

## TÁCH CHIẾT, TINH SẠCH VÀ XÁC ĐỊNH ĐẶC TÍNH SINH HỌC CỦA CHẤT KHÁNG NẤM VÀ CHẤT KHÁNG KHUẨN TỪ CHỦNG VI KHUẨN *BACILLUS VELEZENSIS* CP 1604

Trịnh Thành Trung<sup>1</sup>, Đinh Thị Tuyết Vân<sup>1</sup>, Nguyễn Phương Liên<sup>2</sup>, Đào Thị Lương<sup>1</sup>, Dương Văn Hợp<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội

<sup>2</sup>Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm Y tế

Ngày nhận bài: 25.4.2016

Ngày nhận đăng: 20.8.2016

### TÓM TẮT

*Bacillus velezensis* là một loài vi khuẩn an toàn, sở hữu nhiều đặc tính quý có lợi cho cây trồng, đặc biệt là khả năng sinh các chất kháng nấm và kháng vi khuẩn gây bệnh cây. Từ dịch nuôi cấy của chủng *B. velezensis* CP 1604, chất có hoạt tính kháng nấm *Fusarium oxysporum* và kháng khuẩn *Xanthomonas oryzae* đều có thể tách chiết được bằng phương pháp hấp phụ trong hạt Amberlite XAD-7, chiết trong ethanol từ dịch đông khô, rửa ở pH thấp hoặc chiết bằng các dung môi hữu cơ là 1-butanol và 2-pentanol. Kết quả tinh sạch bằng HPLC cho thấy chất kháng nấm được thôi ra ở thời gian 5,328 phút và chất kháng khuẩn được thôi ra ở thời gian 15,313 phút. Bằng phương pháp phân tích khối phổ, chất kháng nấm được xác định là iturin A có trọng lượng phân tử là 1042 Da và chất kháng khuẩn là macrolactin A có trọng lượng phân tử là 402 Da. Chất kháng nấm bền nhiệt nhưng chất kháng khuẩn bị giảm hoạt tính rõ rệt khi bị xử lý ở 100°C trong thời gian 2 giờ. Cả hai chất này đều giảm hoạt tính ở pH acid nhưng duy trì hoạt tính ở pH base. Hoạt tính kháng nấm và kháng khuẩn không thay đổi khi xử lý với các enzyme thủy phân là trypsin,  $\alpha$ -chymotrypsin, amylase, lipase và proteinase K. Nghiên cứu thử nghiệm tính an toàn và hiệu quả phòng trừ bệnh hại cây là việc làm cần thiết nhằm tìm kiếm khả năng ứng dụng của chất kháng nấm và chất kháng khuẩn từ chủng *B. velezensis* CP 1604 trong phát triển nông nghiệp xanh và bền vững.

**Từ khóa:** *Bacillus velezensis*, chất kháng nấm, chất kháng khuẩn, iturin, lipopeptide, macrolactin, polyketide

### MỞ ĐẦU

*Bacillus velezensis* là một trong số tám loài vi khuẩn thuộc nhóm *Bacillus subtilis* (Rooney *et al.*, 2009). Đây là loài vi khuẩn an toàn, sở hữu nhiều đặc tính quý có lợi cho cây trồng như khả năng sinh các chất kháng nấm và kháng vi khuẩn gây bệnh cây, sản sinh hormone kích thích sinh trưởng thực vật, sản sinh các enzyme thủy phân và có khả năng tăng cường tính miễn dịch của cây chống lại sự xâm nhiễm của các loại vi sinh vật gây bệnh (Chowdhury *et al.*, 2015; Shao *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015). Do sở hữu các đặc tính quý, vi khuẩn *B. velezensis* được nhiều nhà khoa học quan tâm nghiên cứu ở mọi cấp độ từ giải mã hệ gen (genome) đến nghiên cứu các chất trao đổi, nghiên cứu phân loại, nghiên cứu ứng dụng trong nhà kính và ngoài thực địa; nhiều chủng vi khuẩn *B. velezensis* đã được phân lập, đánh giá các đặc tính có lợi và ứng dụng trong đấu tranh sinh học để phòng ngừa các loại dịch bệnh hại cây trồng.

*B. velezensis* sản sinh ra nhiều loại chất trao đổi bậc hai có hoạt tính kháng nấm và kháng vi khuẩn gây bệnh cây. Các chất trao đổi đó bao gồm lipopeptide, polyketide, dipeptide, siderophore và protein kháng khuẩn (Arguelles-Arias *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2014). Lipopeptide cấu tạo từ chuỗi peptide liên kết với acid béo, được tổng hợp không cần ribosome (nonribosomally synthesized peptide) nhờ sự có mặt của nhóm đa enzyme non-ribosomal peptide synthetases (NRPS). Giải mã hệ gen của các chủng *B. velezensis* cho thấy hơn 9% hệ gen của vi khuẩn mang các gen tham gia sinh tổng hợp lipopeptide (Chowdhury *et al.*, 2015). Dựa vào cấu trúc phân tử và đặc tính sinh học, lipopeptide sản sinh từ *Bacillus* và *Paenibacillus* được chia thành 3 nhóm chính là lipopeptide mạch vòng mang điện tích dương, lipopeptide mạch vòng không mang điện tích dương và lipopeptide mạch thẳng mang điện tích dương (Cochrance, Vederas, 2014). Surfactin, iturin và fengycin là các lipopeptide mạch vòng không mang điện tích dương thường được tìm thấy trong

dịch nuôi cấy của các loài *B. subtilis* (Stein, 2005; Ongena, Jacques, 2008). Bên cạnh đó, nhiều chủng *B. velezensis* còn có khả năng sản sinh đồng thời các polyketide là difficidin, bacillaene và macrolactin (Arguelles-Arias *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2012).

Trong quá trình tìm kiếm các chủng vi khuẩn có khả năng ứng dụng trong đấu tranh sinh học để phòng trừ các bệnh hại cây, chúng tôi đã phân lập được chủng *B. velezensis* CP 1604 trong đất nông nghiệp gần vườn Quốc gia Cúc Phương có khả năng đối kháng mạnh với nấm gây bệnh cây là *Sclerotium hydrophilum*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum* và vi khuẩn gây bệnh bạc lá *Xanthomonas oryzae* (Trung *et al.*, 2016). Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành tách chiết, tinh sạch và xác định bản chất của chất kháng nấm và chất kháng khuẩn sinh ra từ chủng CP 1604.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Chủng vi khuẩn nghiên cứu và môi trường nuôi cấy

Chủng *B. velezensis* CP 1604 có hoạt tính đối kháng mạnh với nấm gây bệnh cây *S. hydrophilum*, *R. solani*, *P. capsici*, *F. oxysporum* và vi khuẩn gây bệnh bạc lá *X. oryzae* được lưu giữ tại phòng Bảo tàng Giống chuẩn Vi sinh vật, Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học. Từ ống giữ lạnh sâu ở  $-70^{\circ}\text{C}$ , chủng CP 1604 được hoạt hóa trên môi trường thạch NA (Becton, Dickinson and Company, Pháp) và được nuôi cấy ở  $30^{\circ}\text{C}$ . Sau 24 giờ, tế bào vi khuẩn hoạt hóa được cấy vào bình tam giác 100 ml chứa 25 ml môi trường TSB dịch thể (Becton, Dickinson and Company, Pháp) và được lắc tại tốc độ 160 vòng/phút ở  $30^{\circ}\text{C}$ . Sau 24 giờ, 0,5% dịch lắc hoạt hóa được chuyển sang bình tam giác 250 ml chứa 100 ml môi trường TSB dịch thể và được nuôi cấy lắc tại tốc độ 160 vòng/phút ở  $30^{\circ}\text{C}$ . Nuôi cấy được thực hiện trong 48 giờ. Sau đó, dịch nuôi cấy được thu lại và tế bào vi khuẩn được loại bỏ bằng phương pháp ly tâm ở tốc độ 8.000 vòng/phút trong 10 phút. Phần dịch nổi được sử dụng cho các bước tách chiết và tinh sạch trình bày tại phần dưới.

### Xác định hoạt tính của chất kháng nấm và kháng khuẩn

Hoạt tính kháng nấm và kháng khuẩn từ dịch lên men, dịch tách chiết và tinh sạch được xác định theo phương pháp khuếch tán thạch. Theo đó, dịch thử nghiệm được nhỏ vào lỗ giếng trên môi trường PDA (g/L: khoai tây 200 g, dextrose 20 g và thạch 15 g)

đã cấy sẵn nấm kiểm định *F. oxysporum* hoặc nhỏ vào lỗ giếng trên môi trường NA đã cấy vi khuẩn kiểm định *X. oryzae*. Sau 2 ngày nuôi cấy đối với nấm và 1 ngày nuôi cấy đối với vi khuẩn ở  $30^{\circ}\text{C}$ , hoạt tính kháng nấm và kháng khuẩn được xác định dựa trên kích thước đường kính vòng trong (vòng vô khuẩn) trừ đi kích thước đường kính lỗ giếng ( $\text{Ø} = 6 \text{ mm}$ ).

### Tách chiết chất kháng nấm và kháng khuẩn

Từ dịch nuôi cấy đã loại bỏ tế bào, chất kháng nấm và chất kháng khuẩn được tách chiết bằng 4 phương pháp là (i) sử dụng dung môi hữu cơ, (ii) hấp phụ với hạt Amberlite XAD-7, (iii) đông khô dịch nuôi cấy kèm tách chiết bằng ethanol và (iv) tủa ở pH thấp. Các phương pháp tách chiết được lặp lại 2 đến 3 lần theo quy trình như sau:

i) Phương pháp tách chiết bằng dung môi hữu cơ: dịch nuôi cấy đã loại bỏ tế bào được lần lượt đưa vào các dung môi có độ phân cực khác nhau là benzen, 1-butanol, chloroform, ethyl acetate, hexan, 2-pentanol và toluene theo tỷ lệ 1:1. Sau khi đảo trộn mẫu trong 10 phút, hỗn hợp dung dịch được ly tâm ở tốc độ 8.000 vòng/phút trong 20 phút nhằm tách rõ 2 lớp dịch nuôi cấy và dung môi. Phần dung môi phía trên được thu lại và cô quay ở nhiệt độ  $60^{\circ}\text{C}$ . Sau đó, cặn kháng sinh thô được hoàn nguyên với nước cất và được thử hoạt tính kháng nấm và vi khuẩn kiểm định.

ii) Phương pháp hấp phụ với hạt Amberlite XAD-7: hạt Amberlite XAD-7 được đưa vào dịch nuôi cấy theo tỷ lệ 1:5 (khối lượng/thể tích). Hỗn hợp này được khuấy nhẹ qua đêm trên máy khuấy từ ở nhiệt độ  $4^{\circ}\text{C}$ . Sau đó, hạt amberlite được thu lại và rửa liên tiếp 3 lần với nước cất, 1 lần với ethanol 30%. Hạt amberlite được khuấy nhẹ với ethanol 75% trong 4 giờ (He *et al.*, 2007). Chất kháng sinh thô thô ra trong ethanol được thu lại và cô quay ở nhiệt độ  $60^{\circ}\text{C}$ . Sau đó, cặn kháng sinh thô được hoàn nguyên với nước cất và được thử hoạt tính kháng nấm và vi khuẩn kiểm định.

iii) Phương pháp đông khô: tiến hành đông khô hoàn toàn dịch nuôi cấy. Sau đó, đưa một lượng thể tích ethanol 100% tương đương với lượng mẫu ban đầu vào cặn đông khô và lắc ở 160 vòng/phút trong 2 giờ nhằm chiết rút chất kháng sinh thô. Phần ethanol được thu lại và cô quay ở nhiệt độ  $60^{\circ}\text{C}$ . Sau đó, cặn kháng sinh thô được hoàn nguyên với nước cất và được thử hoạt tính kháng nấm và vi khuẩn kiểm định.

iv) Phương pháp tủa ở pH thấp: dịch nuôi cấy được chỉnh về pH 3,0 sử dụng HCl 6N và được ủ qua đêm ở 4°C. Sau đó, dịch nuôi cấy được ly tâm ở 8.000 vòng/phút trong 10 phút. Phần cặn tủa được thu lại và hoàn nguyên với nước cất. Hoạt tính kháng sinh thô trong cặn tủa được thử với nấm và vi khuẩn kiểm định.

#### **Tinh sạch chất kháng nấm và kháng khuẩn**

Chất kháng nấm và chất kháng khuẩn được tinh sạch bằng kỹ thuật HPLC sử dụng cột Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 × 250 mm, 5 µl, Agilent Technologies, USA). Phương pháp tinh sạch HPLC được thực hiện theo mô tả của He *et al.* (2007). Theo đó, pha động sử dụng methanol và nước chứa 0,05% trifluoroacetic acid. Sau khi cân bằng cột với tỷ lệ 20% methanol, 30 µl dịch kháng sinh tách chiết theo 2 bước bằng dung môi 1-butanol và hạt Amberlite XAD-7 được tải lên cột. Dung môi hệ động được thay đổi tuyến tính theo nồng độ methanol từ 20% lên 40% trong 10 phút, từ 40% lên 60% trong 5 phút và từ 60% lên 70% trong 10 phút. Tốc độ dòng của cả quá trình sắc ký là 0,5 ml/phút. Sắc ký đồ được ghi nhận tại bước sóng 220 nm. Sau khi bị thổi ra khỏi cột, các phân đoạn sắc ký (0,5 ml/phân đoạn) được thu nhận, cô quay loại bỏ dung môi và thử hoạt tính kháng nấm và kháng khuẩn. Sau đó, các phân đoạn có hoạt tính được trộn lại với nhau và được tinh sạch lại một lần nữa theo chu trình sắc ký mô tả như trên. Phân đoạn có hoạt tính kháng nấm và kháng vi khuẩn được gửi sang Trung tâm các Phương pháp Phổ Ứng dụng - Viện Hóa học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam để xác định phổ khối.

#### **Xác định đặc tính sinh hóa lý của chất kháng nấm và kháng khuẩn**

Khả năng bền nhiệt độ, bền pH và bền với các enzyme thủy phân của chất kháng nấm và chất kháng khuẩn được thử nghiệm như sau:

i) Khả năng bền nhiệt: dịch tách chiết chất kháng sinh được xử lý ở các nhiệt độ 60°C, 80°C và 100°C. Sau thời gian xử lý là 30 phút, 60 phút, 90 phút và 120 phút, hoạt tính kháng nấm và kháng vi khuẩn được xác định bằng phương pháp khuếch tán thạch như mô tả ở trên.

ii) Khả năng bền pH: dịch tách chiết chất kháng sinh được xử lý ở các pH từ 3,0 đến 7,0 trong đệm citrate-phosphate và pH 8,0 đến 9,0 trong đệm Tris-HCl. Sau 24 giờ ủ ở 4°C, hoạt tính kháng nấm và kháng vi khuẩn được xác định bằng phương pháp khuếch tán thạch như mô tả ở trên.

iii) Khả năng bền với các enzyme thủy phân: 5 enzyme là trypsin,  $\alpha$ -chymotrypsin, amylase, lipase và proteinase K được pha trong đệm phosphate 25 mM (pH 7,0) tới nồng độ cuối cùng là 1 mg/ml. Sau đó, dịch tách chiết chất kháng sinh được lần lượt trộn đều với các dung dịch enzyme theo tỷ lệ 1:1 và được ủ ở 37°C. Sau 2 giờ xử lý, hoạt tính kháng nấm và kháng vi khuẩn được xác định bằng phương pháp khuếch tán thạch như mô tả ở trên.

#### **KẾT QUẢ**

##### **So sánh hiệu quả tách chiết chất kháng nấm và chất kháng khuẩn**

Từ dịch nuôi cấy chủng CP 1601 trong môi trường TBS, chất có hoạt tính kháng nấm và kháng khuẩn được tách chiết bằng 4 phương pháp khác nhau. Đối với phương pháp tách chiết bằng dung môi hữu cơ, chất có hoạt tính được chiết rút mạnh nhất trong dung môi 1-butanol và 2-pentanol. Hoạt tính kháng nấm không xuất hiện khi dịch nuôi cấy được tách chiết bằng chloroform và hexan nhưng hoạt tính kháng khuẩn vẫn duy trì khá cao khi tách chiết bằng chloroform. Điều đó chứng tỏ có sự khác nhau về tính tan trong các dung môi khác nhau nên dịch nuôi cấy chủng CP 1604 có thể chứa 2 chất kháng nấm và kháng khuẩn riêng biệt nhau.

Hoạt tính kháng nấm và kháng khuẩn thu được khá cao khi tách chiết bằng phương pháp hấp phụ với hạt Amberlite XAD-7 và tách chiết với ethanol từ cặn đông khô. Cặn tủa trong pH thấp của dịch nuôi cấy cũng có hoạt tính kháng nấm và kháng khuẩn nhưng hoạt tính kháng thấp hơn so với các phương pháp còn lại (Bảng 1).

##### **Tinh sạch chất kháng nấm và kháng khuẩn**

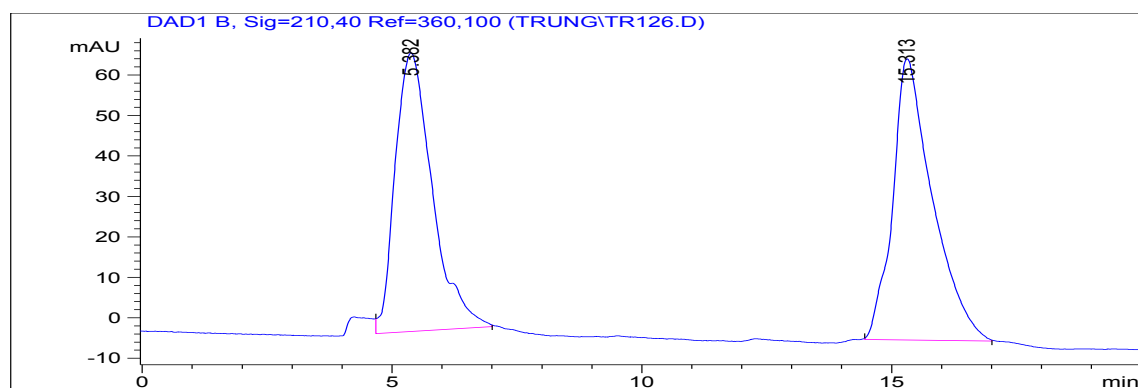
Từ kết quả thu được ở trên, chất kháng sinh thô chuẩn bị cho tinh sạch được tách chiết liên tiếp bằng 2 phương pháp nhằm loại bỏ các tạp chất không mong muốn. Đầu tiên, dịch nuôi cấy chủng CP 1604 được tách chiết với dung môi hữu cơ 1-butanol. Sau đó, dịch kháng sinh được tiếp tục tách chiết bằng phương pháp hấp phụ với hạt amberlite-XAD7 và được thổi ra ở nồng độ ethanol 75%. Kết quả kiểm tra bằng máy HPLC cho thấy đường sắc ký đồ sau khi tách chiết 2 lần có nhiều đỉnh rõ ràng hơn so với dịch chiết 1 lần bằng 1-butanol. Chất kháng sinh thô này sau đó được tinh sạch bằng kỹ thuật HPLC. Kết quả thử nghiệm hoạt tính kháng nấm và kháng khuẩn ở các phân đoạn thu được cho thấy có 2 chất rõ ràng:

chất có hoạt tính kháng nấm được thôi ra ở thời gian 5,328 phút và chất có hoạt tính kháng khuẩn được thôi ra ở thời gian 15,313 phút (Hình 1).

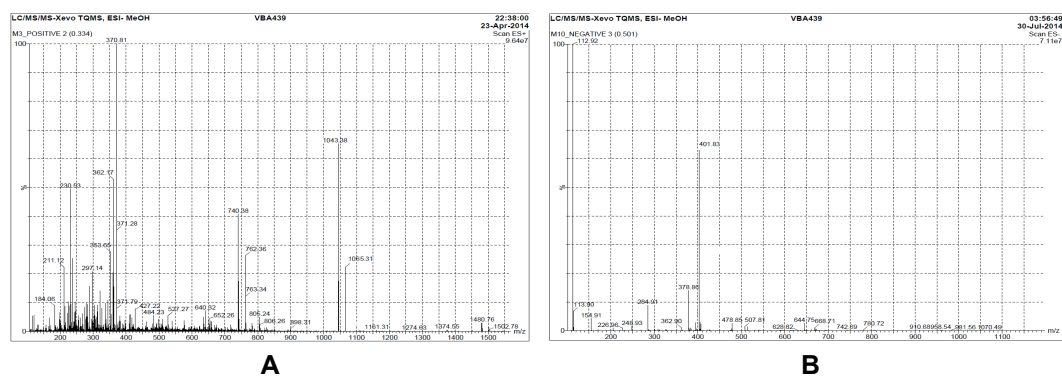
Điều đó chứng tỏ chủng CP 1604 đã sản sinh ra 2 loại chất có hoạt tính kháng nấm và kháng khuẩn khác nhau.

**Bảng 1.** Hoạt tính kháng nấm và vi khuẩn của dịch chiết thô.

STT	Phương pháp tách chiết	Hoạt tính đối kháng (D - d, mm)		
		<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Xanthomonas oryzae</i>	
1	Dung môi hữu cơ	Benzen	6	22
		1 - butanol	9	26
		Chloroform	0	26
		Ethyl acetate	4	26
		Hexan	0	8
		2 - pentanol	6	34
		Toluene	4	16
2	Amberlite XAD-7	10	32	
3	Đông khô	10	30	
4	Tủa ở pH thấp	8	24	



**Hình 1.** Sắc ký đồ HPLC của chất kháng nấm (5,328 phút) và chất kháng khuẩn (15,313 phút) tinh sạch từ dịch nuôi cấy chủng *B. velezensis* CP 1604.



**Hình 2.** Khối phổ phân đoạn chất có hoạt tính kháng nấm  $M + H^+ = 1043$  Da (A) và phân đoạn chất có hoạt tính kháng khuẩn  $M - H^+ = 401$  Da (B).

**Xác định các tính chất của chất kháng nấm và kháng khuẩn**

Phổ khối của chất có hoạt tính kháng nấm và kháng khuẩn được phân tích (Hình 2). Trên bản phổ ion dương, khối lượng phân tử của chất kháng nấm được xác định là 1042 Da ( $M + H^+ = 1043$ ). Trên bản phổ ion âm, khối lượng phân tử của chất kháng khuẩn được xác định là 402 Da ( $M - H^+ = 401$ ).

Khi xử lý ở giải nhiệt độ từ 60°C đến 100°C trong 2

giờ, chất kháng nấm vẫn duy trì hoạt tính kháng *F. oxysporum* nhưng hoạt tính kháng vi khuẩn *X. oryzae* của chất kháng khuẩn giảm rõ rệt, đặc biệt khi bị xử lý ở 100°C (Bảng 2). Cả 2 chất kháng nấm và kháng khuẩn đều giảm hoạt tính khi ở trong dung dịch đệm có pH acid trong khi đó hoạt tính kháng nấm và vi khuẩn vẫn duy trì tốt ở dung dịch đệm có pH base (Bảng 3). Hoạt tính kháng nấm và kháng vi khuẩn của 2 chất cũng không bị ảnh hưởng bởi các enzyme thủy phân trypsin,  $\alpha$ -chymotrypsin, amylase, lipase và proteinase K (Bảng 4).

**Bảng 2.** Khả năng bền nhiệt của chất kháng nấm và kháng khuẩn.

Nhiệt độ xử lý	Thời gian xử lý (phút)	Hoạt tính đối kháng (D - d, mm)	
		<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Xanthomonas oryzae</i>
60°C	30	8	25
	60	8	25
	90	8	25
	120	8	25
80°C	30	8	24
	60	8	20
	90	8	20
	120	8	20
100°C	30	8	20
	60	8	15
	90	8	10
	120	8	7
Đối chứng (mẫu không xử lý)		8	25

**Bảng 3.** Khả năng bền pH của chất kháng nấm và chất kháng khuẩn.

Giá trị pH xử lý	Hoạt tính đối kháng (D - d, mm)	
	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Xanthomonas oryzae</i>
pH 3,0	3	20
pH 4,0	5	24
pH 5,0	6	25
pH 6,0	7	25
pH 7,0	8	25
pH 8,0	8	25
pH 9,0	8	25
Đối chứng (mẫu không xử lý)		8

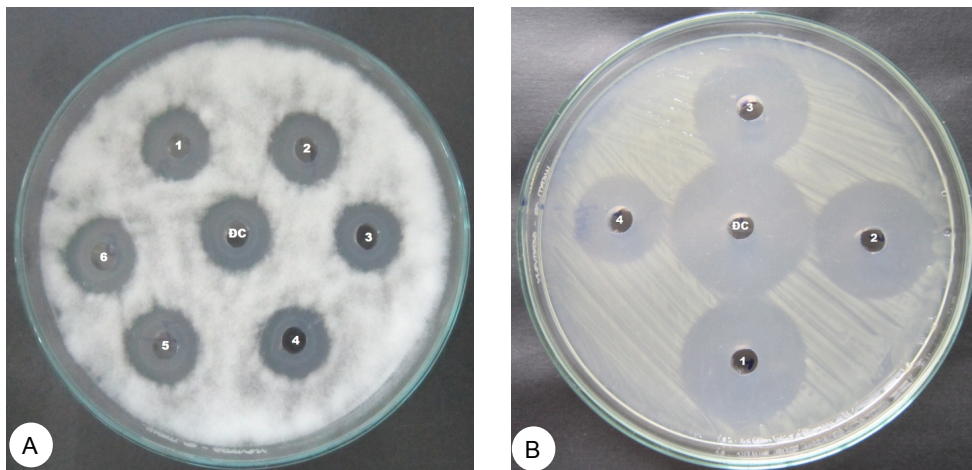
**Bảng 4.** Khả năng bền với các enzyme thủy phân.

Enzyme	Hoạt tính đối kháng (D - d, mm)	
	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Xanthomonas oryzae</i>
Amylase	8	25
Chymotrypsin	8	25
Lipase	8	25
Protease	8	25
Trypsin	8	25
Đối chứng (mẫu không xử lý)		8

## THẢO LUẬN

*B. velezensis* (hay còn gọi là *B. methylotrophicus*, *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* và *B. oryzae*) là một loài vi khuẩn sở hữu nhiều đặc tính quý có lợi cho cây trồng, đặc biệt là khả năng sinh các chất kháng nấm và kháng vi khuẩn gây bệnh cây (Dunlap *et al.*, 2015). Do đó, nhiều chủng *B. velezensis* phân lập từ các vùng sinh thái khác nhau đã được ứng dụng trong đấu tranh sinh học để phòng trừ bệnh cây. Nhiều chất có hoạt tính sinh học từ loài *B. velezensis* đã được nghiên cứu nhằm làm rõ bản chất cấu trúc hóa học cũng như cơ chế tấn công của chất kháng sinh đến các vị trí đích của vi sinh vật gây bệnh. Từ bộ sưu tầm chủng *B. velezensis* phân lập ở các vùng sinh thái khác nhau tại Việt Nam, chủng CP 1604 chứng minh có khả năng sinh chất kháng nấm và kháng khuẩn mạnh nhất kháng lại các loại nấm hại cây là *F. oxysporum*, *S. hydrophilum*, *R. solani*, *P. capsici* và vi khuẩn gây bệnh

bạc lá *X. oryzae* (Trung *et al.*, 2016). Các hoạt chất này đều có thể tách chiết với hiệu quả tương đương bằng các phương pháp hấp phụ trong hạt Amberlite XAD-7, chiết trong ethanol từ dịch đông khô, tủa ở pH thấp hoặc chiết bằng các dung môi hữu cơ là 1-butanol và 2-pentanol. Kết quả tinh sạch bằng HPLC cho thấy chất kháng nấm và chất kháng khuẩn là hai chất khác nhau được thối ra ở hai thời điểm khác nhau. Phân tích khối phổ cho thấy, bên cạnh các mảnh phổ khối được quan sát thấy trên bản phổ ion dương, mảnh có khối lượng phân tử giống iturin A ( $M + H^+ = 1043$ ) được tìm thấy trong phân đoạn chất có hoạt tính kháng nấm. Tương tự mảnh có khối lượng phân tử giống macrolactin A ( $M - H^+ = 401$ ) được phát hiện thấy trên bản phổ ion âm của phân đoạn có hoạt tính kháng khuẩn. Điều đó chứng tỏ chủng CP 1604 sản sinh đồng thời 2 chất kháng nấm và kháng khuẩn trong dịch nuôi cấy và sự hiệp đồng của 2 chất này giúp cho dịch nuôi cấy của chủng CP 1604 có hoạt tính kháng nấm và vi khuẩn phổ rộng.



**Hình 3.** Hoạt tính của chất kháng nấm và chất kháng khuẩn khi xử lý ở các nhiệt độ khác nhau. Hoạt tính kháng nấm *F. oxysporum* (A) khi xử lý ở nhiệt độ 60°C trong 90 phút (1) và 120 phút (2), khi xử lý ở nhiệt độ 80°C trong 90 phút (3) và 120 phút (4), khi xử lý ở nhiệt độ 100°C trong 90 phút (5) và 120 phút (6). Hoạt tính kháng khuẩn *X. oryzae* (B) khi xử lý ở nhiệt độ 100°C trong 30 phút (1), 60 phút (2), 90 phút (3) và 120 phút (4). ĐC là đối chứng.

Lipopeptide là các chất kháng sinh chính sản sinh từ vi khuẩn *Bacillus* và các chi có quan hệ gần gũi như *Paenibacillus* và *Brevibacillus* (Cochrance, Vederas, 2014). Chất kháng sinh này được cấu tạo từ 2 thành phần chính là chuỗi peptide mạch thẳng hoặc vòng liên kết với phần mạch acid béo tại vị trí đầu N của peptide. Trong số các lipopeptide đã công bố, iturin là được xếp vào nhóm không mang điện tích dương, có 7 amino acid khép vòng bởi một liên kết amide giữa đầu N của phân tử  $\beta$ -amino acid béo và đầu C của amino acid cuối (Cochrance, Vederas,

2014). Iturin thường được tách chiết từ các loài vi khuẩn thuộc nhóm *B. subtilis*, trong đó có *B. velezensis* (Meena, Kanwar, 2015). Dựa trên sự khác nhau về thành phần cấu tạo chuỗi amino acid và cấu trúc của phân tử acid béo, lớp iturin được chia ra làm nhiều loại với các tên gọi khác nhau là iturin, mixirin, subtilene, mycosubtilin, mojovensin và bacillomycin. Kháng sinh lớp iturin có hoạt tính kháng nấm mạnh nhưng không có hoạt tính kháng khuẩn. Iturin tấn công vào thành phần sterol trong màng tế bào nấm, làm tăng tính thấm của ion kali,

phá vỡ màng tế bào, làm thoát hoặc bất hoạt các thành phần trong tế bào tế bào nấm, dẫn đến tiêu diệt tế bào nấm (Cochrance, Vederas, 2014; Gong *et al.*, 2015). Theo các công bố trước đây, iturin A có phổ hoạt tính kháng nấm rộng, kháng lại các loại nấm như *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Penicillium*, *Aspergillus* và *Pyricularia* (Yu *et al.*, 2002; Gong *et al.*, 2006; Pyoung *et al.*, 2010). Iturin A sản sinh từ chủng CP 1604 cũng có phổ hoạt tính kháng nấm mạnh kháng lại *F. oxysporum*, *S. hydrophilum*, *R. solani*, *P. capsici*, *A. oryzae*, *A. niger* và *S. cerevisiae* (Trung *et al.*, 2016).

Bên cạnh lipopeptide, polyketide cũng là một trong những chất trao đổi chính thường được tìm thấy trong dịch nuôi cấy của vi khuẩn *Bacillus*. Polyketide thường có hoạt tính kháng khuẩn, kháng virus và kháng tế bào ung thư (Schneider *et al.*, 2007). Phân tích DNA của chủng *B. velezensis* FZB42 cho thấy hệ genome có 3 nhóm gen là *pks1*, *pks2* và *pks3* quy định tổng hợp các polyketide lần lượt là bacillaene, macrolactin và difficidin (Chen *et al.*, 2006; Schneider *et al.*, 2007). Macrolactin là một lactone dạng vòng có 24 phân tử carbon liên kết với 1 hydrocarbon tại vị trí carbon số 7. Đây là chất được phát hiện lần đầu tiên vào năm 1989 trong dịch nuôi cấy của một loài vi khuẩn biển và đến nay có khoảng gần 20 loại macrolactin đã được công bố (Gustafson *et al.*, 1989; Chakraborty *et al.*, 2014). Trong số đó, macrolactin A có hoạt tính kháng vi khuẩn mạnh nhất, đặc biệt là khả năng đối kháng với một số loại vi khuẩn kháng thuốc kháng sinh như *Staphylococcus aureus* kháng methicillin và *Enterococcus* kháng vancomycin (Romero-Tabarez *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2011). Macrolactin A đã được phát hiện trong dịch nuôi cấy của một số chủng *B. velezensis* như chủng GA1 (Arguelles-Arias *et al.*, 2009) và ESB-2 (He *et al.*, 2013). Macrolactin A sản sinh từ các chủng *B. velezensis* như HR62 và NJN-6 đã được chứng minh có hoạt tính kháng lại các loại vi khuẩn gây bệnh héo xanh *Ralstonia solanacearum* (Huang *et al.*, 2014; Yuan *et al.*, 2012). Macrolactin A sản sinh từ chủng CP 1604 được chứng minh có hoạt tính kháng vi khuẩn gây bệnh bạc lá *X. oryzae*. Hơn nữa, dịch nuôi cấy của chủng CP 1604 cũng có hoạt tính kháng vi khuẩn kháng thuốc *S. aureus* và *E. faecalis*.

Lipopeptide từ vi khuẩn *Bacillus* là các chất trao đổi bậc 2 được sản sinh theo con đường sinh tổng peptide không cần ribosome nhờ sự có mặt của nhóm đa enzyme non-ribosomal peptide synthetases (NRPS). Chất kháng sinh này chứa hỗn hợp các

amino acid dạng D và dạng L, giúp cho chất kháng sinh bền với các enzyme thủy phân (Cochrance, Vederas, 2014). Điều đó hoàn toàn đúng với chất kháng nấm và chất kháng khuẩn sinh ra từ chủng CP 1604. Cả hai chất đều bền với một loạt các protease như trypsin,  $\alpha$ -chymotrypsin, và proteinase K. Ngoài ra, hai chất này vẫn duy trì hoạt tính khi xử lý ở pH base. Iturin A bền nhiệt độ hơn so với macrolactin A.

Sử dụng thuốc trừ sâu hóa học trong phòng trừ sâu bệnh hại cây không những gây ô nhiễm môi trường mà còn làm ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khỏe con người. Do đó, việc tìm kiếm các chất mới có thời gian bán hủy nhanh, tiêu diệt đặc hiệu vi sinh vật đích và có nguồn gốc từ vi sinh vật vẫn đang được các nhà khoa học quan tâm (Copping, Mann, 2000). Vì vậy, nghiên cứu tiếp theo để thử nghiệm tính an toàn và hiệu quả phòng trừ bệnh hại cây là việc làm cần thiết nhằm tìm kiếm khả năng ứng dụng của chất kháng nấm và chất kháng khuẩn từ chủng *B. velezensis* CP 1604 trong phát triển nông nghiệp xanh và bền vững.

## KẾT LUẬN

Chủng *B. velezensis* CP 1604 sinh chất kháng nấm và chất kháng khuẩn. Dựa trên phân tích khối phổ, chất kháng nấm được xác định là iturin A có trọng lượng phân tử là 1042 Da và chất kháng khuẩn là macrolactin A có trọng lượng phân tử là 402 Da. Chất kháng nấm bền nhiệt nhưng chất kháng khuẩn bị giảm hoạt tính khi bị xử lý ở 100°C. Cả hai chất này đều giảm hoạt tính ở pH acid nhưng duy trì hoạt tính ở pH base. Hoạt tính kháng nấm và kháng khuẩn không thay đổi khi xử lý với các enzyme thủy phân là trypsin,  $\alpha$ -chymotrypsin, amylase, lipase và proteinase K.

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu này được tài trợ từ đề tài mã số QG.13.12 của Đại học Quốc gia Hà Nội.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Arguelles-Arias A, Ongena M, Halimi B, Lara Y, Brans A, Joris B, Fickers P (2009) *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microb Cell Fact* 8: 63.
- Chakraborty K, Thilakan B, Raola VK (2014) Polyketide family of novel antibacterial 7-O-Methyl-5'-hydroxy-3'-heptenoate-macrolactin from seaweed-associated *Bacillus*

- subtilis* MTCC 10403. *J Agric Food Chem.* 62: 12194–12208.
- Chen XH, Vater J, Piel J, Franke P, Scholz R, Schneider K, Koumoutsi A, Hitzeroth G, Grammel N, Strittmatter AW, Gottschalk G, Sussmuth RD, Borriss R (2006) Structural and functional characterization of three polyketide synthase gene clusters in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *J Bacteriol* 188: 4024–4036.
- Chowdhury SP, Hartmann A, Gao X, Borriss R (2015) Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 - a review. *Front Microbiol* 6: 780.
- Cochrance SA, Vederas JC (2014) Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: A golden mine of antibiotic candidates. *Med Res Rev* 36: 4–31.
- Copping LG, Mann JJ (2000) Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. *Pest Mag Sci* 56: 651–676.
- Dunlap CA, Kim SJ, Kwon SW, Rooney AP (2015) *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and '*Bacillus oryzicola*' are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics. *Int J Syst Evol Microbiol* 66: 1212–1217.
- Gong M, Wang J, Zhang J, Yang H, Lu X, Pei Y, Cheng J (2006) Study of the antifungal ability of *Bacillus subtilis* strain PY-1 in vitro and identification of its antifungal substance (iturin A). *Acta Bioch Bioph Sin* 38: 233–240.
- Gong AD, Li HP, Yuan QS, Song XS, Yao W, He WJ, Zhang JB, Liao YC (2015) Antagonistic mechanism of iturin A and plipastatin A from *Bacillus amyloliquefaciens* S76-3 from wheat spikes against *Fusarium graminearum*. *PLoS One* 10: e0116871.
- Gustafson K, Roman M, Fenical W (1989) The macrolactins, a novel class of antiviral and cytotoxic macrolides from a deep-sea marine bacterium. *J Am Chem Soc* 111: 7519–7524.
- He Z, Kislá D, Zhang L, Yuan C, Green-Church KB, Yousef AE (2007) Isolation and identification of a *Paenibacillus polymyxa* strain that coproduces a novel lantibiotic and polymyxin. *Appl Environ Microbiol* 73: 168–178.
- He S, Wang H, Yan X, Zhu P, Chen J, Yang R (2013) Preparative isolation and purification of macrolactin antibiotics from marine bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* using high-speed counter-current chromatography in stepwise elution mode. *J Chromatogr A* 1272: 15–19.
- Huang J, Wei Z, Tan S, Mei X, Shen Q, Xu Y (2014) Suppression of bacterial wilt of tomato by bioorganic fertilizer made from the antibacterial compound producing strain *Bacillus amyloliquefaciens* HR62. *J Agric Food Chem* 62:10708–10716.
- Kim DH, Kim HK, Kim KM, Kim CK, Jeong MH, Moon KH, Kang JS (2011) Antibacterial activities of macrolactin A and 7-O-succinyl macrolactin A from *Bacillus polyfermenticus* KJS-2 against vancomycin-resistant enterococci and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Arch Pharm Res* 34: 147–152.
- Li SB, Xu SR, Zhang RN, Liu Y, Zhou RC (2015) The antibiosis action and rice induced resistance, mediated by a lipopeptide from *Bacillus amyloliquefaciens* B014, in controlling rice disease caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. *J Microbiol Biotechnol* 26: 748–756.
- Meena KR, Kanwar SS (2015) Lipopeptides as the antifungal and antibacterial agents: Application in food safety and therapeutics. *Biomed Res Int* 2015: 173050.
- Ongena M, Jacques P (2008) *Bacillus lipopeptides*: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol* 16: 115-125.
- Romero-Tabarez M, Jansen R, Sylla M, Lünsdorf H, Häußler S, Santosa DA, Timmis KN, Molinari G (2006) 7-O-Malonyl macrolactin A, a new macrolactin antibiotic from *Bacillus subtilis* active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin-resistant enterococci, and a small-colony variant of *Burkholderia cepacia*. *Antimicrob Agents Chem.* 50: 1701–1709.
- Rooney AP, Price NP, Ehrhardt C, Swezey JL, Bannan JD (2009) Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 59: 2429–2436.
- Pyoung K, Ryu J, Kim YH, Chi YT (2010) Production of biosurfactant lipopeptides iturin A, fengycin, and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *J Microbiol Biotechnol* 20: 138–145.
- Trung TT, Van DTT, Lien NP, Luong DT, Hop DV (2016) Tiềm năng ứng dụng tạo chế phẩm làm phân bón hữu cơ sinh học từ các chủng vi khuẩn *Bacillus velezensis* phân lập từ các vùng sinh thái khác nhau tại Việt Nam. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*. Đang phân biện.
- Schneider K, Chen XH, Vater J, Franke P, Nicholson G, Borriss R, Sussmuth RD (2007) Macrolactin is the polyketide biosynthesis product of the pks2 cluster of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *J Nat Prod* 70: 1417–1423.
- Shao J, Li S, Zhang N, Cui X, Zhou X, Zhang G, Shen Q, Zhang R (2015) Analysis and cloning of the synthetic pathway of the phytohormone indole-3-acetic acid in the plant-beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. *Microb Cell Fact* 14: 130.
- Stein T (2005) *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol* 56: 845–857.



Yuan J, Li B, Zhang N, Waseem R, Shen Q, Huang Q (2012) Production of bacillomycin- and macrolactin-type antibiotics by *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 for suppressing soilborne plant pathogens. *J Agric Food Chem* 60: 2976–2981.

Yu GY, Sinclair GB, Hartman GL, Bertagnolli BL (2002) Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia Solani*. *Soil Biol Biochem* 34: 955–963.

## EXTRACTION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ANTIFUNGAL AND ANTIBACTERIAL SUBSTANCES PRODUCED FROM *BACILLUS VELEZENSIS* CP 1604

Trinh Thanh Trung<sup>1,✉</sup>, Dinh Thi Tuyet Van<sup>1</sup>, Nguyen Phuong Lien<sup>2</sup>, Dao Thi Luong<sup>1</sup>, Duong Van Hop<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Microbiology and Biotechnology, Vietnam National University, Hanoi*

<sup>2</sup>*National Institute for Control of Vaccine and Biologicals*

### SUMMARY

*Bacillus velezensis* is one of the members of the *Bacillus subtilis* species complex which is generally considered as safety organism. The bacterium possesses several beneficial properties for crops, especially production of antifungal and antibacterial agents against plant pathogens. In this study, we aimed to investigate the biological properties of antimicrobial substances produced from *B. velezensis* CP 1604. From liquid culture, substances with activity against *Fusarium oxysporum* and *Xanthomonas oryzae* were extracted by means of adsorption with Amberlite XAD-7, extraction from lyophilized powder using ethanol, precipitation at low pH and extraction with organic solvents of 1-butanol and 2-pentanol. The substances were subsequently purified using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Antifungal substance was eluted at 5.328 min while antibacterial substance was observed at 15.313 min. Mass spectrometry analysis showed that antifungal substance was iturin A with molecular weight of 1042 Da and antibacterial substance was macrolactin A with molecular weight of 402 Da. The antifungal substance was stable at high temperature but antibacterial activity was significantly reduced when treated at 100° C for 2 hours. Both substances reduced the activity at low pH but the activities still maintained at high pH. The antimicrobial activities against the fungal and bacterium were not affected when treated with hydrolytic enzymes such as trypsin,  $\alpha$ -chymotrypsin, amylase, lipase and proteinase K. Further safety and efficiency investigations of the antifungal and antibacterial substances from *B. velezensis* CP 1604 on the plant disease control are required in order to seek for the potential application on sustainable agricultural production.

**Keywords:** *Aantibacterial substance, antifungal substance, Bacillus velezensis, iturin, lipopeptide, macrolactin, polyketide*

---

✉ Author for correspondence: Tel/Fax: +84-4-37547407; Email: [ttrung@vnu.edu.vn](mailto:ttrung@vnu.edu.vn)