng, pyocyanin thể hiện tính kháng khuẩn phổ rộng trên nhiều dạng vi sinh vật khác nhau (Bảng 3.7, Phụ lục 12).

Bảng 3.7. Nồng độ ức chế tối thiểu của pyocyanin và các kháng sinh đối với vi sinh vật kiểm định

Nồng độ ($\mu\text{g/mL}$)	Gram (+) ^a			Gram (-) ^b			Nấm men
	<i>E. faecalis</i> ATCC299212	<i>S. aureus</i> ATCC25923	<i>B. cereus</i> ATCC13245	<i>E. coli</i> ATCC25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	<i>S. enterica</i> ATCC13076	<i>C. albicans</i> ATCC10231
Pyocyanin	25	25	25	25	25	25	6,25
Streptomycin	256	256	128	32	256	128	-
Tetracycline	4	16	64	8	256	256	-
Kanamycin	128	4	8	128	64	16	-
Nystatin	-	-	-	-	-	-	8
Cycloheximide	-	-	-	-	-	-	32

* Ghi chú: Gram (+)^a: *E. faecalis* ATCC299212, *S. aureus* ATCC25923, *B. cereus* ATCC 13245. Gram (-)^b: *E. coli* ATCC25922, *P. aeruginosa* ATCC27853, *S. enterica* ATCC13076. Dấu -: không thực hiện phản ứng

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

3.4.2.1. Đánh giá nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của pyocyanin với các chủng *Vibrio spp.*

Hoạt tính đối kháng của pyocyanin lên các chủng vi khuẩn *Vibrio spp.*, kháng kháng sinh gây bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm thẻ chân trắng và bệnh khác ở tôm đã được kiểm tra trên 5 chủng vi khuẩn đại diện bao gồm *V. parahaemolyticus* (VpKG12T1, VpST22T, VpCMT31) và *V. harveyi* (Vh3) và *V. alginolyticus* (Val) để đánh giá khả năng ức chế tối thiểu của dịch chiết pyocyanin đối với các chủng vi khuẩn này.

Bảng 3.8. Nồng độ ức chế tối thiểu, MIC ($\mu\text{g/mL}$), của pyocyanin đối với các chủng *Vibrio spp.*

	VpKG12T1	VpST22T	VpCMT31	Vh3	Val
Pyocyanin ($\mu\text{g/mL}$)	12,5	12,5	12,5	17,5	17,5

* Ghi chú: VpKG12T1: *V. parahaemolyticus* VpKG12T1; VpST22T: *V. parahaemolyticus* VpST22T; VpCMT31: *V. parahaemolyticus* VpCMT31; Vh3: *V. harveyi* Vh3; Val: *V. alginolyticus*

Từ kết quả trên Bảng 3.8 cho thấy, ba chủng VpKG12T1, VpST22T và VpCMT31 bị ức chế sinh trưởng hoàn toàn ở nồng độ tối thiểu ở 12,5 $\mu\text{g/mL}$, hai chủng còn lại gồm Vh3 và Val bị ức chế ở nồng độ 17,5 $\mu\text{g/mL}$.

3.4.2.2. Đánh giá nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) của pyocyanin với các chủng *Vibrio* spp.

Các chủng *Vibrio* spp. sau 24 giờ được nuôi cấy trong môi trường lỏng APW có bổ sung pyocyanin ở các nồng độ khác nhau từ 4 đến 50 $\mu\text{g/mL}$, kết quả quan sát độ đục cho thấy, tất cả 5 chủng *Vibrio* đều sinh trưởng được đến nồng độ 12 $\mu\text{g/mL}$, riêng 2 chủng Val và Vh3 sinh trưởng được đến nồng độ dịch chiết pyocyanin cao hơn là 15 $\mu\text{g/mL}$. Ở các nồng độ cao hơn, không quan sát thấy độ đục của dịch nuôi cấy của tất cả các vi khuẩn khảo sát (Bảng 3.9). Kiểm tra sự sinh trưởng của các chủng vi khuẩn bằng cách cấy trang dịch nuôi cấy từ tất cả các ống này lên đĩa thạch TCBS, kết quả được tổng hợp tại Bảng 3.10.

Bảng 3.9. Sự sinh trưởng của các chủng *Vibrio* spp. trong môi trường APW bổ sung pyocyanin

<i>Vibrio</i> spp. 1-2.10 ⁵ CFU/mL	Nồng độ pyocyanin ($\mu\text{g/mL}$)									
	4	8	12	15	20	25	30	35	40	50
Vh3	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Val	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
VpKG12T1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
VpST22T	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
VpCMT31	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

* Ghi chú: (+) sinh trưởng; (-) không sinh trưởng; VpKG12T1: *V. parahaemolyticus* VpKG12T1; VpST22T: *V. parahaemolyticus* VpST22T; VpCMT31: *V. parahaemolyticus* VpCMT31; Vh3: *V. harveyi* Vh3; Val: *V. alginolyticus*

Bảng 3.10. Sự sinh trưởng của các chủng *Vibrio* spp. trên môi trường thạch TCBS

<i>Vibrios</i> spp. 1-2.10 ⁵ CFU/mL	Nồng độ pyocyanin ($\mu\text{g/mL}$)									
	4	8	12	15	20	25	30	35	40	50
Vh3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Val	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
VpKG12T1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
VpST22T	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
VpCMT31	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

* Ghi chú: (+) sinh trưởng; (-) không sinh trưởng; VpKG12T1: *V. parahaemolyticus* VpKG12T1; VpST22T: *V. parahaemolyticus* VpST22T; VpCMT31: *V. parahaemolyticus* VpCMT31; Vh3: *V. harveyi* Vh3; Val: *V. alginolyticus*

Kết quả tại Bảng 3.10 cho thấy, ở nồng độ pyocyanin 20 $\mu\text{g/mL}$, không xuất hiện khuẩn lạc của ba chủng vi khuẩn VpCMT31, VpKG12T1 và VpST22T sinh trưởng trên đĩa thạch TCBS, có nghĩa là các chủng vi khuẩn này bị ức chế hoàn toàn ở nồng độ này. Đối với 2 chủng Vh3 và Val, không có khuẩn lạc trên đĩa thạch TCBS ở nồng độ pyocyanin 25 $\mu\text{g/mL}$, có nghĩa là 2 chủng vi khuẩn này bị ức chế hoàn

toàn ở nồng độ pyocyanin 25 µg/mL. Như vậy, có thể khẳng định giá trị diệt khuẩn tối thiểu MBC đến 99,9% của dịch chiết pyocyanin đối với chủng VpCMT31, VpKG12T1 và VpST22T là 20 µg/mL; và đối với chủng Vh3 và Val là 25µg/mL.

3.4.2.3. *Đánh giá khả năng kháng các chủng Vibrio spp. gây bệnh trên tôm bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch*

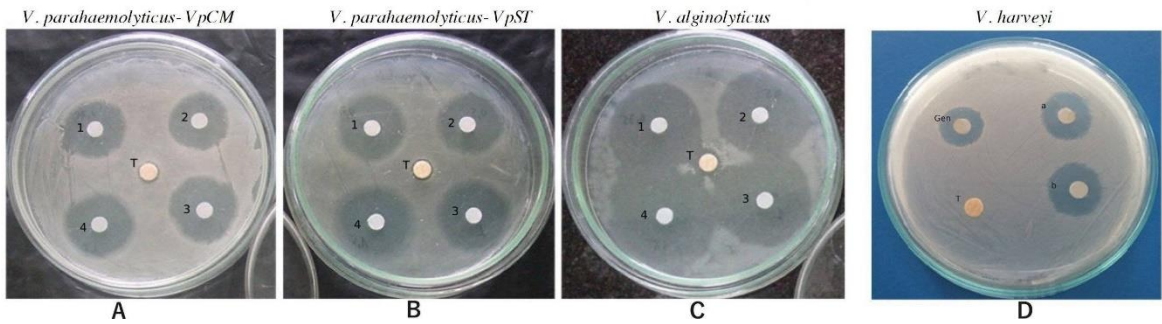
Hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết pyocyanin cũng được đánh giá dựa vào khả năng ức chế sự sinh trưởng của các chủng *Vibrio spp.* theo phương pháp khuếch tán đĩa thạch Kirby-Bauer.

Bảng 3.11. Khả năng kháng các chủng *Vibrio spp.* gây bệnh trên tôm của pyocyanin

pyocyanin (µg/khoanh giấy)	Đường kính vùng ức chế (mm) của các chủng <i>Vibrio spp.</i>				
	VpCMT31	VpST22T	VpKG12T1	Vh3	Val
26	26,0±0,06	28,0±0,06	26,2±0,07	25,3±0,05	31,7±0,12
13	23,3±0,03	25,2±0,05	22,2±0,05	23,6±0,05	28,5±0,07
6,5	21,6±0,05	22,3±0,04	21,7±0,05	22,1±0,05	27,0±0,07
3,25	19,2±0,05	20,6±0,03	18,2±0,05	18,2±0,05	25,4±0,07
1,625	17,9±0,05	19,1±0,05	17,2±0,05	16,3±0,05	18,3±0,06
0,8125	15,0±0,05	16,3±0,05	14,2±0,05	13,7±0,05	15,6±0,05
0,4062	14,0±0,05	12,2±0,05	11,7±0,05	9,9±0,05	14,2±0,05
0,2031	5,7±0,03	0,0	0,0	0,0	6,0±0,01
Gen (10)	9,0±0,02	9,0±0,01	11±0,05	6,0±0,01	7,0±0,01

* Ghi chú: VpKG12T1: *V. parahaemolyticus* VpKG12T1; VpST22T: *V. parahaemolyticus* VpST22T; VpCMT31: *V. parahaemolyticus* VpCMT31; Vh3: *V. harveyi* Vh3; Val: *V. alginolyticus*.

Kết quả nhận được (Bảng 3.11) cho thấy, ở nồng độ pyocyanin dưới 6,5 µg/khoanh giấy (đường kính 6 mm), đường kính vùng kháng khuẩn đa số đều ≤ 20 mm, trong giải nồng độ từ 6,5 – 13 µg/khoanh giấy không có sự khác biệt nhiều trên một chủng, nhưng từ nồng độ 26 µg/khoanh giấy đường kính vùng kháng khuẩn tăng lên rõ rệt và đạt khoảng 25 – 32 mm, trong khi ở kháng sinh đối chứng gentamycin (Gen) 10 µg/khoanh giấy đường kính vùng kháng khuẩn rất nhỏ dao động từ 6-11 mm. Như vậy pyocyanin có khả năng ức chế mạnh các chủng *Vibrio spp.* trong đó có các chủng *V. parahaemolyticus* VpKG12T1, VpST22T, VpCMT31 là các chủng gây bệnh trên tôm. Trong tất cả các thí nghiệm ở nồng độ tetracycline (T) 10 µg/khoanh giấy (đường kính 6 mm) các chủng *Vibrio spp.* đều sinh trưởng bình thường, không phát hiện thấy vòng kháng khuẩn xung quanh khoanh giấy do các chủng này đã kháng lại kháng sinh tetracycline (Hình 3.29).



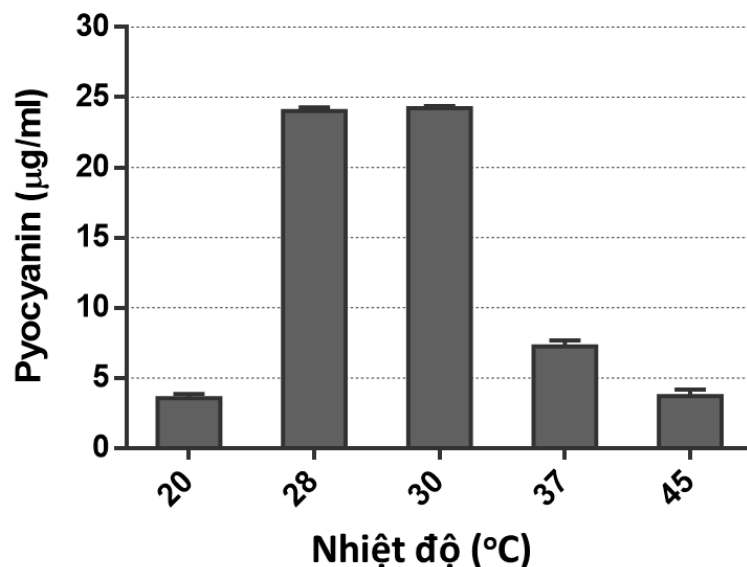
Hình 3.29. Minh họa khả năng kháng của pyocyanin với các chủng *Vibrio* spp. gây bệnh trên tôm: *V. parahaemolyticus* VpCMT3 (A), *V. parahaemolyticus* VpST22T (B), *V. alginolyticus* Val (C) và *V. harveyi* Vh3 (D). T – Tetracycline; Gen – Gentamycin; a, b, 1,2,3 và 4 – tương ứng các nồng độ của pyocyanin 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

Các điều kiện nuôi cấy vi khuẩn có thể ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp hoạt chất của chủng vi sinh vật. Đối với chủng vi khuẩn *P. aeruginosa* PS39-phzMS, các yếu tố hóa lý và thành phần môi trường nuôi cấy được khảo sát để kiểm tra khả năng sinh tổng hợp pyocyanin (Phụ lục 14).

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

3.5.1.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy

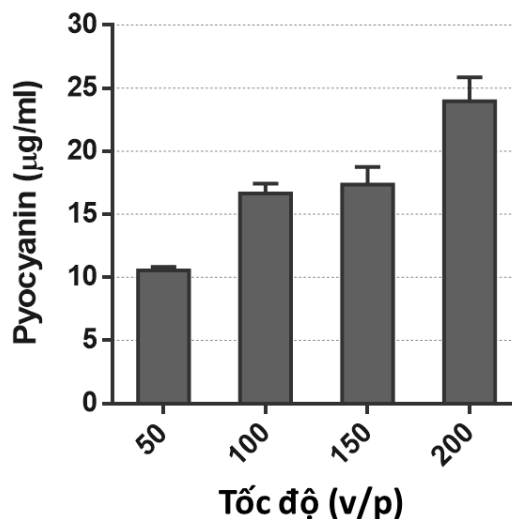


Hình 3.30. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh tổng hợp pyocyanin ở chủng *P. aeruginosa* PS39-phzMS. Nồng độ pyocyanin được thể hiện bằng biểu đồ cột với giá trị trung bình và độ lệch chuẩn.

Ảnh hưởng của nhiệt độ được xác định bằng cách nuôi cấy chủng tái tổ hợp ở giải nhiệt độ khác nhau từ 20°C, 28°C, 30°C, 37°C và 45°C. Trong đó, nhiệt độ tối ưu để sinh tổng hợp pyocyanin có hàm lượng cao là khoảng 28 - 30°C. Nồng độ pyocyanin do *P. aeruginosa* PS39-phzMS tạo ra ở nhiệt độ tối ưu là khoảng 24 µg/mL và có sự khác biệt không đáng kể giữa 28°C và 30°C (t-test_{28 vs 30}: $p=0,3005$). Sự gia tăng nhiệt độ làm giảm nồng độ pyocyanin, khi nhiệt độ đạt 45°C pyocyanin giảm xuống $3,7 \pm 0,43$ µg/mL (Hình 3.30). Kết quả nhận được cho thấy, ở khoảng 28 - 30°C là nhiệt độ thích hợp cho sinh tổng hợp pyocyanin ở chủng PS39-phzMS.

3.5.1.2. Ảnh hưởng của tốc độ lắc

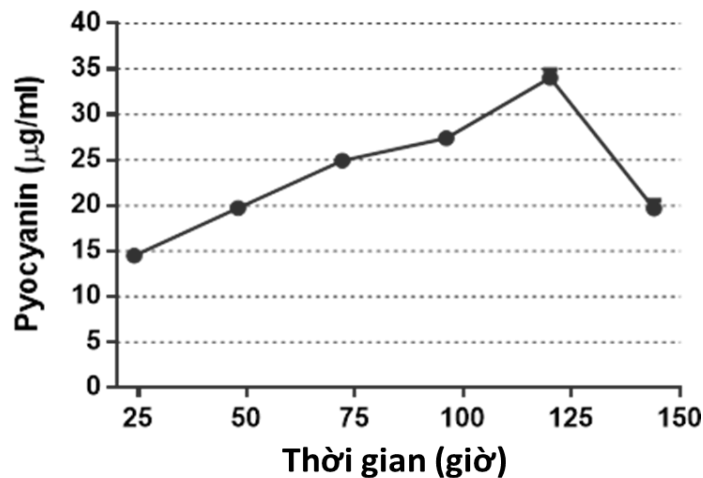
Trong quá trình lên men, nồng độ oxy là yếu tố quan trọng đối với sự phát triển của vi khuẩn cũng như sản xuất các chất chuyển hóa thứ cấp. Kế thừa kết quả xác định nhiệt độ tối ưu, các thử nghiệm về tốc độ lắc được thực hiện ở 30°C và với các tốc độ lắc khác nhau 50, 100, 150 và 200 vòng/phút, kết quả được minh họa trong Hình 3.31. Hàm lượng pyocyanin thu nhận tăng dần theo tốc độ lắc và đạt cao nhất $23,97 \pm 1,89$ µg/mL sau 72 giờ nuôi cấy ở 200 vòng/phút. Kết quả cho thấy, nồng độ pyocyanin tăng tỷ lệ thuận với tốc độ lắc và chủng PS39-phzMS được nuôi cấy ở 200 vòng/phút là tốc độ tối ưu và phù hợp với điều kiện phạm vi thí nghiệm. Điều này cho thấy oxy có vai trò rất quan trọng trong việc sinh tổng hợp pyocyanin ở vi khuẩn *P. aeruginosa*.



Hình 3.31. Ảnh hưởng của tốc độ lắc đến quá trình sinh tổng hợp pyocyanin ở chủng *P. aeruginosa* PS39-phzMS. Nồng độ pyocyanin được thể hiện bằng giá trị trung bình và độ lệch chuẩn.

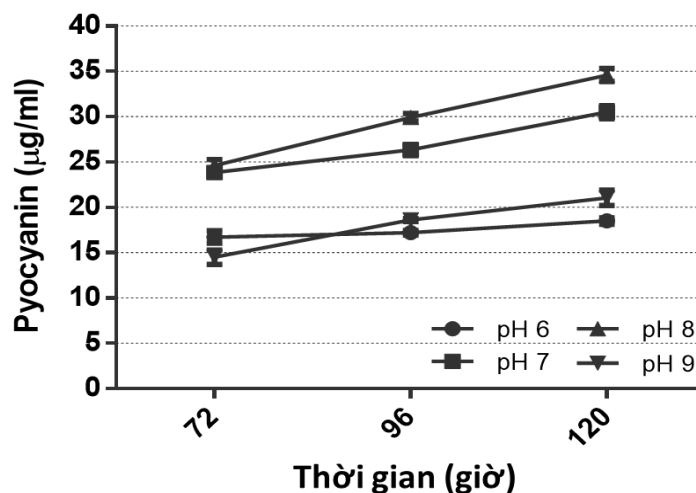
3.5.1.3. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy

P. aeruginosa PS39-phzMS được nuôi cấy trong môi trường KingA với các điều kiện tối ưu đã xác định ở trên. Dịch nuôi cấy được thu thập sau mỗi khoảng thời gian 24 giờ để xác định hàm lượng pyocyanin được tiết ra môi trường. Kết quả nhận được chỉ ra, nồng độ pyocyanin tăng lên theo thời gian và đạt cực đại sau 120 giờ nuôi cấy, với hàm lượng pyocyanin đạt đỉnh $34,04 \pm 0,87 \mu\text{g/mL}$ và giảm nhanh sau đó (144 giờ nuôi cấy) (Hình 3.32). Như vậy, thời gian nuôi cấy thích hợp cho sản sinh pyocyanin ở chủng *P. aeruginosa* PS39-phzMS trong điều kiện thí nghiệm là 120 giờ (hay 5 ngày).



Hình 3.32. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến sinh tổng hợp pyocyanin ở chủng *P. aeruginosa* PS39-phzMS. Nồng độ pyocyanin được hiển thị bằng giá trị trung bình và độ lệch chuẩn.

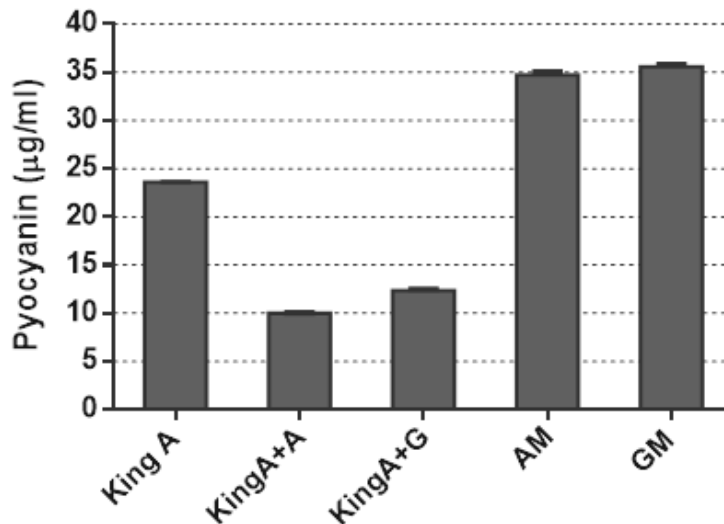
3.5.1.4. Ảnh hưởng của pH



Hình 3.33. Ảnh hưởng của pH đến sinh tổng hợp pyocyanin bởi *P. aeruginosa* PS39-phzMS. Nồng độ pyocyanin được hiển thị bằng giá trị trung bình và độ lệch chuẩn, ANOVA: $p < 0,0001$.

Ảnh hưởng của pH được xác định bằng cách nuôi cấy *P. aeruginosa* PS39-phzMS trên môi trường được điều chỉnh đến các pH khác nhau (6, 7, 8 và 9), được cấy với 10% giống, ở 30°C và 200 vòng/phút theo kết quả của các thí nghiệm trước về nhiệt độ và tốc độ lắc. Nồng độ pyocyanin ở pH 6, 9 không cho thấy sự khác biệt đáng kể sau 72 giờ cho đến 120 giờ, đạt tương ứng từ $16,73 \pm 0,68$ đến $18,5 \pm 0,34$ $\mu\text{g/mL}$ và $14,51 \pm 0,78$ đến $21,06 \pm 0,85$ $\mu\text{g/mL}$. Sự sinh tổng hợp pyocyanin cao nhất đạt $34,60 \pm 0,71$ $\mu\text{g/mL}$ được quan sát thấy ở pH 8 sau 120 giờ nuôi cấy (Hình 3.33). Kết quả nhận được chỉ ra, nồng độ pyocyanin đạt cao nhất sau 120 giờ và ở pH 8 là $34,60 \pm 0,71$ $\mu\text{g/mL}$. Ở môi trường pH 6 hoặc pH 9, nồng độ pyocyanin của chủng *P. aeruginosa* PS39-phzMS bị ảnh hưởng mạnh, có giá trị thấp nhất sau 120 giờ nuôi cấy. Với pH môi trường là 7, nồng độ pyocyanin có sự thay đổi nhưng chưa đạt cao nhất.

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

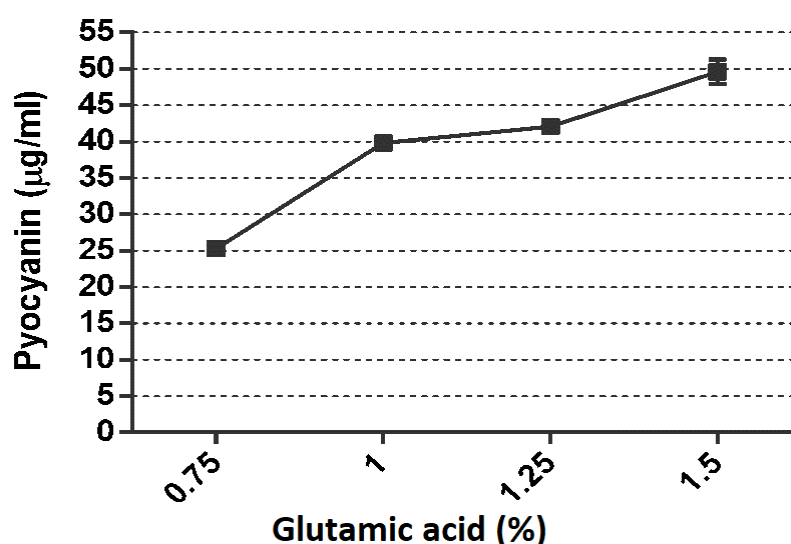


Hình 3.34. Ảnh hưởng của các thành phần môi trường đến sinh tổng hợp pyocyanin ở chủng *P. aeruginosa* PS39-phzMS. KingA: Môi trường KingA; KingA+A: KingA + Alanine; KingA+G: KingA + Glutamic acid; AM: KingA + Alanine không có peptone; GM: KingA + Glutamic acid không có peptone. Nồng độ pyocyanin được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

Năm môi trường khác nhau được tạo nên dựa vào môi trường kinh điển KingA, đã được sử dụng cho nuôi cấy chủng *P. aeruginosa* PS39-phzMS nhằm kiểm tra khả năng sinh tổng hợp pyocyanin. Các điều kiện nuôi cấy được kế thừa từ các thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy đến khả năng sinh 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.

Alanin và glutamic acid đều thích hợp cho sinh tổng hợp pyocyanin, tuy nhiên, với glutamic acid hàm lượng pyocyanin được sinh tổng hợp cao hơn (t-test, $p = 0,0277$) và được chọn cho các bước tiếp theo của quá trình tối ưu. Glutamic acid được bổ sung ở các mức 0,75%, 1%, 1,25% và 1,5% (tương đương 7,5; 10; 12,5 và 15 g/L) dùng khảo sát để nghiên cứu ảnh hưởng đối với sản sinh pyocyanin bởi *P. aeruginosa* PS39-phzMS. 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 $49,57 \pm 1,71 \mu\text{g}/\text{mL}$ (Hình 3.35). Thành phần của môi trường sinh pyocyanin phù hợp với *P. aeruginosa* PS39-phzMS là K_2SO_4 10 g/L; $\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 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.



Hình 3.35. Ảnh hưởng của nồng độ glutamic acid đến sinh tổng hợp pyocyanin ở chủng *P. aeruginosa* PS39-phzMS. Nồng độ pyocyanin được hiển thị bằng giá trị trung bình và độ lệch chuẩn, phân tích one-way ANOVA sử dụng phần mềm GraphPad Prism 6.01 với $p < 0,0001$.

Như vậy nghiên cứu trên cho thấy điều kiện tối ưu của chủng vi khuẩn *P. aeruginosa* PS39-phzMS mang plasmid tái tổ hợp chứa hai gen *phzM*, *phzS* đã sản sinh pyocyanin với hiệu quả cao nhất là: pH 8, nhiệt độ 30°C, tốc độ lắc 200 vòng/phút; thời gian 120 giờ trong môi trường KingA được thay thế peptone bởi 1,5% glutamic acid.

CHƯƠNG 4. THẢO LUẬN

4.1. *P. aeruginosa* PS39 sinh pyocyanin và khả năng kháng khuẩn

Vi khuẩn sinh pyocyanin được tìm thấy từ nhiều nguồn sinh thái khác nhau, các vi khuẩn này có các đại diện được phân lập từ nguồn đất, nước và nước biển, các mẫu bệnh phẩm ... [48][46][114]. Với định hướng tìm kiếm, sàng lọc chủng vi khuẩn có khả năng sinh pyocyanin để phục vụ trong công nghiệp nuôi trồng thủy hải sản, mẫu nước đầm nuôi tôm đã được sử dụng làm nguồn nguyên liệu cho quá trình phân lập và tuyển chọn chủng.

P. aeruginosa được cho là nhóm vi khuẩn đặc trưng cho khả năng sinh tổng hợp pyocyanin. Pyocyanin được tổng hợp bởi 90-95% các chủng *P. aeruginosa* phân lập [115]. Tương tự, kết quả thu được từ nghiên cứu này cho thấy cả 9 chủng vi khuẩn phân lập đều sinh sắc tố xanh đặc trưng của pyocyanin (Hình 3.1) đều thuộc chi *Pseudomonas* và được khẳng định thông qua kết quả khuếch đại đoạn gen PA (Hình 3.2) đặc trưng cho loài *P. aeruginosa*.

Các chủng vi khuẩn được phân lập từ nghiên cứu này cho thấy chúng đều có khả năng sinh pyocyanin trên môi trường KingA với các mức độ khác nhau. Môi trường KingA [87] chứa thành phần chính gồm peptone, MgCl₂, K₂SO₄ là môi trường cơ bản được sử dụng để sàng lọc và thay đổi nhằm tăng cường sự sinh tổng hợp pyocyanin cũng như hạn chế sự hình thành của các loại sắc tố khác. Môi trường KingA là môi trường King đã được bổ sung glycerol, để tối ưu sinh tổng hợp pyocyanin bởi nhiều nghiên cứu trước đây khi so sánh với các môi trường dinh dưỡng khác [46]. Chủng PS39 có khả năng sinh pyocyanin cao nhất trong số 9 chủng vi khuẩn phân lập sinh pyocyanin, có các đặc điểm sinh hóa giống với đặc điểm sinh hóa của chủng chuẩn *P. aeruginosa* ATCC27853 từ bộ sưu tập chủng giống của Mỹ ATCC (Bảng 3.2). Kết hợp các đặc điểm về hình thái khuẩn lạc, tế bào, đặc điểm sinh hóa và trình tự gen đặc trưng loài, gen 16S rRNA, chủng vi khuẩn phân lập PS39 được định danh *P. aeruginosa* PS39. Chủng gốc PS39 trong thí nghiệm này sinh pyocyanin cao hơn so với các chủng phân lập khác được chỉ ra trong quá trình sàng lọc các chủng phân lập (15,02±0,56 mg/L, kết quả được trình bày tại mục 3.1.3). Trong nghiên cứu này, sự thay đổi thành phần môi trường KingA trong sàng lọc các dòng tái tổ hợp, bằng cách thay thế peptone bởi glutamic acid đã làm tăng cường sự sản sinh pyocyanin ở các dòng tái tổ hợp.

Trình tự gen 16S rRNA của chủng vi khuẩn PS39 có độ tương đồng cao 100% với một số chủng *P. aeruginosa* khác được phân lập từ mẫu nước biển hoặc nước lợ như chủng *P. aeruginosa* MCCB117 được phân lập từ nước biển của Ấn Độ và chủng *P. aeruginosa* MCCB102 có nguồn gốc từ nước lợ của Ấn Độ. Đây là

các mẫu được các nhà khoa học Ấn Độ dùng để nghiên cứu thu nhận pyocyanin có khả năng ức chế vi khuẩn *Vibrio* spp. gây bệnh ở tôm sú [51]. *P. aeruginosa* là vi khuẩn Gram âm phổ biến ở môi trường trên cạn và cả dưới nước, là đại diện chính của chi *Pseudomonas* phát huỳnh quang, là chi *Pseudomonas* đa dạng nhất với hơn 140 loài, các loài này thường xuyên được phân loại lại do tính đa dạng sinh học của chúng [116]. Tính linh hoạt trong trao đổi chất của *P. aeruginosa* tạo cho loài vi khuẩn này có sức đề kháng cao và khả năng chịu được các điều kiện bất lợi, và chúng có thể phục hồi trong các môi trường khắc nghiệt khác nhau [117]. Các loài *Pseudomonas* biểu hiện các kiểu hình khác nhau nhờ sản sinh các yếu tố như alginate, chất kết dính, neuraminidases, lipopolysaccharide, exotoxin A, enterotoxin, exoenzyme S, phospholipase C, elastase, leukocycline và các sắc tố [118]. *P. aeruginosa* có thể tổng hợp ít nhất sáu loại sắc tố khác nhau: fluorescein, pyoverdine, pyomelanin, aeruginosin A, aeruginosin B và pyocyanin [119]. Ba chất màu cuối cùng được liệt kê vào nhóm phenazine [115]. Trong đó, pyocyanin là sắc tố quan trọng trong các loại phenazine tự nhiên đã được mô tả, các hợp chất này cũng có thể được tổng hợp bởi một số ít loài vi khuẩn và cổ khuẩn [115].

Ngoài ra, nhờ sự đa dạng kiểu hình và tính linh hoạt trong trao đổi chất mà loài vi khuẩn này có khả năng sử dụng hơn 90 loại phân tử làm nguồn cacbon và năng lượng [120]. Khuẩn lạc *P. aeruginosa* có đường kính trung bình từ 0,8 đến 2,2 μm và có màu xanh lục do sự tổng hợp của hai sắc tố chính được tạo ra là màu xanh lam (pyocyanin) và màu vàng (fluorescein). Khuẩn lạc của chủng *P. aeruginosa* PS39 có kích thước và màu xanh lục đặc trưng (Hình 3.3), là chủng có thể sản sinh cả 2 loại sắc tố là pyocyanin và fluorescein. Việc sinh các sắc tố, đặc biệt là pyocyanin, có thể được xem như tăng cường sự biểu hiện của các yếu tố độc lực của *P. aeruginosa*. Ngoài ra, sự sản sinh các phenazine giúp *P. aeruginosa* tăng khả năng thích nghi trong bất kỳ môi trường sống nào mà chúng sinh trưởng. Điều này giúp chúng tồn tại, duy trì tốt hơn trong môi trường sống [121]. *P. aeruginosa* có thể phát triển trong môi trường tự dưỡng nhưng tạo ra ít pyocyanin hơn khi được tiếp xúc với nước, với môi trường (Gonçalves & Vasconcelos, 2021)[115].

Hiện nay có rất ít công bố về khả năng kháng lại vi khuẩn *Vibrio* gây bệnh trên các đối tượng thủy sản, đặc biệt *Vibrio* spp. gây bệnh trên tôm của pyocyanin. Do đó khả năng ức chế và diệt *Vibrio* gây bệnh tôm của pyocyanin sinh ra bởi chủng *P. aeruginosa* PS39 trong nghiên cứu này đã cung cấp thêm thông tin về ứng dụng của pyocyanin trong ngăn ngừa bệnh nhiễm khuẩn *Vibrio* trong nuôi tôm nước lợ. Kết quả này được củng cố hơn khi có một số nghiên cứu khác đều công bố các kết quả tương đồng về khả năng kháng khuẩn của pyocyanin từ *Pseudomonas*. Có

thể kể đến tác giả Priyaja và cộng sự (2012) đã công bố tính kháng của pyocyanin thu được từ vi khuẩn *Pseudomonas* phân lập từ môi trường nước lợ đối với 7 loài *Vibrio* bao gồm *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. mediterrani* và *V. nereis* với đường kính vòng kháng khuẩn từ 13,5 đến 31,0 mm. Tác giả cũng chỉ ra khả năng sinh pyocyanin của các chủng *P. aeruginosa* phụ thuộc vào độ mặn của môi trường nuôi cấy, lượng pyocyanin cao nhất được sinh tổng hợp trong môi trường có độ mặn 5-10 g/L [51]. Năm 2022, Balakrishnan sử dụng pyocyanin từ *P. aeruginosa* như một loại thuốc an toàn và thân thiện với môi trường khi ứng dụng vào hệ thống nuôi trồng thủy sản, kết quả đã cho thấy hiệu quả ức chế vi khuẩn *Vibrio* spp. ở nồng độ 5 mg/L và không ảnh hưởng đến các nhóm vi sinh vật dị dưỡng tự nhiên khác [122]. Thêm nữa, chủng *P. aeruginosa* và pyocyanin đã được ứng dụng giúp gia tăng sức khỏe và hệ miễn dịch của tôm bạc *Penaeus latisulcatus* khi cho tôm ăn với liều lượng 10^5 CFU/mL. Vi khuẩn *P. aeruginosa* YC58 cũng liên kết hoạt động với hệ vi sinh của ấu trùng hàu *Cortez*, *C. Corteziensis*, giúp gia tăng tỷ lệ sống và tăng trưởng của hàu ngọc *Pinctada mazatlanica* [15][14].

4.2. Chủng tái tổ hợp *P. aeruginosa* PS39-phzMS và khả năng tăng sinh pyocyanin

Chủng tự nhiên *P. aeruginosa* PS39 trong nghiên cứu này có khả năng sinh pyocyanin, tuy nhiên hàm lượng pyocyanin sinh tổng hợp chỉ đạt $15,02 \pm 0,56$ $\mu\text{g/mL}$ (Bảng 3.1) do đó việc tạo chủng tái tổ hợp có khả năng sinh pyocyanin cao và ổn định là mục tiêu được đặt ra. Hai gen quan trọng trong quá trình chuyển hóa sinh tổng hợp pyocyanin bởi *P. aeruginosa* là *phzM* và *phzS*, là hai gen đích được lựa chọn cho việc đồng biểu hiện nhằm tăng năng suất sản sinh pyocyanin ở chủng *P. aeruginosa* PS39. Hai gen này được nhân bản từ bộ gen của chủng tự nhiên *P. aeruginosa* PS39 sau đó, được biến nạp vào chính chủng *P. aeruginosa* PS39 thông qua vector biểu hiện pUCP24 nhằm tăng cường sự biểu hiện của hai enzyme PhzM và PhzS từ đó thúc đẩy sự tăng năng suất pyocyanin của chủng vi khuẩn chủ.

Plasmid tái tổ hợp pUCP24-phzMS chứa 2 gen *phzM* và *phzS* được biến nạp vào tế bào khả biến *P. aeruginosa* PS39 tạo chủng tái tổ hợp *P. aeruginosa* PS39-phzMS. Mavrodi và đồng tác giả (2001) đã khẳng định vai trò của hai enzyme này khi *P. fluorescens* (không sinh tổng hợp pyocyanin) được biến nạp với *phzM* và *phzS* đã tổng hợp một lượng đáng kể pyocyanin và ngay cả với chủng *E. coli* được biến nạp với 2 gen trên đã tiết pyocyanin nhờ chuyển hóa cơ chất PCA được bổ sung vào môi trường nuôi cấy ở thời điểm thích hợp [75]. Thêm nữa, khi chủng *P.*

aeruginosa bị bất hoạt gen *phzM* do đột biến nếu được biến nạp với plasmid mang gen *phzM* sẽ gia tăng sự tổng hợp pyocyanin với hàm lượng cao hơn so với chủng gốc [68][75]. Như vậy, trong thí nghiệm này chủng tái tổ hợp *P. aeruginosa* PS39 - *phzMS* đã nhận plasmid mang 2 gen *phzM* và *phzS* cho phép biểu hiện pyocyanin tăng cường so với chủng gốc.

Trong hai thập kỷ qua, công nghệ giải trình tự thế hệ mới (NGS) đã được phát triển và ứng dụng mạnh mẽ trong y học, nông nghiệp, môi trường, vi sinh và sinh học [123]. NGS là một công cụ mạnh mẽ để phân tích gen, toàn bộ bộ gen và các nhóm gen. Trong vi sinh vật học, nó có thể giúp nghiên cứu bệnh tật và xác định đặc điểm của các gen chức năng ở vi khuẩn [123]. Millan và cộng sự (2015) đã áp dụng NGS để phân tích plasmid pAMBL1 và pAMBL2 từ *P. aeruginosa*, nghiên cứu sử dụng phần mềm Geneious 7.1.7 để xử lý dữ liệu từ hệ thống PacBio. Họ phát hiện ra rằng plasmid pAMBL1 và pAMBL2 có chứa khả năng sao chép *blaVIM-1* cassette, có thể góp phần làm tăng mức độ kháng kháng sinh của *P. aeruginosa*. Trong nghiên cứu này plasmid pUCP24-*phzMS* đã được giải trình tự từ tế bào chủng tái tổ hợp để xác nhận sự tồn tại của cặp gen *phzM-phzS* trong plasmid bằng hệ thống Miseq.

Hai gen *phzM* và *phzS* được cài vào vector pUCP24 được đảm bảo phiên mã trong cùng sợi mRNA nhờ sự có mặt của trình tự khởi động, promotor chung cho cả hai gen (Lac promoter) và sự gắn đúng chiều của 2 gen này trong vector với các trình tự vị trí gắn ribosome phù hợp cho mỗi gen. Quá trình dịch mã mRNA thành PhzM và PhzS sẽ được bắt đầu khi các ribosome liên kết với các vị trí gắn ribosome của mỗi gen. Dữ liệu thu được từ việc giải trình tự toàn bộ vector đã xác nhận và làm rõ vị trí cũng như khả năng hoạt động của các gen đồng biểu hiện *phzM* và *phzS*. Vị trí liên kết của ribosome đối với gen *phzM* nằm ở các nucleotide 3732-3736 (trên trình tự của vector pUCP24), còn với vị trí liên kết ribosome cho *phzS* nằm ở vị trí nucleotide 2652-2655 có nguồn gốc từ gen *phzS* của *P. aeruginosa* PS39.

Thêm nữa, minh chứng cho việc biểu hiện thành công *phzM* và *phzS* còn thể hiện ở việc tăng cường khả năng chuyển hóa PCA thành pyocyanin ở chủng tái tổ hợp. Pyocyanin được tổng hợp từ tiền chất PCA (là một chất thuộc nhóm phenazines, được tổng hợp bởi *Pseudomonas*) bằng hai bước chuyển hóa nhờ hai enzyme PhzS và PhzM được mã hóa từ hai gen trên. Quá trình tổng hợp pyocyanin từ tiền chất PCA bởi *P. aeruginosa* gồm hai bước: Bước 1) Enzyme PhzM xúc tác chuyển hóa PCA thành 5-methylphenazine-1-carboxylic betaine acid; Bước 2) Quá trình hydro hóa và quá trình decarboxy của 5-methylphenazine-1-carboxylic betaine acid thành pyocyanin với sự tham gia của enzyme PhzS (Hình 1.7). Sự tham gia

đồng thời của hai enzyme PhzM và PhzS là điều kiện bắt buộc để *P. aeruginosa* sinh tổng hợp pyocyanin. Đây là cơ sở để nghiên cứu tăng cường khả năng sinh tổng hợp pyocyanin bằng phương pháp chuyển gen [75][70]. Tuy nhiên từ PCA có thể hình thành một số hợp chất khác như PCN và 1-OHPHZ bởi sự xúc tác của các nhóm enzyme khác [70]. Kết quả nhận được ở chủng tự nhiên thể hiện, PCA vẫn còn với một lượng đáng kể không được chuyển hóa hoàn toàn thành pyocyanin. Trong khi đó, với chủng tái tổ hợp lớp dung môi chứa PCA trong suốt không màu chứng tỏ hàm lượng rất thấp hoặc không còn PCA trong dịch nuôi cấy Hình 3.21A và 3.15B cho thấy sự khác biệt về màu sắc của pyocyanin và PCA được tạo ra ở chủng tự nhiên và tái tổ hợp.

Kết quả cho thấy rằng việc tăng cường biểu hiện đồng thời các gen *phzM* và *phzS* trong vi khuẩn tái tổ hợp *P. aeruginosa* PS39-*phzMS* dẫn đến tăng cường sinh tổng hợp pyocyanin thông qua chuyển hóa PCA, thể hiện ở nồng độ chất đích pyocyanin cao hơn và tiền chất PCA ít hơn trong dịch nuôi chủng tái tổ hợp so với chủng tự nhiên. Vì vậy, việc chuyển gen *phzM* và *phzS* vào chủng tự nhiên gốc là một cách hiệu quả để tăng chuyển đổi PCA thành pyocyanin.

Priyaja đạt được kết quả tương tự khi tác giả chuyển cụm gen tổng hợp pyocyanin (hơn 10 kb), operon bao gồm các gen *phz*, trong đó chứa *phzM* và *phzS* của chủng *P. aeruginosa* MCCB117 bằng cách sử dụng vector pUCP24 vào chính *P. aeruginosa* MCCB117 [111]. Năng suất pyocyanin của dòng tái tổ hợp cao gấp đôi so với dòng tự nhiên [111]. Nghiên cứu về *P. putida* KT2440 được biến đổi gen bởi Askitosari và cộng sự đã cho thấy lượng pyocyanin tăng đáng kể bằng cách tái tổ hợp đồng thời hai plasmid, một plasmid chứa *phzM* và một plasmid khác mang *phzS*. Bên cạnh đó, lượng PCA trong chủng đã giảm đáng kể khoảng 90%. Hơn nữa, nghiên cứu cũng chỉ ra rằng cụm gen *phzM* và *phzS* từ các chủng *P. aeruginosa* khác nhau có tác dụng khác nhau trong việc tăng cường sản xuất pyocyanin [124]. Do đó, hiệu suất của plasmid tái tổ hợp pUCP24-*phzMS* rõ ràng đã tác động tích cực đến quá trình tổng hợp pyocyanin của *P. aeruginosa* PS39-*phzMS*, dẫn đến lượng PCA thấp. PCA là hợp chất tiền thân của pyocyanin, 1-hydroxyphenazine (1-OH-PHZ) và phenazine-1-carboxamide (PCN). Sự tổng hợp pyocyanin từ PCA thông qua xúc tác của hai enzyme *phzM* và *phzS*, trong khi 1-OH-PHZ được tạo thành với sự xúc tác bởi chỉ một enzyme *phzS* và PCA chuyển hóa thành PCN nhờ enzyme *phzH*. Nghiên cứu khác cũng cho thấy *E. coli* JM109 mang plasmid chứa các gen *phzM* và *phzS*, đã chuyển hóa PCA thành pyocyanin [75].

Các phương pháp tiếp cận khác cũng đã được nghiên cứu để tăng sản xuất pyocyanin bởi nhiều nhóm nghiên cứu. Ví dụ, Wang et al. (2020) đã tạo ra *P.*

aeruginosa YTA Δ rpoS đột biến trong đó gen *RpoS* bị mất [82]. *P. aeruginosa* YTA Δ rpoS có thể tăng tổng hợp gấp đôi lượng PCA, và nồng độ pyocyanin tăng lên 4 lần so với chủng tự nhiên. Tác giả nhận thấy rằng sự vắng mặt của gen *RpoS* đã gây ra sự gia tăng biểu hiện của gen *phzM* và kết quả là hàm lượng pyocyanin đã tăng lên [82][99].

Tóm lại, trong nghiên cứu này NGS đã được áp dụng để xác định trình tự plasmid của *P. aeruginosa* PS39-*phzMS*. Cấu trúc plasmid tái tổ hợp đã được xác nhận như đã thiết kế. Nồng độ pyocyanin được tạo ra bởi dòng tái tổ hợp tăng đáng kể ở mức cao hơn 2 lần (31,22 $\mu\text{g/mL}$) so với chủng tự nhiên (13,47 $\mu\text{g/mL}$) trong đó PCA từ *P. aeruginosa* PS39-*phzMS* (OD₃₆₇ = 0,03) giảm đáng kể so với *P. aeruginosa* PS39 (OD₃₆₇ = 0,39). Do đó, plasmid chứa các gen *phzM* và *phzS* có thể cải thiện sinh tổng hợp pyocyanin thông qua việc chuyển hóa PCA phenazine thành pyocyanin cao hơn thông qua các enzym PhzM và PhzS. Những dữ liệu đó là bằng chứng cho thấy việc hiệu quả của việc tăng cường biểu hiện *phzM* và *phzS* trong quá trình sinh tổng hợp pyocyanin ở *P. aeruginosa*.

Kết quả NGS của plasmid tái tổ hợp pUCP24-*phzMS* đã chứng minh sự toàn vẹn của gen *phzM* và *phzS* trong plasmid của chủng chuyển gen *P. aeruginosa* PS39-*phzMS* qua đó có thể chọn lọc được chủng có khả năng tạo pyocyanin qua việc xác định hàm lượng do vi khuẩn tạo ra. Đồng thời, kết quả này đã tiếp cận được kỹ thuật NGS và chứng minh sự toàn vẹn, đầy đủ thành phần yếu tố của plasmid tái tổ hợp cho phép biểu hiện của các gen quan tâm. Bằng phương pháp biến nạp plasmid mang các gen *phzM* và *phzS* vào chính chủng tự nhiên (chủng gốc) đã đạt được hiệu quả biểu hiện tính chất của của gen làm tăng chuyển hóa hợp chất PCA tạo năng suất sản sinh pyocyanin tăng cao. Từ kết quả này cho thấy có thể áp dụng cho các nghiên cứu tương tự để tăng năng suất các sản phẩm trao đổi chất do vi khuẩn tạo ra.

Như đã thể hiện qua các kết quả thu được, các dung môi benzene, hexane và ethylacetate đã tạo các pha riêng rẽ giữa dung môi chiết và dịch nuôi cấy vi khuẩn trong quá trình chiết xuất pyocyanin, tuy nhiên không loại bỏ pyorubin (màu đỏ) và pyomelanin (màu nâu) ra khỏi môi trường nuôi cấy có chứa pyocyanin. Ngược lại, dichloromethane và chloroform tạo ra sự phân tách tốt giữa các pha, trong đó lớp trên cùng bao gồm pyorubin và pyomelanin, và pha dưới là hỗn hợp pyocyanin (màu xanh) và pyoverdine (màu vàng). Pha dưới có màu xanh lam chứa dung môi và hợp chất pyocyanin (xanh lam) và pha trên (nâu đỏ) chứa các thành phần khác (Hình 3.22). Pha dung môi chứa pyocyanin được thu và acid hóa bằng cách thêm HCl 0,2N. Pyocyanin hòa tan trong pha HCl và tạo dung dịch màu hồng, còn pyoverdine nằm trong pha dung môi. Dichloromethane và chloroform là những

dung môi thích hợp vì chúng có thể loại pyoverdine ra khỏi pyocyanin. Dung dịch acid hóa được trung hòa bằng NaOH 1N đến pH trung tính để tạo ra dung dịch chứa pyocyanin tinh sạch. Các dung dịch pyocyanin được chiết xuất bằng dichloromethane và chloroform có màu xanh điển hình tương tự như pyocyanin tinh khiết (Hình 3.23) và đạt hàm lượng lần lượt $20,26 \pm 0,876$ ($\mu\text{g/mL}$), $25,27 \pm 1,024$ ($\mu\text{g/mL}$). Như vậy, chloroform là dung môi tốt nhất được sử dụng để chiết xuất pyocyanin, và tương tự với kết quả được công bố ở các nghiên cứu khác [42]. Pyocyanin được chiết bằng cách sử dụng chloroform hòa tan pyocyanin trong môi trường nuôi cấy. Hỗn hợp chiết còn được tinh sạch bằng cột oxit nhôm và sử dụng hỗn hợp dung môi chloroform : ethanol làm dung môi rửa giải [71]. Một số tác giả khác đã sử dụng các phương pháp khác để tách pyocyanin như sử dụng kết tủa với nhôm sulphate, sử dụng màng lọc gel hay dùng sắc ký trao đổi ion. Hassanein, Raouf và cộng sự đã sử dụng chín loại dung môi khác nhau để tách pyocyanin kết quả cho thấy chloroform có hiệu suất tách chiết cao nhất trong các dung môi được sử dụng. Tác giả Saosoong đã tinh sạch pyocyanin từ *P. aeruginosa* bằng cách sử dụng cột Amberlite XDA-4, sau đó cô pyocyanin bằng cột silicagel và cuối cùng dùng HPLC để thu phân đoạn pyocyanin tinh khiết.

Chế phẩm dạng bột pyocyanin được sản xuất từ chủng *P. aeruginosa* PS39-phzMS được phân tích các đặc điểm hóa, lý và đánh giá chất lượng bằng các kỹ thuật như phổ tử ngoại khả kiến UV-Vis, sắc ký bản mỏng, khối phổ phân giải cao và sắc ký lỏng hiệu năng cao. Độ tinh sạch của pyocyanin trong nghiên cứu này được xác định. Pyocyanin được chiết từ dịch nuôi cấy có giá trị Rf là 0,72 trên bản sắc ký lớp mỏng. Phổ UV-Vis của dịch chiết cho thấy các đỉnh hấp thụ từ 274 đến 280 nm, có nghĩa là pyocyanin được sinh tổng hợp bởi *P. aeruginosa* PS39-phzMS có đặc điểm tương đồng với pyocyanin trong các nghiên cứu của Stephen, Abdul-Hussein và những tác giả khác [112][125][113].

4.3. Điều kiện thích hợp cho sinh tổng hợp pyocyanin ở chủng tái tổ hợp *P. aeruginosa* PS39-phzMS

P. aeruginosa là loài vi khuẩn có nhiều tiềm năng ứng dụng thương mại cao. Pyocyanin được tạo ra bởi loài này đã thể hiện các đặc tính của hoạt động kháng khuẩn phổ rộng, hoạt tính kháng nấm, tạo màu thực phẩm, phân hủy thuốc trừ sâu, và nhiều ứng dụng khác, pyocyanin còn sở hữu một đặc tính đặc biệt là kiểm soát sinh học [126][49][46]. Nhờ những đặc tính này, *P. aeruginosa* tạo ra pyocyanin được ứng dụng trong một số lĩnh vực như xử lý môi trường, công nghiệp thực phẩm và nông nghiệp [46].

Bởi vậy, các điều kiện nuôi cấy đã được tối ưu hóa để sinh tổng hợp pyocyanin bởi *P. aeruginosa* PS39-phzMS và các đặc điểm của pyocyanin tinh khiết đã được nghiên cứu. Tại kết quả đánh giá sơ bộ về khả năng sản sinh pyocyanin từ các dòng tế bào biến nạp plasmid tái tổ hợp pUCP24-phzMS trên môi trường tiết pyocyanin GM đã chỉ ra sự tiết pyocyanin rất cao sau 7 ngày. Điều này đưa ra một gợi ý về việc lựa chọn một môi trường sinh tổng hợp pyocyanin thích hợp cho chủng tái tổ hợp. Như đã thấy, kết quả kiểm tra năng suất sinh pyocyanin trên môi trường GM (1,5% glutamic acid) với điều kiện tối ưu ở pH 8, nhiệt độ 30°C, tốc độ lắc 200 vòng/phút và thời gian nuôi cấy trong 120 giờ, pyocyanin đạt hàm lượng cao nhất là 49,57 µg/mL. Sau tối ưu cho thấy hiệu suất sinh pyocyanin tăng đáng kể so với chủng *P. aeruginosa* PS39-phzMS nuôi cấy trên môi trường truyền thống KingA (31,22 mg/L, Hình 3.35). Gaber và cộng sự tối ưu hóa các điều kiện sản xuất pyocyanin của chủng *P. aeruginosa* chủng JY21, họ đề xuất rằng các điều kiện nuôi cấy tối ưu cho JY21 là pH 8, 30°C, tương tự như *P. aeruginosa* PS39-phzMS. Nhưng thời gian lên men tối ưu thì khác nhau giữa 2 chủng nghiên cứu, 72 giờ là thời gian tốt nhất cho *P. aeruginosa* JY21, trong khi *P. aeruginosa* PS39-phzMS cần thời gian lâu hơn [85]. Sự khác biệt có thể được giải thích bởi bản chất khác biệt giữa các chủng sinh pyocyanin này. Chúng thuộc cùng một loài, nhưng là các dòng khác nhau nên các đặc điểm sinh trưởng và thời gian sản xuất pyocyanin cũng khác nhau. Điều kiện nuôi cấy cũng khác nhau giữa các chủng *P. aeruginosa* có khả năng sinh tổng hợp pyocyanin; ví dụ, *P. aeruginosa* được nghiên cứu bởi Liang et al. phát triển ở pH 7 và 30°C với năng suất tối đa 10 µg/mL [127]. Kết quả tương tự cho thấy các chủng *P. aeruginosa* PA14 sản xuất pyocyanin ở pH 7 ở 30°C [128]. Độ pH tối ưu khác với *P. aeruginosa* PS39-phzMS, tuy nhiên, nhiệt độ tối ưu tương tự như nghiên cứu này.

Môi trường GM cải tiến, trong đó peptone được thay thế bằng glutamic acid 1,5%, cho thấy sự khác biệt đáng kể trong sản xuất pyocyanin so với môi trường KingA ban đầu. Dữ liệu đã xác nhận mối quan hệ giữa nguồn nitơ và năng suất sản xuất pyocyanin của chủng PS39-phzMS. Điều này phù hợp với các nghiên cứu thực nghiệm khác đã thay đổi nguồn nitơ để cải thiện nồng độ pyocyanin. Peptone được thay thế bằng các nguồn bổ sung nitơ và dinh dưỡng như đậu tương, ngô và đậu phộng, trong đó đậu tương có lợi thế hơn vì nó làm tăng nồng độ pyocyanin cao gấp ba lần so với đậu phộng [46]. Việc bổ sung amino acid vào môi trường nuôi cấy nhằm tăng sinh pyocyanin đã được nhiều tác giả nghiên cứu, trong đó glutamic acid là một trong các chất có ảnh hưởng đáng kể để khả năng tăng sinh pyocyanin [115][129]. Việc lựa chọn chỉ amino acid và khoáng để làm môi trường nuôi tiết

pyocyanin giúp cho việc sản xuất sau này dễ dàng, giảm giá thành và quá trình tách chiết cũng đơn giản hơn [99]. Trong môi trường KingA, chủng PS39 sinh pyocyanin giao động trong khoảng 13-15 mg/L, tuy nhiên khi khảo sát trên môi trường KingA có cải tiến bổ sung glutamic acid thay thế cho peptone cho thấy khả năng sinh pyocyanin của PS39 cao hơn. Đây là gợi ý cho việc thiết lập môi trường nuôi cấy với giá thành rẻ hơn (glutamic acid rẻ hơn peptone) và hiệu quả cao hơn trong nghiên cứu tối ưu các điều kiện sinh tổng hợp pyocyanin bởi chủng tái tổ hợp.

Pyocyanin là hợp chất dễ phản ứng với phân tử oxy dẫn đến mất hoạt chất. Do đó khi bố trí thí nghiệm này cũng theo dõi thời điểm dùng khí và ngưng dùng khí trong quá trình lên men để thu nhận lượng pyocyanin tốt nhất. Tốc độ khuấy là yếu tố cần thiết trong quá trình lên men đối với *P. aeruginosa* PS39-phzMS, tốc độ tối ưu là 200 vòng/phút. Kết hợp với các điều kiện tối ưu khác, chủng pyocyanin tạo ra *P. aeruginosa* PS39-phzMS có thể tổng hợp pyocyanin ở 23,96 µg/mL. Lựa chọn được các điều kiện nuôi cấy phù hợp: Môi trường khoáng (KingA) và glutamic acid 1,5%, pH 8, nhiệt độ 30°C, tốc độ lắc 200 vòng/phút, với thời gian 120 giờ điều kiện tiêu chuẩn.

P. aeruginosa PS39-phzMS có khả năng sinh pyocyanin cao, hoạt chất pyocyanin có nhiều ứng dụng: hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm. Các kết quả nghiên cứu này đã cung cấp thêm kiến thức cơ bản về phương pháp tạo ra một lượng pyocyanin cao thông qua quá trình lên men vi khuẩn và chiết xuất bằng chloroform với triển vọng ứng dụng ở qui mô công nghiệp để sản xuất được pyocyanin với số lượng cao và giá thành hợp lý qua đó có thể ứng dụng pyocyanin rộng rãi trong nhiều lĩnh vực.

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 $6,01 \pm 1,2$ $\mu\text{g/mL}$ đến $15,02 \pm 0,56$ $\mu\text{g/mL}$, trong đó chọn được một chủng PS39 tổng hợp pyocyanin cao nhất ($15,02 \pm 0,56$ $\mu\text{g/mL}$) 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 bằng dung môi chloroform với tỷ lệ thể tích 1 dung môi : 1 dịch nuôi cấy. Sản phẩm pyocyanin tạo ra có màu xanh đặc trưng, đặc tính phổ UV-Vis tương tự pyocyanin tinh khiết, có phổ khối lượng tương ứng công thức phân tử của pyocyanin ($\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}$) và đạt độ tinh sạch 97% (HPLC).
4. Pyocyanin từ 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.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Vinh, N. Q., N. C. Thuan, N. H. Uyen, Trang, N. H., & Loi, N. T. T. (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
2. Vinh, N. Q., Thuan, N. C., Uyen, N. H., & T., L. N. T. (2022). Increased production of pyocyanin in recombinant pseudomonas aeruginosa ps39-phzms strain harboring plasmid PUCP24-phzms. *Journal of biotechnology* 20(1), 135-142.
3. 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* 19(3), 282-290
4. 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.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Peix, A., Ramírez-Bahena, M.-H., and Velázquez, E., 2018, The current status on the taxonomy of *Pseudomonas* revisited: an update, *Infection, Genetics and Evolution*, 57, pp. 106–116.
2. Anayo, O.F., Peter, O.C., Nneji, U.G., Obinna, A., Scholastica, E.C., and Mistura, L.O., 2019, The Beneficial Roles of *Pseudomonas* in Medicine, Industries, and Environment: A, *Pseudomonas Aeruginosa: An Armory Within*, 97.
3. Gessard, C., 1984, On the Blue and Green Coloration that Appears on Bandages, *Reviews of Infectious Diseases*, 6(Supplement 3), pp. S775–S776.
4. Gaspar, M.C., Couet, W., Olivier, J.-C., Pais, A., and Sousa, J.J.S., 2013, *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis lung disease and new perspectives of treatment: a review, *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 32, pp. 1231–1252.
5. Rennie, J. and Reading-Ikkanda, L., 2017, Seeing the beautiful intelligence of microbes, *Quanta Magazine*,.
6. Neves, P.R., McCulloch, J.A., Mamizuka, E.M., and Lincopan, N., 2014, PSEUDOMONAS | *Pseudomonas aeruginosa*. in: C.A. Batt, M. Lou Tortorello (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*, Second Edi, Academic Press, Oxfordpp. pp. 253–260.
7. Paulsson, M., Su, Y.-C., Ringwood, T., Uddén, F., and Riesbeck, K., 2019, *Pseudomonas aeruginosa* uses multiple receptors for adherence to laminin during infection of the respiratory tract and skin wounds, *Scientific Reports*, 9(1), pp. 1–10.
8. Conrad, J.C., Gibiansky, M.L., Jin, F., Gordon, V.D., Motto, D.A., Mathewson, M.A., et al., 2011, Flagella and pili-mediated near-surface single-cell motility mechanisms in *P. aeruginosa*, *Biophysical Journal*, 100(7), pp. 1608–1616.
9. Klockgether, J., Cramer, N., Wiehlmann, L., Davenport, C.F., and Tümmler, B., 2011, *Pseudomonas aeruginosa* genomic structure and diversity, *Frontiers in Microbiology*, 2, pp. 150.
10. Lyczak, J.B., Cannon, C.L., and Pier, G.B., 2000, Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist, *Microbes and Infection*, 2(9), pp. 1051–1060.
11. Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrener, P., Hickey, M.J., et al., 2000, Complete genome sequence of *Pseudomonas*

- aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen, *Nature*, 406(6799), pp. 959–964.
12. Smits, T.H.M., Witholt, B., and van Beilen, J.B., 2003, Functional characterization of genes involved in alkane oxidation by *Pseudomonas aeruginosa*, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 84, pp. 193–200.
 13. Wang, Y., Li, C., Gao, C., Ma, C., and Xu, P., 2014, Genome sequence of the nonpathogenic *Pseudomonas aeruginosa* strain ATCC 15442, *Genome Announcements*, 2(2), pp. 10–1128.
 14. Hai, N. Van, Buller, N., and Fotedar, R., 2009, Effects of probiotics (*Pseudomonas synxantha* and *Pseudomonas aeruginosa*) on the growth, survival and immune parameters of juvenile western king prawns (*Penaeus latisulcatus* Kishinouye, 1896), *Aquaculture Research*, 40(5), pp. 590–602.
 15. Luna-González, A., González-Ocampo, H.A., Campa-Córdova, A.I., Mazón-Suastegui, J.M., Ascencio, F., and Aguirre-Guzmán, G., 2011, Effect of probiotic bacteria on survival and growth of Cortez oyster larvae, *Crassostrea corteziensis* (Bivalvia: Ostreidae), *Revista de Biología Tropical*, 59(1), pp. 183–191.
 16. Depoorter, E., Bull, M.J., Peeters, C., Coenye, T., Vandamme, P., and Mahenthiralingam, E., 2016, Burkholderia: an update on taxonomy and biotechnological potential as antibiotic producers, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, pp. 5215–5229.
 17. Nguyen Thi Lam Doan, Van, H.T., Thuy, N.T.T., and Anh, N.H., 2016, Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn lactic từ nem chua với khả năng kháng vi sinh vật và đặc điểm của bacteriocin, *Tạp Chí Khoa Học Nông Nghiệp VN*, 14(7), pp. 1089–1099.
 18. Onbasli, D. and Aslim, B., 2008, Determination of antimicrobial activity and production of some metabolites by *Pseudomonas aeruginosa* B1 and B2 in sugar beet molasses, *African Journal of Biotechnology*, 7(24), pp. 4614–4619.
 19. Cardozo, V.F., Oliveira, A.G., Nishio, E.K., Perugini, M.R.E., Andrade, C.G.T.J., Silveira, W.D., et al., 2013, Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a *Pseudomonas* strain against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains, *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 12(1), pp. 1–8.
 20. Simionato, A.S., Navarro, M.O.P., de Jesus, M.L.A., Barazetti, A.R., da Silva, C.S., Simões, G.C., et al., 2017, The effect of phenazine-1-carboxylic acid on

- mycelial growth of *Botrytis cinerea* produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain, *Frontiers in Microbiology*, 8, pp. 1102.
21. Allouche, N., Damak, M., Ellouz, R., and Sayadi, S., 2004, Use of whole cells of *Pseudomonas aeruginosa* for synthesis of the antioxidant hydroxytyrosol via conversion of tyrosol, *Applied and Environmental Microbiology*, 70(4), pp. 2105–2109.
 22. Adesemoye, A.O., Torbert, H.A., and Kloepper, J.W., 2009, Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers, *Microbial Ecology*, 58, pp. 921–929.
 23. Jain, R. and Pandey, A., 2016, A phenazine-1-carboxylic acid producing polyextremophilic *Pseudomonas chlororaphis* (MCC2693) strain, isolated from mountain ecosystem, possesses biocontrol and plant growth promotion abilities, *Microbiological Research*, 190, pp. 63–71.
 24. Kumar, A., Verma, H., Singh, V.K., Singh, P.P., Singh, S.K., Ansari, W.A., et al., 2017, Role of *Pseudomonas* sp. in sustainable agriculture and disease management, *Agriculturally Important Microbes for Sustainable Agriculture: Volume 2: Applications in Crop Production and Protection*, pp. 195–215.
 25. Kumar, A., Meena, R., Meena, V.S., Bisht, J.K., and Pattanayak, A., 2016, Towards the stress management and environmental sustainability, *Journal of Cleaner Production*, 137, p. 821-822.
 26. Goswami, D., Vaghela, H., Parmar, S., Dhandhukia, P., and Thakker, J.N., 2013, Plant growth promoting potentials of *Pseudomonas* spp. strain OG isolated from marine water, *Journal of Plant Interactions*, 8(4), pp. 281–290.
 27. Kumar, S., Pandey, P., and Maheshwari, D.K., 2009, Reduction in dose of chemical fertilizers and growth enhancement of sesame (*Sesamum indicum* L.) with application of rhizospheric competent *Pseudomonas aeruginosa* LES4, *European Journal of Soil Biology*, 45(4), pp. 334–340.
 28. Meena, V.S., Mishra, P.K., Bisht, J.K., and Pattanayak, A., 2017, *Agriculturally important microbes for sustainable agriculture: volume 2: applications in crop production and protection*. Springer.
 29. Ali Siddiqui, I., Ehetshamul-Haque, S., and Shahid Shaukat, S., 2001, Use of rhizobacteria in the control of root rot–root knot disease complex of mungbean, *Journal of Phytopathology*, 149(6), pp. 337–346.
 30. Audenaert, K., Pattery, T., Cornelis, P., and Höfte, M., 2002, Induction of systemic resistance to *Botrytis cinerea* in tomato by *Pseudomonas aeruginosa*

- 7NSK2: role of salicylic acid, pyochelin, and pyocyanin, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(11), pp. 1147–1156.
31. Chu, T.N., Tran, B.T.H., Van Bui, L., and Hoang, M.T.T., 2019, Plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas* PS01 induces salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*, *BMC Research Notes*, 12(1), pp. 1–7.
 32. Tran, H., Kruijt, M., and Raaijmakers, J.M., 2008, Diversity and activity of biosurfactant-producing *Pseudomonas* in the rhizosphere of black pepper in Vietnam, *Journal of Applied Microbiology*, 104(3), pp. 839–851.
 33. Chu, T.N., Pham, T.V.N., and Hoang, M.T.T., 2020, Isolation and screening of *Pseudomonas* isolates enhance salinity tolerance of peanut (*Arachis hypogaea* L.), *VNUHCM Journal of Natural Sciences*, 4(1), pp. 347–356.
 34. Ashengroph, M., Nahvi, I., Zarkesh-Esfahani, H., and Momenbeik, F., 2011, Use of growing cells of *Pseudomonas aeruginosa* for synthesis of the natural vanillin via conversion of isoeugenol, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 10(4), pp. 749.
 35. Nitschke, M., Costa, S.G.V.A.O., and Contiero, J., 2011, Rhamnolipids and PHAs: Recent reports on *Pseudomonas*-derived molecules of increasing industrial interest, *Process Biochemistry*, 46(3), pp. 621–630.
 36. Mahamad, S.S., Baskaran, S.M., Isa, I.N.M., Zakaria, M.R., and Hassan, M.A., 2022, Rhamnolipid Biosurfactants Production and Application in Agriculture, *Microbial Surfactants*, pp. 203–224.
 37. Samanta, A., Pal, P., Mandal, A., Sinha, C., Lalee, A., Das, M., et al., 2012, Estimation of biosurfactant activity of an alkaline protease producing bacteria isolated from municipal solid waste, *Cent. Eur. J. Exp. Biol*, 1, pp. 26–35.
 38. Rios, N.S., Pinheiro, B.B., Pinheiro, M.P., Bezerra, R.M., dos Santos, J.C.S., and Gonçalves, L.R.B., 2018, Biotechnological potential of lipases from *Pseudomonas*: Sources, properties and applications, *Process Biochemistry*, 75, pp. 99–120.
 39. Lee, J.-H., Boyapati, G., Song, K.-B., Rhee, S.-K., and Kim, C.-H., 2000, Cloning and Sequence Analysis of the estA gene encoding enzyme for producing (R)- β -acetylmercaptoisobutyric acid from *Pseudomonas aeruginosa* 1001, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90(6), pp. 684–687.
 40. Manjusha, S., Sarita, G.B., Elyas, K.K., and Chandrasekaran, M., 2005, Multiple antibiotic resistances of *Vibrio* isolates from coastal and brackish water areas, *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 1(4), pp. 201–206.

41. Jayaseelan, S., Ramaswamy, D., and Dharmaraj, S., 2014, Pyocyanin: production, applications, challenges and new insights, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30, pp. 1159–1168.
42. El-Fouly, M.Z., Sharaf, A.M., Shahin, A.A.M., El-Bialy, H.A., and Omara, A.M.A., 2015, Biosynthesis of pyocyanin pigment by *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 8(1), pp. 36–48.
43. Abdelaziz, A.A., Kamer, A.M.A., Al-Monofy, K.B., and Al-Madboly, L.A., 2023, *Pseudomonas aeruginosa*'s greenish-blue pigment pyocyanin: its production and biological activities, *Microbial Cell Factories*, 22(1), pp. 1–14.
44. Anjaiah, V., Cornelis, P., and Koedam, N., 2003, Effect of genotype and root colonization in biological control of fusarium wilts in pigeonpea and chickpea by *Pseudomonas aeruginosa* PNA1, *Canadian Journal of Microbiology*, 91, pp. 85–91.
45. Yan, J., Liu, W., Cai, J., Wang, Y., Li, D., Hua, H., et al., 2021, Advances in phenazines over the past decade: Review of their pharmacological activities, mechanisms of action, biosynthetic pathways and synthetic strategies, *Marine Drugs*, 19(11), p. 610.
46. DeBritto, S., Gajbar, T.D., Satapute, P., Sundaram, L., Lakshmikantha, R.Y., Jogaiah, S., et al., 2020, Isolation and characterization of nutrient dependent pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa* and its dye and agrochemical properties, *Scientific Reports*, 10(1), pp. 1–12.
47. Gohain, N., Thomashow, L.S., Mavrodi, D. V, and Blankenfeldt, W., 2006, The purification, crystallization and preliminary structural characterization of PhzM, a phenazine-modifying methyltransferase from *Pseudomonas aeruginosa*, *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 62(9), pp. 887–890.
48. Angell, S., Bench, B.J., Williams, H., and Watanabe, C.M.H., 2006, Pyocyanin isolated from a marine microbial population: synergistic production between two distinct bacterial species and mode of action, *Chemistry & Biology*, 13(12), pp. 1349–1359.
49. Saha, S., Thavasi, R., and Jayalakshmi, S., 2008, Phenazine pigments from *Pseudomonas aeruginosa* and their application as antibacterial agent and food colourants, *Res J Microbiol*, 3(3), pp. 122–128.

50. Sweedan, E.G., 2010, Study the effect of antibiotics on pyocyanin production from *Pseudomonas aeruginosa* and pyocyanin as antibiotic against different pathogenic bacteria, *Journal of University Anbar Pure Science*, 4, pp. 15–18.
51. Priyaja, P., Jayesh, P., Correya, N.S., Sreelakshmi, B., Sudheer, N.S., Philip, R., et al., 2014, Antagonistic effect of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from various ecological niches on *Vibrio* species pathogenic to crustaceans, *Journal of Coastal Life Medicine*, 2(1), pp. 76–84.
52. De Vleeschauwer, D., Cornelis, P., and Höfte, M., 2006, Redox-active pyocyanin secreted by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 triggers systemic resistance to *Magnaporthe grisea* but enhances *Rhizoctonia solani* susceptibility in rice, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(12), pp. 1406–1419.
53. Kaur, J., Pethani, B.P., Kumar, S., Kim, M., Sunna, A., Kautto, L., et al., 2015, *Pseudomonas aeruginosa* inhibits the growth of *Scenedosporium aurantiacum*, an opportunistic fungal pathogen isolated from the lungs of cystic fibrosis patients, *Frontiers in Microbiology*, 6, p. 147894.
54. Sudhakar, T. and Karpagam, S., 2011, Antifungal efficacy of pyocyanin produced from bioindicators of nosocomial hazards. in: *International Conference on Green Technology and Environmental Conservation (GTEC-2011)*, IEEE, pp. 224–229.
55. Xu, L., Wang, F., Shen, Y., Hou, H., Liu, W., Liu, C., et al., 2014, *Pseudomonas aeruginosa* inhibits the growth of pathogenic fungi: In vitro and in vivo studies, *Experimental and Therapeutic Medicine*, 7(6), pp. 1516–1520.
56. Rada, B., Jendrysik, M.A., Pang, L., Hayes, C.P., Yoo, D., Park, J.J., et al., 2013, Pyocyanin-enhanced neutrophil extracellular trap formation requires the NADPH oxidase, *PloS One*, 8(1), pp. e54205.
57. Hassani, H.H., Hasan, H.M., Al-Saadi, A., Ali, A.M., and Muhammad, M.H., 2012, A comparative study on cytotoxicity and apoptotic activity of pyocyanin produced by wild type and mutant strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *Eur J Exp Biol*, 2(5), pp. 1389–1394.
58. Zhao, J., Wu, Y., Alfred, A.T., Wei, P., and Yang, S., 2014, Anticancer effects of pyocyanin on HepG2 human hepatoma cells, *Letters in Applied Microbiology*, 58(6), pp. 541–548.
59. Laxmi, M. and Bhat, S.G., 2016, Characterization of pyocyanin with radical scavenging and antibiofilm properties isolated from *Pseudomonas aeruginosa* strain BTRY1, *3 Biotech*, 6, pp. 1–5.

60. Priyaja, P., Jayesh, P., Philip, R., and Bright Singh, I.S., 2016, Pyocyanin induced in vitro oxidative damage and its toxicity level in human, fish and insect cell lines for its selective biological applications, *Cytotechnology*, 68, pp. 143–155.
61. Hamad, M.N.F., Marrez, D.A., and El-Sherbieny, S.M.R., 2020, Toxicity evaluation and antimicrobial activity of purified pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa*, *Studies*, 4, pp. 5.
62. Chen, K., Hu, H., Wang, W., Zhang, X., and Xu, Y., 2008, Metabolic degradation of phenazine-1-carboxylic acid by the strain *Sphingomonas* sp. DP58: the identification of two metabolites, *Biodegradation*, 19, pp. 659–667.
63. Reszka, K.J., O'Malley, Y., McCormick, M.L., Denning, G.M., and Britigan, B.E., 2004, Oxidation of pyocyanin, a cytotoxic product from *Pseudomonas aeruginosa*, by microperoxidase 11 and hydrogen peroxide, *Free Radical Biology and Medicine*, 36(11), pp. 1448–1459.
64. Preetha, R., Jose, S., Prathapan, S., Vijayan, K.K., Jayaprakash, N.S., Philip, R., et al., 2010, An inhibitory compound produced by *Pseudomonas* with effectiveness on *Vibrio harveyi*, *Aquaculture Research*, 41(10), pp. 1452–1461.
65. Wadday, A.K., Saleh, Z.A., and Al-Marjani, M.F., 2019, Spectroscopic characteristics and energy transfer of bacterial pigment: (pyocyanin/curcumin). in: *AIP Conf Proc*, American Institute of Physics Inc.,
66. Marrez, D.A. and Mohamad, H.S., 2020, Biological activity and applications of pyocyanin produced by *Pseudomonas aeruginosa*, *Open access journal of Biomedical Science*, 2(1), pp. 140-144.
67. Brown, K.A., Carpenter, E.P., Watson, K.A., Coggins, J.R., Hawkins, A.R., Koch, M.H.J., et al., 2003, Twists and turns: a tale of two shikimate-pathway enzymes, *Biochemical Society Transactions*, 31(3), pp. 543–547.
68. McDonald, M., Mavrodi, D. V, Thomashow, L.S., and Floss, H.G., 2001, Phenazine biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*: Branchpoint from the primary shikimate biosynthetic pathway and role of phenazine-1, 6-dicarboxylic Acid, *Journal of the American Chemical Society*, 123(38), pp. 9459–9460.
69. Nadal Jimenez, P., Koch, G., Thompson, J.A., Xavier, K.B., Cool, R.H., and Quax, W.J., 2012, The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(1), pp. 46–65.

70. Parsons, J.F., Greenhagen, B.T., Shi, K., Calabrese, K., Robinson, H., and Ladner, J.E., 2007, Structural and functional analysis of the pyocyanin biosynthetic protein PhzM from *Pseudomonas aeruginosa*, *Biochemistry*, 46(7), pp. 1821–1828.
71. El-Samerraie, F.T., Mohammed, A.R., Al-Mosawi, M.A., and Matloob, S.E.A., 1997, Treatment of Pseudomonas life threatening chronic suppurative otitis media by new conservative therapy A prospective study 1993-1994, *Journal of Islamic Academy of Sciences*, 10(4), pp. 109–112.
72. Raouf, W.M. and Latif, I.A.R., 2010, In vitro study of the swarming phenomena and antimicrobial activity of pyocyanin produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from different human infections, *Eur J Sci Res*, 47(3), pp. 405.
73. Saosoong, K., Wongphathanakul, W., Poasiri, C., and Ruangviriyachai, C., 2009, Isolation and analysis of antibacterial substance produced from *P. aeruginosa* TISTR 781, *Kkv. Sci. J*, 37(20), pp. 163–172.
74. Vijayan, K.K., Singh, I.S.B., Jayaprakash, N.S., Alavandi, S. V, Pai, S.S., Preetha, R., et al., 2006, A brackishwater isolate of Pseudomonas PS-102, a potential antagonistic bacterium against pathogenic vibrios in penaeid and non-penaeid rearing systems, *Aquaculture*, 251(2–4), pp. 192–200.
75. Mavrodi, D. V, Bonsall, R.F., Delaney, S.M., Soule, M.J., Phillips, G., and Thomashow, L.S., 2001, Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Journal of Bacteriology*, 183(21), pp. 6454–6465.
76. Greenhagen, B.T., Shi, K., Robinson, H., Gamage, S., Bera, A.K., Ladner, J.E., et al., 2008, Crystal structure of the pyocyanin biosynthetic protein PhzS, *Biochemistry*, 47(19), pp. 5281–5289.
77. Montelongo-Martínez, L.F., Hernández-Méndez, C., Muriel-Millan, L.F., Hernández-Estrada, R., Fabian-Del Olmo, M.J., González-Valdez, A., et al., 2023, Unraveling the regulation of pyocyanin synthesis by RsmA through MvaU and RpoS in *Pseudomonas aeruginosa* ID4365, *Journal of Basic Microbiology*, 63(1), pp. 51–63.
78. West, S.E.H., Schweizer, H.P., Dall, C., Sample, A.K., and Runyen-Janecky, L.J., 1994, Construction of improved Escherichia-Pseudomonas shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*, *Gene*, 148(1), pp. 81–86.

79. Lee, B.-U., Hong, J.-H., Kahng, H.-Y., and Oh, K.-H., 2006, Construction of an Escherichia-Pseudomonas Shuttle Vector Containing an Aminoglycoside Phosphotransferase Gene and a lacZ'Gene for α -Complementation, *The Journal of Microbiology*, 44(6), pp. 671–673.
80. Lu, S.-E., Scholz-Schroeder, B.K., and Gross, D.C., 2002, Construction of pMEKm12, an expression vector for protein production in Pseudomonas syringae, *FEMS Microbiology Letters*, 210(1), pp. 115–121.
81. Prijaya P., and Singh, B., 2018, Cloning and overexpression of Phz genes encoding phenazine biosynthetic pathway for the enhanced production of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* MCCB117. in: *Cochin University of Science and Technology*, Shodhganga. India.
82. Wang, K., Kai, L., Zhang, K., Hao, M., Yu, Y., Xu, X., et al., 2020, Overexpression of phzM contributes to much more production of pyocyanin converted from phenazine-1-carboxylic acid in the absence of RpoS in *Pseudomonas aeruginosa*, *Archives of Microbiology*, 202(6), pp. 1507–1515.
83. Ozdal, M., Gurkok, S., Ozdal, O.G., and Kurbanoglu, E.B., 2019, Enhancement of pyocyanin production by *Pseudomonas aeruginosa* via the addition of n-hexane as an oxygen vector, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 22, pp. 101365.
84. Ozdal, M., 2019, A new strategy for the efficient production of pyocyanin, a versatile pigment, in *Pseudomonas aeruginosa* OG1 via toluene addition, *3 Biotech*, 9(10), pp. 374.
85. Abo-Zaid, G.A., Wagih, E.E., Matar, S.M., Ashmawy, N.A., and Hafez, E.E., 2015, Optimization of pyocyanin production from *Pseudomonas aeruginosa* JY21 using statistical experimental designs, *International Journal of ChemTech Research*, 8(9), pp. 137–148.
86. Al-Kazaz, A.A., Al-Awadi, S.J., Al-Gelawi, M.H., and Al-Mohamed, R.S., 2008, Genetic mutation of *Pseudomonas aeruginosa* OM13 to improve its production of antifungal compound, *Iraqi Journal of Biotechnology*, 7(1), pp. 117–132.
87. King, E.O., Ward, M.K., and Raney, D.E., 1954, Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein, *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44(2), pp. 301–307.
88. Yuan, L.-L., Li, Y.-Q., Wang, Y., Zhang, X.-H., and Xu, Y.-Q., 2008, Optimization of critical medium components using response surface

- methodology for phenazine-1-carboxylic acid production by *Pseudomonas* sp. M-18Q, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 105(3), pp. 232–237.
89. Gahlout, M., Chauhan, P.B., Prajapati, H., Tandel, N., Rana, S., Solanki, D., et al., 2021, Characterization, application and statistical optimization approach for enhanced production of pyocyanin pigment by *Pseudomonas aeruginosa* DN9, *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, 1(4), pp. 459–470.
90. Patil, S., Nikam, M., Patil, H., Anokhina, T., Kochetkov, V., and Chaudhari, A., 2017, Bioactive pigment production by *Pseudomonas* spp. MCC 3145: Statistical media optimization, biochemical characterization, fungicidal and DNA intercalation-based cytostatic activity, *Process Biochemistry*, 58, pp. 298–305.
91. Patil, S., Nikam, M., Anokhina, T., Kochetkov, V., and Chaudhari, A., 2017, Multi-stress tolerant plant growth promoting *Pseudomonas* spp. MCC 3145 producing cytostatic and fungicidal pigment, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 10, pp. 53–63.
92. He, P., Wu, S., Pan, L., Sun, S., Mao, D., and Xu, C., 2016, Effect of Tween 80 and acetone on the secretion, structure and antioxidant activities of exopolysaccharides from *Lentinus tigrinus*, *Food Technology and Biotechnology*, 54(3), pp. 290–295.
93. Lei, X.Y., Zhang, M.Y., Ma, Y.J., and Wang, J.W., 2017, Transcriptomic responses involved in enhanced production of hypocrellin A by addition of Triton X-100 in submerged cultures of *Shiraia bambusicola*, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 44(10), pp. 1415–1429.
94. Jabłońska, J., Dubrowska, K., Augustyniak, A., Wróbel, R.J., Piz, M., Cendrowski, K., et al., 2022, The influence of nanomaterials on pyocyanin production by *Pseudomonas aeruginosa*, *Applied Nanoscience*, 12(6), pp. 1929–1940.
95. Ouyang, K., Mortimer, M., Holden, P.A., Cai, P., Wu, Y., Gao, C., et al., 2020, Towards a better understanding of *Pseudomonas putida* biofilm formation in the presence of ZnO nanoparticles (NPs): Role of NP concentration, *Environment International*, 137, pp. 105485.
96. Augustyniak, A., Cendrowski, K., Grygorcewicz, B., Jabłońska, J., Nawrotek, P., Trukawka, M., et al., 2020, The response of *pseudomonas aeruginosa* pao1 to uv-activated titanium dioxide/silica nanotubes, *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20), pp. 7748.

97. Yang, Y. and Alvarez, P.J.J., 2015, Sublethal concentrations of silver nanoparticles stimulate biofilm development, *Environmental Science & Technology Letters*, 2(8), pp. 221–226.
98. Jabłońska, J., Dubrowska, K., Augustyniak, A., Kordas, M., and Rakoczy, R., 2022, Application of Magnetically Assisted Reactors for Modulation of Growth and Pyocyanin Production by *Pseudomonas aeruginosa*, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, pp. 1–7.
99. Jabłońska, J., Augustyniak, A., Dubrowska, K., and Rakoczy, R., 2023, The two faces of pyocyanin - why and how to steer its production?, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(4), p. 103.
100. de Oliveira, B.T.M., Barbosa, P.S.Z., Cavalcanti, T.G., do Amaral, I.P.G., and Vasconcelos, U., 2019, Craft beer waste as substrate for pyocyanin synthesis, 14(1), pp.21-25.
101. Hucker, G.J., 1921, A new modification and application of the Gram stain, *Journal of Bacteriology*, 6(4), pp. 395–397.
102. Spilker, T., Coenye, T., Vandamme, P., and LiPuma, J.J., 2004, PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients, *Journal of Clinical Microbiology*, 42(5), pp. 2074–2079.
103. Sambrook, J. and Russell, D.W., 2006, *The condensed protocols from molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
104. Laemmli, U.K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227(5259), pp. 680–685.
105. Choi, K.-H., Kumar, A., and Schweizer, H.P., 2006, A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation, *Journal of Microbiological Methods*, 64(3), pp. 391–397.
106. Li, H. and Durbin, R., 2009, Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform, *Bioinformatics*, 25(14), pp. 1754–1760.
107. Essar, D.W., Eberly, L., Hadero, A., and Crawford, I.P., 1990, Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: Interchangeability of the two anthranilate synthase and evolutionary implications, *Journal of Bacteriology*, 172(2), pp. 884–900.

108. Hadacek, F. and Greger, H., 2000, Testing of antifungal natural products: Methodologies, comparability of results and assay choice, *Phytochemical Analysis*, 11(3), pp. 137–147.
109. Bauer, R., German, R., and Panesci, J., n.d., 2012, Methods for determining the performance of ejector-diffuser systems used in rocket altitude simulation. in: *Space Simulation Testing Conference*, p. 1428.
110. Elbargisy, R.M., 2021, Optimization of nutritional and environmental conditions for pyocyanin production by urine isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(1), pp. 993–1000.
111. Priyaja, P., Rosamma, P., and Bright Singh, I.S., 2012, *Pyocyanin (5-methyl-1-hydroxyphenazine) produced by Pseudomonas aeruginosa as antagonist to vibrios in aquaculture: Overexpression, downstream process and toxicity*, PhD thesis, Microbiology and Biochemistry School of Marine Sciences, Cochin University of Science and Technology.
112. Ohfuji, K., Sato, N., Hamada-Sato, N., Kobayashi, T., Imada, C., Okuma, H., et al., 2004, Construction of a glucose sensor based on a screen-printed electrode and a novel mediator pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa*, *Biosensors and Bioelectronics*, 19(10), pp. 1237–1244.
113. Dahah, H., Djibaoui, R., and Nemmiche, S., 2016, Antimicrobial, antioxidant and hemolytic effects of Pyocyanin produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from saline soil of Mina river, *Algeria Int J Biosci*, 9(5), pp. 134–143.
114. Ghazi, D. and Kahya, H.F., 2021, Purified Pyocyanin from Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* Enhances Antibiotic Sensitivity Against Some Pathogenic Bacteria, *Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology*, 15(1), pp. 999–1007.
115. Gonçalves, T. and Vasconcelos, U., 2021, Colour Me Blue: The History and the Biotechnological Potential of Pyocyanin, *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26 (4), pp. 927.
116. Lopes, L.D., Davis, E.W., Pereira e Silva, M. de C., Weisberg, A.J., Bresciani, L., Chang, J.H., et al., 2018, Tropical soils are a reservoir for fluorescent *Pseudomonas* spp. biodiversity, *Environmental Microbiology*, 20(1), pp. 62–74.
117. Pirnay, J., Matthijs, S., Colak, H., Chablain, P., Bilocq, F., Van Eldere, J., et al., 2005, Global *Pseudomonas aeruginosa* biodiversity as reflected in a Belgian river, *Environmental Microbiology*, 7(7), pp. 969–980.

118. Winstanley, C., O'Brien, S., and Brockhurst, M.A., 2016, *Pseudomonas aeruginosa* evolutionary adaptation and diversification in cystic fibrosis chronic lung infections, *Trends in Microbiology*, 24(5), pp. 327–337.
119. Yin, Y., Papavasiliou, G., Zaborina, O.Y., Alverdy, J.C., and Teymour, F., 2017, De novo synthesis and functional analysis of polyphosphate-loaded poly (ethylene) glycol hydrogel nanoparticles targeting pyocyanin and pyoverdinin production in *Pseudomonas aeruginosa* as a model intestinal pathogen, *Annals of Biomedical Engineering*, 45, pp. 1058–1068.
120. Moayedi, A., Nowroozi, J., and Sepahy, A.A., 2017, Effect of fetal and adult bovine serum on pyocyanin production in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical and soil samples, *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 20(12), pp. 1331.
121. Guttenberger, N., Schlatzer, T., Leypold, M., Tassoti, S., and Breinbauer, R., 2018, Synthesis of novel ligands targeting phenazine biosynthesis proteins as a strategy for antibiotic intervention, *Monatshefte Für Chemie-Chemical Monthly*, 149, pp. 847–856.
122. Balakrishnan, S., Ameer, A., Pazhur Mohandas, S., Maliyekkal Sajeewan, A.K., Bhaskaran Sathyabhama, A., and Singh, B., 2022, Pyocyanin as a safe aquaculture drug for the control of vibriosis in shrimp recirculating aquaculture system (RAS), *Aquaculture International*, 30(4), pp. 2129–2144.
123. Singh, D. and Gupta, N., 2020, Microbial Laccase: a robust enzyme and its industrial applications, *Biologia*, 75(8), pp. 1183–1193.
124. Askitosari, T.D., Boto, S.T., Blank, L.M., and Rosenbaum, M.A., 2019, Boosting heterologous phenazine production in *Pseudomonas putida* KT2440 through the exploration of the natural sequence space, *Frontiers in Microbiology*, 10, pp. 1990.
125. Abdul-Hussein, Z.R. and Atia, S.S., 2016, Antimicrobial effect of pyocyanin extracted from *Pseudomonas aeruginosa*, *European Journal of Experimental Biology*, 6(3), pp. 1–4.
126. Babu, A.N., Jogaiah, S., Ito, S., Nagaraj, A.K., and Tran, L.-S.P., 2015, Improvement of growth, fruit weight and early blight disease protection of tomato plants by rhizosphere bacteria is correlated with their beneficial traits and induced biosynthesis of antioxidant peroxidase and polyphenol oxidase, *Plant Science*, 231, pp. 62–73.

127. Liang, H., Duan, J., Sibley, C.D., Surette, M.G., and Duan, K., 2011, Identification of mutants with altered phenazine production in *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Medical Microbiology*, 60(1), pp. 22–34.
128. Das, T., Kutty, S.K., Kumar, N., and Manefield, M., 2013, Pyocyanin facilitates extracellular DNA binding to *Pseudomonas aeruginosa* influencing cell surface properties and aggregation, *PloS One*, 8(3), pp. e58299.
129. Poliseti1, S., Baig, N.F., Morales-Soto, N., Shrout, J.D., and Bohn1, P.W., 2017, Spatial Mapping of Pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* Bacterial Communities by Surface Enhanced Raman Scattering, *Physiology & Behavior*, 176(3), pp. 139–148.

PHỤ LỤC

Phụ lục 1. Các môi trường sử dụng trong xác định hoạt tính enzyme ngoại bào

❖ Môi trường thử hoạt tính protease (g/l)

NB: 8g

Casein: 10g

Agar: 17g

Nước: 1 lít

Chỉnh pH = 7,6 bằng NaOH

❖ Môi trường thử hoạt tính amylase (g/l)

NB: 8g

Tinh bột tan: 2g

Agar: 17g

Nước 1 lít

Chỉnh pH7,6 bằng NaOH

❖ Môi trường thử hoạt tính Gelatinase

NB: 8g

Gelatine: 15g

Agar: 17g

Nước 1 lít

Chỉnh pH7,6 bằng NaOH

❖ Môi trường thử hoạt tính Lipase

NB: 8g

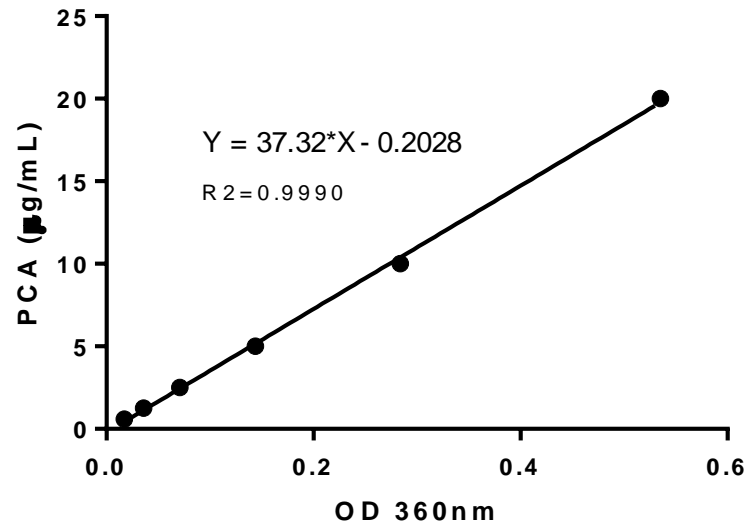
Agar: 17g

Nước: 1 lít

Chỉnh pH = 7,6 bằng NaOH. Sau khi khử trùng để nguội 50°C rồi bổ sung Tween-80 với tỷ lệ 1%

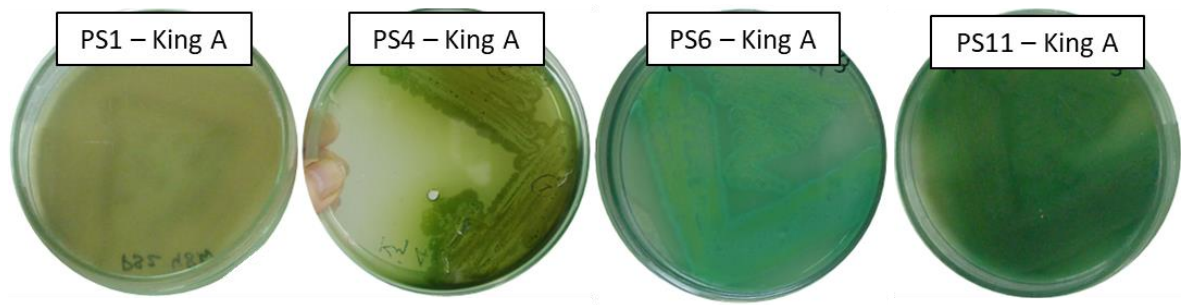
Phụ lục 2: Đường chuẩn PCA

PCA ($\mu\text{g/mL}$)	20	10	5	2.5	1.25	0.6
OD _{367nm}	0.535	0.284	0.144	0.071	0.036	0.017

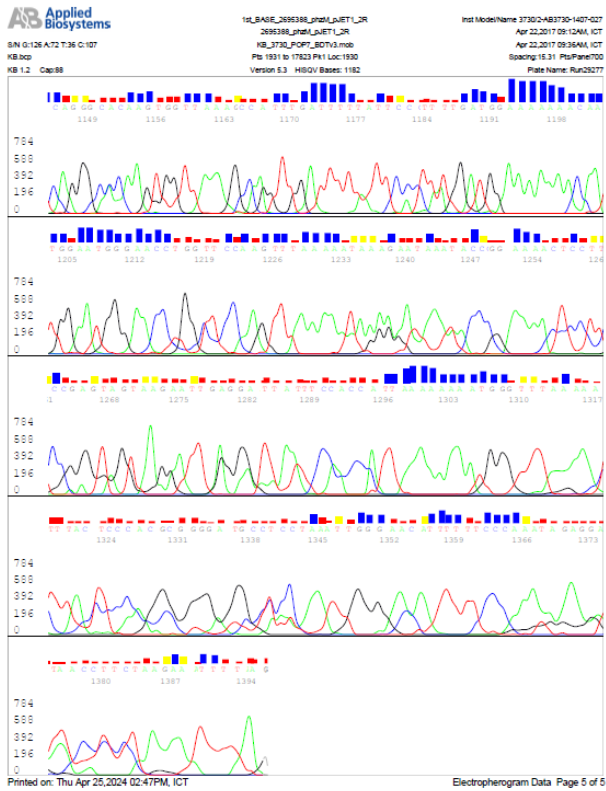
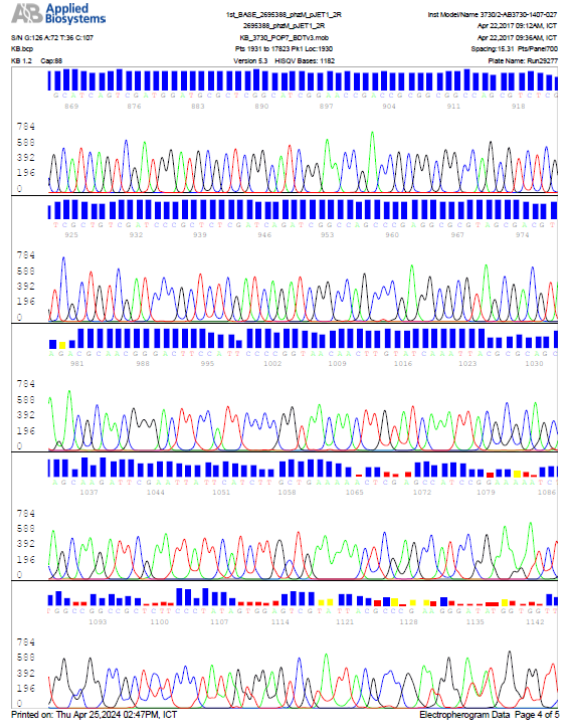
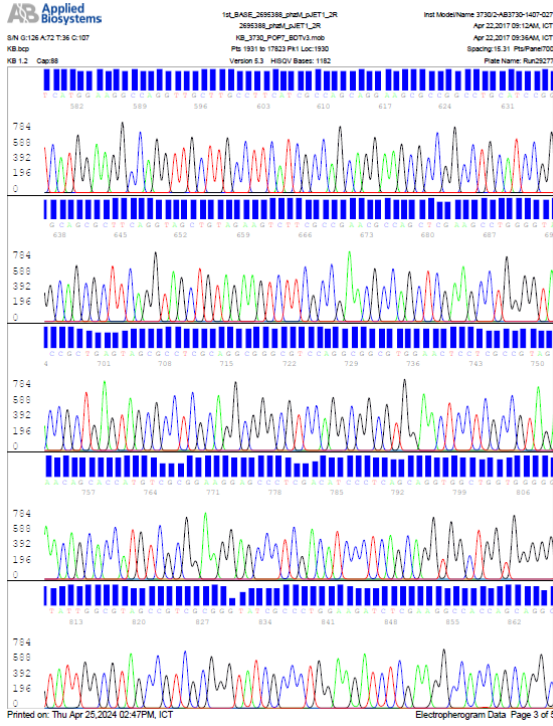


Phụ lục 3. Danh sách các chủng vi khuẩn phân lập và sàng lọc khả năng sinh pyocyanin

STT	Kí hiệu chủng	Khả năng sinh pyocyanin ($\mu\text{g/mL}$)	Nguồn gốc
1	PS5	0	Bộ sưu tập của phòng Công nghệ sinh học tái tạo môi trường, các chủng được phân lập từ các mẫu nước, bùn ao nuôi tôm tại các tỉnh Quảng Ninh, Nam Định.
2	PS8	0	
3	PS9	0	
4	PS10	0	
5	PS12	0	
6	PS39	15,02 \pm 0,56	
7	PS40	0	
8	PS41	0	
9	PS42	0	
10	PS43	0	
11	PS1	0	Bùn ao tôm - Tiên Yên, Quảng Ninh
12	PS2	11,04 \pm 0,79	
13	PS3	12,06 \pm 0,56	
14	PS4	6,01 \pm 1,2	Nước nuôi cá - Ninh Bình
15	PS6	10,03 \pm 0,7	Xoang tiêu hóa tôm – Ninh Bình
16	PS7	0	
17	PS11	11,05 \pm 0,46	Ruột tôm - Ninh Bình
18	PS17	0	
19	PS21	0	Bùn đáy ao nuôi cá- Nam Định
20	PS22	0	
21	PS23	0	
22	PS25	0	
23	PS26	0	
24	PS27	0	
25	PS28	0	
26	PS33	9,07 \pm 0,89	
27	PS35	12,09 \pm 0,7	Nước ao nuôi cá - Nam Định
28	PS44	7,06 \pm 0,62	Ruột cá - Nam Định

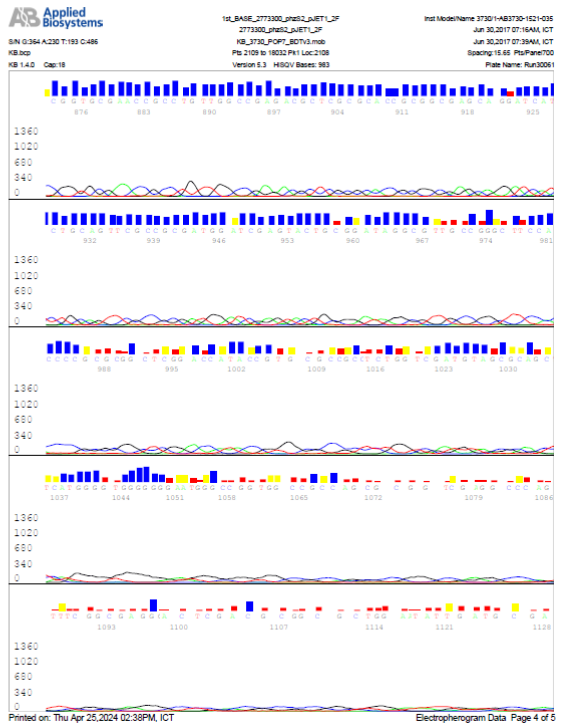
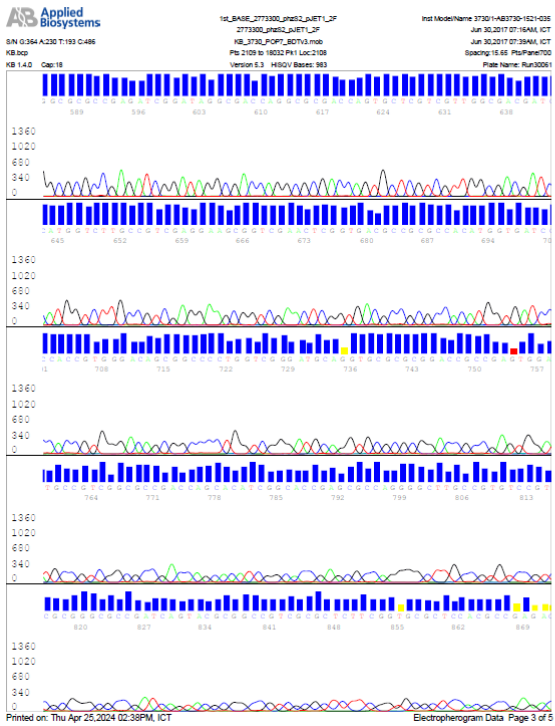
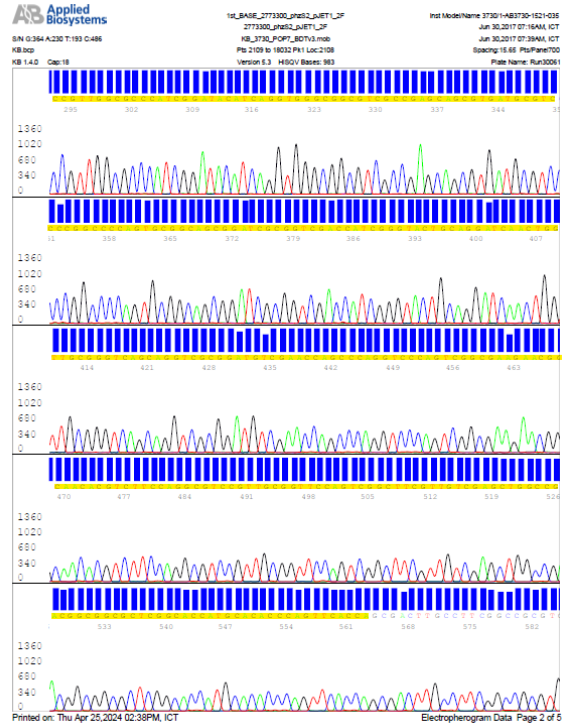
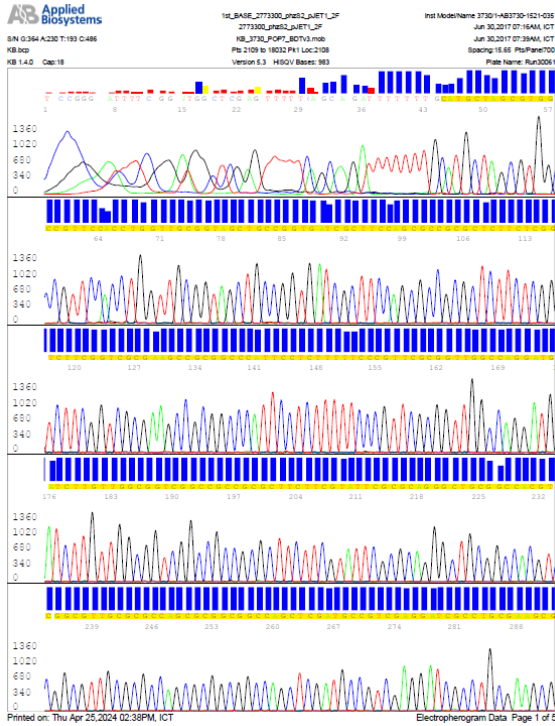


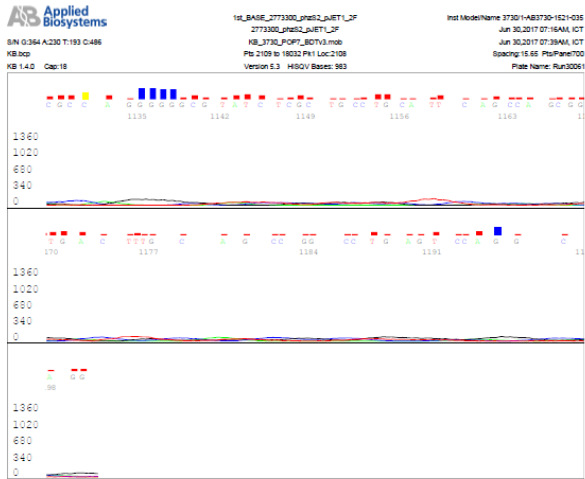
Hình ảnh một số chủng phân lập được từ mẫu thu thập tại Quảng Ninh và Ninh Bình



Phổ giải trình tự nucleotide của gen *phzS*:

phzS_pJET1_2F

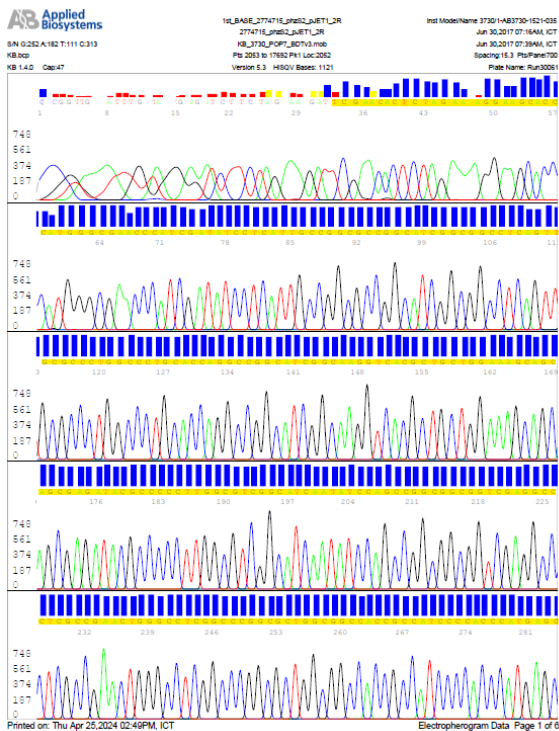




Printed on: Thu Apr 25, 2024 02:38PM, ICT

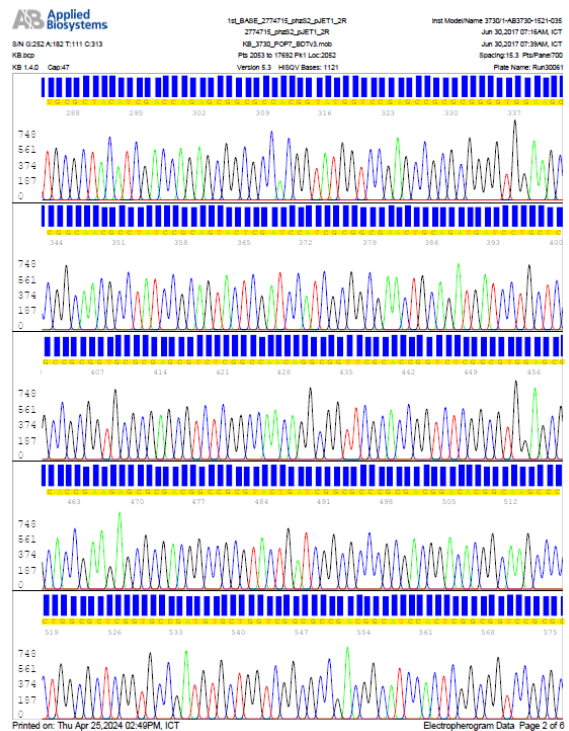
Electropherogram Data Page 5 of 5

phzS_pJET1_2R



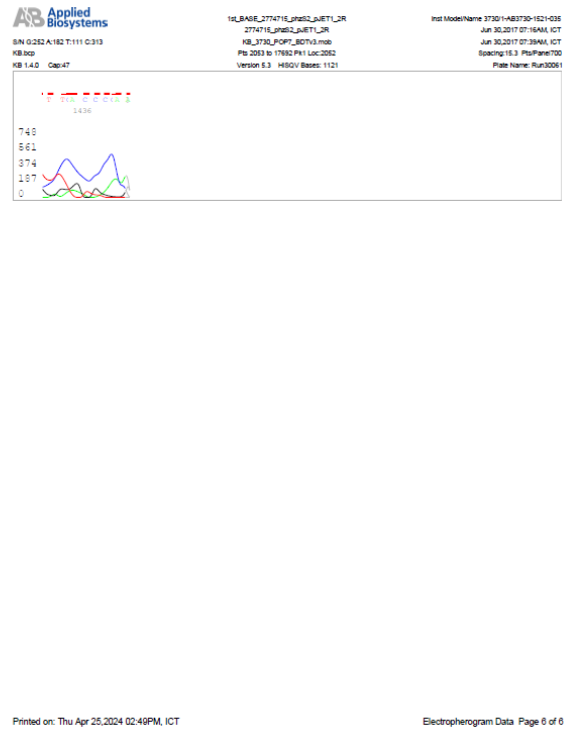
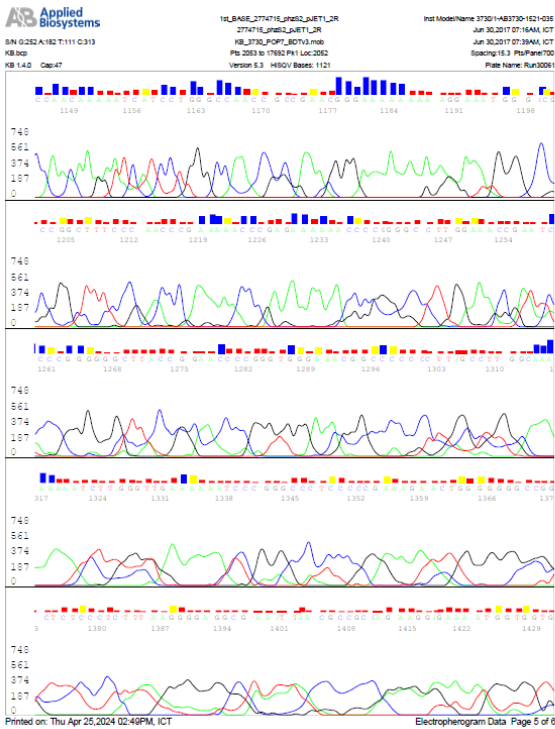
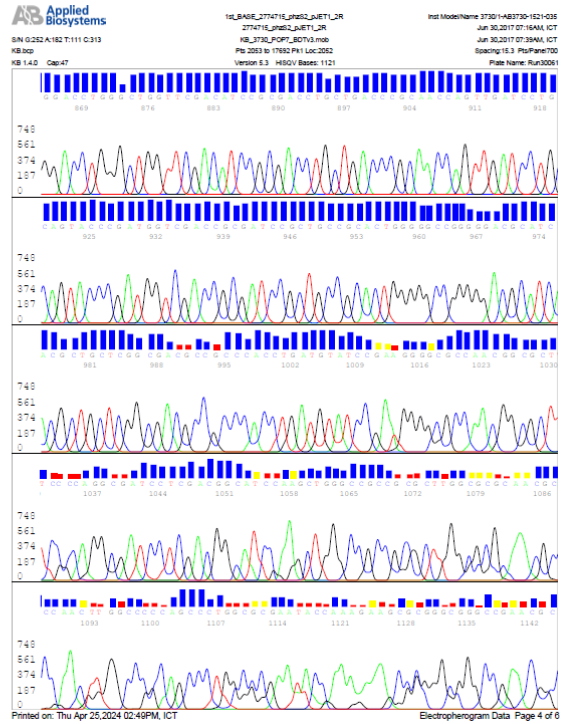
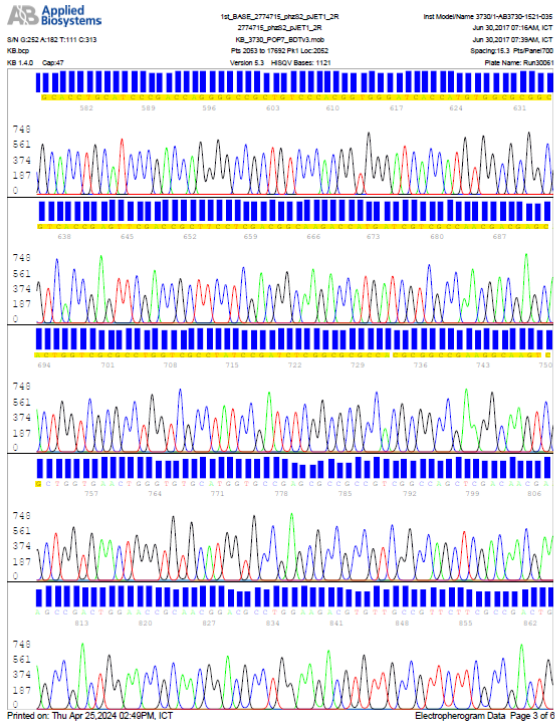
Printed on: Thu Apr 25, 2024 02:49PM, ICT

Electropherogram Data Page 1 of 6



Printed on: Thu Apr 25, 2024 02:49PM, ICT

Electropherogram Data Page 2 of 6



Phụ lục 5. Trình tự nucleotide của gen *phzM* từ chủng *P. aeruginosa* PS39

```
1 atgaataatt cgaatcttgc tgctgcgcgt aatttgatac aagttgttac cggggaatgg
61 aagtcccgtt gcgtctacgt cgctacgcgc ctgggctgg ccgatctgat cgagagcggg
121 atcgacagcg acgagacgct ggccgcccgc gtcggttccg atgccgagcg catccatcga
181 ctgatgcgcc tgctggtggc cttcgagatc ttccagggcg ataccgcga cggctacgcc
241 aatacccca ccagccacct gctgagggat gtcgagggct cctccgcga catggtgctg
301 ttctacggcg aggagttcca cgccgcctgg acgcccgcct gcgagggcgt actcagcggg
361 accccaggct tcgagctggc gttcggcgaa gacttctaca gctacctgaa gcgctgcccg
421 gatgcaggcc ggcgcttcct gctggcgatg aaggcaagca acctggcctt ccatgagatc
481 cccaggctcc tggatttccg cgggcgtagc ttcgtcgacg tcggtggcgg ttccggcgaa
541 ttgaccaagg ccatcctgca ggccgagccc agcggccggg gcgtgatgct cgaccgcgag
601 ggttccctcg gcgtggcccg cgacaacctc tccagcctgt tggcagggga gcgctcagc
661 ctggtgggcg gcgacatgct gcaagaggtg ccgtccaacg gcgatatcta cctgctgtcg
721 cggatcatcg gcgatctgga cgaagccgcc agcctgaggt tgctcggcaa ttgccgcgag
781 gcgatggccg gcgacggccg ggtggcggtg atcgagcgaa ccatctcggc cagcgagccg
841 tcgccgatgt cgggtgctctg ggacgtgcac ctgttcatgg cctgcgctgg ccgccaccgc
901 accaccgagg aggtggtcga cctgctcggg cgcggcggtc tcgcggtgga gcggatcgtc
961 gacctgccga tggaaaccgc catgatcgtc gctgccaggg cctgaatcgg aactttcaac
1021 gg//
```

Phụ lục 6. Thông tin đăng ký trên Ngân hàng gen của gen *phzM* (dưới định dạng GenBank)

LOCUS MF673740 1022 bp DNA linear BCT 04-
JUL-2018
DEFINITION *Pseudomonas aeruginosa* strain PS39 phenazine specific
methyltransferase (*phzM*) gene, complete cds.
ACCESSION MF673740
VERSION MF673740.1
KEYWORDS .
SOURCE *Pseudomonas aeruginosa*
ORGANISM *Pseudomonas aeruginosa*
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria;
Pseudomonadales;
Pseudomonadaceae; *Pseudomonas*.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1022)
AUTHORS Nguyen,L.T.T., Nguyen,U.H., Nguyen,T.C., Nguyen,T.H. and
Nguyen,V.Q.
TITLE Efficiency of pyocyanin biosynthesis in a genetic modified
Pseudomonas aeruginosa PS39
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 1022)
AUTHORS Nguyen,L.T.T., Nguyen,U.H., Nguyen,T.C., Nguyen,T.H. and
Nguyen,V.Q.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (16-AUG-2017) Institute of Biotechnology, 18 Hoang
Quoc
Viet street, Cau Giay District, Ha Noi 100000, Viet Nam
COMMENT ##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..1022
/organism="*Pseudomonas aeruginosa*"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="PS39"
/isolation_source="Pond of fish culture"
/db_xref="taxon:287"
gene 1..1005
/gene="phzM"
CDS 1..1005
/gene="phzM"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="phenazine specific methyltransferase"
/protein_id="AWX68796.1"

Phụ lục 7. Trình tự nucleotide của gen *phzS* từ chủng *P. aeruginosa* PS39

```
1 tcgaacactc tagaaaagga agcaccatg ggcgaacca tcgatatacct cattgcccgc
61 gccggcatcg gcggcctcag ttgcgccctg gccctgcacc aggccggcat cggcaaggtc
121 acgtgctgg aaagcagcag cgagatacgc ccccttggcg tcggcatcaa tatccagccg
181 gcggcggtcg aggccctcgc cgaactgggc ctccggcccgg cgctggcggc caccgccatc
241 cccacccatg agctgcgcta catcgaccag agcggcgcca cggtatggtc cgagccgcgc
301 ggggtggaag ccggcaacgc ctatccgag tactcgatcc atcgcggcga actgcagatg
361 atcctgctcg ccgcggtgcg cgagcgtctc ggccaacagg cggttcgcac cggctctggc
421 gtggagcgca ccgaagagcg cgacggccgc gtactgatcg gcgcccgca cggacacggc
481 aagcccctgg cgctcgggtc cgatgtgctg gtcggcgccg acggcatcca ctccggcgtc
541 cgcgcgcacc tgcattccga ccaggggccc ctgtcccacg gtgggatcac catgtggcgc
601 ggcgtcaccg agttcgaccg cttcctcgac ggcaagacca tgatcgtcgc caacgacgag
661 cactggtcgc gcctggtcgc ctatccgatc tcggcgcgcc acgcggccga aggcaagtcg
721 ctggtgaact ggggtgtgcat ggtgccgagc gccgccgctc gccagctcga caacgaagcc
781 gactggaacc gcaacggacg cctggaagac gtggtgccgt tcttcgccga ctgggacctg
841 ggctggttcg acatccgcga cctgctgacc cgcaaccagt tgatcctgca gtaaccgatg
901 gtcgaccgcg atccgctgcc gcaactggggc cggggacgca tcacgctgct cggcgacgcc
961 gccacactga tgtatccgat gggcgccaac ggcgcttcgc aggcgatcct cgacggcatc
1021 gagctggccg ccgcgctggc gcgcaacgcc gacgtggccg cagccctgcg cgaatacgaa
1081 gaagcgcggc ggccgaccgc caacaagatc atcctggcca accgcgaacg ggaaaaagag
1141 gaatgggccg cggcttcgcg accgaagacc gagaagagcg cggcgctgga agcgatcacc
1201 gccagctacc gcaaccaggt ggaacggcca cgctagcatg caaaaaa//
```

Phụ lục 8. Thông tin đăng ký trên Ngân hàng gen của gen *phzS* (dưới định dạng GenBank)

```

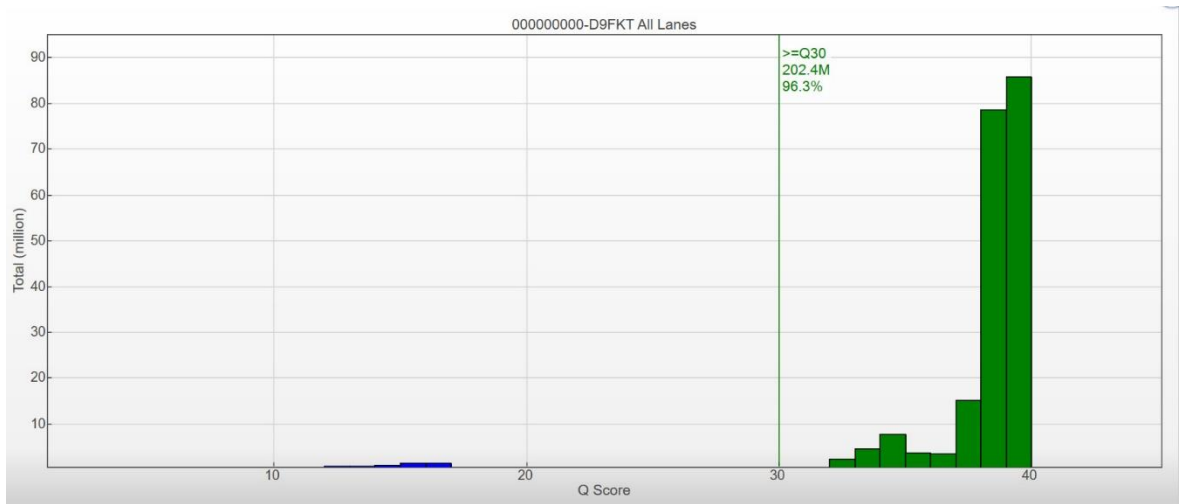
LOCUS       MF770713                1247 bp    DNA     linear   BCT 04-
JUL-2018
DEFINITION Pseudomonas aeruginosa strain PS39 putative flavin-containing
            monooxygenase (phzS) gene, complete cds.
ACCESSION   MF770713
VERSION     MF770713.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Pseudomonas aeruginosa
            ORGANISM Pseudomonas aeruginosa
                Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria;
                Pseudomonadales;
                Pseudomonadaceae; Pseudomonas.
REFERENCE   1 (bases 1 to 1247)
            AUTHORS Vinh,N.Q., Uyen,N.H., Thuan,N.C. and Loi,N.T.T.
            TITLE    Efficiency of pyocyanin biosynthesis in a genetic modified
                    Pseudomonas aeruginosa PS39
            JOURNAL  Unpublished
REFERENCE   2 (bases 1 to 1247)
            AUTHORS Vinh,N.Q., Uyen,N.H., Thuan,N.C. and Loi,N.T.T.
            TITLE    Direct Submission
            JOURNAL  Submitted (25-AUG-2017) Institute of Biotechnology, 18 Hoang
            Quoc
                Viet street, Cau Giay District, Ha Noi 100000, Viet Nam
FEATURES             Location/Qualifiers
     source           1..1247
                     /organism="Pseudomonas aeruginosa"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="PS39"
                     /isolation_source="Pond of fish culture"
                     /db_xref="taxon:287"
                     /country="Viet Nam"
     gene             28..1236
                     /gene="phzS"
     CDS              28..1236
                     /gene="phzS"
                     /codon_start=1
                     /transl_table=11
                     /product="putative flavin-containing monooxygenase"
                     /protein_id="AWX68830.1"

```


Read 3

Lane	Tiles	Density (K/m ²)	Clusters PF (%)	Legacy Phasing/Prephasing rate	Phasing slope/offset	Prephasing slope/offset	Cluster Count Row (M)	Cluster Count PF (M)	% \geq Q30	Yield (G)	Cycles Error Rate	Aligned (%)	Error Rate (%)	Error Rate 35 cycle (%)	Error Rate 75 cycle (%)	Error Rate 100 cycle (%)	Intensity Cycle 1
1	2	501 \pm 0	96.27 \pm 2.30	0.195 / 0.130	NaN / NaN	NaN / NaN	0.70	0.68	96.03	0.10	0	0.00 \pm 0.00	NaN \pm NaN	NaN \pm NaN	NaN \pm NaN	NaN \pm NaN	195 \pm 5

Chất lượng mẻ chạy



Phụ lục 10. Trình tự Plasmid pUCP24-phzMS

LOCUS MZ399165 6266 bp DNA circular SYN 12-OCT-2022
DEFINITION Shuttle vector pUCP24-phzMS, complete sequence.
ACCESSION MZ399165
VERSION MZ399165.1
KEYWORDS .
SOURCE Shuttle vector pUCP24-phzMS
ORGANISM Shuttle vector pUCP24-phzMS
other sequences; artificial sequences; vectors.
REFERENCE 1 (bases 1 to 6266)
AUTHORS West SE, Schweizer HP, Dall C, Sample AK and Runyen-Janecky LJ.
TITLE Construction of improved Escherichia-Pseudomonas shuttle vectors
derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in Pseudomonas aeruginosa
JOURNAL Gene 148 (1), 81-86 (1994)
PUBMED 7926843
REFERENCE 2 (bases 1 to 6266)
AUTHORS Vinh,N.Q., Loi,N.T.T., Uyen,N.H., Thuan,N.C. and Trang,N.H.
TITLE The recombinant plasmid pUCP24-phzMS in boosting production of pyocyanin in Pseudomonas aeruginosa PS39-phzMS strain
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 3 (bases 1 to 6266)
AUTHORS Vinh,N.Q., Loi,N.T.T., Uyen,N.H., Thuan,N.C. and Trang,N.H.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (13-JUN-2021) Vast Culture Collection of Microorganisms,
Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet Street, Hanoi, Cau Giay 10000, Vietnam
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..6266
/organism="Shuttle vector pUCP24-phzMS"
/mol_type="other DNA"
/db_xref="taxon:2983419"
gene complement(1436..2644)
/gene="phzS"
CDS complement(1436..2644)
/gene="phzS"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="putative flavin-containing monooxygenase"
/protein_id="UXX42323.1"

1 cctctcaggc ggcgctggtg ccgctggttg gacgccaaagg gtgaatccgc ctcgataccc
61 tgattactcg cttcctgcgc cctctcaggc ggcgataggg gactggtaaa acgggggattg
121 cccagacgcc tccccgcgcc cttcaggggc acaaatgcgg ccccaacggg gccacgtagt
181 ggtgctgttt ttgctgttcc acccttttct tccttttccc ttttaaacct tttaggacgt
241 ctacaggcca cgtaatccgt ggctgtaga gtttaaaaag ggacggattt gttgccatta
301 agggacggat ttgttgtaa gaaggacgg atttgttgtt gtaaaggac ggatttgtg
361 tattgtggga cgcagataca gtgtcccctt atacacaagg aatgtcgaac gtggcctcac
421 ccccaatggt ttacaaaagc aatgccctgg tcgaggccgc gtatcgctc agtgttcagg
481 aacagcggat cgttctggcc tgtattagcc aggtgaagag gagcgagcct gtcaccgatg
541 aagtgatgta ttcagtgcgc gcgaggaca tagcgacgat ggcggtgtc cctatcgaat
601 cttcctacaa ccagctcaaa gaagcggccc tgcgcctgaa acggcgggaa gtccgggttaa
661 cccaagagcc caatggcaag gggaaaagac cgagtgtgat gattaccggc tgggtgcaaa

721 caatcatcta ccgggaggggt gagggccgtg tagaactcag gttcaccaaa gacatgctgc
781 cgtacctgac ggaactcacc aaacagttca ccaaatacgc cttggctgac gtggccaaga
841 tggacagcac ccacgcgac aggttttacg agctgctcat gcaatgggac agcatcggcc
901 agcgcgaaat agaaattgac cagctgcgaa agtgggttca actggaaggc cggtatccct
961 cgatcaagga cttcaagttg cgagtgtttg atccagccgt gacgcagatc aacgagcaca
1021 gccgcgtaca ggtggagtgg gcgcagcgaa agaccgggcy caaggtcaca catctgttgt
1081 tcagttttgg accgaagaag cccgccaaag cggtaggtaa ggccccagcy aagcgcaagg
1141 ccgggaagat ttcagatgct gagatcgcga aacaggctcy ccctggtgag acatgggaag
1201 cggccccgcy tcgactaacc cagatcccy tggatctggc cttagaggcy tggccaccac
1261 ggccccgcyt gcctttcagc ctgcgcaact gttgggaagg gcgataagt tgggtaacgc
1321 cgctattacg ccagctggcy aaaggggat gtgctgcaag gcgattaagt tgggtaacgc
1381 cagggttttc ccagtcacga cgttgtaaaa cgacggccag tgccaagctt gcatgctagc
1441 gtggccgttc cacctggttg cggtagctgc cggtagctgc ttccagcgc ccgctcttct
1501 cggctctcgg tcgcaagcc gcggccatt cctcttttc ccgttcgcy tttggccagga
1561 tgatcttgtt ggcggtcggc cgcgcgctt cttcgtattc gcgcagggt gcgcccacgt
1621 cggcgttgcy gccagcgcy gcggccagct cgatgccctc gaggatcgc tgcgaagcgc
1681 cgttgccgc ccacggatac atcaggtggg cggcgtcgc gagcagcgt atgctccc
1741 ggccccagtg cggcagcga tcgcggtcga ccacgggta ctgcaggatc aactggttg
1801 gggctcagcag gtcgcgatg tcgaaccagc ccaggctcca gtcggcgaag aacggcaaca
1861 cgtcttcag gcgtccgttg cggttccagt cggcttcgtt gtcgagctgg ccgacggcgy
1921 cgctcggcac catgcacacc cagttcacca gcgacttgcc ttcggccgcy tggcgcgcy
1981 agatcggata ggcgaccag cygcgaccag gctcgtcgtt ggcgacgatc atggtcttgc
2041 cgtcaggaa gcggtcgaac tcggtgacgc cgcgccacat ggtgatcca ccgtgggaca
2101 gcggccccctg gtcgggatgc aggtgcgcy ggaccgccga gtggatgcy tgcggccga
2161 ccagcacatc ggcaccgagc gccagggct tgcctgtcc gtcgcyggcy ccgatcagta
2221 cgcggccgcy gcgctcttcg gtcgctcca cgcagagacc ggtgcgaacc gcctgttggc
2281 actagcctc gcgcaccgcy gcgacagga tcatctgcag ttcgcygcy tggatcagt
2341 agtcgggata ggcgttgcy gcttcaccc cgcgcgctc ggaccatacc gtcgcygcy
2401 tctggtcgat gtagegcagc tcatgggtg ggatggcgtt ggcgccagc gccggyccga
2461 ggcccagttc ggcgagggcc tcgaccgcy ccggtggat attgatgcy acgccaagg
2521 ggcgtatctc gctgctgctt tcagcagcy tgacctgcy gatgccgcy tgggtcaggy
2581 ccagggcga actgagggcy ccgatgccy cgcggcaat gaggatatc atgggttcgc
2641 ccattgggtg ttcctttct agaggatccc cccgttgaa gttccgattc aggcctggc
2701 agcagcagtc atgcyggtt ccacggcag gtcgacgac cgtccaccy cgaagccgc
2761 gcgccgagc aggtcgacca cctcctcgtt ggtgcggtg cggccagcy aggccatgaa
2821 caggtgcagc tcccagagca ccgacatcgy cgacggctcy ctggccgaga tggctcgtc
2881 gatcaccacc acccgccgt cgcggccat cgcctcgcgy caattgccga gcaacctcag
2941 gctggcggct tcgtccagat cgcgatgat ccgcgacagc aggtagatat cgccttgya
3001 cggcacctct tgcagcatg cgcgccccac caggctgac cyctcccctg ccaacaggct
3061 ggagaggtt tgcggygca cgcgaggya accctcgcgy tcgagcatca cgcgccggy
3121 gctgggctcy gcctgcagga tggccttgyt caattcgcgy gaaccgccac cgacgtcagc
3181 gaagctacgc ccgcygaaat ccaggagcct ggggatctca tggaaagcca ggttgccttgc
3241 cttcatcgc agcaggaagc gccggcctgc atccggcag cycttcaggt agctgtagaa
3301 gctctcgcgy aacgccagct cgaagcctgy ggtaccctcy agtagcctc cgcagcgy
3361 cgtccagcy gcggtgaaact ctcgcygta gaacagcacc atgtcgcga aggagccctc
3421 gacatccctc agcaggtgcy tgggtggggt attggcgtag ccgtcgcgy tatcgcctcy
3481 gaagatctcy aaggccacca gcagggcag cagtcgatgy atgctcgy catcgyaac
3541 gaccgcygcy gccagcgtct cgtcgtgct gatccgctc tcgatcagat cggccagccc
3601 gaggcgcgta gcgagctaga cgcacggga cttccattc ccgtaacaa cttgtatcaa
3661 attacgcgca gcagcaagat tcgaattatt catgggtacc gagctcgaat tcgtaatcat
3721 gtcatagcty tttcctgtgt gaaattgta tccgctcaca attccacaca acatacagc
3781 cggaaagcata aagtgtaaag cctggggtgc ctaatgagty agctaactca cattaattgc
3841 gttgcgctca ctgcccgtt tcagtcggy aaacctgcty tgcagctgc ataatgaa
3901 cggccaacgc gcggggagag gcggttgcy tattggcgc tctccgctt cctcgtcac
3961 tgactcgtcy cgtcggctcy ttcggtcgy gcgagcgyta tcagctcact caaagcgyt
4021 aatacggtta tccacagaat caggggataa cgcaggaag aacatgtgag caaaggyca
4081 gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggcgc gttgctggy tttttccata ggctccgccc
4141 ccctgacgag catcacaana atcagcctc aagtcagag tggcgaacc cgacaggact
4201 ataaagatac caggcgtttc cccctggaag ctccctcgt cyctctctcy ttcgacct
4261 gccgcttacc ggatacctgt ccgctttct ccttcggya agcgtggyc tttctcatag
4321 ctacgctgt aggtatctca gttcgggtga ggtcgttcgc tccaagctgy gctgtgtga
4381 cgaaccccc gttcagcccy accgctcgc cttatccgt aactatcgt ttgagtcaa
4441 cccggtaaaga cacgacttat cgcactggy agcagccact ggtaacagga ttagcagagc

```

4501 gaggtatgta ggcggtgcta cagagttctt gaagtgggtg cctaactacg gctacactag
4561 aagaacagta tttggtatct gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa aaagagttgg
4621 tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg ggTTTTTTTg tttgcaagca
4681 gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacgggggtc
4741 tgacgctcag tggaaacgaaa actcacgtta agggattttg gtcatgagat tatcaaaaaa
4801 gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa atgaagtttt aaatcaatct aaagtatata
4861 tgagtaaact tggctctgaca gttaccaatg cttaatcagt gaggcaccta tctcagcgat
4921 ctgtctattt cgttcatcca tagttgctg actccccgct gtgtagataa ctacgatacg
4981 ggagggctta ccactctggcc ccagtctgct aatgataccg cgagaccac gctcaccggc
5041 tccagattta tcagcaataa accagccagc cgggaaggcc gagcgcagaa gtggtcctgc
5101 aactttatcc gcctccatcc agtctattaa ttggtgcccg gaagctagag taagttagttc
5161 gccagttaat agtttgcgca acgttggtgc cattgctaca ggcatcgtgg tgtcacgctc
5221 gtcgtttggt atggcttcat tcagctccgg ttcccaacga tcaaggcgag ttacatgatc
5281 ccccatgttg tgcaaaaaag cggttagctc ctccggtcct ccgatcgttg tcagaagtaa
5341 gttggccgca gtgttatcac tcatggttat ggcagcactg cataattctc ttactgtcat
5401 gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg tgagtcgaat tggccgcgcc gttgtgacaa
5461 tttaccgaac aactccgagg ccgggaagcc gatctcggct tgaacgaatt gttaggtggc
5521 ggtacttggg tcgatatcaa agtgcacac ttcttcccgt atgcccact ttgtatagag
5581 agccactgag ggatcgtcac cgtaatctgc ttgcacgtag atcacataag caccaagcgc
5641 gttggcctca tgcttgagga gattgatgag cgcggtggca atgcccctgcc tccggtgctc
5701 gccggagact gcgagatcat agatatagat ctactacgc ggctgctcaa acttggggag
5761 aacgtaagcc gcgagagcgc caacaaccgc ttcttggtcg aaggcagcaa gcgcatgaa
5821 tgtcttacta cggagcaagt tcccagggtg atcggagtc ggctgatgtt gggagtaggt
5881 ggctacgtct ccgaactcac gaccgaaaag atcaagagca gcccgcattg atttgacttg
5941 gtcagggccg agcctacatg tgogaatgat gccatactt gagccaccta actttgtttt
6001 agggcgactg ccctgctgag taacatcgtt gctgctgctg aacatcgttg ctgctccata
6061 acatcaaaaa acagtcataa caagccatga aaaccgccac tgcgccgta ccaccgctgc
6121 gtacaaaaaa acagtcataa caagccatga aaaccgccac tgcgccgta ccaccgctgc
6181 gttcgggtcaa ggttctggac cagttgctg agcgcatacg ctacttgcac tacagtttac
6241 gaaccgaaca ggcttatgtc aattcg//

```

Chú thích:

Atgcatgc: vị trí gắn ribosome và vị trí gen pR01614rep (411-1244)

Atgcatgc: vị trí gắn ribosome và vị trí gen pUCGM aacC1 (5511-6044, mạch bổ sung)

Atgcatgc: vị trí mỗi xuôi M13_pUC (1390-1412)

Atgcatgc: vị trí mỗi ngược M13_pUC (3734-3756, mạch bổ sung)

Atgcatgc: vị trí Lac-promotor (3770-3799, mạch bổ sung)

Atgcatgc: vị trí gắn ribosome Lac (3732-3736, mạch bổ sung)

Atgcatgc: Vị trí gen *phzM* (2672-3693, mạch bổ sung)

Atgcatgc: Vị trí gắn ribosome gen *phzS* (1436-2644, mạch bổ sung)

Phụ lục 11. Kết quả phân tích pyocyanin bằng HPLC

VIỆN HÓA SINH BIÊN
TRUNG TÂM TIÊN TIẾN VỀ HÓA SINH HỮU CƠ

Địa chỉ: Tòa nhà B1, 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội
Điện thoại: 024.32121509 Fax: 024.37917054

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

Số: 18.177/KQ

KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM

Mã số mẫu: 181119-177



Tên khách hàng: Nguyễn Thị Thanh Lợi

Địa chỉ: Viện Công nghệ Sinh học

Tên mẫu: PYO dịch chiết từ *Pseudomonas aeruginosa* PS39-phz

Số lượng mẫu: 01

Số lô:

Số ĐK/CNTC:

Tình trạng mẫu: Mẫu dạng lỏng, đựng trong eppendorf kín.

Ngày nhận mẫu: 19/11/2018

Ngày trả kết quả: 05/12/2018

Kết quả thử nghiệm:

STT	Chỉ tiêu thử nghiệm	Phương pháp thử nghiệm	Đơn vị	Kết quả
1	Đánh giá cảm quan	ACBC-GM-D.07		Mẫu lỏng, màu xanh dương
2	Pyocyanin*	Nội bộ (HPLC)	µg/mL	278,97 (nguyên trạng)

Ghi chú:

Kết quả ghi trên phiếu này chỉ có giá trị đối với mẫu đã gửi phân tích, tên mẫu và tên khách hàng được ghi theo yêu cầu của khách hàng.

Khi sao chép phải đảm bảo toàn vẹn nội dung phiếu kết quả thử nghiệm này, các trích dẫn một phần không có giá trị nếu không có sự đồng ý bằng văn bản của Trung tâm tiên tiến về Hóa sinh hữu cơ.

(*): Chỉ tiêu không được VILAS công nhận (ISO/IEC 17025:2005).

(a): Chỉ tiêu gửi nhà thầu phụ, KPH: Không phát hiện, LOD: Giới hạn phát hiện.

Thời gian lưu mẫu: 5 ngày kể từ ngày trả kết quả.

Trung tâm không tiếp nhận các trường hợp khiếu nại khi không có mẫu lưu.

Hà Nội, ngày 05 tháng 12 năm 2018

PHỤ TRÁCH KỸ THUẬT

Nguyễn Hải Đăng

GIÁM ĐỐC TRUNG TÂM

Phạm Văn Cường

Số: 18.176/KQ

KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM

Mã số mẫu: 181119-176



Tên khách hàng: Nguyễn Thị Thanh Lợi

Địa chỉ: Viện Công nghệ Sinh học

Tên mẫu: PYO mẫu từ *Pseudomonas aeruginosa* PS39-phz

Số lượng mẫu: 01

Số lô:

SỐ ĐK/CNTC:

Tình trạng mẫu: Mẫu dạng bột, đựng trong eppendorf kín.

Ngày nhận mẫu: 19/11/2018

Ngày trả kết quả: 05/12/2018

Kết quả thử nghiệm:

STT	Chỉ tiêu thử nghiệm	Phương pháp thử nghiệm	Đơn vị	Kết quả
1	Đánh giá cảm quan	ACBC-GM-D.07		Mẫu bột, màu xanh đen
2	Pyocyanin*	Nội bộ (HPLC)	mg/g	951,27 (nguyên trạng)
			%	95,13 (nguyên trạng)

Ghi chú:

Kết quả ghi trên phiếu này chỉ có giá trị đối với mẫu đã gửi phân tích, tên mẫu và tên khách hàng được ghi theo yêu cầu của khách hàng.

Khi sao chép phải đảm bảo toàn vẹn nội dung phiếu kết quả thử nghiệm này, các trích dẫn một phần không có giá trị nếu không có sự đồng ý bằng văn bản của Trung tâm tiên tiến về Hóa sinh hữu cơ.

(*): Chỉ tiêu không được VILAS công nhận (ISO/IEC 17025:2005).

(a): Chỉ tiêu gửi nhà thầu phụ, KPH: Không phát hiện, LOD: Giới hạn phát hiện.

Thời gian lưu mẫu: 5 ngày kể từ ngày trả kết quả.

Trung tâm không tiếp nhận các trường hợp khiếu nại khi không có mẫu lưu.

Hà Nội, ngày 05 tháng 12 năm 2018

PHỤ TRÁCH KỸ THUẬT

Nguyễn Hải Đăng

GIÁM ĐỐC TRUNG TÂM



Phạm Văn Cường

BÁO CÁO KẾT QUẢ PHÂN TÍCH HPLC

Người gửi mẫu: Nguyễn Thị Thanh Lợi

Đơn vị: Viện Công nghệ sinh học

SĐT: 0868 796 499

Email: thithanhloi.nguyen@gmail.com

Tên mẫu/số lượng mẫu: 02

STT	Tên mẫu	Mã hóa mẫu	Tình trạng mẫu
1	PYO mẫu từ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PS39-phz	181119-176	Mẫu dạng bột màu xanh đen
2	PYO dịch chiết từ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PS39-phz	181119-177	Mẫu dạng lỏng, màu xanh dương

Yêu cầu phân tích: Định lượng Pyocyanin trong mẫu thử nghiệm.

Chất tham chiếu	Độ sạch theo HPLC (%)
Pyocyanin	97

1. Hóa chất, thiết bị

- Dung môi hóa chất: Methanol và nước cất loại dùng cho phân tích và chạy HPLC (Fisher Scientific, USA).
- Đệm TFA, Merck, Germany.
- Máy LC-MS: Agilent 1260 Series Single Quadrupole LC/MS Systems, CA, USA.
- Cột sắc ký: Cột VertiSep GES C₁₈ (150 x 4.6 mm, 5 μ m) và cột bảo vệ GES C₁₈ của hãng Vertical.
- Bể rung siêu âm, model: Elmasonic S100 H, Germany.
- Micropipet loại 200, 1000 μ L, Eppendorf, Germany.
- Xylanh nhựa 5 mL.

- Màng lọc 0,45 μm cho kim bơm mẫu dùng để lọc mẫu trước khi bơm vào hệ thống.

2. Thiết lập các thông số cho hệ thống HPLC

- Pha động sử dụng hệ dung môi kênh A H_2O (0,05% TFA) – kênh B MeOH được thiết lập gradient biến thiên từ tỉ lệ 90/10 đến tỉ lệ 0/100 trong 40 phút.

- Tốc độ dòng: 0,5 mL/phút

- Lượng bơm mẫu: 5 μL .

- Thời gian phân tích: 25 phút.

- Nhiệt độ cột: 25°C

3. Chuẩn bị mẫu, thiết lập đường chuẩn định lượng

a. Chuẩn bị mẫu

- Chuẩn bị chất tham chiếu: mẫu chất tham chiếu được pha trong dung môi thành nồng độ 2 mg/mL, sau đó tiến hành pha loãng thành dãy các nồng độ khác nhau để thiết lập đường chuẩn định lượng.

- Chuẩn bị mẫu thử nghiệm: mẫu được trộn đều, cân lấy khối lượng xác định rồi pha trong dung môi MeOH thu được dung dịch mẫu có nồng độ chính xác.

- Các dung dịch chất tham chiếu và mẫu phân tích đều được lọc qua màng lọc 0,45 μm trước khi bơm vào hệ thống HPLC.

b. Thiết lập đường chuẩn định lượng

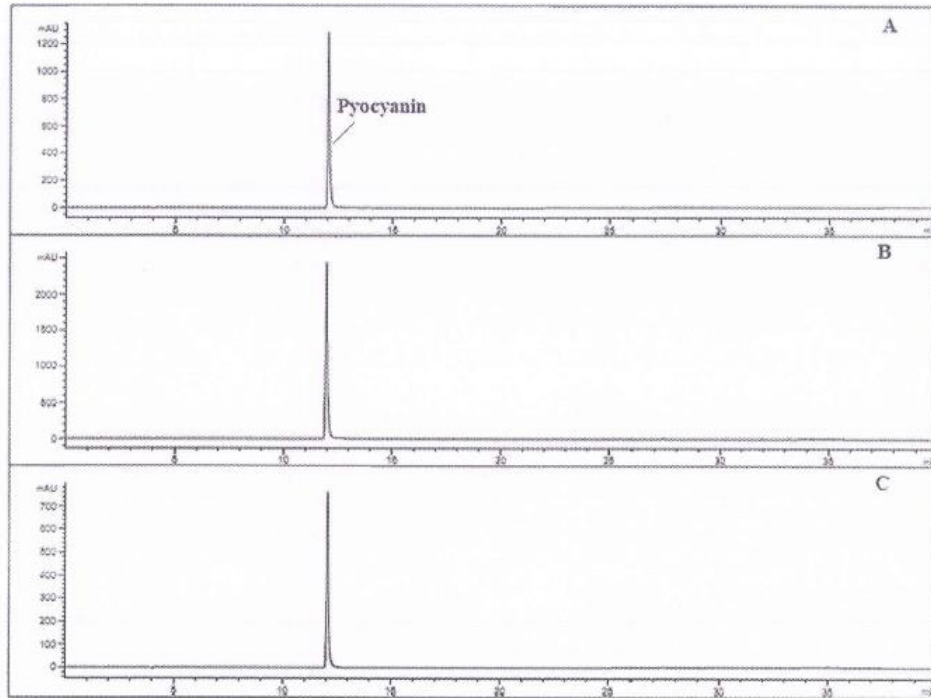
- Định lượng Pyocyanin:

+ Bước sóng lựa chọn: 280 nm

+ Trên hệ thống LC, pic tín hiệu được lựa chọn của Pyocyanin được phát hiện một cách ổn định tại thời gian lưu Rt 12,0 – 12,1 min đối với các mẫu chất tham chiếu dùng trong thang định lượng. Đường chuẩn được tính toán xây dựng bằng phần mềm Chemstation dựa trên diện tích pic UV 280 nm tại thời gian lưu Rt 12,0 – 12,1 min.

4. Kết quả

a. Phân tích các tín hiệu trên hệ thống LC



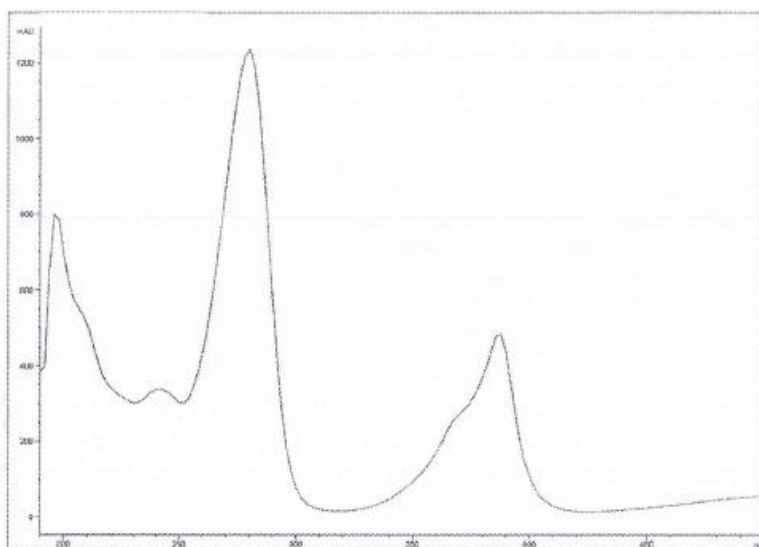
Hình 1: Sắc ký đồ UV 280nm của chất tham chiếu Pyocyanin (A) và mẫu thử nghiệm 181119-176 (B) và mẫu thử nghiệm 181119-177 (C).

b. Dựng đường chuẩn định lượng

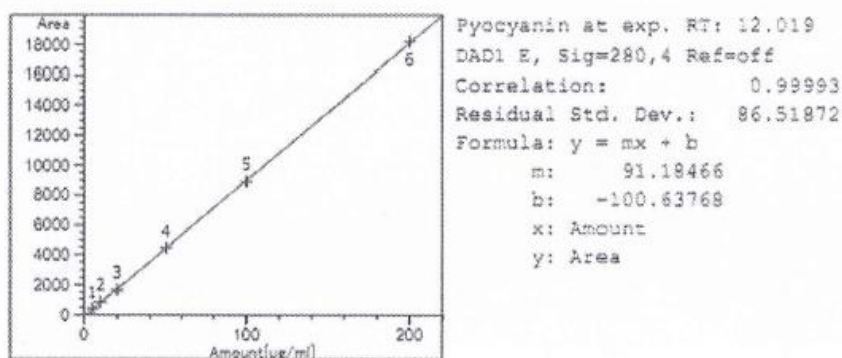
Đường chuẩn định lượng có dạng $y = ax + b$ được xây dựng dựa trên mối quan hệ giữa diện tích pic UV được chọn (y) và nồng độ tương ứng của chất tham chiếu (x). Đường chuẩn định lượng thu được đạt độ tuyến tính cao với hệ số tương quan $R^2 \geq 0,999$ đối với phương pháp định lượng bằng DAD.

Chất tham chiếu	Phương trình đường chuẩn	Hệ số tương quan
Pyocyanin	$Y = 91,18466x - 100,63768$	0,99993

PHỤ LỤC



Hình 1: Phổ UV của Pyocyanin



Hình 2: Đường chuẩn định lượng chất tham chiếu Pyocyanin

Bảng 1: Dải nồng độ định lượng của chất tham chiếu Pyocyanin

Level	1	2	3	4	5	6
C(µg/mL)	5	10	20	50	100	200

Phụ lục 12. Kết quả thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn

VIỆN HÓA SINH BIÊN

Phòng: Công nghệ sinh học

KẾT QUẢ THỬ HOẠT TÍNH

Ngày thực hiện: TS. Vũ Thị Quyên

Tên mẫu	Gram +			Gram -			Nấm men	Ghi chú
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC299212	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	<i>Bacillus cereus</i> ATCC13245	<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	<i>Salmonella enterica</i> ATCC13076	<i>Candida albicans</i> ATCC10231	
MIC (µg/ml)								
PYO	25	25	25	25	25	-	6,25	
IC50(µg/ml)								
PYO	12,77	12,57	12,67	12,33	13,03	-	3,69	
Đã lập lại 3 lần								
MIC								
Chủng	VPKG		VPTS	VPCM				
PYO	12,5		12,5	12,5				
IC50								
PYO	6,29		6,27	6,67				
Kháng Sinh	Streptomycin	256	256	128	32	256	128	-
	Tetramycin	4	16	64	8	256	256	-
	Kanamycin	128	4	8	128	64	16	
	Nistatin	-	-	-	-	-	-	8
	Cyclohexamide							32

Các chủng vi sinh vật kiểm định chuẩn quốc tế ATCC: 3 chủng vi khuẩn Gram – (*Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Salmonella enterica* ATCC12228), 3 chủng Gram + (*Enterococcus faecalis* ATCC13124, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC 13245), 1 chủng Nấm men *Candida albicans* ATCC10231 được cung cấp bởi viện Kiểm nghiệm vệ sinh an toàn thực phẩm quốc gia.

Phương pháp thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định

Hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định được thực hiện dựa trên phương pháp pha loãng đa nồng độ của (Hadacek F, Greger H., 2000). Đây là phương pháp thử hoạt tính kháng VSVKD và nấm nhằm đánh giá mức độ kháng khuẩn mạnh yếu của các mẫu thử thông qua các giá trị thể hiện hoạt tính là MIC (nồng độ ức chế tối thiểu). Mẫu ban đầu được pha loãng trong DMSO ở dải nồng độ giảm dần: 50µg/ml, 25µg/ml, 12,5µg/ml, 6,25µg/ml, 3,125µg/ml, 1,625µg/ml, 0,8125µg/ml và 0,40625 µg/ml với số thí nghiệm lặp lại N=3.

Chuẩn bị dung dịch vi khuẩn hoặc nấm với nồng độ 2×10^4 CFU/ml

Tiến hành thử: lấy 5,12 µl dung dịch mẫu thử có nồng độ 10mg/ml vào hàng đầu tiên có chứa 100µl môi trường LB rồi pha loãng nối tiếp giảm $\frac{1}{2}$ nồng độ vào các hàng có chứa 50µl cho đến khi đạt được nồng độ là 2 µg/ml, thêm 50 µl dung dịch vi khuẩn và nấm ở nồng độ 2×10^4 CFU/ml, ủ ở 37°C. Sau 24h, xác định sơ bộ giá trị MIC bằng quan sát. Giá trị MIC được xác định tại giếng có nồng độ chất thử thấp nhất gây ức chế hoàn toàn sự phát triển của vi sinh vật sau 24 giờ nuôi cấy và được xác định chính xác dựa trên số liệu đo độ đục tế bào bằng máy quang phổ Bioteck và phần mềm Raw data. Chất đối chứng là kháng sinh Streptomycin và Kanamycin cho các chủng vi khuẩn. Nistatin và cyclohexamide cho nấm.

Hà Nội, ngày 26 tháng 10 năm 2018

Xác nhận của Viện

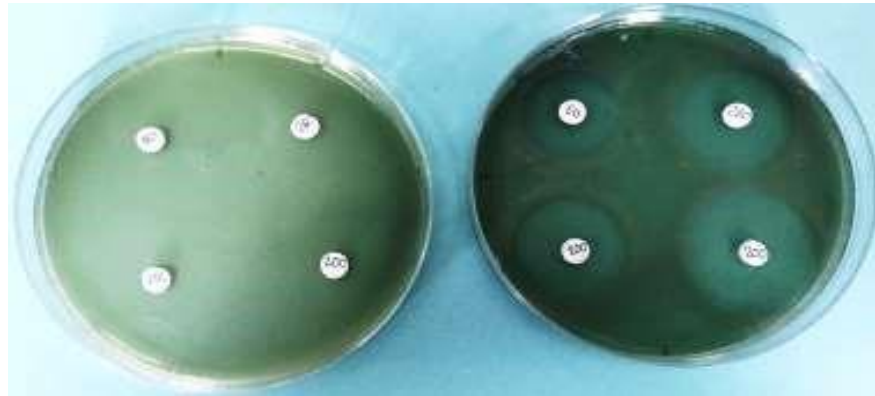


Trần Thị Phương Hoa

Người thực hiện

TS. Vũ Thị Quyên

Phụ lục 13. Hình ảnh khả năng kháng kháng sinh của chủng *P. aeruginosa* PS39



Khả năng kháng kháng sinh gentamycin của chủng tái tổ hợp *P. aeruginosa* PS39-phzMS (trái); chủng *P. aeruginosa* PS39 có vòng ức chế (phải)

Phụ lục 14. Bảng số liệu và hình ảnh các điều kiện ảnh hưởng đến quá trình sinh tổng hợp pyocyanin bởi chủng tái tổ hợp *P. aeruginosa* PS39-phzMS

1. Ảnh hưởng của các thành phần môi trường

Môi trường	PYO (mg/ml)		
	Mean	SD	n
KingA	23,6	0,05	3
KingA+A	10	0,05	3
KingA+G	12,4	0,1	3
AM	34,71	0,35	3
GM	35,57	0,26	3



5 loại môi trường (1) KingA, (2) KingA+A); (3) KingA+G; (4) AM; (5) GM

2. Ảnh hưởng của nồng độ axit glutamic

Axit glutamic (%)	PYO (mg/ml)		
	Mean	SD	n
0,75	25,27	0,34	3
1	39,8	0,43	3
1,25	42,07	0,34	3
1,5	49,57	1,71	3



GM1: 0,75%; GM2: 1%; GM3: 1,25%; GM4: 1,5%

3. Ảnh hưởng của pH môi trường

pH	pH 6			pH 7			pH 8			pH 9		
	Mean	SD	n	Mean	SD	n	Mean	SD	n	Mean	SD	n
72	16,73	0,68	3	23,85	0,45	3	24,6	0,69	3	14,51	0,78	3
96	17,2	0,26	3	26,34	0,62	3	29,93	0,43	3	18,61	0,17	3
120	18,5	0,34	3	30,5	0,7	3	34,6	0,71	3	21,06	0,85	3



4. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy

Nhiệt độ (°C)	PYO (mg/ml)		
	Mean	SD	n
20	3,56	0,3	3
28	24,04	0,25	3
30	24,24	0,15	3
37	7,26	0,43	3
45	3,7	0,49	3

5. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy

Thời gian (giờ)	Pyocyanin (µg/ml)		
	Mean	SD	n
24	14,51	0,52	3
48	19,75	0,33	3
72	24,94	0,7	3
96	27,42	0,67	3
120	34,04	0,87	3
144	19,68	0,91	3

6. Ảnh hưởng của tốc độ lắc

Tốc độ lắc (vòng/phút)	Pyocyanin (µg/ml)		
	Mean	SD	n
50	10,556	0,2744	3
100	16,657	0,7769	3
150	17,353	1,4114	3
200	23,967	1,8903	3

