

EVALUATION OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY AND ABILITY TO CYTOTOXIC CANCER CELLS OF BACTERIA ISOLATED FROM TAM GIANG LAGOON SLUDGE, THUA THIEN HUE PROVINCE

Nguyen Thi Ngoc Anh^{1,2}, Tran Thi Hong^{2,3*}, Ta Thi Thu Thuy¹, Vu Kim Thoa¹

¹Hanoi Open University, ²Graduate University of Science and Technology - VAST,

³Mien Trung Institute for Scientific Research, Vietnam National Museum of Nature - VAST

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 22/7/2024 Revised: 17/11/2024 Published: 18/11/2024	Tam Giang, a lagoon located in the Central region of Vietnam, is one of the largest in Southeast Asia, and is considered very diverse and rich in biological resources. However, there have been no studies evaluating the microflora here. This study aimed to isolate bacterial strains capable of being cultured in the Tam Giang lagoon and their potential to biosynthesize antibacterial and anti-cancer compounds. This study screened twenty-two bacterial strains with antagonistic activity against 1 - 6 test strains. An antagonistic ring diameter ranging from 5.0 - 36.3 mm, especially strain TGGD GII15 was determined to be antagonistic to the six tested strains included <i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778, <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, <i>Pseudomonas putida</i> 3326K1, <i>Pseudomonas auroginosa</i> ATCC 9027, <i>Candida albicans</i> ATCC 10231, and <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028. This strain was also found to be cytotoxic to the MCF-7 breast cancer and Hep G2 liver cancer cells but not to the regular HEK 293T cells. Gene 16S rRNA sequencing results showed that strain TGGD GII15 was 99.93% similar to <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (NR code 041455.1 in NCBI). This is the first study on Vietnamese coastal lagoon microorganisms, opening up excellent prospects for exploiting valuable biological compounds from this ecosystem.
KEYWORDS Tam Giang Lagoon Bacterial Antibacterial Anticancer <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	

ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN VÀ GÂY ĐỘC TẾ BÀO UNG THƯ CỦA VI KHUẨN PHÂN LẬP TỪ Bùn Đáy Phá Tam Giang, Tỉnh Thừa Thiên Huế

Nguyễn Thị Ngọc Anh^{1,2}, Trần Thị Hồng^{2,3*}, Tạ Thị Thu Thủy¹, Vũ Kim Thoa¹

¹Trường Đại học Mở Hà Nội, ²Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam,

³Viện Nghiên cứu Khoa học Miền Trung, Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 22/7/2024 Ngày hoàn thiện: 17/11/2024 Ngày đăng: 18/11/2024	Tam Giang, một phá nằm ở miền Trung, Việt Nam, thuộc loại lớn nhất Đông Nam Á, được nhận định là rất đa dạng và phong phú về tài nguyên sinh vật nhưng chưa có nghiên cứu nào đánh giá hệ vi sinh vật nơi đây. Nghiên cứu này nhằm phân lập các chủng vi khuẩn có khả năng nuôi cấy ở phá Tam Giang và tiềm năng sinh tổng hợp các hợp chất kháng khuẩn và chống ung thư của chúng. Trong nghiên cứu này 22 chủng vi khuẩn có hoạt tính đối kháng với 1 - 6 chủng kiểm định đã được sàng lọc. Đường kính vòng đối kháng từ 5,0 – 36,3 mm, đặc biệt chủng TGGĐ GII15 được xác định là đối kháng với 6 chủng kiểm định gồm <i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778, <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, <i>Pseudomonas putida</i> 3326K1, <i>Pseudomonas auroginosa</i> ATCC 9027, <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 và <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028. Chủng này cũng được xác định là gây độc tế bào ung thư vú MCF-7, tế bào ung thư gan Hep G2, và không gây độc tế bào thường HEK 293T. Kết quả giải trình tự gene 16S rRNA cho thấy chủng TGGĐ GII15 tương đồng 99,93% với <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (Mã số NR 041455.1 trong NCBI). Đây là nghiên cứu đầu tiên trên đối tượng là vi sinh vật đầm phá ven biển Việt Nam, mở ra triển vọng lớn trong việc khai thác hợp chất sinh học có giá trị từ hệ sinh thái này.
TỪ KHÓA Phá Tam Giang Vi khuẩn Kháng khuẩn Tế bào ung thư <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.10799>

* Corresponding author. Email: tranhongtrn@gmail.com

1. Giới thiệu

Phần lớn các hợp chất có hoạt tính sinh học đều có nguồn gốc từ các vi sinh vật trên cạn, nhưng ngày nay, việc phát hiện các chất chuyển hóa mới đang giảm dần [1]. Vì vậy, việc tìm kiếm các phân tử có hoạt tính mới đã được mở rộng sang sàng lọc các vi sinh vật ở những môi trường ít được khám phá hơn như vùng biển và ven biển [2], [3]. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra những vi khuẩn đặc hữu hiện diện trong môi trường đầm phá là nguồn cung cấp các hoạt chất có đặc tính chống ung thư, kháng khuẩn và chống ký sinh trùng [4]. Vi khuẩn là những thành viên sinh thái quan trọng trong đầm phá, nhưng số lượng, thành phần và sự đa dạng của chúng trong các môi trường chuyển tiếp này ít được biết đến [5].

Ở Việt Nam, các đầm phá chủ yếu tập trung ở miền Trung, nơi giàu bồi tích cát ven bờ, động lực sóng mạnh và thủy triều không lớn. Phá Tam Giang là một phá lớn trên thế giới và lớn nhất ở Việt Nam, chiếm khoảng 11% diện tích đầm phá ven bờ của cả nước, được đánh giá là phong phú về tài nguyên sinh vật và đa dạng về hệ sinh thái động thực vật thủy sinh và vi sinh vật... Hiện nay, đã có những nghiên cứu về hình thái, cấu trúc, tiến hóa đầm Tam Giang - Cầu Hai, về chất lượng nước [6], sự ô nhiễm bởi polychlorinated dibenzopdioxins và dibenzofurans (PCDD/Fs) [7], nghiên cứu về các khu hệ động vật, thực vật như xác định 43 loài động vật nổi (Zoophankton) thuộc 24 giống của 18 họ và 3 bộ của hệ đầm phá [8], đánh giá sự phân bố và phong phú của thảm thực vật nước trong các đầm phá ven biển [9]... Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu về vi sinh vật của hệ sinh thái này. Do vậy, nghiên cứu này được tiến hành với mục tiêu phát hiện các vi khuẩn tiềm năng sinh tổng hợp các hợp chất có hoạt tính kháng khuẩn và ức chế tế bào ung thư.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Các mẫu bùn đáy phá Tam Giang được lấy tại 5 vị trí đại diện cho phá gồm, mẫu tại khu vực giao giữa các sông và phá (TGCS); giữa phá (TGGĐ); vùng nông cách bờ 100 m (TGCB); cửa biển Thuận An giao với phá (TGTA); rừng ngập mặn Rú Chá (TGRC) (Hình 1). Bùn đáy sau khi lấy, đựng trong lọ chứa mẫu vô trùng, bảo quản lạnh và vận chuyển ngay về phòng thí nghiệm để tiến hành phân lập vi sinh vật. Phần mẫu còn dư, bổ sung glycerol 20%, bảo quản tủ -30°C.

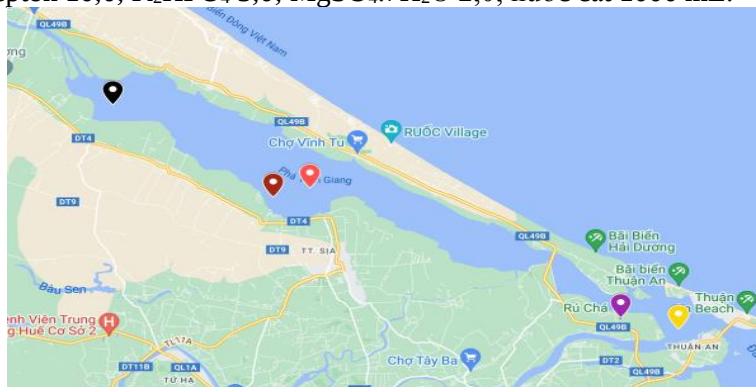
Vi sinh vật kiểm định (VSVKD) gây bệnh sử dụng trong nghiên cứu: *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas putida* 3326K1, *Pseudomonas auroginosa* ATCC 9027, *Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* ATCC 11105, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 được cung cấp bởi Trung tâm Giống và bảo tồn nguồn gene Vi sinh vật (VCCM), Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Các dòng tế bào sử dụng trong nghiên cứu: Tế bào ung thư gan Hep G2, tế bào ung thư vú MCF-7, tế bào thường HEK 293T được cung cấp bởi Trung tâm Nghiên cứu Ứng dụng Tế bào gốc và Liệu pháp gene, Viện Công nghệ sinh học; và Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Các môi trường sử dụng để phân lập vi khuẩn đáy đầm phá: Môi trường MA (g/L): NH_4NO_3 0,0016; H_3BO_3 0,022; CaCl_2 1,8; Na_2HPO_4 0,008; $\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7$ 0,1; MgCl_2 5,9; MgSO_4 3,24; peptone 5,0; KBr 0,08; KCl 0,55; NaHCO_3 0,16; NaCl 19,45; NaF 0,0024; Na_2SiO_3 0,004; SrCl_2 0,034; cao nấm men 1,0; agar 15,0; nước biển nhân tạo 1000 mL, pH $7,6 \pm 0,2$ (25°C). OLIGO (g/L): Cao nấm men 0,05; trytone 0,5; $\text{C}_3\text{H}_7\text{Na}_2\text{O}_6\text{P}$ 0,1; agar 15,0; nước biển nhân tạo 1000 mL. SCA (g/L): Soluble starch 10,0; K_2HPO_4 2,0; KNO_3 2,0; casein 0,3; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05; CaCO_3 0,02; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01; agar 15,0; nước biển nhân tạo 1000 mL; pH $7,0 \pm 0,1$. AIA (g/L): Sodium caseinate 2,0; L-Asparagine 0,1; sodium propionate 4,0; K_2HPO_4 0,5; MgSO_4 0,1; FeSO_4 0,001; agar 15,0; pH $8,1 \pm 0,2$ ở 25°C; nước biển nhân tạo 1000 mL. KA (g/L): Glycerol 10 mL; casein 0,3; KNO_3 2,0; NaCl 2,0; K_2HPO_4 2,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05; CaCO_3 0,02; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01; agar 18,0; nước biển nhân tạo 1000 mL. Gauze I (g/L): Soluble starch 20,0; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01; KNO_3 1,0; K_2HPO_4 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5;

NaCl 2,0; agar 15,0; nước biển nhân tạo 1000 mL. Gauze II (g/L): Glucose 10,0; NaCl 5,0; pepton 5,0; trypton 3,0; agar 15,0; nước biển nhân tạo 1000 mL. M1 (g/L): Soluble starch 10,0; cao nấm men 4,0; pepton 2,0; agar 18,0; nước biển nhân tạo 1000 mL.

Môi trường nuôi cấy vi sinh vật kiểm định: Môi trường nuôi cấy vi khuẩn (LB, g/L): pepton 10,0; cao nấm men 5,0; NaCl 5,0; nước cất 1000 mL; môi trường nuôi cấy nấm (Hansen, g/L): glucose 50,0; pepton 10,0; K₂HPO₄ 3,0; MgSO₄·7H₂O 2,0; nước cất 1000 mL.



◉ Cửa sông ◉ Giữa đầm ◉ Cách bờ 100 m ◉ Cửa biển Thuận An ◉ Rừng NM RC

Hình 1. Bản đồ vị trí lấy mẫu tại phá Tam Giang

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập vi khuẩn từ các mẫu bùn đáy phá Tam Giang

Mỗi mẫu bùn đáy được cân 10 g và nghiền nhỏ trong cối chày sứ (đã khử trùng). Sau đó hòa tan trong 90 mL nước muối sinh lý vô trùng (0,85% NaCl), lắc ở 150 vòng/phút trong 10 - 20 phút, để lắng 15 phút rồi hút 1 mL dung dịch sang ống nghiệm có 9 mL nước muối sinh lý mới. Tiếp tục pha loãng tới 10⁻⁴ và 10⁻⁵. Từ mỗi nồng độ pha loãng hút 1 mL dung dịch cấy trang trên đĩa petri chứa các môi trường phân lập vi khuẩn đầy đậm phá, ủ ở 30°C, trong 1 - 5 ngày quan sát sự phát triển của khuẩn lạc, làm thuần và giữ giống.

2.2.2. Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn

Các chủng vi khuẩn phân lập được nuôi cấy trong môi trường gốc ban đầu ở 30°C, trong 1-2 ngày, với tốc độ lắc 150 vòng/phút để nghiên cứu khả năng kháng VSVKD bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch của Hadacek và cộng sự (2000) [10]. Vòng kháng khuẩn/ kháng nấm được xác định theo công thức:

$$HTKS = D - d \text{ (mm)}$$

Trong đó: D: Đường kính vòng kháng khuẩn/ kháng nấm
d: Đường kính lỗ thạch.

2.2.3. Thử nghiệm khả năng gây độc tế bào

Xét nghiệm MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) được dùng để xác định khả năng ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn có hoạt tính đối kháng tuyển chọn từ phá Tam Giang đến khả năng sống của các dòng tế bào ung thư gan Hep G2, ung thư vú MCF7 và tế bào thường HEK 293T theo Monks và cộng sự (1991) [11]. Các dòng tế bào được nuôi cấy in vitro theo phương pháp của Skehan và cộng sự (1990) [12]. Các giá trị độ hấp phụ được đo ở bước sóng 570 nm bằng đầu đọc vi bản và tính toán khả năng sống sót của tế bào (CS%).

$$CS\% = \frac{OD \text{ (mẫu thử)} - OD \text{ (ngày 0)}}{OD \text{ (đối chứng)} - OD \text{ (ngày 0)}} \times 100$$

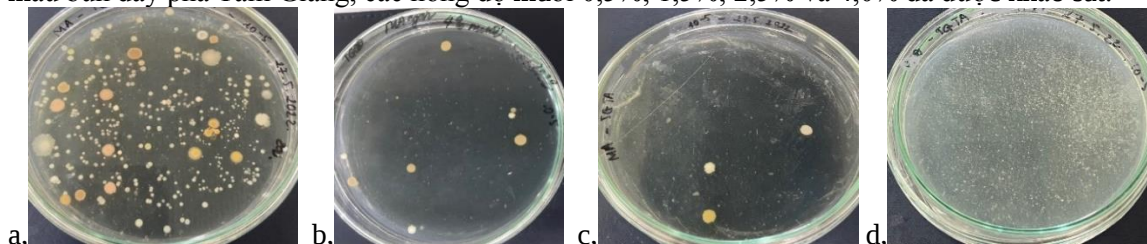
2.2.4. Định danh các chủng vi khuẩn đầy tuyển chọn

DNA tổng số của chủng vi khuẩn tuyển chọn được tách chiết theo hướng dẫn của NucleoSpin Soil Mini Kit for DNA (Macherey Nagel, Đức). Gene 16S rRNA của vi khuẩn được khuếch đại bằng cặp mồi 16SF: 5'-AGA GTT TGA TCA TGG CTC A-3' và 16SR: 5'-AAG GAG GTG ATC CAG CC-3' (Sigmaaldrich, Mỹ) với chu trình nhiệt: 94°C trong 3 phút, 30 chu kỳ (94°C trong 1 phút, 50°C trong 1 phút, 72°C trong 1 phút 30 giây), chu kỳ cuối ở 72°C: 7 phút và giữ mẫu ở 4°C. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 1%. Mẫu được gửi đi giải trình tự tại hãng FIRST BASE Malaysia theo nguyên lý giải trình tự của Sanger. Xử lý trình tự nhận được bằng phần mềm Bioedit và so sánh với cơ sở dữ liệu của ngân hàng gene NCBI bằng chương trình BLAST nhằm tìm ra các chủng có độ tương đồng cao với chủng nghiên cứu. Cây phát sinh chủng loại của các chủng nghiên cứu được xây dựng bằng phần mềm MEGA11.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Phân lập và sàng lọc vi khuẩn có hoạt tính đối kháng và gây độc tế bào ung thư từ các mẫu bùn đáy phá Tam Giang

Tại phá Tam Giang, độ mặn ở các vị trí lấy mẫu có sự chênh lệch nhau, tại vị trí giao thoa giữa phá với cửa biển và khu vực rừng ngập mặn, có độ mặn cao hơn so với khu vực đầu phá và giữa phá, còn vị trí giao thoa với các sông chảy vào phá thì độ mặn tương đối thấp. Vào mùa khô, phá Tam Giang có độ mặn trung bình $10,8 \pm 7,78\%$ và mùa mưa là độ $8,0 \pm 6,28\%$ [13]. Trong nghiên cứu này, thời điểm lấy mẫu là vào tháng 4, đây là thời kỳ giao mùa giữa mùa khô và mùa mưa nên nồng độ muối có thể ảnh hưởng đến sự phân bố vi khuẩn trong môi trường phá ở các vị trí lấy mẫu. Vì vậy, để có thể phân lập được tối ưu lượng vi khuẩn và đánh giá mật độ vi khuẩn xuất hiện ở các mẫu bùn đáy phá Tam Giang, các nồng độ muối 0,5%; 1,5%; 2,5% và 4,0% đã được khảo sát.



Hình 2. Một số hình ảnh phân lập vi khuẩn từ bùn đáy phá Tam Giang trên các môi trường khác nhau

a, b: Mẫu TGGĐ phân lập vi khuẩn trên môi trường MA 2,5 % muối, MA 4% muối, tương ứng;

c, d: Mẫu TGTA phân lập vi khuẩn trên môi trường MA 2,5 % muối, MA 4% muối, tương ứng.

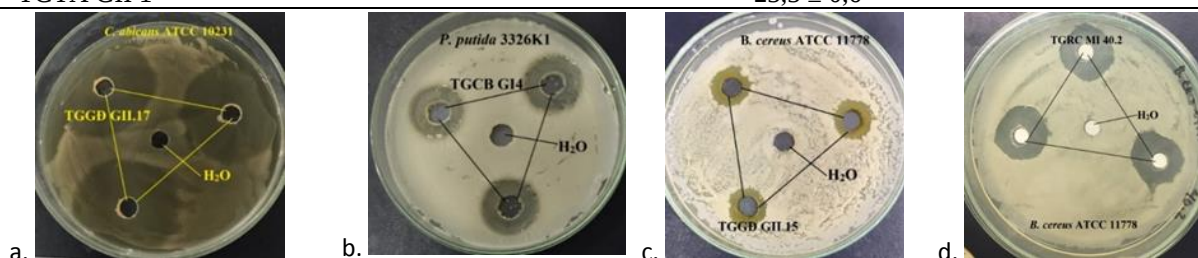
Kết quả thí nghiệm cho thấy số lượng vi khuẩn phân lập được nhiều nhất và đa dạng nhất là vị trí giữa phá, tiếp đến là vị trí cách bờ 100 m, vị trí giao thoa giữa các sông, rừng ngập mặn, và ít nhất là vị trí giao thoa với cửa biển Thuận An. Như vậy, có thể thấy, ở các vị trí có độ mặn cao, số lượng vi khuẩn xuất hiện khá thấp. Hầu hết các vi khuẩn mọc nhiều nhất, đa dạng nhất và phát triển tốt nhất trên nồng độ muối 2,5% ở tất cả các mẫu. Tại nồng độ muối 0,5% và 4,0% hầu như không có sự xuất hiện của vi khuẩn hoặc rất ít. Trong các môi trường phân lập, môi trường MA, Gauze II và MI phân lập được số lượng vi khuẩn nhiều nhất và đa dạng màu sắc nhất ở hầu hết các mẫu, trong khi đó môi trường SCA, AIA phân lập được ít vi sinh vật nhất. Các vi khuẩn phân lập trên môi trường nồng độ muối 0,5%; 1,5% và 4,0% đều phát triển tốt trên môi trường nồng độ 2,5%. Vì vậy, nồng độ muối 2,5% được lựa chọn để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.

Tổng số 553 khuẩn lạc vi khuẩn đã được lựa chọn và nuôi tăng sinh trên các môi trường phân lập tương ứng và thử hoạt tính đối kháng với 8 chủng vi sinh vật gây bệnh kiểm định ở trên (Phần 2.1). Kết quả thu được 40 khuẩn lạc (chủng) có khả năng đối kháng nguồn bệnh, trong đó 21 chủng được nhận định là có khả năng đối kháng tốt nhất được trình bày trong bảng 1. Từ kết quả bảng 1 cho thấy, đa số các chủng có hoạt tính được phân lập chủ yếu ở vị trí giữa phá (8/21 chủng) và rừng ngập mặn Rú Chá (9/21 chủng), trong đó một số chủng có khả năng kháng 2 chủng kiểm định như TGRC AIA24, TGRC GII2, TGRC GII15.3, TGRC GII24, TGRC GII27, TGGĐ GII17,

TGGĐ GII14, TGCB GI4, với đường kính vòng kháng khuẩn từ 9,3 - 36,3 mm; một số chủng có khả năng kháng 3 đến 4 chủng kiểm định như TGRC MI40.2, TGRC GII6, TGGĐ GII9, TGGĐ GII18, TGGĐ GII16, TGGĐ GII7.1 và TGGĐ GII7.2, với đường kính vòng kháng khuẩn từ 5,0 - 22,3 mm; đặc biệt, chủng TGGĐ GII15 có khả năng ức chế lên đến 6 chủng kiểm định, với đường kính vòng kháng khuẩn từ 13,7 - 21,0 mm. Từ kết quả nghiên cứu bảng 1 cũng cho thấy, vi khuẩn phân lập tại phá Tam Giang có khả năng ức chế đa dạng, từ vi khuẩn Gram âm (*P. putida* 3326K1, *P. auroginosa* ATCC 9027, *E. coli* ATCC 11105 và *S. typhimurium* ATCC 14028) đến vi khuẩn Gram dương (*B. cereus* ATCC 11778, *S. aureus* ATCC 6538 và *E. aerogenes* ATCC 13048) và nấm men *C. abicans* ATCC 10231.

Bảng 1. Các chủng vi khuẩn phân lập có hoạt tính đối kháng mạnh với VSVKĐ

Stt	Chủng vi khuẩn phân lập	Khả năng ức chế vi sinh vật gây bệnh kiểm định (D-d, mm)							
		<i>B. cereus</i> ATCC 11778	<i>P. putida</i> 3326K1	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>C. abicans</i> ATCC 10231	<i>P. auroginosa</i> ATCC 9027	<i>E. coli</i> ATCC 11105	<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048
1	TGRC AIA 24	13,0 ± 3,6	-	-	-	9,3 ± 2,5	-	-	-
2	TGRC AIA 22	21 ± 1,0	-	-	-	-	-	-	-
3	TGRC MI 40.2	22,3 ± 1,5	14,7 ± 0,7	-	-	-	17,7 ± 0,6	-	-
4	TGRC GII 2	17,7 ± 0,6	-	-	-	-	-	-	13,0 ± 1,0
5	TGRC GII 6	11,3 ± 0,6	13,3 ± 0,6	15,7 ± 0,6	-	-	13,5 ± 0,3	-	-
6	TGRC GII 15.3	-	-	26,0 ± 1,0	14,0 ± 1,0	-	-	-	-
7	TGRC GII 23	-	-	-	-	-	-	14,0 ± 1,7	-
8	TGRC GII 24	-	-	16,0 ± 1,0	-	16,3 ± 0,6	-	-	-
9	TGRC GII 27	-	-	15,0 ± 1,0	-	16,3 ± 0,6	-	-	-
10	TGGĐ GII 9	-	-	-	-	11,7 ± 1,1	12,0 ± 1,7	10,7 ± 0,6	-
11	TGGĐ GII 15	21,0 ± 1,0	14,3 ± 1,1	15,0 ± 1,0	16,7 ± 1,5	13,7 ± 0,7	-	14,7 ± 0,6	-
12	TGGĐ GII 18	-	14,7 ± 0,7	-	16,3 ± 0,6	15,3 ± 0,6	-	-	-
13	TGGĐ GII 19	-	-	-	30,3 ± 1,5	-	-	-	-
14	TGGĐ GII 16	-	13,7 ± 1,5	8,7 ± 1,3	-	5,0 ± 1,7	-	8,7 ± 1,1	-
15	TGGĐ GII 17	-	-	-	36,3 ± 1,5	13,7 ± 1,0	-	-	-
16	TGGĐ GII 7.1	14,7 ± 0,6	-	14,0 ± 1,0	-	14,0 ± 1,0	-	-	-
17	TGGĐ GII 7.2	14,7 ± 0,6	-	14,0 ± 1,0	-	14,7 ± 1,5	-	-	-
18	TGGĐ GII 14	-	-	-	35,3 ± 1,5	11,7 ± 0,7	-	-	-
19	TGCB SCA 12.2	20,3 ± 0,6	-	-	-	-	-	-	-
20	TGCB GI 4	12,7 ± 0,7	25,3 ± 0,6	-	-	-	-	-	-
21	TGTA GII 1	-	-	-	-	23,3 ± 0,6	-	-	-



Hình 3. Khả năng kháng VSVKĐ của một số chủng vi khuẩn phân lập tại phá Tam Giang

a. Khả năng kháng nấm *C. anbicans* ATCC 10231 của chủng TGCB GII 17; b. Khả năng kháng *P. putida* 3326K1 của chủng TGCB GI4; Khả năng kháng *B. cereus* ATCC 11778 của chủng TGGĐ GII 15; Khả năng kháng *B. cereus* STCC 11778 của chủng TGRC MI 40.2

Nhiều nghiên cứu cho thấy, phần lớn hoạt chất kháng ung thư được sản sinh từ các chủng vi sinh vật có hoạt tính kháng khuẩn [14], [15]. Vì vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi lựa chọn 40 chủng có khả năng kháng VSVKĐ để tiến hành thử khả năng gây độc tế bào ung thư vú MCF-7, tế bào ung thư gan Hep G2 và tế bào thường HEK 293T theo phương pháp MTT đã nêu (Phương

pháp 2.2.3. Kết quả nghiên cứu cho thấy, 17 chủng gây độc tế bào ung thư vú MCF7, 17 chủng gây độc tế bào ung thư gan Hep G2 (với CS% của cả 2 tế bào < 50), trong đó, 12 chủng gây độc cả 2 dòng tế bào ung thư thử nghiệm (Bảng 2). Tương tự với hoạt tính đối kháng, các chủng có hoạt tính gây độc tế bào ung thư đa số được phân lập ở vị trí giữa phá và rừng ngập mặn Rú Chá, và các chủng có hoạt tính đối kháng mạnh thì khả năng gây độc tế bào ung thư cũng mạnh. Một số chủng như TGRC MI22.1, TGRC MI22.2, TGRC MI40.2, TGRC GII5.1, TGGĐ GII7.2 và TGGĐ GII17 có khả năng tiêu diệt gần như hoàn toàn tế bào ung thư gan Hep G2 (CS% ≤ 10), và khá cao với tế bào ung thư vú MCF7 (CS% = 13,5 - 46,1), nhưng đồng thời chúng cũng tiêu diệt mạnh tế bào thường HEK 293T (CS% = 40,2 - 73,9). Vì vậy, những chủng này mặc dù có hoạt tính gây độc tế bào ung thư mạnh nhưng không có ý nghĩa trong y học. Trong số 5 chủng vi khuẩn phân lập không gây độc tế bào thường HEK 293T (CS% ≥ 99), chủng TGRC AIA21 và TGRC GII2 gây độc tế bào ung thư không mạnh (CS% ≥ 50); chủng TGRC MI34 và TGTA GII1 gây độc mạnh tế bào ung thư gan Hep G2 (CS% = 12,9 và 8,0, tương ứng), nhưng gây độc yếu tế bào ung thư vú MCF7 (CS% = 84,3 và 50,1, tương ứng). Điều đáng chú ý, chủng TGGĐ GII15 có hoạt tính gây độc cả 2 dòng tế bào ung thư rất mạnh (với tế bào ung thư vú MCF7 thì CS% = 13,3, và với tế bào ung thư gan Hep G2 là CS% = 30,5). Chủng TGGĐ GII15 cũng đã được xác định là có khả năng đối kháng cả vi khuẩn Gram dương (*B. cereus* ATCC 11778, *S. aureus* ATCC 6538), vi khuẩn Gram âm (*P. putida* 3326K1, *P. auroginosa* ATCC 9027, *S. typhimurium* ATCC 14028) và nấm men *C. abicans* ATCC 10231, vì vậy, chủng này được lựa chọn để định danh sinh học phân tử xác định tên loài.

Bảng 2. Kết quả đánh giá khả năng gây độc tế bào ung thư và tế bào thường của các chủng vi khuẩn nghiên cứu

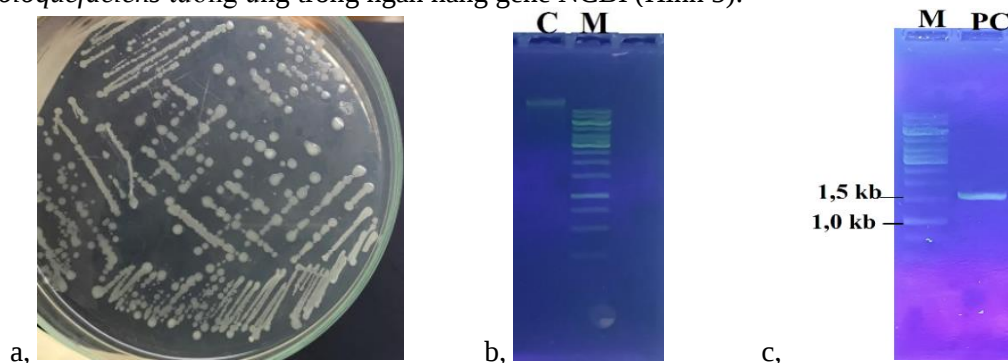
STT	Kí hiệu chủng	CS% của MCF-7	CS% của Hep G2	CS% của HEK 293T	STT	Kí hiệu chủng	CS% của MCF-7	CS% của Hep G2	CS% của HEK 293T
1	TGRC AIA 21	50,3 ± 0,3	84,3 ± 0,5	100 ± 0,0	21	TGRC Oli 9	67,2 ± 0,6	70,5 ± 0,5	88,4 ± 0,8
2	TGRC AIA 22	50,7 ± 0,6	72,2 ± 1,0	56,3 ± 0,4	22	TGGĐ Oli 5	70,2 ± 0,6	70,3 ± 0,7	53,2 ± 0,6
3	TGRC AIA 24	46,3 ± 0,7	70 ± 1,0	53,3 ± 0,3	23	TGGĐ Oli 10	66,3 ± 0,7	80,6 ± 1,0	74,2 ± 0,6
4	TGRC MI 17	51,2 ± 0,4	90 ± 3,0	56,2 ± 0,6	24	TGGĐ GII 7.1	44,3 ± 0,1	17,3 ± 2,0	94,2 ± 0,2
5	TGRC MI 22.1	46,1 ± 0,3	7,9 ± 0,5	40,3 ± 2,0	25	TGGĐ GII 7.2	45,0 ± 1,2	9,4 ± 0,2	56,1 ± 0,4
6	TGRC MI 22.2	13,5 ± 0,2	10,2 ± 0,4	40,2 ± 0,4	26	TGGĐ GII 9	50,8 ± 0,6	44,4 ± 2,0	51,7 ± 0,3
7	TGRC MI 24	36,7 ± 0,4	50,1 ± 0,5	40,6 ± 0,6	27	TGGĐ GII 12	55,9 ± 0,7	54,3 ± 1,0	54,6 ± 0,8
8	TGRC MI 34	84,3 ± 1,2	12,9 ± 0,9	100 ± 0,0	28	TGGĐ GII 13	51,2 ± 0,3	55,7 ± 0,3	55,3 ± 0,5
9	TGRC MI 40.2	22,8 ± 3,6	9,0 ± 1,0	75,6 ± 1,0	29	TGGĐ GII 14	38,2 ± 0,5	55,6 ± 0,6	52,2 ± 0,6
10	TGRC GII 2	60,2 ± 0,6	64,3 ± 0,3	99,2 ± 0,6	30	TGGĐ GII 15	13,3 ± 0,2	30,5 ± 1,0	100 ± 0,0
11	TGRC GII 6	43,3 ± 0,7	65,4 ± 1,3	93,7 ± 0,3	31	TGGĐ GII 16	52,4 ± 0,4	12,1 ± 3,0	54,9 ± 0,3
12	TGRC GII 10	83,1 ± 0,7	62,4 ± 0,6	53,4 ± 0,8	32	TGGĐ GII 17	26,1 ± 0,4	9,7 ± 0,5	73,9 ± 2,8
13	TGRC GII 14	13,9 ± 0,2	64,4 ± 0,4	50,2 ± 0,3	33	TGGĐ GII 18	37,1 ± 5,7	39 ± 1,0	50,5 ± 1,1
14	TGRC GII 15.1	15,8 ± 3,4	10,9 ± 0,4	49,1 ± 2,0	34	TGTA GII 1	50,1 ± 1,5	8,0 ± 0,1	99,2 ± 0,4
15	TGRC GII 15.3	50,2 ± 0,6	57,5 ± 0,7	60,2 ± 0,3	35	TGTA Oli 2	66,7 ± 0,3	60,3 ± 0,7	92,7 ± 1,0
16	TGRC GII 17	53,1 ± 0,5	64,5 ± 0,5	91,2 ± 0,6	36	TGTA Oli 4	62,5 ± 0,3	80,3 ± 0,7	89,1 ± 0,5
17	TGRC GII 23	53,3 ± 0,7	66,4 ± 0,6	61,9 ± 0,3	37	TGTA Oli 6	73,2 ± 1,0	60,4 ± 1,0	73,9 ± 2,8
18	TGRC GII 24	54,2 ± 0,6	7,8 ± 0,2	89,3 ± 0,7	38	TGCB SCA 12.2	36,7 ± 0,4	46 ± 1,0	73,9 ± 2,8
19	TGRC GII 27	68,3 ± 0,5	56,5 ± 0,3	95,7 ± 0,7	39	TGCB SCA 12.3	34,5 ± 0,7	48 ± 3,0	53,1 ± 0,3
20	TGRC Ma 49	56,4 ± 0,2	55,8 ± 0,6	50,2 ± 0,4	40	TGCB GI 4	28,4 ± 0,4	40,5 ± 0,5	68,7 ± 0,5
					41	Đôi chứng	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0,0

Ghi chú: Đối chứng là môi trường nuôi cấy gốc của vi khuẩn, có thể là MA, OLI, SCA, AIA, GI, GII và MI

3.2. Định danh chủng vi khuẩn TGGĐ GII15 bằng kỹ thuật sinh học phân tử

Để định danh chủng TGGĐ GII15 (Hình 4a) bằng phân tích trình tự gene 16S rRNA, DNA tổng số của chủng đã được tách chiết và điện di kiểm tra trên gel agarose 1% (Hình 4b). Kết quả thu được cho thấy DNA sạch, không bị đứt gãy, tỷ lệ A260/A280 đo bằng máy quang phổ là 1,83 chứng tỏ DNA đạt yêu cầu PCR. PCR được thực hiện theo các điều kiện được mô tả ở trên (Phương pháp 2.2.4). Sản phẩm PCR của gene 16S rRNA là 1 băng sáng rõ, đặc hiệu, có kích thước khoảng 1,5 kb trên ảnh điện di, tương ứng với tính toán lý thuyết (Hình 4c). Sản phẩm PCR được tinh sạch

(Kít tinh sạch sản phẩm PCR, Invitrogen) và giải trình tự (ABI PRISM 3100, Applied Bioscience). Xử lý trình tự nhận được bằng phần mềm BioEdit và so sánh với cơ sở dữ liệu của ngân hàng gene NCBI bằng chương trình BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Kết quả thu được cho thấy trình tự gene 16S rRNA của chủng TGGĐ GII15 tương đồng 99,93% với gene 16S rRNA *Bacillus amyloqueliefaciens* chủng NBRC 15635 (Ass.No NR 041455.1). Xây dựng cây phát sinh chủng loại cũng khẳng định chủng TGGĐ GII15 có quan hệ họ hàng gần gũi với các chủng thuộc loài *B. amyloqueliefaciens* tương ứng trong ngân hàng gene NCBI (Hình 5).



Hình 4. Hình thái khuẩn lạc chủng TGGĐ GII15 (a) và điện di đồ sản phẩm DNA (b), sản phẩm PCR (c) của chủng này trên gel agarose 1% (M: thang Marker 1 kb của Invitrogen, C: DNA tổng số, PC: sản phẩm PCR)



Hình 5. Cây phát sinh chủng loại của chủng TGGĐ GII15

4. Kết luận

Nghiên cứu này đã xác định được hoạt tính đối kháng và gây độc tế bào ung thư của các chủng vi khuẩn phân lập được từ vùng phá Tam Giang. Từ 40 chủng vi khuẩn có khả năng kháng ít nhất 1/8 chủng VSVKĐ được dùng để thử nghiệm khả năng gây độc tế bào ung thư bằng dịch nuôi cấy theo phương pháp MTT thu được kết quả: 17 chủng gây độc tế bào ung thư vú MCF-7, 16 chủng gây độc tế bào ung thư gan Hep G2, 12 chủng có khả năng gây độc mạnh với cả 2 loại tế bào kể trên và 3 chủng trong số đó không hoặc ít gây độc cho tế bào thường HEK 293T. Chủng TGGĐ GII 15 có khả năng ức chế mạnh nhất với 6/8 chủng vi sinh vật gây bệnh kiểm định và gây độc cao với cả 2 dòng tế bào ung thư thử nghiệm (tỷ lệ sống của tế bào ung thư vú MCF-7 là $13,3 \pm 0,2\%$, của tế bào ung thư gan Hep G2 là $30,5 \pm 1,0\%$), không gây độc cho tế bào thường (tỷ lệ sống sót của tế bào thường là 100%). Từ phân tích kết quả giải trình tự gene 16S rRNA của chủng này bước đầu đặt tên là *Bacillus amyloqueliefaciens* TGGĐ GII 15.

Lời cảm ơn

Công trình này được hoàn thành từ nguồn kinh phí của Bộ Khoa học và Công nghệ hỗ trợ cho đề tài có mã số: ĐTĐL.CN-114/21. Nhóm tác giả cam kết không có xung đột lợi ích từ các kết quả nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] P. R. Jensen and W. Fenical, "Marine microorganisms and drug discovery: current status and future potential," *Drugs from the Sea*, pp. 6-29, 2000.
- [2] F. Ameen, S. AlNadhari, and A. A. Al-Homaidan, "Marine microorganisms as an untapped source of bioactive compounds," *Saudi Journal of Biological Sciences*, vol. 28, no. 1, pp. 224-231, 2021.
- [3] S. Hakvag, E. Fjaervik, K. D. Josefsen *et al.*, "Characterization of *Streptomyces* spp. isolated from the sea surface microlayer in the Trondheim Fjord, Norway," *Mar. Drugs*, vol. 6, pp. 620-635, 2008.
- [4] C. R. Flores, Q. N. Ruiz, A. J. Hernáñez-Tasco *et al.*, "Evaluation of antimicrobial and antiproliferative activities of Actinobacteria isolated from the saline lagoons of northwestern Peru," *PLoS ONE*, vol. 16, no. 9, 2021, Art. no. e0240946.
- [5] G. M. Quero, L. Perini, G. Pesole *et al.*, "Seasonal rather than spatial variability drives planktonic and benthic bacterial diversity in a microtidal lagoon and the adjacent open sea," *Mol. Ecol.*, vol. 26, no. 21, pp. 5961-5973, 2017.
- [6] H. A. Nguyen, Đ. N. U. Nguyen, and V. H. Nguyen, "Spatial distribution patterns in surface water of Tam Giang – Cau Hai lagoon, Thua Thien Hue province," (in Vietnamese), *Journal of Hydro-Meteorology*, vol. EME4, pp. 94-102, 2022.
- [7] R. Piazza, S. Guiliani, L. G. Bellucci, C. Mungnai, N. H. Cu, Đ. H. Nhon *et al.*, "PCDD/Fs in sediments of Central Vietnam coastal lagoons: In search of TCDD," *J. Mar. Pollut. Bull.*, vol. 60, no. 12, pp. 2303-2310, 2019.
- [8] V. P. Vo and D. T. Hoang, "Study of fluctuations of zooplankton in Tam Giang – Cau Hai lagoons system, Thua Thien Hue province," (in Vietnamese), *Hue University Journal of Science*, vol. 75A, no. 6, pp. 123-133, 2012.
- [9] T. T. T. Cao, D. T. Tran, and X. S. Le, "Assessment of pollution load into Tam Giang - Cau Hai lagoon and a prediction to 2020," *Journal of Marine Science and Technology*, vol. 13, no. 3, pp. 276-283, 2013.
- [10] F. Hadacek and H. Greger, "Test of antifungal natural products methodologies, comparability of result and assay choice," *Phytochem Anal.*, vol. 11, no. 3, pp. 137-147, 2000.
- [11] A. Monks, D. Scudiero, P. Skehan *et al.*, "Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 83, no. 11, pp. 757-766, 1991.
- [12] P. Skehan, R. Storeng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J. T. Warren, H. Bokesch, S. Kenney, and M. R. Boyd, "New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening," *J. Nat. Cancer Inst.*, vol. 82, no. 13, pp. 1107-1112, 1990.
- [13] V. D. Truong and Q. L. Nguyen, "Zoning of water quality for shrimp culture in Tam Giang – Cau Hai, Thua Thien Hue province with GIS," *Hue University Journal of Science*, vol. 127, no. 3B, pp. 69- 80, 2020.
- [14] M. J. Kennish and W. P. Hans, *Coastal Lagoons: Critical Habitats of Environmental Change*. CRC Press, pp. 1-15, Jun 15, 2010.
- [15] I. E. Gonenc and J. P. Wolflin (eds.), *Coastal lagoons: Ecosystem processes and modeling for sustainable use and development*. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2004.