

ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN
-----o0o-----

Ngô Thị Trang

**NGHIÊN CỨU ĐỊNH DANH VI KHUẨN LAM
PHÂN LẬP TẠI MỘT SỐ ĐỊA PHƯƠNG Ở
VIỆT NAM VÀ ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH SINH HỌC
CỦA CÁC CHỦNG TIỀM NĂNG**

Chuyên ngành: Hóa sinh học

Mã số: 9420101.16

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Hà Nội – 2026

**ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN
-----o0o-----**

Ngô Thị Trang

**NGHIÊN CỨU ĐỊNH DANH VI KHUẨN LAM
PHÂN LẬP TẠI MỘT SỐ ĐỊA PHƯƠNG Ở
VIỆT NAM VÀ ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH SINH HỌC
CỦA CÁC CHỦNG TIỀM NĂNG**

Chuyên ngành: Hóa sinh học

Mã số: 9420101.16

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1. PGS. TS. Nguyễn Đình Thắng
2. TS. Phạm Thị Lương Hằng

Hà Nội – 2026

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi dưới sự hướng dẫn khoa học của PGS.TS. Nguyễn Đình Thắng và TS. Phạm Thị Lương Hằng. Các kết quả nêu trong luận án là trung thực, các số liệu tham khảo đều có nguồn trích dẫn rõ ràng. Kết quả của luận án chưa từng được bảo vệ để nhận học vị trước bất kỳ hội đồng nào trước đây.

Nghiên cứu sinh

Ngô Thị Trang

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành được luận án này, trước tiên tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới **PGS. TS. Nguyễn Đình Thắng** người thầy đã luôn định hướng và truyền đạt cho tôi những kinh nghiệm quý báu trong suốt quá học tập và nghiên cứu.

Đặc biệt, tự đáy lòng mình tôi xin gửi lời cảm ơn sâu sắc tới **TS. Phạm Thị Lương Hằng**, người đã truyền cho tôi niềm yêu thích hướng nghiên cứu về vi khuẩn lam và trao cho tôi cơ hội được thực hiện luận án này. Người luôn dành thời gian, tận tình chỉ bảo, hướng dẫn tôi trong suốt quá trình thực hiện luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn **PGS.TS. Nguyễn Thị Kim Oanh** - Trường Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội (USTH) đã hỗ trợ đo sắc ký lỏng khối phổ có độ phân giải cao. Đồng thời tôi cũng xin chân thành cảm ơn **GS.TS. Võ Hành** - trường Đại học Vinh và **PGS.TS. Nguyễn Thị Thu Liên** - trường Đại học Huế đã cung cấp chủng DL1, DL12 và PM3; **PGS. TS. Nguyễn Lai Thành** - Bộ môn Tế bào học đã cung cấp các chủng Tế bào; **PGS.TS. Bùi Thị Việt Hà** - Bộ môn Vi sinh vật học, Khoa Sinh học đã cung cấp các chủng vi khuẩn kiểm định cho luận án.

Bên cạnh đó, tôi xin chân thành cảm ơn Ban Giám hiệu, các Phòng ban chức năng, Khoa Sinh học và Bộ môn Hóa sinh và Sinh học phân tử đã tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Cuối cùng tôi xin gửi lòng biết ơn sâu sắc tới gia đình, bạn bè, người thân và tập thể nhóm nghiên cứu và các em sinh viên đã luôn sát cánh, ủng hộ, động viên và giúp đỡ tôi.

Nghiên cứu này được tài trợ bởi các đề tài: cấp Đại học Quốc gia (mã số QG.22.04; QG.19.04) và quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia - Nafosted, mã số 106.02 - 2019.336).

Một lần nữa, tôi xin chân thành cảm ơn!

Hà Nội, ngày 12 tháng 03 năm 2026

Tác giả luận án

NCS. Ngô Thị Trang

MỤC LỤC

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT	4
DANH MỤC BẢNG.....	6
DANH MỤC HÌNH	7
MỞ ĐẦU.....	9
1. Tính cấp thiết của đề tài	9
2. Mục tiêu nghiên cứu của đề tài	10
3. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu.....	10
4. Nội dung nghiên cứu	10
5. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án	11
6. Những đóng góp mới của luận án	11
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	13
1.1. Giới thiệu chung về vi khuẩn lam	13
1.1.1. Đặc điểm cấu tạo tế bào	13
1.1.2. Đặc điểm hình thái và sự phân bố.....	16
1.2. Phân loại vi khuẩn lam bằng phương pháp tiếp cận đa chiều.....	18
1.2.1. Phân loại dựa vào đặc điểm hình thái và siêu cấu trúc tế bào.....	19
1.2.2. Phân loại dựa vào đặc điểm sinh thái.....	19
1.2.3. Phân loại dựa vào trình tự gen	20
1.2.4. Phân loại dựa vào mối quan hệ phát sinh chủng - loại	23
1.3. Các hợp chất có hoạt tính sinh học từ vi khuẩn lam	26
1.3.1. Các hoạt chất ức chế vi khuẩn.....	28
1.3.2. Các hoạt chất ức chế tế bào ung thư	30
1.3.3. Cơ chế tác động lên tế bào ung thư bởi các hoạt chất từ vi khuẩn lam	32
1.3.3.1. Làm ngừng (bắt giữ) chu trình tế bào	32
1.3.3.2. Kích hoạt con đường apoptosis.....	33
1.3.3.3. Ức chế khả năng di cư của tế bào	36
1.4. Ứng dụng của vi khuẩn lam trong lĩnh vực dược phẩm	37
1.5. Các nghiên cứu về vi khuẩn lam tại Việt Nam	40
1.5.1. Các nghiên cứu về đa dạng vi khuẩn lam	40

1.5.2. Các nghiên cứu về hoạt chất sinh học từ vi khuẩn lam.....	41
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	43
2.1. Đối tượng nghiên cứu.....	43
2.1.1 Chủng vi khuẩn lam	43
2.1.2. Chủng vi khuẩn kiểm định	43
2.1.3. Dòng tế bào	43
2.2. Hóa chất, thiết bị	44
2.3. Phương pháp nghiên cứu.....	45
2.3.1. Các phương pháp phân lập và phân loại vi khuẩn lam	45
2.3.1.1. Phương pháp thu mẫu vi khuẩn lam	45
2.3.1.2. Phương pháp phân lập vi khuẩn lam.....	45
2.3.1.3. Quan sát và phân tích hình thái.....	46
2.3.1.4. Tách chiết DNA tổng số, khuếch đại và giải trình tự đoạn gen 16S rRNA.....	46
2.3.1.5. Xây dựng cây phát sinh chủng - loại.....	48
2.3.2. Các phương pháp nuôi sinh khối và thu cao chiết tổng số.....	49
2.3.2.1. Nuôi và thu sinh khối vi khuẩn lam	49
2.3.2.2. Tách chiết và thu cao chiết tổng số	49
2.3.3. Phương pháp đánh giá hoạt tính và cơ chế tác động.....	50
2.3.3.1. Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn	50
2.3.3.2. Đánh giá độc tính tế bào.....	50
2.3.3.3. Xác định tỷ lệ tế bào chết theo con đường apoptosis.....	51
2.3.3.4. Xác định pha bị bắt giữ trong chu trình tế bào.....	52
2.3.3.5. Đánh giá khả năng di cư của tế bào ung thư.....	53
2.3.3.6. Đánh giá mức độ biểu hiện của các gen.....	53
2.3.4. Các phương pháp phân tách và xác định thành phần hoạt chất.....	54
2.3.4.1. Chiết phân lớp lỏng - lỏng.....	54
2.3.4.2. Phân tách các chất bằng sắc ký cột thủy tinh.....	55
2.3.4.3. Sắc ký mỏng (TLC).....	57
2.3.4.4. Sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).....	58
2.3.4.5. Xác định thành phần hợp chất bằng LC-HRMS	58
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	60

3.1. Phân lập và định danh các chủng vi khuẩn lam	60
3.1.1. Kết quả phân lập của các chủng vi khuẩn lam.....	60
3.1.2. Đặc điểm hình thái của các chủng vi khuẩn lam.....	60
3.1.3. Phân tích trình tự đoạn gen 16S rRNA của các chủng vi khuẩn lam.....	66
3.1.3.1. Khuếch đại và giải trình tự đoạn gen 16S rRNA	66
3.1.3.2. Mối quan hệ tiến hóa của các chủng vi khuẩn lam	66
3.2. Đánh giá hoạt tính sinh học của cao chiết tổng số từ vi khuẩn lam.....	85
3.2.1. Khối lượng sinh khối và cao chiết	85
3.2.2. Hoạt tính kháng khuẩn của các cao chiết.....	87
3.2.3. Hoạt tính ức chế tế bào ung thư của các cao chiết.....	90
3.3. Cơ chế tác động của cao chiết NK13 lên tế bào HeLa.....	95
3.3.1. Tác động lên chu trình tế bào HeLa	95
3.3.2. Tác động lên con đường apoptosis của tế bào HeLa	98
3.3.3. Tác động ức chế khả năng di cư của tế bào HeLa	102
3.4. Phân tách hoạt chất ức chế tế bào HeLa từ cao chiết tổng số NK13	104
3.4.1. Phân tách thành phần cao chiết NK13 bằng phương pháp chiết lỏng - lỏng	104
3.4.2. Phân tách phân lớp có hoạt tính bằng sắc ký cột	107
3.4.2.1. Phân đoạn cao chiết n-hexane bằng sắc ký cột silica gel.....	107
3.4.2.2. Phân tách phân lớp EtOAc bằng sắc ký cột sephadex LH20.....	109
3.4.2.3. Phân tách phân đoạn BC ₀ bằng sắc ký cột silica gel.....	111
3.4.3. Kết quả tinh sạch phân đoạn D3 bằng phương pháp HPLC	112
3.4.5. Phân tích thành phần hoạt chất trong phân đoạn F6 bằng LC-HRMS.....	116
KẾT LUẬN	127
KIẾN NGHỊ	128
DANH MỤC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	129
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	131

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tên đầy đủ và giải thích
ACN	Acetonitrile
ATCC	American Type Culture Collection (Bộ sưu tập chủng vi sinh chuẩn Hoa Kỳ)
BI	Bayesian Inference (Suy luận Bayes)
CDKN	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor
CICD	Caspase-Independent Cell Death (Sự chết của tế bào không phụ thuộc caspase)
D	Diameter of the inhibition zone (Đường kính vòng vô khuẩn)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
ĐCSH	Đối chứng sinh học
EtOAc	Ethyl acetate
FBS	Fetal Bovine Serum (Huyết thanh thai bò)
GenBank	Ngân hàng gen thế giới
GHS	Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (Hệ thống hài hòa toàn cầu về phân loại và ghi nhãn hóa chất)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Sắc ký lỏng hiệu năng cao)

IC	Inhibitory concentration (Nồng độ ức chế)
ITS	Internal transcribed spacer (Vùng đệm trong được phiên mã)
LC-HRMS	Liquid Chromatography – High Resolution Mass spectrometry (Sắc ký lỏng khối phổ độ phân giải cao)
MEGA	Molecular Evolution Gentic Analysis (Phân tích di truyền tiến hóa phân tử)
MeOH	Methanol
MTT	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction (Phản ứng chuỗi trùng hợp)
PI	Propidium iodide
R _f	Retention factor (Hệ số lưu giữ)
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium
rRNA	Ribosomal Ribonucleic Acid
RT- qPCR	Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction (PCR phiên mã ngược định lượng)
TAE	Tris-HCl - Acid acetic - EDTA
TLC	Thin layer chromatography (Sắc ký bản mỏng)
UV	Ultraviolet (tia tử ngoại)
VKL	Vi khuẩn lam
v/v	Volunme/ volunme (thể tích / thể tích)

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Các hợp chất kháng virus và tế bào ung thư từ VKL đã được thương mại	39
Bảng 2.1. Trình tự môi cho phản ứng PCR.....	47
Bảng 2.2. Thành phần phản ứng PCR.....	47
Bảng 2.3. Hệ dung môi cho chạy sắc ký cột silicagel.....	56
Bảng 2.4. Gradient nồng độ MeOH trong phân tích HPLC.....	58
Bảng 3.1. Tỷ lệ tương đồng (%) về trình tự đoạn gen 16S rRNA của các chủng thuộc chi <i>Aulosira</i> và <i>Ahomia</i>	70
Bảng 3.2. Tỷ lệ tương đồng (%) về trình tự đoạn gen 16S rRNA của các chủng thuộc chi <i>Desmonostoc</i> và <i>Desikacharya</i>	73
Bảng 3.3. Tỷ lệ tương đồng (%) về trình tự đoạn gen 16S rRNA của các chủng thuộc chi <i>Aliinostoc</i>	78
Bảng 3.4. Hệ số tương đồng về trình tự đoạn gen 16S rRNA của 5 chi <i>Neowestilopsis</i> , <i>Westilopsis</i> , <i>Hapalosiphon</i> , <i>Scytonema</i> và <i>Dulcicalothrix</i>	82
Bảng 3.5. Sinh khối khô, khối lượng cao chiết và hiệu suất tách chiết	85
Bảng 3.6. Khả năng gây độc của cao chiết từ 7 chủng VKL lên tế bào HeLa	90
Bảng 3.7. Giá trị IC ₅₀ của cao chiết từ 5 chủng VKL lên tế bào HeLa.....	92
Bảng 3.8. Giá trị IC ₅₀ của cao chiết NK13 lên 5 dòng tế bào	93
Bảng 3.9. Khối lượng, hiệu suất chiết, độc tính trên tế bào HeLa của 4 cao chiết.....	105
Bảng 3.10. Khối lượng các phân đoạn (A1-A8) từ cao chiết n-hexane.....	108
Bảng 3.11. Khối lượng của các phân đoạn (B1 - B10) từ phân đoạn A ₂₋₃	109
Bảng 3.12. Khối lượng của các phân đoạn (C1 - C15) từ cao chiết EtOAc	110
Bảng 3.13. Khối lượng các phân đoạn (D1- D12) từ phân đoạn BC ₀	112
Bảng 3.14. Thời gian lưu, khối lượng và độc tính của phân đoạn F5, F6	113
Bảng 3.15. Thành phần hợp chất trong phân đoạn F6 ở chế độ ion hóa [M+H] ⁺ ...	121
Bảng 3.16. Thành phần hợp chất trong phân đoạn F6 ở chế độ ion hóa [M+H] ⁻ ...	124

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Cấu tạo thành tế bào vi khuẩn Gram dương, Gram âm và VKL	14
Hình 1.2. Các dạng bao nhày của một số loài VKL.....	15
Hình 1.3. Các dạng hình thái của vi khuẩn lam	17
Hình 1.4. Cấu trúc gen 16SrRNA ở vi khuẩn	21
Hình 1.5. Các hoạt tính sinh học ứng dụng trong y dược của VKL	27
Hình 1.6. Cơ chế ức chế vi khuẩn của các chất thứ cấp từ VKL	29
Hình 2.1. Sơ đồ quy trình thí nghiệm.....	45
Hình 2.2. Quy trình chiết phân lớp lỏng - lỏng.....	55
Hình 3.1. Quy trình phân lập vi khuẩn lam.....	60
Hình 3.2. Hình thái của 20 chủng vi khuẩn lam thuộc nhóm I.....	61
Hình 3.3. Hình thái của 21 chủng vi khuẩn lam thuộc nhóm I.....	62
Hình 3.4. Hình thái của 3 chủng vi khuẩn lam thuộc nhóm II.....	64
Hình 3.5. Hình thái của 6 chủng vi khuẩn lam thuộc nhóm III	65
Hình 3.6. Vị trí 3 nhóm hình thái trên cây phát sinh chủng - loại	67
Hình 3.7. Cây phát sinh chủng - loại của chi <i>Aulosira</i> và <i>Ahomia</i>	69
Hình 3.8. Cây phát sinh chủng - loại của chi <i>Desmonostoc</i> và <i>Desikachary</i>	72
Hình 3.9. Cây phát sinh chủng - loại của chi <i>Aliinostoc</i>	76
Hình 3.10. Cây phát sinh chủng - loại của 5 chi <i>Neowestilopsis</i> , <i>Westilopsis</i> , <i>Hapalosiphon</i> , <i>Scytonema</i> và <i>Dulcicalothrix</i>	81
Hình 3.11. Hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết tổng số từ 12 chủng VKL	88
Hình 3.12. Độc tính của cao chiết từ 5 chủng VKL lên tế bào HeLa	91
Hình 3.13. Độc tính của cao chiết NK13 lên 4 dòng tế bào.....	93
Hình 3.14. Tác động của cao chiết NK13 lên chu trình tế bào HeLa	96
Hình 3.15. Mức độ biểu hiện gen điều hòa chu trình tế bào HeLa	97
Hình 3.16. Tác động của cao chiết NK13 lên con đường apoptosis của tế bào HeLa	99
Hình 3.17. Mức độ biểu hiện của gen điều hòa con đường apoptosis của tế bào HeLa	100

Hình 3.18. Diện tích tế bào HeLa di cư o được theo khoảng thời gian	102
Hình 3.19. Biểu đồ so sánh diện tích tế bào HeLa di cư.....	103
Hình 3.20. Mức độ biểu hiện các gen điều hòa quá trình di cư của tế bào HeLa ...	103
Hình 3.21. Độc tính của 3 phân lớp n-hexane, EtOAc, MeOH lên tế bào HeLa....	105
Hình 3.22. Sắc ký đồ TLC của ba cao chiết n-hexane, EtOAc, MeOH.....	106
Hình 3.23. Sắc ký đồ TLC của các phân đoạn (A1- A8) từ cao chiết n-hexane.....	108
Hình 3.24. Sắc ký đồ TLC của các phân đoạn (B1 - B10) từ phân đoạn A ₂₋₃	108
Hình 3.25. Sắc ký đồ TLC của các phân đoạn (C1 - C15) từ phân lớp EtOAc	110
Hình 3.26. Sắc ký đồ TLC của các phân đoạn (D1 - D12) từ phân đoạn BC ₀	111
Hình 3.27. Sắc ký đồ HPLC của phân đoạn D3 (A) và TLC của phân đoạn F5, F6 (B, C).....	113
Hình 3.28. Độc tính của phân đoạn F6 lên tế bào HeLa	114
Hình 3.28. Tác động của phân đoạn F6 lên hình thái tế bào HeLa.....	115
Hình 3.30. Sắc ký đồ tổng ion của phân đoạn F6 ở chế độ ion hóa [M+H] ⁺	119
Hình 3.31. Sắc ký đồ tổng ion của phân đoạn F6 ở chế độ ion hóa [M+H] ⁻	120

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của đề tài

Vi khuẩn lam thuộc nhóm vi khuẩn Gram âm có khả năng quang tự dưỡng, đã xuất hiện trên trái đất từ 3,8 tỉ năm trước. Chúng đóng vai trò quan trọng trong hệ sinh thái tự nhiên nhờ khả năng quang hợp tạo oxy, cố định nitơ và sinh tổng hợp nhiều hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học như khả năng gây độc tế bào, kháng khuẩn, kháng nấm, kháng virus, chống oxy hóa, Trong những năm gần đây, vi khuẩn lam trở thành đối tượng được các nhà khoa học quan tâm nghiên cứu và ứng dụng trong nhiều lĩnh vực như công nghệ sinh học, dược học, nông nghiệp bền vững và nhiên liệu sinh học.

Mặc dù vậy, một trong những thách thức lớn trong nghiên cứu vi khuẩn lam hiện nay là hạn chế trong việc xác định danh pháp khoa học của chúng. Các phương pháp phân loại truyền thống dựa vào đặc điểm hình thái thường thiếu tính chính xác do hình thái của vi khuẩn lam dễ bị thay đổi dưới tác động của môi trường và các giai đoạn sinh trưởng khác nhau. Sự phát triển của sinh học phân tử hiện đại đã mở ra hướng tiếp cận mới giải quyết những hạn chế này. Phương pháp tiếp cận đa chiều (polyphasic approach) là phương pháp kết hợp dữ liệu hình thái, sinh thái và các chỉ thị phân tử (trình tự gen 16S rRNA, vùng ITS, các marker phân tử). Phương pháp này đã được chứng minh là công cụ hiệu quả và cần thiết trong phân loại vi khuẩn lam một cách chính xác và xác định được mối quan hệ tiến hóa giữa các đơn vị phân loại (taxon).

Việt Nam là quốc gia có nền nông nghiệp trồng lúa nước lâu đời với diện tích đất trồng lúa chiếm khoảng 22% diện tích cả nước tạo sinh cảnh thuận lợi cho sự phát triển của các loài vi khuẩn lam đặc biệt là vi khuẩn lam có khả năng cố định đạm. Nhiều nghiên cứu trong nước cho thấy sự đa dạng của các loài vi khuẩn lam phân lập từ đất ruộng lúa. Tuy nhiên, các nghiên cứu này chủ yếu dừng lại ở mức mô tả hình thái mà ít đi sâu về định danh dựa trên phương pháp tiếp cận đa chiều. Mặt khác, giá trị về nguồn hợp chất có hoạt tính sinh học do các chủng vi khuẩn lam bản địa sinh tổng hợp vẫn chưa được khai thác đầy đủ như tiềm năng của chúng. Điều này dẫn

đến nguy cơ bỏ sót nhiều nguồn tài nguyên vi khuẩn lam quý giá có thể phục vụ trong lĩnh vực thực phẩm chức năng, chế phẩm sinh học và giải pháp bền vững cho nông nghiệp và đặc biệt là ứng dụng trong nghiên cứu và phát triển thuốc mới trong lĩnh vực y - dược.

Chính vì vậy, nghiên cứu sinh đã thực hiện đề tài “**Nghiên cứu định danh vi khuẩn lam phân lập tại một số địa phương ở Việt Nam và đánh giá hoạt tính sinh học của các chủng tiềm năng**”.

2. Mục tiêu nghiên cứu của đề tài

- ✓ Phân lập và định danh các chủng vi khuẩn lam tại một số địa phương ở Việt Nam.
- ✓ Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn và ức chế tế bào ung thư của một số chủng vi khuẩn lam tiềm năng.

3. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu

Nghiên cứu tập trung vào việc định danh các chủng vi khuẩn lam dạng sợi phân lập từ mẫu đất ở các tỉnh/ thành phố Hà Nội, Hưng Yên, Thanh Hóa, Huế và Đắk Lắk dựa vào phương pháp tiếp cận đa chiều; đồng thời, đánh giá hoạt tính ức chế vi khuẩn và hoạt tính gây độc tế bào của cao chiết từ các chủng vi khuẩn lam đã phân lập để lựa chọn chủng tiềm năng phục vụ định hướng nghiên cứu và phát triển thuốc.

4. Nội dung nghiên cứu

Nội dung 1. Phân lập và định danh các chủng vi khuẩn lam tại một số tỉnh/ thành phố ở Việt Nam.

Nội dung 2. Đánh giá hoạt tính ức chế vi khuẩn và hoạt tính gây độc tế bào của cao chiết tổng số từ các chủng vi khuẩn lam đã phân lập.

Nội dung 3. Đánh giá cơ chế tác động của cao chiết của chủng *Scytonema bilaspurense* NK13 lên tế bào HeLa.

Nội dung 4. Phân tách và xác định thành phần hoạt chất ức chế tế bào HeLa trong cao chiết tổng số từ chủng *Scytonema bilaspurense* NK13.

5. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án

* Ý nghĩa khoa học:

- Luận án cung cấp bằng chứng về tính đa dạng của vi khuẩn lam tại Việt Nam thông qua việc phân lập, định danh các chủng bằng phương pháp tiếp cận đa chiều; bổ sung nguồn dữ liệu quan trọng về trình tự đoạn gen 16S rRNA của vi khuẩn lam vào ngân hàng gen thế giới (GenBank) làm các trình tự tham khảo cho các nghiên cứu tiếp theo về vi khuẩn lam;

- Đồng thời luận án còn cung cấp dữ liệu mới về cơ chế tác động của cao chiết từ chủng *Scytonema bilaspurense* NK13 trong tác động ức chế tế bào ung thư HeLa.

* Ý nghĩa thực tiễn: Nghiên cứu mở ra tiềm năng ứng dụng các chủng vi khuẩn lam bản địa trong phát triển nguồn dược liệu tự nhiên, đặc biệt là các hợp chất có hoạt tính kháng khuẩn và chống ung thư, phục vụ nghiên cứu và sản xuất thuốc có nguồn gốc tự nhiên.

6. Những đóng góp mới của luận án

- ✓ Kết quả của luận án đã cung cấp cơ sở dữ liệu phân loại đến cấp độ loài của 34/50 chủng vi khuẩn lam ở Việt Nam theo phương pháp phân loại học hiện đại. Đồng thời, luận án đã phát hiện 16/50 chủng vi khuẩn lam chưa được đề xuất đến tên loài trong hệ thống phân loại của vi khuẩn lam. Kết quả này góp phần bổ sung cơ sở dữ liệu mới về nguồn tài nguyên vi sinh vật bản địa ở Việt Nam và cập nhật trình tự đoạn gen 16S rRNA trong ngân hàng gen thế giới (GenBank).
- ✓ Kết quả của luận án đã chỉ ra hai chủng vi khuẩn lam có hoạt tính sinh học mạnh, trong đó chủng *Desmonostoc* sp. CAVN8204 ức chế vi khuẩn *Bacillus cereus* ATCC 14579 với đường kính vòng vô khuẩn đạt 19,0 mm và chủng *Scytonema bilaspurense* NK13 thể hiện độc tính cao trên tế bào ung thư HeLa với giá trị IC₅₀ là 3,8 µg/ml. Bên cạnh đó, một phân đoạn (F6) được phân tách từ dịch chiết tổng số của chủng *Scytonema bilaspurense* NK13 có khả năng ức chế tế bào HeLa với giá trị IC₅₀ là 3,5 µg/ml. Kết quả này mở ra hướng nghiên cứu và phát triển thuốc điều trị ung thư có nguồn gốc từ vi khuẩn lam bản địa của Việt Nam.

- ✓ Kết quả của luận án đã làm sáng tỏ cơ chế gây chết của cao chiết tổng số từ chủng *S. bilaspurense* NK13 lên dòng tế bào ung thư HeLa thông qua kích hoạt con đường apoptosis, làm dừng chu trình tế bào và ức chế khả năng di cư của tế bào HeLa. Đây là lần đầu tiên các hợp chất có hoạt tính ức chế tế bào ung thư của chi *Scytonema* được nghiên cứu tương đối đầy đủ về cơ chế tác động.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

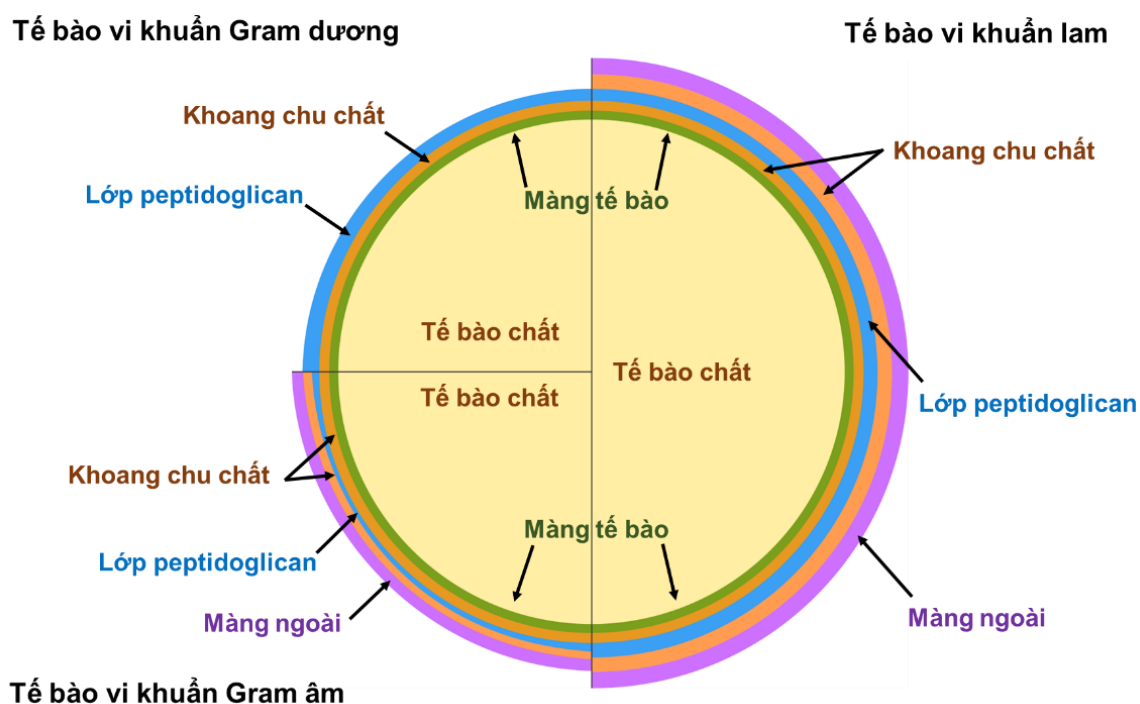
1.1. Giới thiệu chung về vi khuẩn lam

1.1.1. Đặc điểm cấu tạo tế bào

Vi khuẩn lam (VKL) là một trong những nhóm sinh vật nhân sơ nguyên thủy nhất trên trái đất xuất hiện cách đây khoảng 3,5 - 3,8 tỷ năm, có khả năng thực hiện quá trình quang tự dưỡng. Chúng được tìm thấy ở hầu hết các môi trường được chiếu sáng và đóng vai trò quan trọng trong việc chuyển đổi bầu khí quyển trái đất từ trạng thái khử, thiếu oxy thành một bầu khí quyển oxy hóa. Sự kiện này là bước ngoặt lớn giúp đa dạng hóa các dạng sống và góp phần vào quá trình tiến hóa sinh học toàn cầu [Schopf J.W., 1987].

Trước đây, VKL được xếp vào nhóm tảo do chúng có cơ chế quang hợp giống tảo nhân chuẩn và thực vật chứa lục lạp. Năm 1971, Stanier và cộng sự đã đề xuất đổi tên thành “vi khuẩn lam” (cyanobacteria) để nhấn mạnh hai đặc điểm tiêu biểu của chúng là sinh vật nhân sơ (bacteria) có màu xanh lam (cyano). Thứ nhất là cấu trúc và thành tế bào của VKL mang đặc điểm điển hình của sinh vật nhân sơ hơn so với các sinh vật nhân chuẩn như tế bào không có màng nhân và DNA không liên kết với protein histone. Thứ hai là trong tế bào có màng thylakoid chứa các sắc tố thực hiện chức năng quang hợp (trừ bộ *Gloeobacter*) và ribosome 70S phân bố rải rác trong tế bào chất. Tuy nhiên, tế bào chất lại thiếu một số bào quan như bộ máy golgi, mạng lưới nội chất, ty thể, lục lạp [Stanier R.Y, 1971].

Khi quan sát dưới kính hiển vi, thành tế bào VKL mang đặc điểm tương tự thành tế bào vi khuẩn Gram âm bao gồm bốn lớp là lớp màng ngoài (outer membrane) chứa lipopolyschaccarides (LPS), 2 khoang chu chất (periplasmic space) và lớp peptidoglycan nằm sát màng sinh chất. Tuy nhiên so với các vi khuẩn Gram âm, lớp peptidoglycan của VKL dày hơn đáng kể từ 10 nm (chi *Synechococcus*) đến hơn 700 nm (loài *Oscillatoria princeps*) (Hình 1.1) [Sciuto K, 2015].



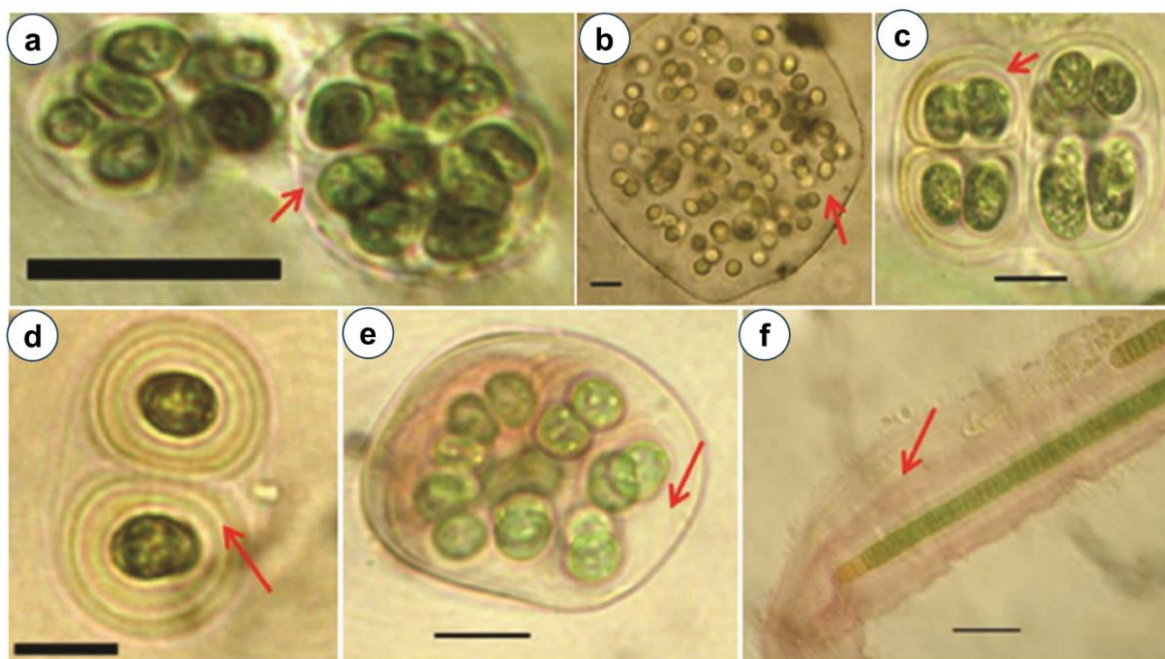
Hình 1.1. Cấu tạo thành tế bào vi khuẩn Gram dương, Gram âm và VKL

(Nguồn: Sciuto K. và cộng sự, 2015)

Bên cạnh đó, VKL sử dụng các sắc tố chính trong quá trình quang hợp là chlorophyll a. Ngoài ra, ở một số loài VKL còn chứa chlorophyll d như loài *Acaryochloris marina* hay chlorophyll f ở loài *Halomicronema hongdechloris* giúp chúng có thể quang hợp được ở điều kiện ánh sáng yếu [Allakhverdiev S.I., 2016]. Thêm vào đó, màu xanh lam đặc trưng của chúng là kết quả từ sự kết hợp giữa diệp lục và các sắc tố phycobiliprotein như phycocyanin, allophycocyanin và đôi khi là phycoerythrin - sắc tố đỏ khiến tế bào có màu đỏ hoặc đen. Các sắc tố này tập trung trong phycobilisome nằm trên màng thylakoid, đóng vai trò như chiếc anten hấp thu ánh sáng và truyền năng lượng đến quang hệ II (photosystem II - PS II), từ đó chuyển tiếp đến quang hệ I (photosystem I - PS I), đồng thời giải phóng oxy. Tại quang hệ I, năng lượng ánh sáng được chuyển hóa thành năng lượng hóa học dưới dạng ATP, NADPH và H^+ phục vụ cho pha tối (chu trình Calvin) tổng hợp carbohydrate từ CO_2 . Hầu hết VKL quang hợp trong điều kiện hiếu khí, sử dụng H_2O làm chất cho điện tử và giải phóng oxy. Tuy nhiên, một số loài có khả năng thích nghi với môi trường yếm

khí bằng cách chỉ dùng quang hệ I và thay thế H₂O bằng các chất khác như H₂S, H₂ hoặc các hợp chất hữu cơ làm nguồn điện tử.

Ngoài ra, nhiều loài VKL chứa lớp bao nhầy đặc biệt bao quanh các tế bào hoặc các sợi gọi là lớp ngoại bào (Hình 1.2). Thành phần chính của lớp ngoại bào là các exopolysaccharides (EPS) gồm các polysaccharide liên kết với protein. Các EPS được chia thành 3 loại là bao nhầy (sheaths), bao nhờn (slimes) hoặc bao nang (capsules) [Kumar D., 2018]. Lớp EPS của VKL có chức năng bảo vệ tế bào chống lại các điều kiện bất lợi của môi trường như tia cực tím, nồng độ muối cao, pH môi trường, nhiệt độ, ... và tạo thành một lớp rào cản cơ học đối với hầu hết các phân tử có kích thước lớn giúp VKL có thể tồn tại trong môi trường sống cực đoan [Xiao Y., 2020].



Hình 1.2. Các dạng bao nhầy của một số loài VKL

a, *Aphanothece saxicola*; b, *Aphanocapsa gravillei*; c, *Gloeocapsa caldariorum*; d, *Gloeotheca rupestris*; e, *Asterocapsa submerse*; f, *Porphyrosiphon notarisii*. Thước đo: 10 μ m.

(Nguồn: Kumar D. và cộng sự, 2018)

Ở một số loài VKL thuộc bộ Nostocales khi sống trong điều kiện môi trường thiếu nitơ có thể biệt hóa tế bào sinh dưỡng (vegetative cell) thành tế bào dị hình (heterocyst). Đây là một loại tế bào đặc biệt có khả năng cố định nitơ khí quyển (N₂) thành dạng amoni (NH₄⁺) nhờ sự có mặt của enzyme nitrogenase. Chúng có hình dạng

lớn, thành tế bào dày và chứa lớp glycolipid và polysaccharide đặc biệt giúp ngăn oxy xâm nhập, bảo vệ enzyme nitrogenase khỏi bị phân hủy. Trong tế bào dị hình, quang hệ II bị bất hoạt để ngăn sản sinh oxy, duy trì điều kiện kỵ khí cho quá trình cố định nito. Enzyme nitrogenase gồm hai thành phần là dinitrogenase và dinitrogenase reductase được phiên mã bởi họ gen *nif* [Zehr J.P., 2003].

Khi điều kiện môi trường trở nên bất lợi như hạn hán, nhiệt độ cực đoan, thiếu ánh sáng hay dinh dưỡng, một số loài VKL trong bộ Nostocales có thể biệt hóa tế bào sinh dưỡng thành tế bào nghỉ (akinetes cell). Đây là các tế bào có lớp thành dày, kích thước lớn hơn tế bào sinh dưỡng, chứa nhiều chất dự trữ như glycogen và cyanophycin, cùng với lượng DNA tăng để giúp tế bào chuẩn bị nảy mầm khi điều kiện môi trường được cải thiện. Dù ở trạng thái nghỉ, các tế bào nghỉ vẫn duy trì quá trình trao đổi chất ở mức thấp. Chúng có thể tồn tại trong thời gian dài từ 18 đến 64 năm. Thậm chí, tế bào nghỉ của loài *Anabaena cylindrica* có thể tồn tại trong môi trường trên Sao Hỏa [Olsson-Francis K., 2009].

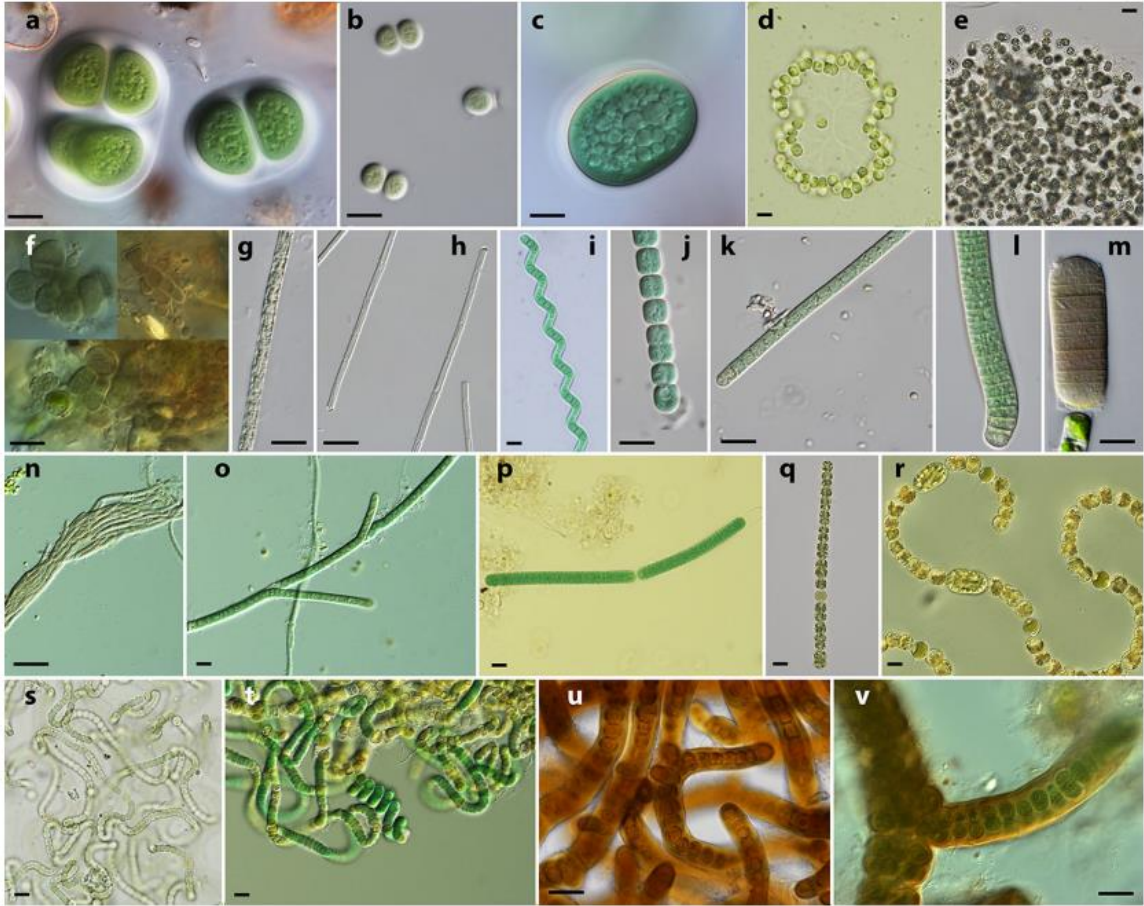
1.1.2. Đặc điểm hình thái và sự phân bố

Hình thái của VKL có mức độ đa dạng cao. Chúng có thể tồn tại ở dạng đơn bào, tập đoàn đến dạng sợi đa bào với sự biệt hóa tế bào phức tạp (Hình 1.3). Kích thước tế bào VKL thay đổi từ 0,2 μm (đối với các loài thuộc chi *Picosynechococcus*) đến hơn 100 μm (đối với một số loài thuộc chi *Oscillatoria* phân bố ở vùng nhiệt đới) [Flombaum P., 2013, Whitton B.A., 2007].

VKL đơn bào là những tế bào độc lập, thường có hình cầu, hình trứng hoặc hình trụ, có kích thước từ 0,2 - 40 μm , phân bố rộng rãi ở thủy vực nước ngọt, nước lợ và nước mặn. Tế bào của VKL dạng đơn bào thường có thành tế bào dày và bao nhày bảo vệ, một số loài có thể di chuyển bằng cách trượt trên bề mặt nước.

Các loài VKL dạng tập đoàn bao gồm nhiều tế bào liên kết bởi lớp bao nhày cấu tạo từ polysaccharide (EPS), giúp bảo vệ chúng khỏi điều kiện khắc nghiệt. Tùy điều kiện môi trường, mỗi tập đoàn có thể chứa từ vài tế bào đến hàng nghìn tế bào, với kích thước thay đổi từ vài trăm micromet đến milimet. Hình dạng và cấu trúc của

các tập đoàn đa dạng, có thể phân bố đều (như *Merismopedia*), theo cụm (*Microcystis*) hoặc dạng giả sợi (*Cyanodictyon*) [Whitton B.A., 2007].



Hình 1.3. Các dạng hình thái của vi khuẩn lam

VKL dạng đơn bào: *Chroococcus subnudus* (a), *Chroococcus limneticus* (b), *Cyanothece aeruginosa* (c), *Snowella litoralis* (d); VKL dạng tập toàn: *Microcystis aeruginosa* (e), *Pleurocapsa minor* (f); VKL dạng sợi: *Planktothrix agardhii* (g), *Limnothrix redekei* (h), *Arthrospira jenneri* (i), *Johanseninema constrictum* (j), *Phormidium* sp. (k), *Oscillatoria* sp. (l, m), *Schizothrix* sp. (n), *Tolypothrix* sp. (o), *Katagnymene accurate* (p), *Dolichospermum planctonicum* (q), *Dolichospermum* sp. (r), *Nostoc* sp. (s), *Nodularia moravica* (t), *Stigonema* sp. (u, v)

(Nguồn: Dvořák P. và cộng sự, 2015)

VKL dạng sợi được cấu tạo từ các chuỗi tế bào nối tiếp nhau gọi là trichomes. Đôi khi các chuỗi có thể được bao bọc trong lớp bao nhầy hình thành sợi. Các tế bào của các loài vi khuẩn lam dạng sợi có hình dạng đa dạng (hình trụ, hình thừng, hình cầu hay vô định hình). Trong quá trình sinh trưởng, các chuỗi có thể phân mảnh thành

các tảo đoạn (hormogonia) hoặc tách rời nhờ sự hình thành lớp nhầy hay tế bào hoại tử (necridic cells), từ đó hình thành chuỗi mới. Dựa trên đặc điểm phân nhánh, VKL dạng sợi được chia thành ba nhóm là sợi không phân nhánh; sợi phân nhánh giả (*Scytonema*-like, *Tolypothrix*-like) và sợi phân nhánh thật [Komárek J., 2015]

Chính sự đa dạng về hình thái đã góp phần giúp VKL thích nghi với nhiều điều kiện môi trường khác nhau. Chúng được tìm thấy ở hầu hết các môi trường được chiếu sáng trên trái đất từ các thùy vực nước ngọt, nước mặn, nước lợ đến đất liền thậm chí ở cả những nơi có điều kiện vô cùng khắc nghiệt như sa mạc khô nóng, vùng cực lạnh hay suối nước nóng tới 72°C [Bennett A.C., 2020; Vincent W.F., 2000]. Khả năng tồn tại trong điều kiện khắc nghiệt là kết quả của quá trình tiến hóa lâu dài và đặc điểm sinh lý đặc biệt như: chịu được nồng độ oxy thấp, sử dụng H₂S làm chất khử, chống tia cực tím. Cấu trúc tế bào của chúng thuộc nhóm vi khuẩn Gram âm, nhưng lại chứa không bào giúp chúng có thể nổi trên mặt nước; lục lạp để quang hợp và tế bào dị hình để cố định nitơ khí quyển. Những đặc điểm này không chỉ giúp VKL thực hiện nhiều chức năng sinh học mà còn thích nghi với các điều kiện môi trường khác nhau. Thêm vào đó, sự linh hoạt đặc điểm sinh lý và khả năng thích nghi nhanh với thay đổi môi trường, khí hậu và điều kiện sống giúp chúng tồn tại được từ sa mạc, rừng nhiệt đới, đến các đại dương hay vùng cực, thể hiện tính đa dạng sinh học và khả năng sinh tồn vượt trội [Gaysina L.A, 2018].

1.2. Phân loại vi khuẩn lam bằng phương pháp tiếp cận đa chiều

Vi khuẩn lam là nhóm cổ sinh vật mang đặc điểm của cả sinh vật nhân sơ và sinh vật nhân chuẩn có khả năng quang hợp như tảo nhân chuẩn hay thực vật. Điều này khiến việc phân loại chúng trở nên phức tạp. Các phương pháp phân loại truyền thống chủ yếu dựa vào các đặc điểm hình thái của VKL dễ dẫn đến khả năng phân loại thiếu chính xác do hình thái của chúng thường bị thay đổi bởi điều kiện môi trường hay giai đoạn sinh trưởng khác nhau. Phương pháp tiếp cận đa chiều (polyphasic approach) được đề xuất bởi Hoffman và cộng sự năm 2005 không chỉ giúp cải thiện độ chính xác trong định danh khoa học cho các loài VKL, mà còn cung cấp cái nhìn toàn diện về sự đa dạng và tiến hóa của chúng. Đây là phương pháp kết

hợp nhiều phương pháp phân loại bao gồm đánh giá đặc điểm hình thái, siêu cấu trúc tế bào, sinh thái, sinh hóa và phân tử. Việc kết hợp các dữ liệu từ nhiều nguồn khác nhau trong phương pháp tiếp cận đa chiều không chỉ giúp cải thiện độ chính xác của hệ thống phân loại, mà còn cung cấp cái nhìn toàn diện về sự đa dạng và tiến hóa của VKL. Điều này đặc biệt quan trọng trong việc phân loại các nhóm VKL có đặc điểm hình thái tương tự nhưng lại có quan hệ tiến hóa khác nhau, giúp xây dựng một hệ thống phân loại phản ánh đúng sự đa dạng sinh học và các mối quan hệ tiến hóa của chúng [Hoffmann L., 2005]. Hiện nay, phương pháp tiếp cận đa chiều đã được các nhà phân loại học trên thế giới chấp nhận rộng rãi. Năm 2023, Strunecký và cộng sự đã xây dựng một hệ thống phân loại VKL chi tiết đến cấp độ chi bao gồm 20 bộ và 65 họ, 601 chi [Strunecký O., 2023].

1.2.1. Phân loại dựa vào đặc điểm hình thái và siêu cấu trúc tế bào

Các đặc điểm hình thái như hình dạng và cách sắp xếp tế bào (đơn bào, đa bào, chuỗi phân nhánh, không phân nhánh giả, phân nhánh thật), kích thước tế bào, màu sắc, sự hiện diện của các tế bào chuyên biệt như tế bào dị hình, tế bào nghỉ; đặc điểm bao nhày và hình thức sinh sản vẫn là một trong các tiêu chí quan trọng để phân loại VKL [Dvořák P., 2015]. Đây là phương pháp phân loại truyền thống dựa trên việc quan sát dưới kính hiển vi quang học [Komárek J., 2014].

Từ những năm 1960, kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM) đã được sử dụng để nghiên cứu cấu trúc siêu hiển vi của VKL. Đến những năm 1980, các đặc điểm siêu cấu trúc này đã được mô tả chi tiết. Hệ thống phân loại do Rippka và cộng sự (1979) đề xuất hệ thống phân loại VKL dựa trên hình thái, đặc biệt là cấu trúc nội bào. Các đặc điểm siêu cấu trúc thường được dùng trong phân loại gồm: cách sắp xếp màng thylakoid, sự hiện diện của carboxysome, túi khí, tế bào dị hình, tế bào nghỉ và các cấu trúc đặc trưng khác [Gonzalez-Esquer C.R., 2016].

1.2.2. Phân loại dựa vào đặc điểm sinh thái

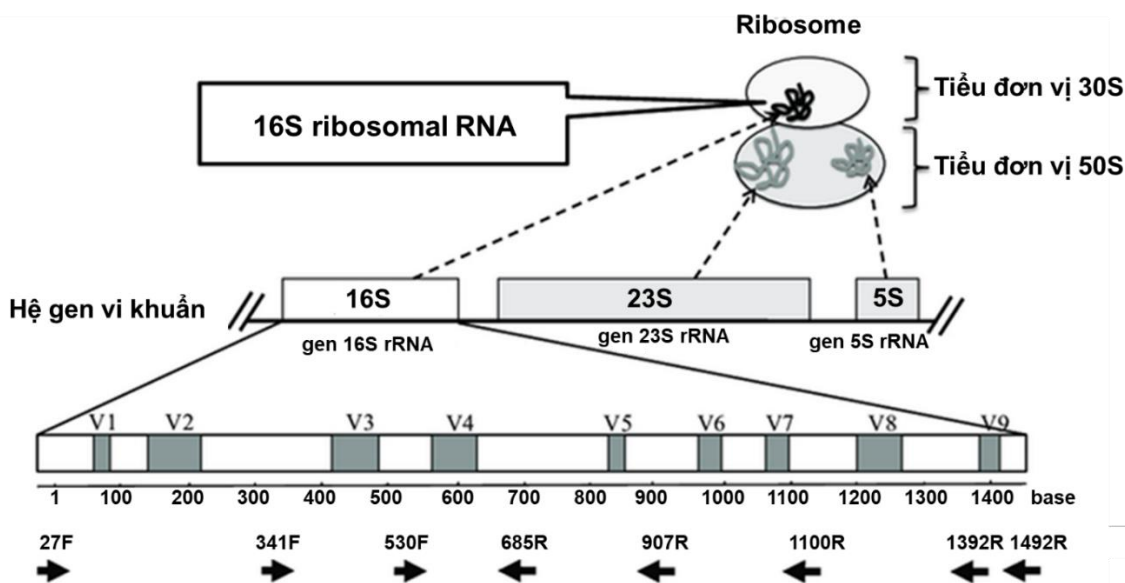
Trong phương pháp tiếp cận đa chiều, phân loại VKL dựa vào đặc điểm sinh thái đóng vai trò bổ trợ quan trọng nhằm xác định mối quan hệ giữa các loài VKL với môi trường sống. Tiêu chí này phản ánh rõ khả năng thích nghi đa dạng của chúng

với nhiều điều kiện môi trường khác nhau, từ các hệ sinh thái nước ngọt, biển cho đến những vùng cực đoan khắc nghiệt.

Sự phân bố kiểu gen của các loài VKL liên quan chặt chẽ với hệ sinh thái của chúng. Khi phân loại VKL theo đặc điểm sinh thái và sự phân bố của chúng cần được đánh giá trong mối liên quan đến môi trường và vị trí địa lý nơi chúng được phân lập. Nhiều loài có hình thái và môi trường sống tương tự nhưng lại khác biệt về đặc điểm di truyền nếu phân bố ở điều kiện địa lý cách xa nhau. Ví dụ 3 chủng VKL dạng *Phormidium* phân lập ở Bắc Cực và Nam Cực có hình thái giống nhau nhưng lại có sự khác biệt về kiểu gen [Comte K., 2010]; hay một số loài thuộc chi *Microcoleus* phân lập ở Bắc Mỹ và châu Âu đều có dạng sợi tương tự nhau lại thuộc các nhánh tiến hóa khác nhau [Dvořák P., 2012]. Tương tự, bảy loài mới thuộc chi *Oculatella* phân lập ở nhiều nơi trên thế giới cũng cho thấy sự đa dạng di truyền mặc dù có đặc điểm hình thái và ổ sinh thái tương đồng [Osorio-Santos K., 2014].

1.2.3. Phân loại dựa vào trình tự gen

Sự tiến bộ của các kỹ thuật sinh học phân tử đã đem lại cuộc cách mạng trong việc phân loại phân tử VKL. Các nghiên cứu về mối quan hệ phát sinh chủng loại của các nhóm, loài và chi VKL khác nhau chỉ được quan tâm nhiều vào những thập niên cuối của thế kỷ 20 dựa trên phân tích trình tự gen 16S rRNA. Cho đến nay, phân tích gen 16S rRNA được xem là “tiêu chuẩn vàng” để định danh VKL do tính “bảo thủ cao” của gen này. Đây là gen phiên mã cho ribosome 16S - một thành phần trên tiểu đơn vị nhỏ 30S của ribosome ở vi khuẩn tham gia vào quá trình tổng hợp protein. Gen 16S rRNA có kích thước khoảng 1500 bp, bao gồm các vùng bảo thủ (conserved regions) và vùng biến đổi (variable regions) (Hình 1.4). Vùng bảo thủ đóng vai trò thiết yếu trong chức năng của ribosome và thường được dùng để thiết kế môi đặc hiệu để PCR trong quá trình khuếch đại gen. Các vùng biến đổi từ V1 đến V9 chứa thông tin đặc trưng giúp phân biệt và định danh các loài vi khuẩn khác nhau. Tốc độ tiến hóa chậm và cấu trúc bảo thủ của gen 16S rRNA giúp chúng trở thành chỉ thị phân tử đáng tin cậy trong phân loại vi khuẩn [Fukuda K., 2016].



Hình 1.4. Cấu trúc gen 16SrRNA ở vi khuẩn lam

(Nguồn: Fukuda K. và cộng sự, 2016)

Hiện nay, trình tự nucleotide của đoạn gen 16S rRNA của nhiều loài VKL đã được bổ sung vào cơ sở dữ liệu của ngân hàng gen thế giới (Genbank), góp phần cung cấp các trình tự tham khảo hữu ích để nghiên cứu mối quan hệ phát sinh chủng - loại và hệ thống phân loại của chúng. Các chủng VKL có độ tương đồng trình tự đoạn gen 16S rRNA trên 98,65% và nằm cùng nhánh đơn phát sinh trên cây phát sinh chủng - loại sẽ được xếp cùng một loài [Kim M., 2014]. Tuy nhiên, để xác định một chủng VKL là loài mới cần kết hợp phân tích đặc điểm hình thái và các chỉ thị phân tử khác như phân tích trình tự của vùng ITS (Internal Transcribed Spacer Region). Đây là đoạn trình tự đệm nằm giữa hai gen 16S rRNA và 23S rRNA có chứa hoặc không chứa trình tự gen tRNA^{Ile} (Isoleucine) và tRNA^{Ala} (Alanine) có kích thước từ 283 bp - 545 bp. Các đoạn trình tự bảo thủ trên vùng ITS là mục tiêu để thiết kế mồi cho phản ứng PCR nhằm phát hiện và xác định các chủng VKL mới ở các cấp độ phân loại khác nhau. Dựa vào trình tự nucleotide của đoạn ITS cho phép dự đoán cấu trúc bậc hai của phân tử RNA, qua đó so sánh với các trình tự bảo thủ đặc trưng như box B, D1 - D1' và V3 với những loài tham chiếu gần để xác định loài mới [Iteaman I., 2000].

Ngoài ra, trình tự nucleoitide của một số gen chức năng như gen *rbcL*, *nifH*, ... cũng được sử dụng trong phân loại VKL. Gen *rbcL* là gen mã hóa tổng hợp tiểu phần lớn của enzyme RuBisCO - một loại enzyme thiết yếu chịu trách nhiệm quang hợp và quang hô hấp ở sinh vật có chứa diệp lục. Đoạn gen này có tính chất tương đối bảo thủ được sử dụng để đánh giá mối quan hệ giữa các loài ở sinh vật có khả năng quang hợp [Singh P., 2015]. Gen *nifH* mã hóa tổng hợp enzyme nitrogenase ở VKL. Trình tự gen *nifH* phản ánh sự tiến hóa của quá trình cố định đạm ở các loài VKL có khả năng cố định nitơ [Zehr J.P., 2003]. Gen *rpoC* mã hóa tiểu đơn vị β' của enzyme RNA polymerase đóng vai trò quan trọng trong quá trình tổng hợp RNA. Phân tích trình tự đoạn gen *rpoC* được sử dụng như một trong những marker phân tử thường được dùng để phân loại các chủng VKL do tính bảo thủ và sự đa dạng của chúng giữa các nhóm VKL khác nhau. Trình tự gen *rpoC* có sự khác biệt rõ rệt giữa các nhóm VKL có khả năng quang hợp và các nhóm sống trong các môi trường đặc thù [Bergsland K.J., 2011].

Mặc dù gen 16S rRNA được sử dụng rộng rãi trong phân loại vi khuẩn lam nhờ tính bảo thủ, dễ khuếch đại và có bộ cơ sở dữ liệu tham chiếu lớn, nhưng đối với các nhóm VKL có mối quan hệ gần, gen này thường chưa đủ độ phân giải để phân loại sâu hoặc tách biệt các nhóm này. Do đó, việc bổ sung các marker có mức biến thiên cao hơn như ITS, *rpoC1* và *rbcL*, *nifH* giúp gia tăng độ chính xác trong suy luận mối quan hệ phát sinh chủng - loại đặc biệt là các nhóm có mối quan hệ tiến hóa gần. Việc sử dụng kết hợp phân tích trình tự các gen này cùng với gen 16S rRNA giúp phân loại chính xác hơn các loài vi khuẩn lam và cung cấp cái nhìn sâu sắc về sự tiến hóa của chúng.

So với phân loại dựa vào phân tích đặc điểm hình thái và sinh thái thì phân loại dựa vào sinh học phân tử có nhiều ưu điểm hơn, giúp quá trình xác định các loài trở nên chính xác hơn và phản ánh được mối quan hệ tiến hóa giữa các nhóm. Mục tiêu chính của phân loại học phân tử là: (i) Xác định mối quan hệ tiến hóa giữa các loài dựa trên nguồn gốc tổ tiên chung - các loài có quan hệ tiến hóa gần gũi sẽ được nhóm lại với nhau; (ii) Ước tính thời điểm phân kỳ giữa các loài, tức là thời gian tồn tại của

tổ tiên chung gần nhất. Các phương pháp phân tích phân tử đã mở rộng cách tiếp cận truyền thống, cho phép tái hiện chính xác hơn mối quan hệ tiến hóa giữa các sinh vật. Đặc biệt, trong nghiên cứu VKL, dữ liệu phân tử không chỉ hỗ trợ mô tả đặc điểm loài mà còn giúp xây dựng cây phát sinh chủng - loại một cách chi tiết. Nhờ vậy, dữ liệu sinh học phân tử đã trở thành tiêu chí nền tảng trong hệ thống phân loại hiện đại của VKL [Komárek J., 2014].

Cùng với sự tiến bộ trong công nghệ gen đặc biệt là công nghệ giải trình tự gen thế hệ mới (Next-Generation Sequencing - NGS) và công nghệ giải trình tự thế hệ thứ ba (Third-Generation Sequencing) đã cho phép phân tích bộ gen hoàn chỉnh của VKL một cách nhanh chóng và chính xác hơn. Phân tích toàn bộ hệ gen góp phần bổ sung những hiểu biết về mối quan hệ tiến hóa, khả năng trao đổi chất, các cơ chế sinh học của các loài VKL và xác định các loài mới tiềm năng. Trình tự bộ gen VKL đầu tiên được công bố là trình tự của chủng *Synechocystis* sp. PCC 6803 vào năm 1996 bởi nhóm nghiên cứu của Kaneko và cộng sự [Kaneko T., 1996]. Tính đến tháng 2/2026, đã có khoảng gần 8.400 bộ gen của các chủng VKL được cập nhật vào cơ sở dữ liệu của GenBank [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>].

1.2.4. Phân loại dựa vào mối quan hệ phát sinh chủng - loại

Cây phát sinh chủng - loại (phylogenetic tree) là một biểu đồ thể hiện các mối quan hệ tiến hóa giữa các loài, các nhóm sinh vật hoặc các gen có chung tổ tiên dựa trên phân tích dữ liệu gen, protein. Đây là công cụ cốt lõi trong nghiên cứu sinh học tiến hóa và phân loại học. Quá trình xây dựng cây phát sinh chủng - loại bao gồm các bước: thu thập các trình tự tham khảo từ cơ sở dữ liệu có sẵn, tiến hành căn chỉnh, sau đó áp dụng các phương pháp phân tích để suy luận mối quan hệ tiến hóa. Cây phát sinh chủng - loại đầu tiên được Haeckel E. và cộng sự xây dựng năm 1866 [Kapli P., 2020].

Trước khi xây dựng cây phát sinh chủng - loại việc thu thập các trình tự tham khảo hay còn gọi là nhóm ngoại (outgroup) có vai trò rất quan trọng trong việc xác định hướng tiến hóa và đảm bảo các nhánh trong cây phân loại được sắp xếp chính xác. Việc lựa chọn trình tự tham khảo cần đảm bảo hai tiêu chí: (1) phải có quan hệ

tiến hóa gần nhưng đủ khác biệt để không gây nhầm lẫn vị trí phân loại với các loài trong nhóm nghiên cứu; (2) cần đại diện cho một nhánh tiến hóa rõ ràng, đã được xác định từ trước. Nhờ có nhóm ngoại, cây phát sinh có thể tạo "gốc nhánh" (rooted), giúp xác định được chiều hướng của tiến hóa, phân biệt được đâu là đặc điểm tổ tiên và đâu là đặc điểm tiến hóa mới. Việc lựa chọn nhóm ngoại phù hợp là một bước quan trọng trong phân tích quan hệ tiến hóa của các chủng VKL. Sau đó, các trình tự nghiên cứu và trình tự tham khảo sẽ được tiến hành căn chỉnh, giống hàng sao cho các vị trí tương đồng về mặt tiến hóa được đặt cùng một cột. Điều này giúp xác định được vị trí vùng bảo thủ và vị trí vùng biến đổi của đoạn gen. Đây là bước bắt buộc và quyết định chất lượng của cây phát sinh chủng - loại. Lựa chọn đúng phần mềm và thông số căn chỉnh phù hợp sẽ giúp đảm bảo rằng các vị trí trên cây phản ánh đúng mối quan hệ tiến hóa giữa các sinh vật [Kapli P., 2020].

Cây phát sinh chủng - loại được xây dựng dựa trên hai nhóm phương pháp chính là phương pháp dựa trên khoảng cách (distance-based methods) hoặc phương pháp dựa trên đặc điểm (character-based methods). Các phương pháp dựa khoảng cách như phương pháp UPGMA và kết nối láng giềng (Neighbor Joining - NJ) sẽ tính toán khoảng cách của mỗi trình tự để tập hợp thành một ma trận khoảng cách di truyền và kết hợp các thuật toán phân cụm để phân tích và dựng cây phát sinh. Mặc dù phương pháp này có ưu điểm về tốc độ xử lý nhưng thường làm mất thông tin do dữ liệu bị nén và không xét đến sự phân bố của trạng thái ký tự. Ngược lại, các phương pháp xây dựng cây phát sinh dựa trên đặc điểm như phương pháp tiết kiệm tối đa (Maximum Parsimony - MP), phương pháp hợp lý tối đa (Maximum Likelihood - ML) hay phương pháp suy luận Bayes (Bayesian Inference - BI) sẽ phân tích từng vị trí trong trình tự bằng cách so sánh đồng thời giữa các chuỗi; sử dụng xác suất để đánh giá sự thay đổi tiến hóa nhằm xây dựng được cây phát sinh thể hiện ít thay đổi về đặc điểm di truyền nhất và có xác suất xảy ra cao nhất. Tuy nhiên, các phương pháp này đòi hỏi thời gian xử lý lâu và khả năng tính toán cao, đặc biệt khi xử lý bộ dữ liệu phân tử có kích thước lớn. Trong khi phương pháp tiết kiệm tối đa (MP) xây dựng cây phát sinh chủng - loại dựa trên nguyên tắc tiến hóa xảy ra đơn giản nhất, thì

phương pháp hợp lý tối đa (ML) lại dựng cây phát sinh chủng - loại theo mô hình tiến hóa xác suất để tính toán khả năng xuất hiện của dữ liệu trình tự là cao nhất, còn phương pháp Suy luận Bayes (BI) lại ước tính phân bố xác suất của cây có thể theo định lý Bayes dựa vào xác suất hậu kiểm [Van de Peer Y., 2003]. Mỗi thuật toán sẽ có ưu điểm và nhược điểm riêng, trong đó, phương pháp Hợp lý tối đa (Maximum likelihood method) và Suy luận Bayes (Bayesian Inference - BI) được sử dụng rộng rãi và có khả năng áp dụng cho nhiều mô hình tiến hóa khác nhau [Felsenstein J., 1981].

Mức độ tin cậy của cây phát sinh chủng - loại được kiểm tra bằng giá trị bootstrap. Đây là chỉ số quan trọng trong khi xây dựng cây phát sinh chủng - loại thể hiện tần số xuất hiện của một nhóm (cluster) trên số lần cây phân loại được thiết lập tính theo tỷ lệ %. Giá trị bootstrap là một công cụ hỗ trợ cho việc xây dựng cây phát sinh loài thể hiện độ tin cậy về mối quan hệ tiến hóa của các thành viên trong nhóm của cây phả hệ [Felsenstein J., 1985]. Giá trị này chỉ ước tính được độ tin cậy của từng cụm nhỏ chứ không ước tính được độ tin cậy tổng thể của cây phân loại. Nếu giá trị bootstrap lớn hơn hoặc bằng 70% được coi là có ý nghĩa thống kê và trên 95% được xem là có độ tin cậy cao [Stamatakis A., 2005].

Để xây dựng các cây phát sinh chủng - loại, các nhà nghiên cứu sử dụng nhiều phần mềm như phần mềm MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis), BEAST (Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees), IQ-TREE, MrBayes, Mỗi phần mềm đều có những ưu điểm, nhược điểm riêng. Do đó, việc lựa chọn phần mềm phù hợp phụ thuộc vào loại dữ liệu, phương pháp phân tích mong muốn và mục đích nghiên cứu. Các công cụ này không chỉ hỗ trợ việc xây dựng cây phát sinh chủng - loại mà còn cung cấp các công cụ phân tích mạnh mẽ để hiểu rõ hơn về các quá trình tiến hóa giữa các loài. Trong đó, phần mềm MEGA là một trong những phần mềm phổ biến nhất để phân tích dữ liệu trình tự và xây dựng cây phát sinh chủng - loại. Phần mềm này được xây dựng bởi Kumar và cộng sự năm 1994, giúp cung cấp các công cụ và phương pháp để phân tích dữ liệu di truyền, bao gồm các trình tự DNA và protein, nhằm xây dựng cây phát sinh chủng - loại, xác định mối quan hệ tiến hóa

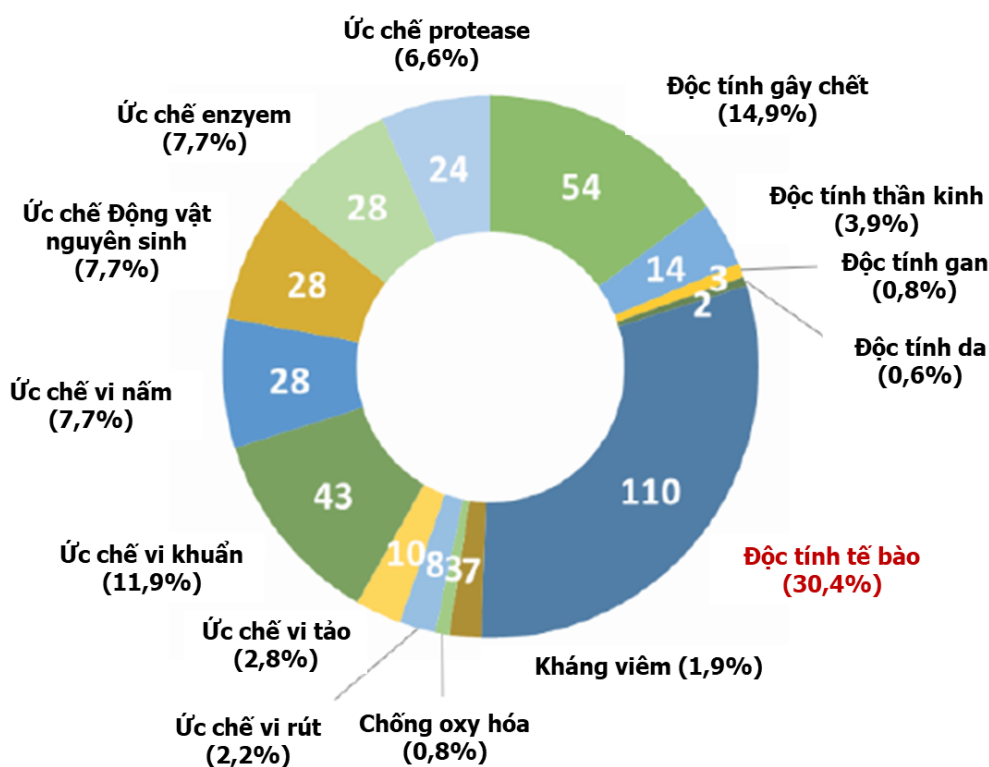
giữa các loài và hiểu rõ hơn về các quá trình tiến hóa ở mức phân tử. Phần mềm MEGA cũng hữu ích trong các nghiên cứu y học, đặc biệt là trong việc phân tích các bệnh di truyền và nghiên cứu tiến hóa của các tác nhân gây bệnh. Nó hỗ trợ nhiều phương pháp xây dựng cây như là phương pháp Neighbor-Joining, Maximum Likelihood hay Maximum Parsimony. Cho đến nay, phần mềm MEGA đã trải qua nhiều lần nâng cấp và hiện nay đã cập nhật đến phiên bản MEGA XII [Kumar S., 2024].

1.3. Các hợp chất có hoạt tính sinh học từ vi khuẩn lam

Khả năng phân bố rộng rãi và hình thái đa dạng của VKL là kết quả của quá trình tiến hóa lâu dài, giúp chúng hình thành các cơ chế thích nghi hiệu quả, đặc biệt là khả năng tổng hợp lượng lớn các hợp chất thứ cấp. Các hợp chất này đóng vai trò quan trọng trong việc giúp chúng tồn tại trong điều kiện môi trường khắc nghiệt và chống lại sự cạnh tranh từ các sinh vật khác [Mazard S., 2016]. Tính đến năm 2019, đã có hơn 1630 hợp chất thứ cấp được phân lập từ VKL, thuộc 260 họ hợp chất thể hiện 14 loại hoạt tính sinh học khác nhau (Hình 1.5). Trong đó, nổi bật nhất là hoạt tính gây độc tế bào (cytotoxicity) với 110 họ chất chiếm 30,4%; tiếp theo là hoạt tính gây chết (lethality activities) và hoạt tính kháng khuẩn (antibacterial) lần lượt có 54 và 43 họ hợp chất (tương ứng 14,9% và 11,9%). Các hợp chất này được xếp vào 10 lớp hóa học khác nhau bao gồm alkaloid, depsipeptide, lipopeptide, macrolide/lactone, peptide, terpen, polysaccharit, lipid, polyketide và các nhóm khác. Phần lớn các hợp chất thứ cấp từ VKL được tổng hợp theo bốn con đường sinh hóa chính gồm: con đường shikimate, con đường malonate, con đường mevalonate và con đường methylerythritol-phosphate (MEP). Các con đường này đóng vai trò quan trọng trong quá trình sinh tổng hợp các hợp chất có hoạt tính sinh học cao của VKL [Demay J., 2019].

Năm 2021, Jones và cộng sự đã xây dựng cơ sở dữ liệu CyanoMetDB tập hợp 2.010 hợp chất thứ cấp được sinh ra từ VKL có khối lượng phân tử giao động từ 0,12 - 2,71 kDa [Jones M.R., 2021]. Cập nhật đến tháng 9 năm 2024, cơ sở dữ liệu trên CyanoMetDB phiên bản 3 đã ghi nhận gần 3.200 hợp chất từ VKL. Điều đó cho thấy

tốc độ phát hiện các hợp chất mới từ nhóm sinh vật này ngày càng gia tăng [Janssen E.M.-L., 2024].



Hình 1.5. Các hoạt tính sinh học ứng dụng trong y dược của VKL

(Nguồn: Demay J. và cộng sự, 2019)

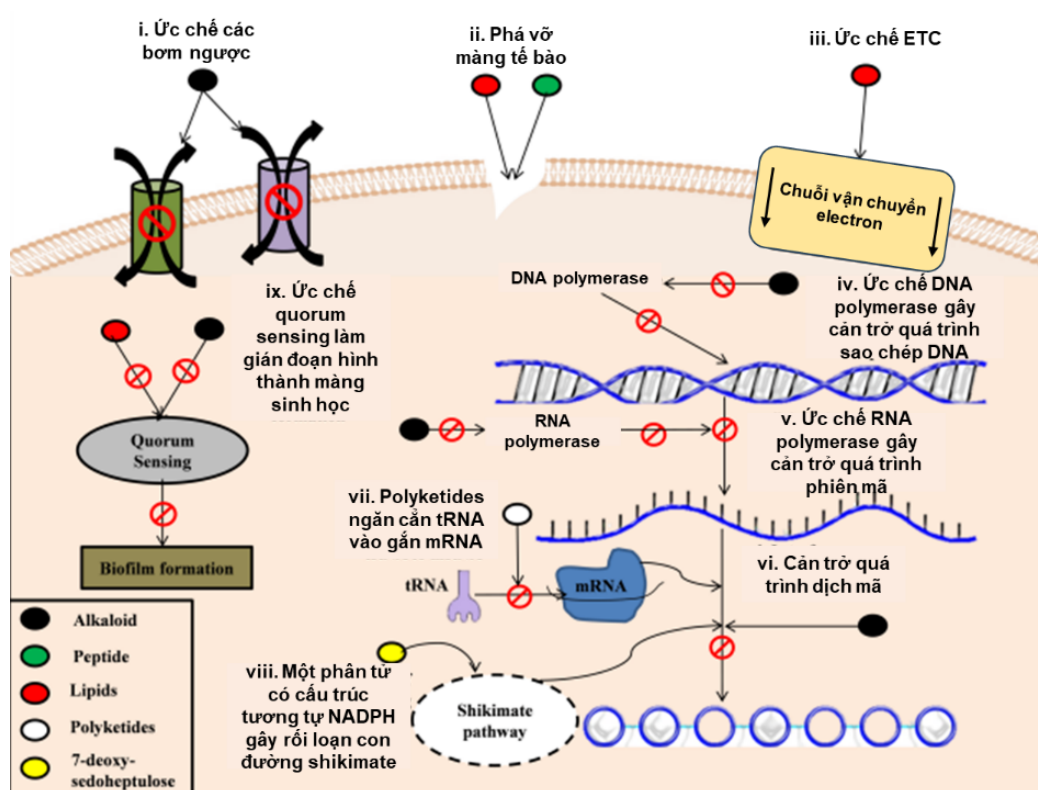
Bên cạnh đó, hơn 90 trong số 300 chi VKL đã định danh trong hệ thống phân loại của Komárek và cộng sự (2014) có khả năng tổng hợp các hợp chất có hoạt tính sinh học. Trong đó, có 153 họ hợp chất được sinh ra từ các loài VKL thuộc bộ Oscillatoriales chiếm tỷ lệ cao nhất đạt 46,5%, tiếp theo là bộ Nostocales tổng hợp được 98 họ hợp chất chiếm 29,7%. Ở cấp độ chi, *Lyngbya* là chi nổi bật nhất với 78 họ hợp chất đã được phân lập, tính riêng loài *L. majuscula* đã phân lập được 48 họ hợp chất; chi *Nostoc* cũng là chi tiềm năng thứ hai với 50 họ hợp chất có hoạt tính đã được công bố [Demay J., 2019]. Anjum và cộng sự (2017) đã chỉ ra rằng có khoảng 450 hợp chất đã được phát hiện từ VKL ở biển chủ yếu từ các chi *Lyngbya*, *Oscillatoria*, và *Symploca*, trong đó có 58% hợp chất được phân lập từ chi *Oscillatoria* và 35% hợp chất được phân lập từ chi *Lyngbya* [Anjum K., 2017].

1.3.1. Các hoạt chất ức chế vi khuẩn

Sự bùng nổ của các chủng vi sinh vật đa kháng thuốc trong những thập niên gần đây đã làm tăng nhu cầu tìm kiếm và phát triển các hợp chất mới kháng vi sinh vật theo các cơ chế tác động riêng. Simplkin và cộng sự (2017) đã chỉ ra rằng chỉ có 33% các loại thuốc kháng sinh được nghiên cứu có thể phát triển thành các sản phẩm thương mại trên thị trường [Simplkin V.L., 2017]. Hiện nay, VKL đang nổi lên như một nguồn nguyên liệu mới sản sinh ra nhiều hợp chất thứ cấp tiềm năng có hoạt tính chống lại nhiều loại vi sinh vật gây bệnh. Swain và cộng sự (2017) đã thống kê được 121 hợp chất thuộc các lớp cấu trúc hóa học khác nhau có khả năng kháng khuẩn, kháng nấm mạnh đặc biệt là kháng các chủng vi khuẩn đa kháng thuốc, có tiềm năng sử dụng trong việc phát triển thuốc kháng sinh mới [Swain S.S., 2017].

Trong số 260 họ hợp chất phát hiện từ VKL, có 43 họ hợp chất ức chế được vi khuẩn Gram âm, Gram dương hay vi khuẩn đa kháng thuốc, chiếm 11,9% tổng số họ hợp chất [Demay J., 2019]. Trong đó, có đến 81% số hợp chất kháng khuẩn được phát hiện từ các chủng VKL thuộc bộ Nostocales và 70% số hợp chất kháng khuẩn thuộc nhóm alkaloid và polyketide [Carpine R., 2021]. Hợp chất malyngolide một loại kháng sinh thuộc nhóm polyketide đầu tiên được phân lập từ loài *Lyngbya majuscula* ức chế mạnh vi khuẩn *Mycobacterium smegmatis* and *Streptococcus pyogenes* [Cardllina J.H., 1979]. Họ hợp chất eucapsitrione phân lập từ *Eucapsis* sp. là dẫn xuất của anthraquinone có khả năng ức chế vi khuẩn *Mycobacterium tuberculosis* với nồng độ ức chế tối thiểu là 3,1 μM [Sturdy M., 2010]. Trong khi đó, họ hợp chất kulolide thuộc lớp depsipeptide bao gồm 44 hợp chất, được phân lập từ một số loài VKL thuộc bộ Nostocales, Oscillatoriales không chỉ thể hiện hoạt tính kháng khuẩn mà còn có hoạt tính ức chế đối với động vật nguyên sinh, độc tính tế bào và độc tính gây chết [Demay J., 2019]. Bên cạnh đó, có khoảng 80 hợp chất thuộc họ hapalindole - like thuộc nhóm alkaloid được phân lập từ các loài VKL phân nhánh thật thuộc chi *Westiella*, *Westiellopsis*, *Fischerella* và *Hapalosiphon* thể hiện khả năng ức chế 27 chủng vi khuẩn khác nhau, cùng với hoạt tính kháng nấm, kháng tảo, độc tính tế bào, diệt côn trùng, thậm chí là đảo ngược tình trạng kháng thuốc của một

số dòng tế bào ung thư thông qua khả năng điều hòa kênh natri của tế bào [Cagide E., 2014]. Hợp chất scytoscalarol và cybastacine A, B (thuộc nhóm terpen sesterterpen) phát hiện từ một số loài thuộc chi *Scytonema* và *Nostoc* có khả năng ức chế mạnh một số loại vi khuẩn với nồng độ ức chế tối thiểu thấp hơn 32 $\mu\text{g/ml}$ [Cabanillas A.H., 2018; Mo S., 2009]. Các hợp chất crossbyanol polybrominated A- E (thuộc nhóm polyhalogenated (PHC) được phân lập từ loài *Leptolyngbya crossbyana* ức chế vi khuẩn *Staphylococcus aureus* kháng methicillin (MRSA) ở nồng độ ức chế tối thiểu từ 2,0 đến 3,9 $\mu\text{g/ml}$ [Choi H., 2010].



Hình 1.6. Cơ chế ức chế vi khuẩn của các chất thứ cấp từ VKL

(Nguồn: Kar J. và cộng sự, 2022)

Các hợp chất thứ cấp từ VKL ức chế vi khuẩn gây bệnh theo nhiều cơ chế khác nhau (Hình 1.6). Một trong những cơ chế phổ biến là ức chế hệ thống quorum sensing - hệ thống truyền tin giữa các tế bào vi khuẩn, đóng vai trò quan trọng trong việc điều hòa độc lực và hình thành màng sinh học. Một số hợp chất thuộc nhóm alkaloid và lipid như honaucin A-C, doscadenamide A, malyngolide, lyngbyoic acid phân lập từ VKL ở biển có thể ức chế hệ thống cảm nhận quorum của một số vi khuẩn *V. harveyi*,

E. coli và *P. aeruginosa* [Choi H., 2012; Dobretsov S., 2010; Liang X., 2019; Kwan J.C., 2011]. Trong khi đó, một số hợp chất thuộc nhóm lipid và peptide từ một số loài VKL ức chế vi khuẩn bằng cách phá vỡ tính toàn vẹn của màng tế bào vi khuẩn, gây ra sự rò rỉ các chất trong tế bào chất ra ngoài bào, phá vỡ chuỗi vận chuyển điện tử và ức chế các enzym quan trọng của tế bào vi khuẩn [Kar J., 2022].

Một số hợp chất lại tác động lên một số con đường trao đổi chất quan trọng của tế bào vi khuẩn như con đường Shikimate, chuỗi vận chuyển điện tử và sinh tổng hợp thành tế bào. Hợp chất anaephenes A - C phân lập từ loài *Hormoscilla* sp. ức chế quá trình tổng hợp ATP và vận chuyển tích cực của vi khuẩn *B. cereus* và *S. aureus* [Brumley D., 2018]. Đường 7-deoxy-sedoheptulose phân lập từ loài *Synechococcus elongates* có cấu trúc tương tự NADPH sẽ thay thế NADPH trong con đường Shikimate, từ đó các phản ứng khử sẽ bị dừng dẫn đến làm gián đoạn con đường Shikimate, từ đó tế bào không tổng hợp được axit amin thơm và gây ức chế sự sinh trưởng của vi khuẩn [Brilisauer K., 2019]. Ngoài ra, một số hợp chất thứ cấp của VKL cũng có khả năng ức chế enzyme DNA polymerase và RNA polymerase tham gia quá trình tổng hợp DNA, RNA và protein như hợp chất 12-epi-hapalindole E isonitrile phân lập từ loài *Fischerella* sp. và calothrixin A phân lập từ loài *Calothrix* sp. ức chế RNA polymerase trong quá trình phiên mã mRNA, từ đó ngăn cản quá trình tổng hợp protein của vi khuẩn *B. subtilis* [Doan T.N., 2000]. Nhóm hợp chất macrolides, thuộc lớp polyketide tác động lên quá trình gắn aminoacyl tRNA-ribosome vào mRNA, từ đó ngăn chặn tổng hợp các protein mới [Kar J., 2022].

1.3.2. Các hoạt chất ức chế tế bào ung thư

Vi khuẩn lam là nguồn sản sinh dồi dào các hợp chất có hoạt tính gây độc tế bào, đặc biệt tiềm năng trong nghiên cứu phát triển thuốc điều trị ung thư. Theo Demay và cộng sự (2019), các hợp chất gây độc tế bào chiếm tỷ lệ cao nhất trong các hợp chất đã được phân lập từ VKL với 110 họ chất tương ứng 30,4% số họ hợp chất. Những hợp chất này thuộc 4 lớp hóa học chính bao gồm nucleoside, depsipeptide, macrolide và lipopeptide [Demay J., 2019]. Các chi *Symploca*, *Lyngbya*, *Scytonema* và *Oscillatoria* cũng là nguồn tổng hợp các hợp chất macrolide có độc tính mạnh đối

với tế bào ung thư [Wang M., 2017]. Đáng chú ý, chỉ riêng chi *Lyngbya* đã phát hiện được 144 hợp chất ức chế tế bào ung thư [Swain S.S., 2015]. Một số hợp chất ức chế tế bào ung thư được phát hiện từ một số loài VKL tiêu biểu như hợp chất scytonycin A - E được phân lập từ loài *Scytonema pseudohofmanni* có khả năng ức chế mạnh đối với tế bào ung thư biểu bì và ung thư phổi đã được Bộ Thương mại Hoa Kỳ cấp bằng sáng chế năm 1994 [Furusawa E., 1994]; hợp chất ambiguine I isonitriles phân lập từ một số loài VKL dạng phân nhánh thật như *Fischerella ambigua*, *Hapalosiphon hibernicus*, *Westiellopsis prolifica* có độc tính mạnh với dòng tế bào ung thư kết ruột HT-29 và tế bào ung thư vú MCF7 với giá trị EC_{50} lần lượt là 4,35 μ M và 1,7 μ M [Acuña U.M., 2015]. Năm 2020, Kawaguchi và cộng sự đã tinh sạch được hợp chất neo-aplysiatoxin A - một dẫn xuất mới của aplysiatoxin từ loài *Moorea producens* thể hiện độc tính trên tế bào ung thư hạch L1210 của chuột mạnh hơn so với các hợp chất đã biết trong họ chất aplysiatoxin [Kawaguchi M., 2020].

Cho đến nay, ngày càng có nhiều hợp chất phân lập từ các chủng VKL đã được nghiên cứu và phát triển thành thuốc điều trị ung thư và được Cơ quan quản lý thực phẩm và thuốc Hoa Kỳ (FDA) và Cơ quan quản lý dược phẩm Châu Âu (EMA) cấp phép cho lưu hành trên thị trường hoặc trong các giai đoạn thử nghiệm lâm sàng. Trong đó, nổi bật nhất là các hợp chất trong họ Dolastatin đã được thử nghiệm lâm sàng ở pha 2 và được đánh giá là có hiệu quả chữa trị cao hơn thuốc chống ung thư Taxol từ 100-1000 lần. Hiện nay, đã có 5 loại thuốc sản xuất từ dolastatin10 được FDA cấp phép lưu hành trên thị trường là brentuximab vedotin, polatuzumab vedotin, enfortumab vedotin, disitamab vedotin, và tisotumab vedotin để điều trị ung thư [Kallifidas D., 2024]. Bên cạnh đó, hợp chất cryptophycin phân lập từ chủng *Nostoc* sp. GSV 224 có khả năng ức chế các dòng tế bào ung thư đa kháng thuốc với giá trị IC_{50} nhỏ hơn 50pM, là thành phần của thuốc kháng thể liên hợp trong liệu pháp điều trị ung thư mới. Dẫn xuất cryptophycin-52 đã được đưa vào thử nghiệm pha II trong điều trị ung thư buồng trứng kháng platinum [Weiss C., 2017]. Tỷ lệ phát hiện các hợp chất có cấu trúc mới ngày càng tăng, cho thấy VKL có tiềm năng trở thành nguồn dược liệu thay thế cho nguồn cây dược liệu truyền thống hay các loại vi sinh vật kinh

điên như nấm sợi và xạ khuẩn.

1.3.3. Cơ chế tác động lên tế bào ung thư bởi các hoạt chất từ vi khuẩn lam

Các hoạt chất từ VKL có khả năng tương tác với các phân tử đích quan trọng và kích hoạt quá trình chết tế bào ung thư theo chương trình một cách có kiểm soát (apoptosis). Một số cơ chế tác động chính lên tế bào ung thư của các hoạt chất từ VKL bao gồm: gây ngừng chu kỳ tế bào; kích hoạt con đường apoptosis của tế bào thông qua điều hòa biểu hiện họ enzyme caspase, thay đổi biểu hiện họ protein Bcl-2 và ức chế khả năng di cư của tế bào ung thư.

1.3.3.1. Làm ngừng (bắt giữ) chu trình tế bào

Chu trình tế bào là quá trình sinh học thiết yếu điều khiển sự tăng trưởng, nhân đôi DNA và phân chia tế bào. Việc làm gián đoạn quá trình này có thể dẫn đến suy giảm khả năng sống dẫn đến kích hoạt sự chết theo chương trình (apoptosis) của tế bào. Nhiều hợp chất từ VKL đã được chứng minh có khả năng làm ngừng (bắt giữ) chu trình tế bào, đặc biệt thông qua tác động lên các protein tham gia hình thành bộ khung tế bào như sợi tubulin và actin hay phá vỡ cấu trúc thoi vô sắc. Tiêu biểu là các hợp chất trong họ dolastatin và dẫn xuất của nó như symplostatin 1 thuộc nhóm peptide phân lập từ một số chủng VKL sống ở biển gây dừng chu kỳ tế bào tại pha G2/M [Luesch H., 2000; Mooberry S.L., 2003]. Tương tự, cryptophycin 52 (depsipeptide vòng phân lập từ chủng *Nostoc sp.*) gây rối loạn sự hình thành thoi vô sắc và dẫn đến làm dừng chu kỳ tế bào ở pha G2/M hay hợp chất calothrixin A - một indole phenanthridine pentacyclic - có khả năng gây ngừng chu trình tế bào tại pha S của tế bào ung thư bạch cầu [Drew L., 2002; Xu S., 2016]. Ngoài ra, hợp chất hectochlorin và lyngbyabellin gây bắt giữ chu trình tế bào ung thư lympho Burkitt bằng cách làm tăng độ dày bộ khung tế bào (gồm sợi actin, vi ống và sợi trung gian), đồng thời làm tăng đáng kể tỷ lệ tế bào hai nhân, từ đó làm dừng chu trình tế bào ở pha G2/M [Luesch H., 2000; Ramaswamy A.V., 2007]. Một số hợp chất khác tác động lên pha G1 như apratoxin A (từ *Lyngbya sp.*) gây ngừng chu trình tại pha G1 trên tế bào ung thư cổ tử cung HeLa ở nồng độ 50 nM, hay largazole phân lập từ loài

Symploca sp. gây dừng chu trình tế bào tại pha G1 và kích hoạt sự thoái hóa proteasome của E2F1 ở một số dòng tế bào ung thư phổi [Ma D., 2006; Wu L.C., 2013].

Bên cạnh đó, protein ức chế khối u p53 (được mã hóa bởi gen *TP53*) đóng vai trò then chốt trong quá trình kiểm soát chu trình tế bào thông qua cảm ứng với các tín hiệu stress nội bào đặc biệt là tổn thương DNA. Khi DNA bị tổn thương, p53 tác động tăng mức động biểu hiện gen *CDKN1A* (*p21*) mã hóa protein p21^{WAF1/CIP1}, protein này gắn với cyclin-dependent kinases (CDK) và ức chế quá trình phosphoryl hóa Rb, dẫn đến ngừng chu trình tế bào tại pha G1/S [Vogelstein B., 2000]. Đồng thời, p53 còn kiểm soát biểu hiện gen *GADD45α* mã hóa protein GADD45α có vai điều hòa chu trình tế bào tại điểm kiểm soát G2/M và tham gia sửa chữa DNA [Vogelstein B., 2000; Wang X.W., 1999]. Ngoài ra, khi DNA không được sửa chữa, p53 còn có khả năng hoạt hóa các protein tiền apoptosis như BAX và PUMA, làm tăng tính thấm màng ty thể, giải phóng cytochrome c và kích hoạt chuỗi caspase dẫn đến quá trình apoptosis của tế bào [Vogelstein B., 2000]. Nhờ những cơ chế này, p53 được xem như một “người gác cổng” di truyền, ngăn chặn sự nhân đôi của các tế bào có DNA bị tổn thương, từ đó hạn chế sự tiến triển ác tính của tế bào ung thư. Trong khi đó, gen *CDKN2A* (*p16*) mã hóa protein p16^{INK4a} ức chế thụ thể CDK4/6, ngăn sự phosphoryl hóa Rb từ đó cũng gây ngừng chu trình ở pha G1 [Serrano M., 1993; Kim W.Y., 2006]. Một số hợp chất phân lập từ vi khuẩn lam có khả năng tăng mức độ biểu hiện gen mã hóa p53, p21 và p16 từ đó gây ngừng chu trình tế bào như cylindrospermopsin, cryptophycin 52, largazole [Bain P., 2007; Drew L., 2002; Hu Z., 2006, Wu L.C., 2013].

1.3.3.2. Kích hoạt con đường apoptosis

Apoptosis là quá trình tế bào chết một cách có kiểm soát. Nó là cơ chế thiết yếu được đặc trưng bởi những thay đổi sinh hóa và hình thái tế bào nhằm duy trì cân bằng nội môi và loại bỏ các tế bào bất thường. Quá trình này được diễn ra thông qua hai con đường tín hiệu: nội sinh (intrinsic pathway) và ngoại sinh (extrinsic pathway). Trong đó con đường nội sinh được kích hoạt bởi các stress nội bào như tổn thương

DNA, thiếu oxy, stress nội bào (rối loạn chức năng ty thể), ... Quá trình này chủ yếu liên quan đến rối loạn chức năng ty thể dẫn đến việc thay đổi tính bán thấm của màng ty thể và giải phóng cytochrome C vào bào tương. Song song đó, con đường ngoại sinh (extrinsic pathway) có thể được kích hoạt bởi sự gắn kết của các ligand đặc hiệu vào thụ thể chết trên bề mặt tế bào [Cavalcante G.C., 2019].

** Điều hòa biểu hiện họ enzyme caspase*

Caspase thuộc nhóm enzyme protease cysteine đóng vai trò quan trọng trong việc kích hoạt quá trình apoptosis của tế bào được mã hóa bởi họ gen *CASP*. Họ enzyme caspase được chia thành 3 nhóm chính là nhóm caspase khởi phát (initiator caspase); caspase thực thi (executioner caspases) và caspase viêm (inflammatory caspase). Trong đó caspase 8 và caspase 9 đóng vai trò như hai “công tắc” chính trong nhóm caspase khởi phát có vai trò nhận tín hiệu gây chết để khởi động quá trình apoptosis. Caspase 8 được kích hoạt bởi tín hiệu ngoại bào như FasL - Fas, TNF - TNFR, TRAIL - DR4/5 để kích hoạt con đường apoptosis ngoại sinh còn caspase 9 được kích hoạt bởi các tín hiệu nội bào như tổn thương ty thể từ đó kích hoạt con đường apoptosis nội sinh. Enzyme caspase 3 là “caspase chính” trong nhóm caspase thực thi được hoạt hóa bởi các caspase khởi phát, đóng vai trò trung tâm tham gia vào cả con đường apoptosis nội sinh và ngoại sinh [Fan T.J., 2005].

Một số hợp chất thứ cấp có nguồn gốc từ VKL có khả năng điều hòa chuỗi phản ứng caspase, qua đó kích hoạt con đường apoptosis hiệu quả trên nhiều dòng tế bào ung thư. Cao chiết từ một số loài VKL thuộc chi *Anabaena* có khả năng kích hoạt quá trình apoptosis trên dòng tế bào bạch cầu cấp tủy (AML) thông qua cơ chế hoạt hóa enzyme caspase, từ đó làm tăng đáng kể số lượng tế bào chết theo chương trình so với mẫu đối chứng. Ngoài ra, các cao chiết này còn ức chế tác dụng bảo vệ của protein LEDGF (p75) khi protein này được biểu hiện quá mức trong tế bào AML giúp tế bào ung thư kháng lại với hóa trị [Ofstedal L., 2010].

Các hợp chất như symplostatin 1, biselyngbyaside, cryptophycin, dolastatin 10, dolastatin 15 và curacin A tác động hoạt hóa enzyme caspase-3 từ đó kích hoạt con đường apoptosis của nhiều dòng tế bào ung thư như ung thư vú MDA-MB-435, ung

thư biểu mô buồng trứng SKOV3, ung thư phổi A549 [Catassi A., 2006; Mooberry S.L., 1997; 2003; Yonezawa T., 2012]. Drew và cộng sự (2002) đã chỉ ra rằng hợp chất cryptophycin 52 có vai trò hoạt hóa cả enzyme caspase-1 và caspase-3 từ đó khởi động quá trình apoptosis của một số dòng tế bào ung thư tuyến tiền liệt LNCaP, PC-3 và DU-145 [Drew L., 2002]. Bên cạnh đó, hợp chất somocystinamide A, một lipopeptide phân lập từ loài *Lyngbya majuscula* có khả năng ức chế sự tăng sinh khối u trên nhiều dòng tế bào ung thư như Jukrat, ung thư bạch cầu CEM, ung thư phổi A549, ung thư vú MCF-7 và ung thư tuyến tiền liệt PC-3 thông qua kích hoạt enzyme caspase-8 [Wrasidlo W., 2008].

* *Điều hòa biểu hiện họ protein Bcl-2*

Họ protein Bcl-2 là nhóm protein nằm trên màng ngoài ty thể, đóng vai trò quan trọng trong điều hòa quá trình apoptosis của tế bào theo con đường nội sinh. Họ protein này gồm hai nhóm là protein tiền apoptosis (pro-apoptotic) gồm các protein Bad, Bax, Bak có chức năng tăng tính thấm màng ty thể để giải phóng cytochrome C kích hoạt quá trình apoptosis theo con đường nội sinh. Nhóm protein ức chế apoptosis (anti-apoptotic) gồm các protein Bcl-2, Bcl-xL giúp bảo vệ tính toàn vẹn màng, ức chế quá trình chết tế bào.

Nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng một số hợp từ VKL có khả năng ức chế mạnh hoạt tính của protein Bcl-2 và Bcl-xL trong tế bào ung thư. Các hợp chất này thường tác động thông qua cơ chế phosphoryl hóa, từ đó làm giảm hoạt tính của các protein chống apoptosis. Chẳng hạn, hợp chất symplostatin 1 có khả năng ức chế sự sống sót của tế bào ung thư vú người thông qua việc phosphoryl hóa và ức chế Bcl-2 [Mooberry S.L., 2003]. Tương tự, cryptophycin 52 làm tăng phosphoryl hóa Bcl-2 và Bcl-xL, tăng mức độ biểu hiện của gen *BAX* từ đó kích hoạt con đường apoptosis của dòng tế bào ung thư tiền liệt tuyến người LNCaP [Drew L., 2002]; dolastatin 10 cũng kích hoạt phosphoryl hóa Bcl-2 trên dòng tế bào bạch cầu [Kalemkerian G.P., 1999].

Ngoài ra, một số hợp chất phân lập từ VKL còn có tác động hoạt hóa protein tiền apoptosis. Catassi và cộng sự (2006) đã chỉ ra rằng các hợp chất curacin,

dolastatin 10 và 15 có thể ức chế quá trình phosphoryl hóa protein Bad tại vị trí serine 136 ở dòng tế bào ung thư phổi A549, từ đó hoạt hóa protein Bad, di chuyển vào ty thể và giải phóng cytochrome C, dẫn đến apoptosis tế bào thông qua hoạt hóa caspase-3 [Catassi A., 2006].

1.3.3.3. *Ức chế khả năng di cư của tế bào*

Khả năng di cư là một trong những đặc điểm điển hình của tế bào ung thư phân biệt so với tế bào thường. Nó phản ánh khả năng xâm nhập, di chuyển của tế bào cũng như mối liên hệ chặt chẽ với quá trình di căn của tế bào ung thư. Vì vậy, ức chế được quá trình di cư của tế bào đóng vai trò quan trọng trong điều trị ung thư [Ohgami N., 2015]. Cơ chế điều hòa quá trình này được kiểm soát bởi nhiều con đường tín hiệu khác nhau với sự tham gia của các phân tử then chốt như Integrin, N-cadherin, FAK, PI3K và AKT [Ohgami N., 2015; Thang N.D., 2015;]. Sự tăng biểu hiện N-cadherin thúc đẩy tương tác với integrin, kích hoạt enzyme focal adhesion kinase (FAK). Sau đó, FAK hoạt hóa enzyme phosphoinositide 3 – kinase (PI3K), dẫn đến tạo PIP3 và hoạt hóa enzyme kinase B (AKT). AKT hoạt hóa giúp tái tổ chức bộ xương actin, hình thành cấu trúc lamellipodia và filopodia, đồng thời bảo vệ tế bào khỏi anoikis, từ đó tăng khả năng di cư và xâm lấn của tế bào ung thư (Mitra S.K., 2006).

Mặc dù VKL được xem là nguồn phong phú của các hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học, nhưng các nghiên cứu về khả năng ức chế sự di cư của tế bào ung thư từ cao chiết hoặc hợp chất phân lập từ nhóm sinh vật này vẫn còn hạn chế. Một số nghiên cứu đã cho thấy hợp chất coibamide A ức chế khả năng di cư của dòng tế bào ung thư não U87-MG; majusculamide D ức chế sự di cư và tăng sinh của tế bào ung thư tuyến tụy [Serrill J.D., 2016; Zhao X., 2024]. Bên cạnh đó, hợp chất Isomalyngamide A và A1 phân lập từ loài *Lyngbya majuscula* ức chế sự di cư của dòng tế bào ung thư vú MDA-MB-231 ở nồng độ 0,06 và 0,337 μ M bằng cách bất hoạt các phân tử p-FAK, FAK, p-AKT và AKT thông qua con đường ức chế integrin β 1 [Chang T.T., 2011]. Polysaccharide từ chủng *Nostoc commune* NVPS có khả năng ức chế mạnh sự di chuyển tế bào ung thư phổi tế bào nhỏ (SCLC) thông qua ức chế

tín hiệu integrin β 1/FAK, ngăn chặn EMT, giảm MMP-9, và ức chế JAK1/STAT3 [Guo M., 2016].

1.4. Ứng dụng của vi khuẩn lam trong lĩnh vực dược phẩm

Vi khuẩn lam là nhóm vi sinh vật quang tự dưỡng có khả năng tổng hợp nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học giúp chúng thích nghi với điều kiện môi trường khắc nghiệt và chống lại sự cạnh tranh từ các sinh vật khác [Mazard S., 2016]. Bên cạnh đó, với ưu điểm tốc độ sinh trưởng nhanh, dễ nuôi cấy và chi phí thấp, VKL có tiềm năng lớn để sản xuất ở quy mô công nghiệp. Nhờ vào những đặc tính sinh học và hóa học độc đáo này, chúng được coi là nguồn nguyên liệu mới tiềm năng thay thế các nguồn nguyên liệu truyền thống trong ngành dược, mỹ phẩm.

Các hợp chất scytonemin và mycosporine-like amino acids (MAAs) được tổng hợp từ nhiều loài VKL giúp bảo vệ tế bào khỏi tổn thương do bức xạ UV được dùng để sản xuất kem dưỡng da, kem chống nắng hiệu quả [Derikvand P., 2017]. Không chỉ vậy, VKL còn được coi là nguồn cung cấp dồi dào các chất dinh dưỡng có giá trị như polysaccharide, protein, axit amin, axit béo thiết yếu, enzyme, vitamin và khoáng chất. Nổi bật là các loài VKL thuộc chi *Athrospira* chẳng hạn *Arthrospira maxima*, *A. platensis* (với tên thương mại là tảo xoắn - spirulina) có chứa hàm lượng protein rất cao từ 51 - 71% sinh khối khô, vitamin B12 và sắt - những vi chất thiết yếu cho hệ thần kinh, quá trình tạo DNA và huyết sắc tố [Khan Z., 2005]. Ngoài ra, các sắc tố tự nhiên từ VKL như carotenoid (beta-carotene, zeaxanthin, canthaxanthin) và phycobiliprotein (phycocyanin) vừa được dùng làm chất tạo màu thực phẩm, vừa có tác dụng chống oxy hóa, phòng ngừa ung thư, bệnh tim mạch và thoái hóa điểm vàng [Torregrosa-Crespo J., 2018].

Bên cạnh đó, nhiều loài VKL còn sản sinh lượng lớn các hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học cao như gây độc tế bào, kháng khuẩn, kháng nấm, kháng virus, chống oxy hóa, chống viêm, ức chế lipoprotein mật độ thấp (LDL - Low-Density Lipoprotein) và tác dụng hạ triglyceride ứng dụng trong ngành dược phẩm. Từ 1500 năm trước Công nguyên, loài *Nostoc* sp. đã được sử dụng để điều trị bệnh Gout và

một số loại ung thư [Liu X.J., 2003]. Tuy nhiên, các nghiên cứu về hợp chất có hoạt tính sinh học từ VKL chỉ được quan tâm nhiều từ năm 1982 sau khi các nhà khoa học tại trường Đại học ở Hawaii phân lập được hợp chất lyngbyatoxin A và aplysiatoxin từ loài *Lyngbya majuscula* có hoạt tính ức chế tế bào ung thư mạnh [Moore R.E., 1982]. Từ năm 1983 đến 1994, khoảng 80% thuốc kháng khuẩn và chống ung thư được phê duyệt có nguồn gốc từ nguyên liệu tự nhiên. Bên cạnh đó, các hợp chất chiết xuất từ VKL còn có tác dụng hỗ trợ điều hòa huyết áp, cải thiện viêm mũi dị ứng, tăng cường miễn dịch, kiểm soát đường huyết, hỗ trợ sức khỏe tim mạch và tăng cường cơ bắp. Một số hợp chất có tác dụng điều hòa miễn dịch thúc đẩy sự phát triển của hệ vi sinh vật có lợi cho đường ruột [Furmaniak M.A., 2017].

Không những vậy, nhiều chất thứ cấp từ VKL đã được ứng dụng thương mại rộng rãi, đặc biệt trong ngành mỹ phẩm và thực phẩm chức năng. Dự kiến đến năm 2026, thị trường tảo toàn cầu sẽ đạt 6,09 tỷ USD với tốc độ tăng trưởng 6,7% mỗi năm, riêng thị trường VKL được dự báo tăng trưởng gấp đôi trong giai đoạn 2018 - 2025. Trong đó, các sản phẩm sản xuất từ sắc tố phân lập từ VKL như phycocyanin và phycoerythrin chiếm tỷ trọng lớn trong các sản phẩm thương mại, điển hình là các sản phẩm C-Phycocyanin, PhycoLink®, PhycoPro™, Lightning Link® C-PE và Streptavidin C-Phycoerythrin. Gần đây, hợp chất Methylsilanolspirulinat chiết xuất từ *Arthrospira platensis* và *Limnospira maxima* đã được đưa vào cơ sở dữ liệu thành phần mỹ phẩm của Liên minh Châu Âu (EU) dùng cho sản phẩm chăm sóc da. Bên cạnh đó, sinh khối từ loài *Aphanizomenon flos-aquae* (tảo Klamath) được sử dụng làm thành phần chính trong nhiều loại mỹ phẩm như mặt nạ phục hồi tóc “Blue Green Algae” do công ty Aubrey Organics (Mỹ) sản xuất. Điều này cho thấy tiềm năng lớn của VKL trong công nghiệp mỹ phẩm.

Ngoài ra, nhiều hợp chất tự nhiên từ VKL đã được nghiên cứu và phát triển thành thuốc chống virus và điều trị ung thư đã được thương mại (Bảng 1.1). Từ 1992 đến năm 2020, trên thế giới đã có 21 bằng sáng chế được cấp cho nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học sinh ra từ VKL [Verma S., 2022].

Bảng 1.1. Các hợp chất kháng virus và tế bào ung thư từ VKL đã được thương mại

Hoạt tính	Chủng VKL	Tên sản phẩm thương mại	Công ty
Thuốc kháng virus	<i>Spirulina</i>	Apogen® Children Granules, Apogen® Children Chewables, Apogen® Lozenges 400 mg Tablets, Apogen® capsules,	Far East Bio-Tec. Co. Ltd. (FEBICO) (Nangang, Đài Bắc, Đài Loan)
	<i>Arthrospira</i> FEM-101	ApoX Surface Anti-Viral Spray	
	<i>Spirulina</i>	Apogen® Liquid Tincture	
	<i>Spirulina</i> (hoạt chất FB-1603)	Apomivir® (thuốc kháng virus mới)	
	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	Blue - Green Algae from Klamath Lake	Source Naturals, Inc. (California, Mỹ)
	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	Blue - Green Algae from Klamath Lake - 1000 MG	Sunny Greens (Utah, Mỹ)
Thuốc trị ung thư	<i>Symploca hydnoides</i> , <i>Lyngbya majuscula</i>	Brentuximab vedotin 63 (Adcetris™) (dạng thuốc liên hợp kháng thể)	Seattle Genetics (Bothell, WA, Mỹ)
	<i>Lyngbya sp.</i>	Glembatumumab vedotin	Celldex Therapeutics, Inc. (Phillipsburg, New Jersey, Mỹ)
	<i>Nostoc sp.</i> GSV 224	Cryptophycin 1	Merck Pvt. Ltd. (Mỹ)

(Nguồn: Verma S. và cộng sự, 2022)

1.5. Các nghiên cứu về vi khuẩn lam tại Việt Nam

1.5.1. Các nghiên cứu về đa dạng vi khuẩn lam

Việt Nam là quốc gia nằm trong khu vực khí hậu nhiệt đới gió mùa ẩm với tiềm năng đa dạng sinh học cao trong đó có đa dạng VKL. Các nghiên cứu phân loại VKL tại Việt Nam được thực hiện từ những năm 1960 với nghiên cứu của Cao Ngọc Phương và cộng sự (1964) và Hortobagyi (1967 - 1969). Đáng chú ý, năm 1996, Dương Đức Tiến lần đầu tiên xây dựng hệ thống phân loại VKL tại Việt Nam ghi nhận 262 loài và dưới loài thuộc 61 chi từ môi trường đất ruộng lúa và nước ngọt [Dương Đức Tiến, 1996]. Sau đó, nhiều nghiên cứu khác tiếp tục bổ sung dữ liệu về đa dạng VKL tại các hệ sinh thái khác nhau. Chẳng hạn, Võ Hành và cộng sự (2006) đã phân loại được 26 loài VKL có tế bào dị hình từ đất nông nghiệp tỉnh Đắk Lắk, trong khi Nguyễn Thị Thu Liên (2007) ghi nhận 33 loài từ các thủy vực ở thành phố Huế, trong đó có 18 loài mới được ghi nhận tại Việt Nam [Võ Hành, 2006, Nguyễn Thị Thu Liên, 2017]. Ngô Thị Trang và cộng sự (2012) phát hiện được 6 chủng VKL thuộc các chi *Jaaginema*, *Phormidium* và *Microcystis* từ thủy vực Hà Nội [Ngô Thị Trang, 2012]; Phạm Thị Bình Nguyên và cộng sự (2020) xác định 47 loài từ các thủy vực ở Trà Vinh [Phạm Thị Bình Nguyên, 2020]. Đặc biệt, Nguyễn Đức Diện và cộng sự (2018) công bố danh lục gồm 75 loài và dưới loài VKL có tế bào dị hình phân lập từ đất trồng tại Việt Nam, trong đó 32 loài đặc hữu vùng nhiệt đới [Nguyễn Đức Diện, 2018]. Nhìn chung, các nghiên cứu đã phản ánh rõ sự đa dạng và phong phú của VKL tại Việt Nam, đồng thời cho thấy tiềm năng lớn trong việc phát hiện các loài VKL mới ở nước ta. Tuy nhiên, phần lớn các nghiên cứu trên vẫn dựa trên đặc điểm hình thái, dễ gây thiếu chính xác trong định danh các loài VKL.

Cùng với sự phát triển của công nghệ sinh học, các nhà khoa học trong nước đã áp dụng các kỹ thuật sinh học phân tử hiện đại trong phân loại VKL ở Việt Nam. Hoàng Phương Hà và cộng sự (2003) đã phân loại được 3 chủng VKL thuộc chi *Anabeana* bằng phương pháp phân loại truyền thống kết hợp phân loại phân tử dựa trên trình tự gen 16S rRNA [Hoàng Phương Hà, 2003]. Sau đó, Hồ Sỹ Hạnh và cộng sự (2006) đã sử dụng kỹ thuật RAPD-PCR để phân tích tính đa dạng di truyền của 5 loài VKL thuộc chi

Calothrix phân lập ở đất trồng lúa tỉnh Đắk Lắk [Hồ Sỹ Hạnh, 2006]. Đến năm 2017, nhóm nghiên cứu của Phạm Thị Lương Hằng và cộng sự lần đầu tiên công bố về đa dạng của 13 chủng VKL thuộc họ Nostocaceae phân lập từ đất ruộng lúa ở Thừa Thiên Huế dựa trên phương pháp tiếp cận đa chiều [Phạm H.T.L., 2017]. Bên cạnh đó, Nguyễn Đức Bách và cộng sự (2021) cũng đã thành công định danh chủng *Arthrospira platensis* VQ-VN bằng đánh giá trình tự đoạn gen 16S rRNA kết hợp phân tích đặc điểm hình thái [Nguyễn Đức Bách, 2021]. Maltseva và cộng sự (2022) công bố được loài *Aliinostoc vietnamicum* - loài VKL mới được phân lập từ đất rừng ở vườn Quốc gia Cát Tiên, góp phần khẳng định tiềm năng trong việc phát hiện và mô tả các loài VKL mới ở nước ta [Maltseva S., 2022].

1.5.2. Các nghiên cứu về hoạt chất sinh học từ vi khuẩn lam

Trong những năm gần đây, nghiên cứu về hợp chất có hoạt tính sinh học từ VKL ở Việt Nam đã được các nhà khoa học quan tâm nhiều. Năm 2011, Nguyễn Tiến Đạt và cộng sự là nhóm đầu tiên công bố khả năng sinh hợp chất ức chế dòng tế bào ung thư của 4 chủng VKL thuộc chi *Microcystis* và *Anabaena* phân lập tại thủy vực nước ngọt Việt Nam. Nghiên cứu đã cho thấy cao chiết tổng số từ cả 4 chủng này đều có độc tính tế bào đối với tế bào ung thư cổ tử cung HeLa. Hợp chất Ergosterol phân lập từ chủng *M. aeruginosa* TC-3 ức chế mạnh sự hoạt hóa NF- β B với giá trị IC₅₀ là 0,91 μ g/ml [Nguyen T.D., 2011]. Năm 2017, Phạm Thị Lương Hằng và cộng sự cũng công bố về khả năng ức chế dòng tế bào ung thư vú (MCF7), ung thư đại trực tràng (HCT116) và ung thư gan (HepG2) của 26 cao chiết tổng số từ 13 chủng VKL phân lập từ đất ruộng lúa ở tỉnh Thừa Thiên Huế với giá trị IC₅₀ từ 47,8 μ g/ml đến 232 μ g/ml [Phạm H.T.L., 2017].

Bên cạnh đó, các nghiên cứu về hoạt tính kháng vi sinh vật của cao chiết VKL cũng được quan tâm nhiều hơn. Lê Thị Ánh Tuyết và cộng sự (2011) thành công phân tách được hợp chất flourensandiol từ loài *Anabaena* sp. phân lập tại tỉnh Đắk Lắk có hoạt tính kháng khuẩn mạnh [Lê Thị Ánh Tuyết, 2011]. Nguyễn Thị Thu Liên và cộng sự (2017) đã sàng lọc được 11 trong số 20 chủng VKL phân lập từ đất ruộng lúa tỉnh Thừa Thiên Huế ức chế được các chủng vi sinh vật gây bệnh trên người với

đường kính vòng kháng khuẩn từ 4,5 - 9,0 mm [Nguyễn Thị Thu Liên, 2017]. Cùng năm đó, Phạm Thị Lương Hằng và cộng sự (2017) cũng đã thành công sàng lọc được 11 trong số 13 chủng VKL thuộc họ Nostocaceae thể hiện khả năng tổng hợp được hợp chất có hoạt tính kháng các chủng vi khuẩn Gram dương, Gram âm, trong đó cao chiết methanol từ chủng *Nostoc* sp APD4 ức chế mạnh nhất chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* với đường kính vòng kháng khuẩn là 23,3 mm [Phạm T.L.H, 2017]. Cao Thị Huệ và cộng sự (2017) đã cho thấy cao chiết từ chủng tảo xoắn *S. platensis* BM thể hiện hoạt tính kháng 3 chủng vi khuẩn Gram dương là *E. faecalis*, *S. aureus* và *B. cereus* và một chủng nấm *C. albicans* với nồng độ ức chế tối thiểu từ 16 - 64 μ l/ ml [Cao Thị Huệ, 2020]. Năm 2022, Nguyễn Văn Kiên và cộng sự lần đầu tiên công bố khả năng ức chế vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh chết sớm trên tôm của một số chủng VKL phân lập tại Việt Nam. Kết quả cho thấy, chủng NK1111 thuộc họ Nostocaceae có khả năng làm giảm 95,6% nồng độ vi khuẩn *V. parahaemolyticus* sau 96 giờ cùng nuôi và cao chiết MeOH từ chủng này đã ức chế được 83,9% vi khuẩn ở nồng độ 2,5 mg/ ml. Điều đó chứng tỏ chủng NK1111 có khả năng sản sinh hợp chất có hoạt tính ức chế vi khuẩn gây bệnh trên tôm [Nguyễn Văn Kiên, 2022]. Nhóm đã thành công tạo ra màng sinh học tự dưỡng kết hợp giữa chủng vi khuẩn lam NK1111 với vi tảo ức chế được 99,6% vi khuẩn *V. parahaemolyticus* sau 120 giờ thử nghiệm [Phạm Thị Lương Hằng, 2025]. Các kết quả nghiên cứu cho thấy tiềm năng ứng dụng hợp chất có hoạt chất sinh học từ VKL ở Việt Nam rất lớn và cần được nghiên cứu sâu hơn.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

2.1.1 *Chủng vi khuẩn lam*

Bốn mươi bảy chủng VKL được phân lập từ đất ruộng lúa, đất ven sông ở các tỉnh/ thành phố Hà Nội (kinh độ 21°00'N - 21°14'N, vĩ độ 105°37'E - 105°51'E), Hưng Yên (20°20'N kinh độ, vĩ độ 106°15'E) và Thanh Hóa (kinh độ 19°43'N - 20°27'N, vĩ độ 105°12'E - 105°50'E). Mẫu đất được thu ở ba vị trí khác nhau trong thời gian từ tháng 4 năm 2019 đến tháng 12 năm 2021.

Bên cạnh đó, ba chủng DL1, DL12 và PM3 đã có trong bộ sưu tập chủng giống VKL của nhóm. Chủng DL1, DL12 được phân lập bởi Võ Hành và cộng sự (2006) từ mẫu đất trồng lúa và đất trồng bông tỉnh Đắk Lắk [Võ Hành, 2006]; chủng PM3 được phân lập từ đất ruộng lúa huyện Phú Vang, TP. Huế bởi PGS.TS. Nguyễn Thị Thu Liên, Viện Công nghệ Sinh học, Đại học Huế.

Các chủng VKL thuần khiết được nuôi giữ trong môi trường BG11 (Phụ lục 1) [Rippka R., 1979] và lưu trữ tại Bộ môn Chuyên Sinh, Trường THPT Chuyên, Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG Hà Nội.

2.1.2. *Chủng vi khuẩn kiểm định*

Bốn chủng vi khuẩn thử nghiệm dùng trong nghiên cứu gồm: *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27852 được cung cấp bởi Bộ môn Vi sinh vật học, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên.

Các chủng vi khuẩn được bảo quản ở -80°C sẽ được hoạt hóa trong môi trường LB lỏng và nuôi lắc với tốc độ 200 vòng/ phút/ 37°C trong thời gian 24 giờ.

2.1.3. *Dòng tế bào*

Năm dòng tế bào A549 ATCC CCL - 185 (tế bào ung thư phổi), HeLa ATCC CCL-2 (tế bào ung thư cổ tử cung), OVCAR-8 ATCC CVCL-1629 (tế bào ung thư vú), HaCaT ATCC CVCL-0038 (tế bào tạo sừng da người), HEK293 ATCC CRL-1573 (tế bào thận phôi người) được cung cấp bởi PTN nuôi cấy Tế bào động vật

(Trung tâm Nghiên cứu Khoa học Sự sống, Khoa Sinh học). Các dòng tế bào được nuôi cấy trong môi trường DMEM hoặc RPMI 1640 bổ sung 10% huyết thanh thai bò, 1% kháng sinh Penicillin/Streptomycin trong tủ nuôi cấy tế bào duy trì ở 37°C và 5% CO₂.

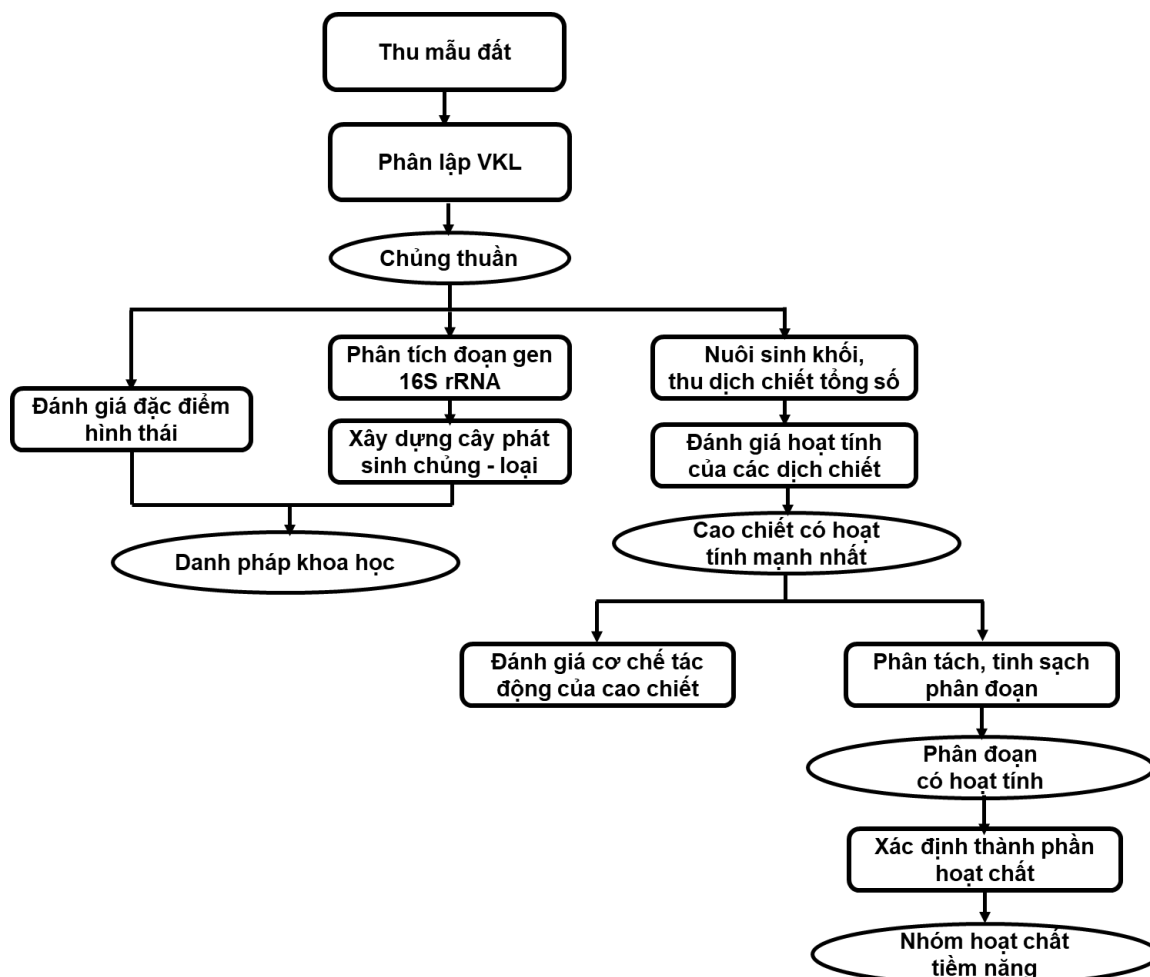
2.2. Hóa chất, thiết bị

Các hóa chất chính sử dụng trong nghiên cứu gồm: Dung môi n-hexane, ethyl acetate (EtOAc), methanol (MeOH) (Fisher- Hàn Quốc); kháng sinh Ceftriaxone (Bio industries - Mỹ), sắc ký bản mỏng silica gel 60F254 (Merck- Đức), Sephadex - LH20 (Merck- Đức), Silica gel 60 (0,040 - 0,063 mm, Merck- Đức), PrepMan® Ultra Sample Preparation Reagent (Applied Biosystems - Mỹ), DMEM Low Glucose, RPMI 1640 Low Glucose (Pan Biotech - Đức), Penicillin/Streptomycin (Cytiva - Mỹ), Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco - Mỹ), kit MTT (Invitrogen - Mỹ), kit tách RNA tổng số (Gen JET RNA Purification Kit - Thermo Scientific - Mỹ), kit tổng hợp cDNA (RevertAid First Strand cDNA Synthesis - Thermo Scientific - Mỹ), kit Annexin V (Invitrogen - Mỹ), Propidium Iodide (Invitrogen - Mỹ), RNase A (Merck - Mỹ), ...

Các thiết bị chính sử dụng trong thí nghiệm tại phòng thí nghiệm Hóa sinh và sinh học phân tử, trung tâm Khoa học sự sống, phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Protein và Enzyme (KLEP), Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội (USTH) bao gồm: Bể rửa siêu âm (Elmasonic S40 - Đức); tủ an toàn sinh học (Esco - Singapore), máy cô quay chân không; tủ ấm nuôi vi khuẩn (Incubator - Hàn quốc); tủ sấy (Mettler - Đức); máy lắc; cân điện tử (VNS - Trung Quốc); máy ly tâm lạnh Sigma 3K (Đức); bể ổn nhiệt sinh học (Mettler - Đức); máy đo quang phổ ; máy đo Nanodrop, máy đông khô, kính hiển vi Zeiss Axioplan II, tủ nuôi tế bào 37°C có điều chỉnh CO₂ và độ ẩm 5%, kính hiển vi, máy realtime PCR, Tủ âm sâu (-80°C), hệ thống đo Flow Cytometer (BD FACSCanto II), hệ thống sắc ký lỏng cao áp (Shimadzu), hệ thống Acquity UPLC I-Class Plus kết hợp với khối phổ kế Xevo G3 ESI/QTOF mass spectrometer (Waters Corporation - Mỹ).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Quy trình thí nghiệm được thực hiện theo sơ đồ Hình 2.1.



Hình 2.1. Sơ đồ quy trình thí nghiệm

2.3.1. Các phương pháp phân lập và phân loại vi khuẩn lam

2.3.1.1. Phương pháp thu mẫu vi khuẩn lam

Các mẫu vi khuẩn lam ngoài tự nhiên được thu theo hướng dẫn của Graham và cộng sự (2008). Mẫu đất được thu ở tầng mặt (0 - 2 cm), diện tích 10 x 10 cm. Mẫu được lấy tại 3 vị trí khác nhau tại mỗi điểm thu mẫu cho vào mỗi túi nilon đã ghi nhãn về địa điểm, thời gian và người thu mẫu [Graham J.L., 2008].

2.3.1.2. Phương pháp phân lập vi khuẩn lam

Vi khuẩn lam được phân lập theo phương pháp cấy trải trên đĩa thạch theo mô tả của Andersen và cộng sự (2005) [Andersen R.A., 2005]. Đầu tiên, 1 g mỗi mẫu đất

đất ruộng lúa, đất ven sông chứa VKL được hoà trong môi trường BG₀ thành dạng huyền phù, sau đó hút 0,5 ml hỗn hợp nuôi trong các đĩa petri chứa môi trường thạch BG₀ (môi trường BG11 thiếu nitrate) theo phương pháp cấy vạch. Các đĩa được nuôi ở điều kiện chiếu sáng 12 giờ sáng/ 12 giờ tối, với cường độ chiếu sáng 10 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Các khuẩn lạc VKL mọc sau 2 tuần sẽ được nhặt ngẫu nhiên và quan sát các đặc điểm về màu sắc, hình dạng sợi, hình thái tế bào sinh dưỡng, tế bào dị hình, tế bào nghỉ dưới kính hiển vi quang học. Bước này được lặp lại nhiều lần để thu được dòng thuần (chủng thuần). Các chủng thuần sẽ được nuôi trong môi trường BG11 có bổ sung kháng sinh augmetin nồng độ 10 $\mu\text{g/ml}$ để thu được các chủng thuần khiết không nhiễm các loại vi sinh vật khác.

2.3.1.3. Quan sát và phân tích hình thái

Các chủng VKL thuần khiết được đánh giá đặc điểm hình thái dưới kính hiển vi huỳnh quang Zeiss Axioplan II được kết nối với máy ảnh kỹ thuật số BUC5F-2000C. Các đặc điểm hình thái được quan sát bao gồm hình dạng, màu sắc sợi, hình thái của tế bào đầu sợi, sự hiện diện của tế bào dị hình, tế bào nghỉ và bao nhầy. Hình thái của mỗi chủng được quan sát và chụp ảnh lặp lại 3 ngày/ lần trong thời gian 10 tuần. Kích thước của tế bào sinh dưỡng, tế bào dị hình, tế bào nghỉ (chiều rộng, chiều dài) được đo lặp lại 30 lần trên mẫu tế bào sống theo mô tả của Phạm Thị Lương Hằng và cộng sự (2017) [Phạm T.L.H., 2017].

2.3.1.4. Tách chiết DNA tổng số, khuếch đại và giải trình tự đoạn gen 16S rRNA

Quy trình tách chiết DNA tổng số các chủng VKL được thực hiện theo mô tả của Boyer S.L. và cộng sự (2001; 2002). Mỗi chủng được nuôi 2 tuần trong môi trường BG11 để thu sinh khối tươi. Sau đó, 50 mg sinh khối tươi được chuyển sang ống eppendorf 1,5 ml và bổ sung 100 μl dung dịch PrepMan (Applied Biosystems, USA). Mẫu được ủ ở 96°C trong 5 phút và ly tâm ở tốc độ 12.000g/ 4°C trong 10 phút. Tiếp theo, dịch nổi được chuyển sang ống eppendorf mới và được pha loãng 5 lần bằng dung dịch tris-HCl 10 mM, pH = 8,0. Mẫu DNA tổng số được bảo quản ở -20°C và sử dụng trực tiếp làm khuôn mẫu trong phản ứng PCR khuếch đại đoạn gen 16S rRNA [Boyer S.L., 2001; 2002].

Một phần của gen 16S rRNA được khuếch đại thông qua kỹ thuật PCR lồng sử dụng ba mồi 1R, 2F và 6R theo Boyer và cộng sự (2001; 2002) [Boyer S.L., 2001; 2002]. Đầu tiên, cặp mồi 2F/1R được sử dụng để khuếch đại đoạn gen 16S và vùng ITS với kích thước khoảng 1600 bp; sau đó, sản phẩm của phản ứng PCR lần 1 được dùng làm khuôn để thực hiện phản ứng PCR lần 2 với cặp mồi 2F/ 6R nhằm khuếch đại một phần đoạn gen 16S rRNA có kích thước khoảng 991 bp (xấp xỉ 1000 bp). Trình tự các mồi, vị trí gắn mồi và thành phần phản ứng PCR được thể hiện ở Bảng 2.1 và 2.2. Chu kỳ nhiệt PCR gồm 3 bước chính như sau: (1) bước biến tính ban đầu ở 95 °C trong 2 phút; (2) 40 chu kỳ lặp lại (biến tính ở 95 °C trong 20 giây, gắn mồi ở 56 °C trong 20 giây, kéo dài ở 72 °C trong 1 phút 30 giây); và bước (3) kéo dài cuối cùng ở 72 °C trong 10 phút [Pham T.L.H., 2017].

Bảng 2.1. Trình tự mồi cho phản ứng PCR

Mồi	Trình tự (3' - 5')	Vị trí	TLTK
2F	GGG GGA TTT TCC GCA ATG GG	359-78	[Boyer S.L., 2001; 2002]
1R	CTC TGT GTG CCT AGG TAT CC	26-45	
6R	GAC GGG CCG GTG TGT ACA	1334-50	

Bảng 2.2. Thành phần phản ứng PCR

Thành phần	Thể tích (µl)	Nồng độ
Master mix 2X (GoTaq®, Promega, US)	15	
Mồi xuôi (F)	1	0,3 µM
Mồi ngược (R)	1	0,3 µM
DNA tổng số	1	5 ng/ µl
H ₂ O (free DNAase)	12	
Tổng thể tích	30	

Sản phẩm của phản ứng PCR được điện di kiểm tra chất lượng trên gel agarose 1% (pha trong đệm TAE, bổ sung 1 μ l thuốc nhuộm redsafe) chạy trong đệm TAE 1X với thời gian 25 phút ở hiệu điện thế 100V. Kích thước của các băng DNA được quan sát dưới đèn UV và so sánh với thang chuẩn (DNA ladder 1kb - Cleaver Scientific Ltd, Anh) để xác định kích thước băng. Các sản phẩm PCR khuếch đại thành công (băng DNA sáng rõ, kích thước gần 1000 bp) được gửi tới công ty First Base, Malaysia để giải trình tự hai chiều theo phương pháp Sanger.

2.3.1.5. Xây dựng cây phát sinh chủng - loại

Trình tự đoạn gen 16S rRNA của các chủng VKL sau khi giải trình tự sẽ được trích xuất bằng phần mềm Snapgene Viewer và tìm kiếm các trình tự tham chiếu trên cơ sở dữ liệu của ngân hàng gen thế giới (GenBank) bằng công cụ BLAST [<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>]. Các trình tự tham chiếu được lựa chọn khi có độ tương đồng về trình tự đoạn gen 16S rRNA lớn hơn 98,65% - chỉ số giới hạn để xếp các chủng vi khuẩn lam vào cùng một loài theo Kim và cộng sự (2014) [Kim M., 2014]. Bên cạnh đó, trình tự đoạn gen 16S rRNA của một số loài chuẩn (type species) thuộc các bộ Synechococcales, Spirulinales, Pleurocapsales, Oscillatoriales, Gloeobacterales, Chroococcales, Chroococcidiopsidales trong cơ sở dữ liệu của <https://www.algaebase.org/> được sử dụng làm nhóm ngoại (outgroup) khi xây dựng cây phát sinh chủng - loại.

Trình tự đoạn gen 16S rRNA của các chủng trong nghiên cứu và các trình tự tham chiếu được giống hàng trình tự bằng công cụ MAFFT v7 [Kato K., 2013]. Các trình tự có độ dài khác nhau sẽ được căn chỉnh, loại bỏ những phần không trùng khớp ở hai đầu. Kết quả giống hàng trình tự được trích xuất thành tệp lưu trữ ở định dạng “.FASTA”. Sau đó, dữ liệu trình tự sau khi giống hàng được dùng để xây dựng cây phát sinh chủng - loại bằng phần mềm phân tích MEGA 12 (Molecular Evolution Genetic Analysis ver.12.0) theo phương pháp Maximum Likelihood (ML) với mô hình tiến hóa K2+G+I (K2: Kimura 2 parameter, G+I: Gamma distributed with Invariant sites) và giá trị bootstrap là 1.000 lần lặp lại [Kumar S., 2024].

2.3.2. Các phương pháp nuôi sinh khối và thu cao chiết tổng số

2.3.2.1. Nuôi và thu sinh khối vi khuẩn lam

Các chủng VKL được nuôi riêng rẽ trong 2 lít môi trường BG11, ở nhiệt độ 25 ± 2 °C, theo chu kỳ chiếu sáng/tối 12:12 giờ với ánh sáng huỳnh quang trắng có cường độ $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Các bình nuôi được lắc nhẹ hai ngày một lần để tăng lượng CO₂ trong môi trường. Sinh khối tươi của mỗi chủng được thu sau 7 tuần nuôi cấy bằng cách ly tâm ở 6.000 g/ 10 phút ở 20°C. Sinh khối tươi được sấy thăng hoa hơi nước để chuyển thành sinh khối khô bằng hệ thống máy đông khô Operon FDTA5025 (Hàn Quốc) và bảo quản ở nhiệt độ - 20°C [Pham T.L.H., 2017].

Bên cạnh đó, sau khi sàng lọc được chủng VKL thể hiện hoạt tính sinh học ấn tượng nhất sẽ được nuôi với thể tích lớn. Mỗi mẻ nuôi từ 10 - 20 lít và lặp lại nhiều lần để đảm bảo có đủ sinh khối khô cho thí nghiệm phân tách hợp chất có hoạt tính sinh học.

2.3.2.2. Tách chiết và thu cao chiết tổng số

Các hợp chất thứ cấp từ sinh khối của các chủng VKL được tách chiết theo mô tả bởi Phạm và cộng sự (2017) với một số điều chỉnh. Đầu tiên, lượng sinh khối khô của mỗi chủng được nghiền nát trong một ít hỗn hợp dung môi hữu cơ (EtOAc - MeOH, 1:1, v/v) bằng cối, chày sứ. Sau đó, bổ sung lượng hỗn hợp dung môi theo tỷ lệ 100 ml cho 2 g sinh khối. Tế bào được phá vỡ bằng siêu âm trong thời gian 30 phút. Tiếp theo, hỗn hợp được lắc ở 120 vòng/ phút trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ phòng và ly tâm ở 5.000 g với thời gian 10 phút ở nhiệt độ 20° C để thu dịch nổi. Dịch nổi được lọc qua giấy lọc để thu dịch lọc. Phần cặn tế bào được chiết thêm hai lần nữa trong 100 ml hỗn hợp dung môi theo quy trình trên. Phần dịch lọc của 3 lần chiết được gộp thành dịch chiết tổng số. Tiếp theo, dung môi hữu cơ được làm bay hơi hoàn toàn bằng phương pháp cô quay chân không và sấy khô để thu được cao chiết tổng số. Cao chiết tổng số của mỗi chủng được xác định khối lượng và bảo quản ở -20° C cho đến khi sử dụng [Pham T.L.H., 2017].

2.3.3. Phương pháp đánh giá hoạt tính và cơ chế tác động

2.3.3.1. Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn

Cao chiết tổng số từ các chủng VKL được sử dụng để đánh giá hoạt tính kháng khuẩn theo mô tả của Bui H.T. và cộng sự (2007). Ban đầu, 2 mg cao chiết của mỗi chủng vi khuẩn lam được hòa tan trong 40 μ l hỗn hợp dung môi (EtOAc - MeOH, 1:1) và tra lên đĩa giấy thử hoạt tính có đường kính 6 mm. Dung môi MeOH (40 μ l/đĩa giấy) được sử dụng làm đối chứng âm; kháng sinh cefotaxim (hàm lượng 10 μ g/ 40 μ l) được dùng làm đối chứng dương. Sau khi để bay hơi hoàn toàn dung môi trong tủ cấy vô trùng, các đĩa giấy đã thấm cao chiết được đặt lên bề mặt đĩa thạch peptri chứa các chủng vi khuẩn thử nghiệm tương ứng và được giữ ở 4°C trong thời gian 3 giờ để cao chiết khuếch tán vào thạch. Cuối cùng, các đĩa thử hoạt tính được đặt ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 24 giờ. Vùng ức chế là vùng không màu (trong suốt) bao quanh đĩa giấy. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, đường kính vòng ức chế (D) của mỗi cao chiết/kháng sinh được đo bao gồm cả đường kính của đĩa giấy [Bui H.T., 2007]. Số liệu được xử lý bằng phần mềm GraphPad Prism 8.

2.3.3.2. Đánh giá độc tính tế bào

Ban đầu, phương pháp limit test được sử dụng để sàng lọc sơ bộ khả năng gây độc của cao chiết tổng số từ các chủng VKL trên dòng tế bào ung thư HeLa. Cao chiết mỗi chủng VKL sẽ được pha loãng trong dung môi DMSO ở 4 nồng độ là 1, 10, 50, 100 μ g/ml. Tế bào HeLa được nuôi trong đĩa 96 giếng đến khi đạt nồng độ khoảng 5.000 tế bào/ giếng sẽ được ủ với các cao chiết ở 4 nồng độ trên trong thời gian 48 giờ. Sau đó, hình thái tế bào được quan sát dưới kính hiển vi soi ngược để xác định khoảng nồng độ gây ảnh hưởng đến tỷ lệ sống sót của tế bào HeLa ở bốn mức độ tác động là không tác động; gây chết tế bào dưới 10%; từ 10 - 60% và trên 60%. Cao chiết được đánh giá có “*tiềm năng*” khi bắt đầu gây chết tế bào ở nồng độ 10 μ g/ ml; “*ít tiềm năng*” khi tác động gây chết tế bào từ nồng độ 50 μ g/ ml và “*không tiềm năng*” khi bắt đầu gây chết tế bào ở nồng độ 100 μ g/ ml.

Các cao chiết VKL tiềm năng và ít tiềm năng sẽ được lựa chọn đánh giá độc tính trên dòng tế bào ung thư HeLa bằng kit MTT (Invitrogen, Mỹ) theo mô tả của

Mosmann T. (1983). Sau khi tế bào HeLa nuôi trong mỗi giếng của đĩa 96 giếng đạt mật độ khoảng 5.000 tế bào sẽ được bổ sung 50 μ l dịch chiết VKL đã pha loãng ở các nồng độ khác nhau. Dải nồng độ phù hợp cho thí nghiệm MTT được tính toán dựa vào kết quả thí nghiệm limit test. Taxol (Invitrogen, USA) là thuốc được FDA phê duyệt để điều trị nhiều loại ung thư như ung thư vú, buồng trứng, phổi, cổ tử cung được sử dụng làm đối chứng dương và pha ở dải nồng độ từ 0,1 nM đến 125,9 nM theo nghiên cứu của Nguyen T.B.L và cộng sự (2021) [Nguyen T.B.L, 2021]. Các tế bào được nuôi trong môi trường bổ sung 0,1% DMSO được sử dụng làm đối chứng âm. Sau 48 giờ ủ với dịch chiết/ taxol/ DMSO, 10 μ l dung dịch MTT (nồng độ 10 mg/ml) được bổ sung vào mỗi giếng và tiếp tục ủ ở 37°C trong 4 giờ. Sau đó, dung dịch chứa MTT được loại bỏ và 100 μ l DMSO được thêm vào mỗi giếng để hòa tan tinh thể formazan hình thành [Mosmann T., 1983]. Tỷ lệ tế bào sống được tính dựa trên giá trị đo mật độ quang học bằng máy ELISA SpectraMax Plus384 (Molecular Devices, USA) tại hai bước sóng 540 nm và 630 nm. Tỷ lệ sống sót của tế bào được tính theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ sống (\%)} = \frac{\text{Giá trị trung bình (A}_{540} - \text{A}_{630}) \text{ mẫu}}{\text{Giá trị trung bình (A}_{540} - \text{A}_{630}) \text{ đối chứng âm}} \times 100\%$$

Mỗi nồng độ được lặp lại 3 lần và mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Giá trị IC₅₀ (nồng độ cao chiết gây ức chế 50% sự phát triển tế bào) được tính toán bằng phần mềm GraphPad Prism 8.

Cao chiết có độc tính mạnh nhất trên dòng tế bào HeLa sẽ được đánh giá độc tính trên 2 dòng tế bào ung thư (A549, OVCAR-8) và hai dòng tế bào thường (HaCaT, HEK293) bằng phương pháp MTT theo quy trình như trên.

2.3.3.3. *Xác định tỷ lệ tế bào chết theo con đường apoptosis*

Tỷ lệ tế bào chết theo con đường apoptosis bởi tác động của cao chiết từ chủng có độc tính mạnh nhất trên tế bào HeLa được xác định theo mô tả của Schutte và cộng sự (1998). Phương pháp này được thực hiện dựa trên nguyên lý phát hiện sự có mặt của phosphatidylserine (PS) ở mặt ngoài màng tế bào của những tế bào trong giai đoạn apoptosis bằng cách sử dụng Annexin V gắn với thuốc nhuộm FITC huỳnh

quang. Đầu tiên, tế bào HeLa được nuôi cấy trong đĩa peptri đường kính 6 cm đến khi đạt tỷ lệ bao phủ bề mặt khoảng 30 - 40%. Sau 24 giờ, môi trường nuôi cấy được thay thế bằng môi trường mới có chứa dịch chiết NK13 nồng độ 3,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (giá trị IC_{50}); hoặc Taxol nồng độ 13,5 ng/ml (giá trị IC_{50} - đối chứng dương); hoặc DMSO 0,1% (đối chứng âm); hoặc không xử lý (ĐCSH). Tế bào được tiếp tục nuôi trong thời gian 24 giờ. Tiếp theo, cặn tế bào được thu bằng cách ly tâm và hòa trong đệm annexin 1X (annexin binding buffer) ở nồng độ 1×10^6 tế bào/ml. Sau đó, các tế bào được nhuộm với thuốc thử PI (propidium iodide) ở nồng độ 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ và 1 μl Annexin V-FITC trong thời gian 15 phút ở điều kiện 4°C và tránh ánh sáng để đánh dấu các tế bào sống, hoại tử (necrosis) hoặc apoptosis. Cuối cùng, các mẫu tế bào được bổ sung 150 μl đệm Annexin binding 1X [Schutte B., 1998]. Tỷ lệ các tế bào bị apoptosis được đánh giá bằng cách xác định theo tỷ lệ tế bào gắn với annexin V theo phương pháp đo tế bào theo dòng chảy (flow cytometry) trên hệ thống FACSCanto II (BD Biosciences).

2.3.3.4. Xác định pha bị bất giữ trong chu trình tế bào

Phương pháp này dựa trên nguyên lý DNA tế bào được nhuộm bằng propidium iodide (PI). Cường độ tín hiệu của PI tương ứng với khối lượng DNA được đo bằng phương pháp đo tế bào theo dòng chảy trên hệ thống FACSCanto II và được thực hiện theo mô tả của Darzynkiewicz và cộng sự (2017). Các tế bào HeLa sau khi ủ 24 giờ với cao chiết NK13/Taxol/hoặc DMSO 0,1% sẽ được rửa trong đệm PBS lạnh (pH 7,4) và thu riêng rẽ, rồi được bổ sung hai lần thể tích ethanol 100% lạnh để cố định tế bào trong thời gian 2 giờ. Tiếp theo, tế bào được thu lại bằng cách ly tâm ở 400 g trong 5 phút và rửa lại một lần bằng đệm PBS (pH 7,4). Sau đó, tế bào được huyền phù trong đệm PBS ở nồng độ 1×10^6 tế bào/ml và được bổ sung 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase A vào mỗi giếng, ủ ở 37°C trong 30 phút. Sau khi ủ, 20 μg PI được bổ sung vào mỗi ống tế bào và giữ trong 45 phút ở điều kiện 4°C và tránh ánh sáng để nhuộm nhân tế bào [Darzynkiewicz Z., 2017]. Tỷ lệ tế bào tại các pha sub-G1, G0/G1, S và G2/M trong chu trình tế bào được xác định bằng phương pháp đo tế bào theo dòng chảy trên hệ thống FACSCanto II.

2.3.3.5. Đánh giá khả năng di cư của tế bào ung thư

Khả năng di cư của tế bào ung thư được đánh giá bằng phương pháp tạo vết xước (would healing) theo mô tả của Grada và cộng sự (2017). Đầu tiên, các tế bào HeLa được nuôi trong môi trường DMEM có bổ sung 10% huyết thanh bò (FBS) ủ với dịch chiết trong đĩa 24 giếng cho đến khi đạt độ phủ bề mặt trên 95%. Vết xước được tạo trên lớp tế bào đơn bằng đầu pipet vô trùng loại có thể tích 200 μ l. Tiếp theo, đĩa nuôi cấy được rửa nhiều lần bằng dung dịch PBS 10% đến khi loại bỏ hết các tế bào bị bong. Sau đó, tế bào được nuôi tiếp trong môi trường có dịch chiết NK13 ở nồng độ 1,2 μ g/ ml (giá trị IC₁₀) hoặc Taxol nồng độ 1,8 ng/ ml (giá trị IC₁₀ - đối chứng dương) hoặc DMSO 0,1% (đối chứng âm). Theo thời gian, tế bào HeLa từ vùng lân cận sẽ di cư lan sang khoảng trống vừa được tạo ra do xước [Grada A., 2017]. Diện tích tế bào HeLa di cư sẽ được đánh giá bằng phần mềm ImageJ phiên bản IJ154 bản miễn phí tại các thời điểm 0 giờ, 6 giờ, 12 giờ và 21 giờ và tính toán theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ diện tích vết xước được che phủ tại thời điểm T (\%)} = \frac{\text{Diện tích vết xước ban đầu (pixel)} - \text{Diện tích xước còn lại tại thời điểm T (pixel)}}{\text{Diện tích xước còn lại tại thời điểm T (pixel)}} \times 100\%$$

2.3.3.6. Đánh giá mức độ biểu hiện của các gen

Mức độ biểu hiện của 12 gen *TP53*, *Caspase-3 (CASP-3)*, *Caspase-8 (CASP-8)*, *BAX*, *CDKN1A (p21)*, *CDKN2A (p16)*, *Integrin 1 α* , *Integrin 1 β* , *FAK*, *AKT*, *PI3K* và *N-cadherin* được đánh giá thông qua phương pháp RT- qPCR theo mô tả của Nguyễn Thị Bích Loan và cộng sự (2021) [Nguyen T.B.L., 2021]. Mức độ biểu hiện của các gen trong nghiên cứu được so sánh với gen nội chuẩn TBP. Trình tự các cặp mồi đặc hiệu được thể hiện ở phụ lục 2.

Quy trình thực hiện phản ứng RT - qPCR như sau: trước tiên, RNA tổng số của tế bào HeLa được tách bằng kit Gen JET RNA Purification Kit. Nồng độ RNA được đo bằng máy Nanodrop. Sau đó, cDNA được tổng hợp từ 1 μ g RNA tổng số theo quy trình của bộ kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis cho phản ứng thể tích 20 μ l. Thành phần phản ứng bao gồm 10 μ l master mix 2X (power SYBR1 Green - Enzymonics, Hàn Quốc); 0,5 μ l mồi xuôi (nồng độ 10 μ M); 0,5 μ l mồi ngược (nồng

độ 10 μM); 2 μl cDNA và 7 μl H_2O (tổng thể tích phản ứng 20 μl). Phản ứng RT-qPCR được thực hiện trên máy Realtime PCR LightCycler @ 96 (Enzymonics, Hàn Quốc) với quy trình như sau: biến tính ban đầu ở 95°C trong 15 phút, tiếp theo là 40 chu kỳ lặp lại gồm biến tính ở 95°C trong 15 giây, gắn môi ở 58°C trong 10 giây và kéo dài cuối cùng ở 72°C trong 30 giây.

Mức độ biểu hiện của các gen trong nghiên cứu được tính toán dựa trên phương pháp Ct và so sánh với gen nội chuẩn TBP [Nguyen T.B.L., 2021]. Gen TBP là gen nội chuẩn mã hóa cho protein TATA-binding (TBP) - một yếu tố phiên mã cơ bản, đóng vai trò then chốt trong quá trình khởi đầu phiên mã ở sinh vật nhân thực.

$$\text{Mức biểu hiện gen (Fold-change)} = 2^{-[\text{Ct}_1 - \text{Ct}_2]}$$

Ct_1 : chu kỳ ngưỡng của gen mục tiêu

Ct_2 : chu kỳ ngưỡng của gen nội chuẩn (TBP)

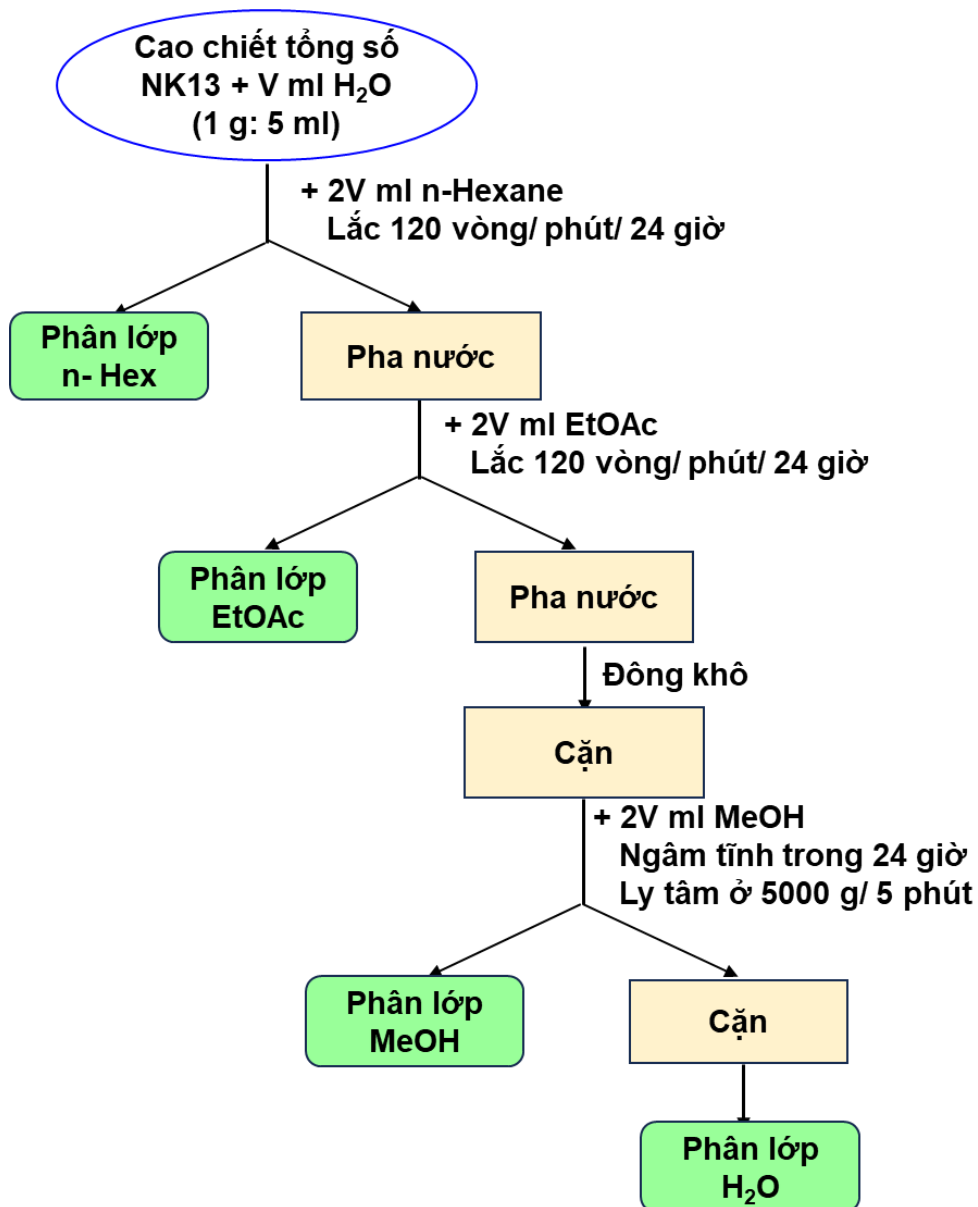
Các thí nghiệm đều được lặp lại ba lần. Kết quả thí nghiệm được thể hiện giá trị trung bình và sai số bằng phương pháp phân tích phương sai (ANOVA), kết hợp với kiểm định hậu nghiệm Student-Newman-Keuls (SNK). Phần mềm SPSS phiên bản 18 (SPSS Japan Inc.) được sử dụng để xử lý số liệu thống kê, với mức ý nghĩa thống kê là $p < 0,05$.

2.3.4. Các phương pháp phân tách và xác định thành phần hoạt chất

2.3.4.1. Chiết phân lớp lỏng - lỏng

Phương pháp chiết phân lớp lỏng - lỏng được áp dụng để phân tách cao chiết tổng thành các phân đoạn có độ phân cực khác nhau, dựa trên nguyên lý về khả năng không trộn lẫn giữa các dung môi có độ phân cực khác biệt. Cụ thể, một dung môi có độ phân cực cao (như nước) sẽ không được hòa với một dung môi có độ phân cực thấp hơn (như EtOAc hoặc n-hexane), từ đó cho phép phân tách được các hợp chất được tan trong mỗi pha dung môi tùy theo đặc tính phân cực của chúng [Mazzola P.G., 2008]. Quy trình tiến hành phương pháp chiết phân lớp lỏng - lỏng được thực hiện theo sơ đồ Hình 2.2. Cao chiết tổng số NK13 được phân tách thành 4 phân lớp n-hexane, EtOAc, MeOH và H_2O . Sau đó, các phân lớp được cô quay chân không và

sấy ở 37°C đến khi loại bỏ hoàn toàn dung môi để xác định khối lượng, thành phần vết chất và đánh giá độc tính trên tế bào HeLa của mỗi cao chiết.



Hình 2.2. Quy trình chiết phân lớp lỏng - lỏng

2.3.4.2. Phân tách các chất bằng sắc ký cột thủy tinh

Sắc ký cột được lựa chọn để phân tách tiếp các hợp chất thứ cấp từ các cao chiết thu được sau khi chiết lỏng - lỏng. Vật liệu pha tĩnh được sử dụng trong các cột sắc ký bao gồm silica gel và sephadex LH20, tương ứng với hai hệ dung môi khác nhau (pha động) nhằm tối ưu hiệu quả phân tách.

** Sắc ký cột silica gel*

Sắc ký cột sử dụng silica gel làm pha tĩnh để phân tách các hợp chất thứ cấp dựa trên độ phân cực của các hợp chất. Những hợp chất có độ phân cực thấp có khả năng ái lực yếu với hạt silica gel, do đó di chuyển nhanh ra khỏi cột; trong khi đó, các hợp chất có độ phân cực cao tạo ái lực mạnh hơn với silica gel và bị giữ lại trong cột lâu hơn sẽ được rửa giải ra sau trong hệ dung môi có độ phân cực cao.

Cao chiết n-Hexane được phân tách thành phần hợp chất có hoạt tính bằng sắc ký cột silica gel theo mô tả của Bui H.H. và cộng sự (2007) có sự điều chỉnh tỷ lệ hệ dung môi pha động [Bui H.H., 2007]. Đầu tiên, 60g silica gel được trương nở hoàn toàn trong 200 ml hệ dung môi đầu (n-hexane - EtOAc, 7:3, v/v), sau đó hỗn hợp được chuyển vào cột sắc ký thủy tinh có kích thước 1,2 cm x 120 cm và giữ ổn định trong khoảng 60 phút. Sau khi cột được ổn định, 500 mg cao chiết được hòa tan trong 2 ml dung môi hệ 1 đến khi tan hoàn toàn và nhẹ nhàng tra lên bề mặt gel bằng pipet. Các hợp chất thứ cấp trong cao chiết được rửa giải bằng các hệ dung môi có độ phân cực tăng dần (Bảng 2.3) với tốc độ dòng khoảng 0,5 ml/ phút. Các phân đoạn rửa giải được thu vào các ống nghiệm với thể tích từ 3-5 ml.

Bảng 2.3. Hệ dung môi cho chạy sắc ký cột silicagel

Hệ dung môi	Thành phần	Thể tích (ml)
1	n-hexane - EtOAc (7: 3, v/v)	200
2	n-hexane - EtOAc (5: 5, v/v)	200
3	n-hexane - EtOAc (2: 8, v/v)	200
4	EtOAc - MeOH (9: 1, v/v)	200
5	EtOAc - MeOH (7:3, v/v)	200
6	EtOAc - MeOH (5:5, v/v)	200
7	EtOAc - MeOH (2: 8, v/v)	200
8	MeOH	200

Sau đó thành phần hợp chất trong các phân đoạn sẽ được phân tích bằng phương pháp sắc ký đồ TLC ở hai bước sóng 254 nm và 365 nm. Các phân đoạn có số lượng

và thành phần vết chất tương tự nhau sẽ được gộp lại, loại bỏ dung môi và xác định khối lượng.

** Phương pháp sắc ký cột sephadex LH20*

Sắc ký cột sử dụng gel sephadex LH20 được sử dụng để phân tách các hợp chất dựa trên kích thước phân tử. Sephadex LH20 là vật liệu có kích thước hạt rất nhỏ, cấu tạo từ các chuỗi dextran đã được hydroxypropyl hóa và liên kết chéo để tạo thành mạng lưới polysaccharide. Trong quá trình sắc ký, các phân tử lớn không thâm nhập vào bên trong hạt gel mà chỉ di chuyển quanh bề mặt bên ngoài, do đó được rửa giải ra khỏi cột nhanh hơn. Ngược lại, các phân tử nhỏ hơn có thể xâm nhập vào cấu trúc lưới của gel với tốc độ khác nhau tùy thuộc vào khối lượng và hình dạng phân tử; phân tử càng nhỏ thì càng dễ bị giữ lại lâu trong pha tĩnh do thời gian di chuyển qua gel kéo dài.

Khoảng 60g sephadex LH20 được trương nở trong 400 ml MeOH trong vòng 30 phút. Sau khi trương nở hoàn toàn, gel được chuyển nhẹ nhàng vào cột sắc ký thủy tinh và được giữ ổn định trong khoảng 60 phút. Sau đó, 500 mg cao chiết đã hòa tan trong 2 ml MeOH được tra lên bề mặt gel và rửa giải bằng dung môi MeOH với tốc độ dòng 0,5 ml/ phút. Các phân đoạn thu được sau rửa giải được tiếp tục phân tích bằng phương pháp TLC để đánh giá sơ bộ thành phần hóa học. Những phân đoạn có thành phần và vị trí vết chất tương tự nhau khi quan sát ở bước sóng 254 nm và 365 nm sẽ được gộp lại [Ngô T.T., 2021].

2.3.4.3. Sắc ký mỏng (TLC)

Các phân đoạn thu được sau khi chiết phân lớp và sắc ký cột thủy tinh sẽ được phân tích thành phần chất bằng phương pháp TLC sử dụng bản silica gel 60 F₂₅₄ theo mô tả của Ngô T.T. và cộng sự (2021) [Ngo T.T., 2021]. Trước tiên, bản TLC silica gel 60F₂₅₄ được chuẩn bị có kích thước 6,5 x 7 cm hoặc 4 x 7 cm; vạch xuất phát được đánh dấu cách mép dưới 1 cm và vạch kết thúc cách mép trên 0,5 cm tương ứng với khoảng cách di chuyển của chất trên bản TLC lần lượt là 5 cm và 2,5 cm. Các cao phân đoạn sẽ được hòa tan trong dung môi tương ứng với nồng độ 0,1 µg/ 10µl, sau đó sẽ được tra lên vạch xuất phát bằng ống mao dẫn, để ở nhiệt độ phòng trong 5

- 10 phút cho dung môi bay hơi hoàn toàn. Tiếp theo, bản TLC được đặt vào hộp kín chứa 5 ml hệ dung môi gồm n-hexane - EtOAc - MeOH (65: 35: 5, v/v) (gọi là pha động). Bản TLC được lấy ra khi mức dung môi chạy đến vạch kết thúc và được quan sát, phát hiện thành phần các vết chất ở bước sóng 254 nm và 365 nm. Những phân đoạn có thành phần vết chất tương tự nhau sẽ được gộp lại và đánh giá hoạt tính.

2.3.4.4. Sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

Các phân đoạn được hòa tan trong dung môi MeOH với nồng độ 10 mg/ml và được tinh sạch bằng hệ thống sắc ký HPLC pha đảo (reversed-phase HPLC) sử dụng cột C18 (C18-80Å, 250 × 10 mm, 4µm, Water, Mỹ) trong gradient dung môi của MeOH từ 30% - 100% trong nước khử ion, tốc độ dòng 0,8 ml/ phút (Bảng 2.4). Thời gian chạy toàn bộ chu trình phân tích là 35 phút. Các hợp chất khác nhau được phát hiện trong khoảng bước sóng từ 190 nm đến 400 nm sẽ được thu lại để đánh giá hoạt tính và xác định thành phần hoạt chất bằng phương pháp sắc ký lỏng kết hợp đo phổ khối lượng độ phân giải cao (LC- HRMS).

Bảng 2.4. Gradient nồng độ MeOH trong phân tích HPLC

Thời gian (phút)	0,2	5	8	12	28	30	35
MeOH (%)	30	70	90	100	100	30	30

2.3.4.5. Xác định thành phần hợp chất bằng LC-HRMS

Phân đoạn có hoạt tính sau khi tinh sạch bằng phương pháp HPLC được phân tích thành phần hoạt chất bằng phương pháp sắc ký lỏng phổ khối phân giải cao (LC-HRMS) ở hai chế độ ion hóa dương $[M+H]^+$ và chế độ ion hóa âm $[M+H]^-$ trên hệ thống Acquity UPLC I-Class Plus kết hợp với khối phổ kế Xevo G3 ESI/QTOF mass spectrometer (Waters Corporation - Mỹ) được thực hiện bởi PGS.TS. Nguyễn Thị Kiều Oanh, trường Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội.

Quy trình thí nghiệm được thực hiện theo mô tả của Phan và cộng sự (2024). Trước tiên, phân đoạn có hoạt tính được hòa tan trong dung môi MeOH với tỷ lệ 1,0 mg/ml, sau đó lọc qua màng lọc có kích thước lỗ 0,22 µm trước khi tiêm vào hệ thống

ACQUITY UPLC I-Class Plus. Các hợp chất được phân tách bằng cột UPLC BEH C18 130 Å, 1,7 µm, 2,1 mm × 100 mm, với pha động là thành phần của dung môi A (0,1% axit formic trong H₂O) và dung môi B (acetonitrile - ACN). Các hợp chất được rửa giải trong hệ dung môi gradient bắt đầu với 1% dung môi B tại thời điểm 0,5 phút, sau đó tăng tuyến tính lên 35% trong khoảng thời gian 15,5 phút, tiếp tục tăng lên 100% trong vòng 2 phút, cuối cùng cột được cân bằng ở 1% dung môi B trong 5 phút trước khi tiêm mẫu tiếp theo. Tốc độ dòng của pha động được duy trì ở mức 0,6 ml/phút và thể tích mẫu được tiêm vào cột là 10 µl [Phan U.T.T., 2024].

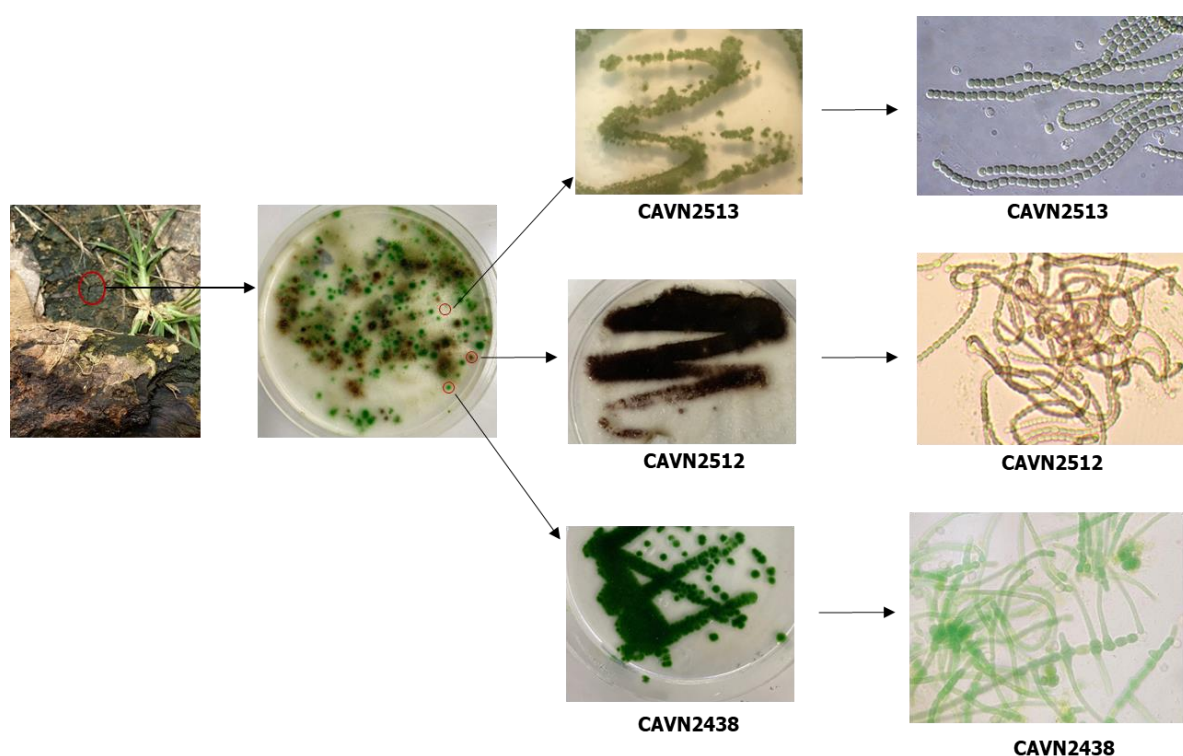
Các thông số của hệ thống QTOF được thiết lập ở chế độ MSe với dải quét khối lượng điện tích (m/z) từ 100 đến 1500, tần suất mỗi lần quét là 0,1 giây. Ở chế độ năng lượng thấp, điện áp được thiết lập ở mức 6 V, trong khi ở chế độ năng lượng cao, điện áp được tăng dần từ 15 V đến 40 V. Dữ liệu về khối lượng điện tích (m/z) và sắc ký đồ LC, phổ khối lượng được thu thập và phân tích bằng phần mềm Masslynx 4.2 và UNIFI (Waters Corporation). Các KLPT đo được (observed mass) và tra cứu trên cơ sở dữ liệu <http://dnp.chemnetbase.com/> và <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> để xác định CTCT và tên của các hợp chất thu được.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Phân lập và định danh các chủng vi khuẩn lam

3.1.1. Kết quả phân lập của các chủng vi khuẩn lam

Quy trình phân lập các chủng VKL được thể hiện ở Hình 3.1. Qua nhiều lần cấy chuyển liên tục, nghiên cứu đã phân lập được 47 chủng VKL thuần khiết. Các chủng này được nuôi giữ trong môi trường BG11 để định danh các chủng dựa theo phương pháp tiếp cận đa chiều bằng cách phân tích đặc điểm hình thái trên kính hiển vi quang học và trình tự đoạn gen 16S rRNA.

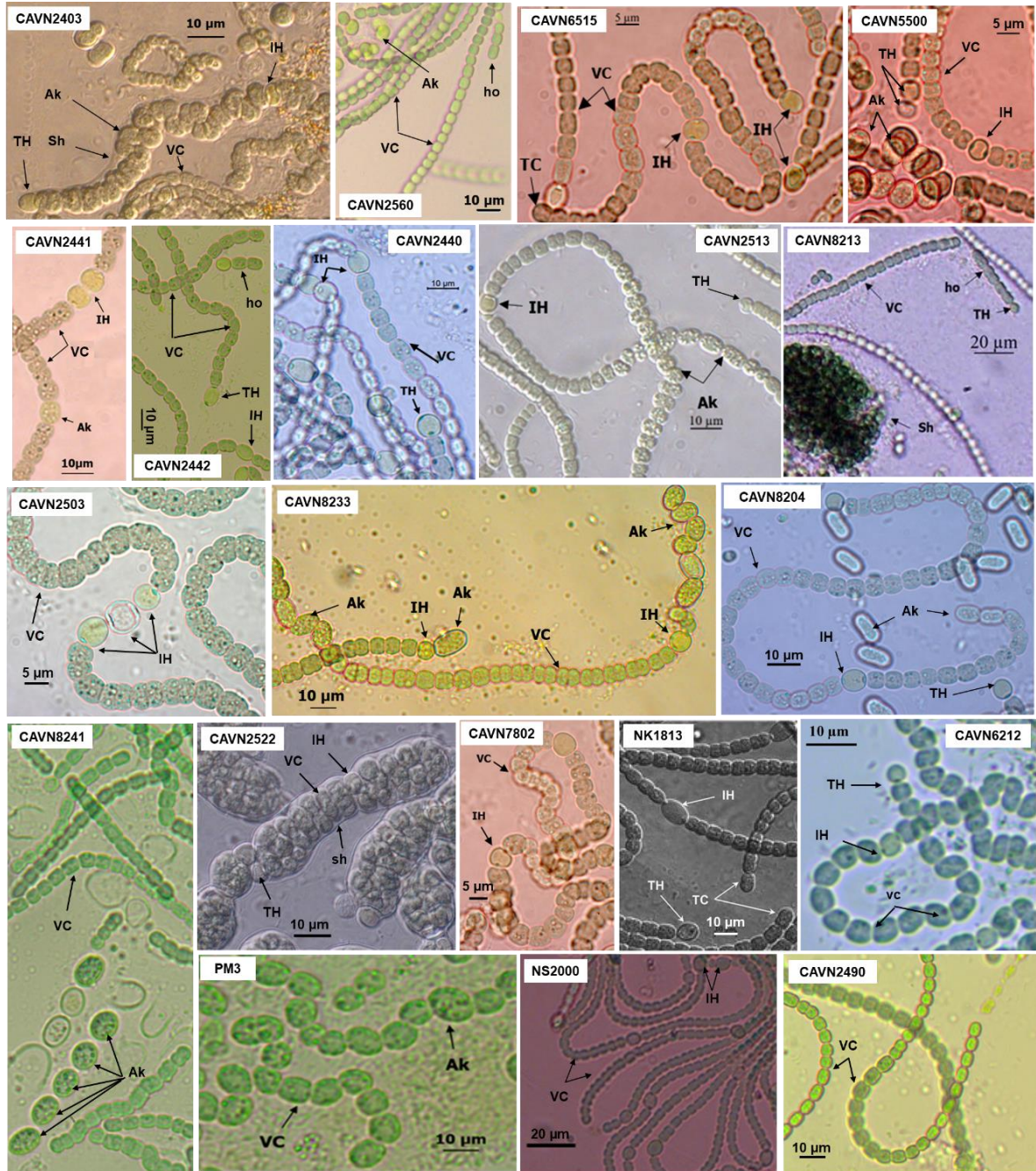


Hình 3.1. Quy trình phân lập vi khuẩn lam

3.1.2. Đặc điểm hình thái của các chủng vi khuẩn lam

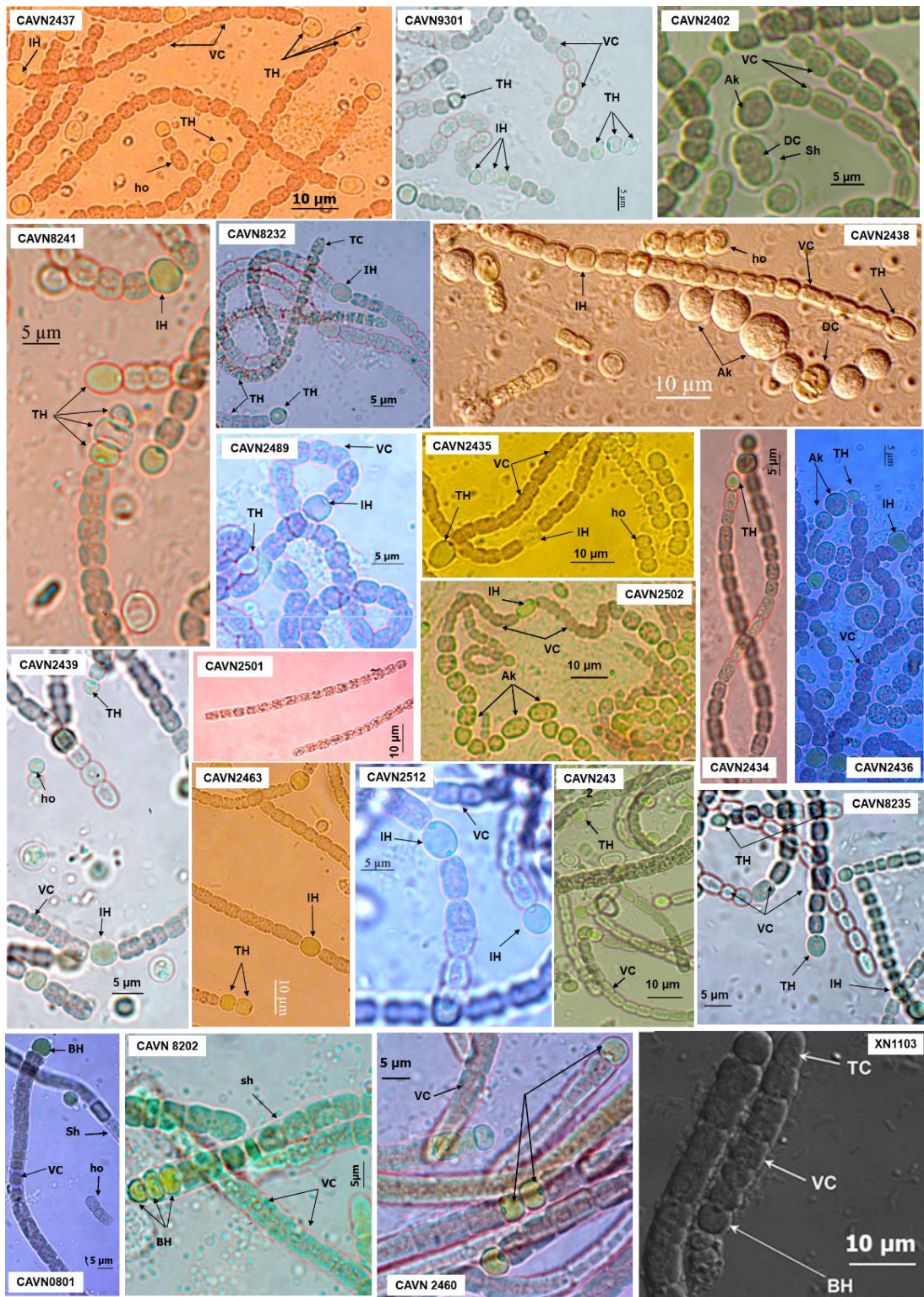
Đặc điểm hình thái của 47 chủng VKL đã phân lập và 3 chủng có trong bộ sưu tập được đánh giá dựa trên hình dạng, màu sắc chuỗi, kích thước, hình dạng của tế bào sinh dưỡng, tế bào nghỉ và tế bào dị hình dưới kính hiển vi quang học. Kết quả cho thấy hình thái của các chủng VKL này được chia thành 3 nhóm khác nhau. Trong đó, nhóm I bao gồm 41 chủng VKL dạng thẳng không phân nhánh; nhóm II gồm có 3 chủng VKL dạng sợi phân nhánh giả và nhóm III bao gồm 6 chủng VKL dạng sợi

phân nhánh thật. Đặc điểm hình thái và kích thước tế bào mỗi chủng VKL được thể hiện ở Phụ lục 3.



Hình 3.2. Hình thái của 20 chủng vi khuẩn lam thuộc nhóm I

Ak: Akinete cell (Tế bào nghi); *BH*: Basal heterocyst (Tế bào dị hình gốc); *Ho*: Hormogonia (Tảo đoạn); *IH*: Intercalary heterocyst (Tế bào dị hình xen kẽ); *TH*: Terminal heterocyst (Tế bào dị hình đầu chuỗi); *Sh*: Sheath (Lớp màng nhầy); *VC*: Vegetative cell (Tế bào sinh dưỡng)



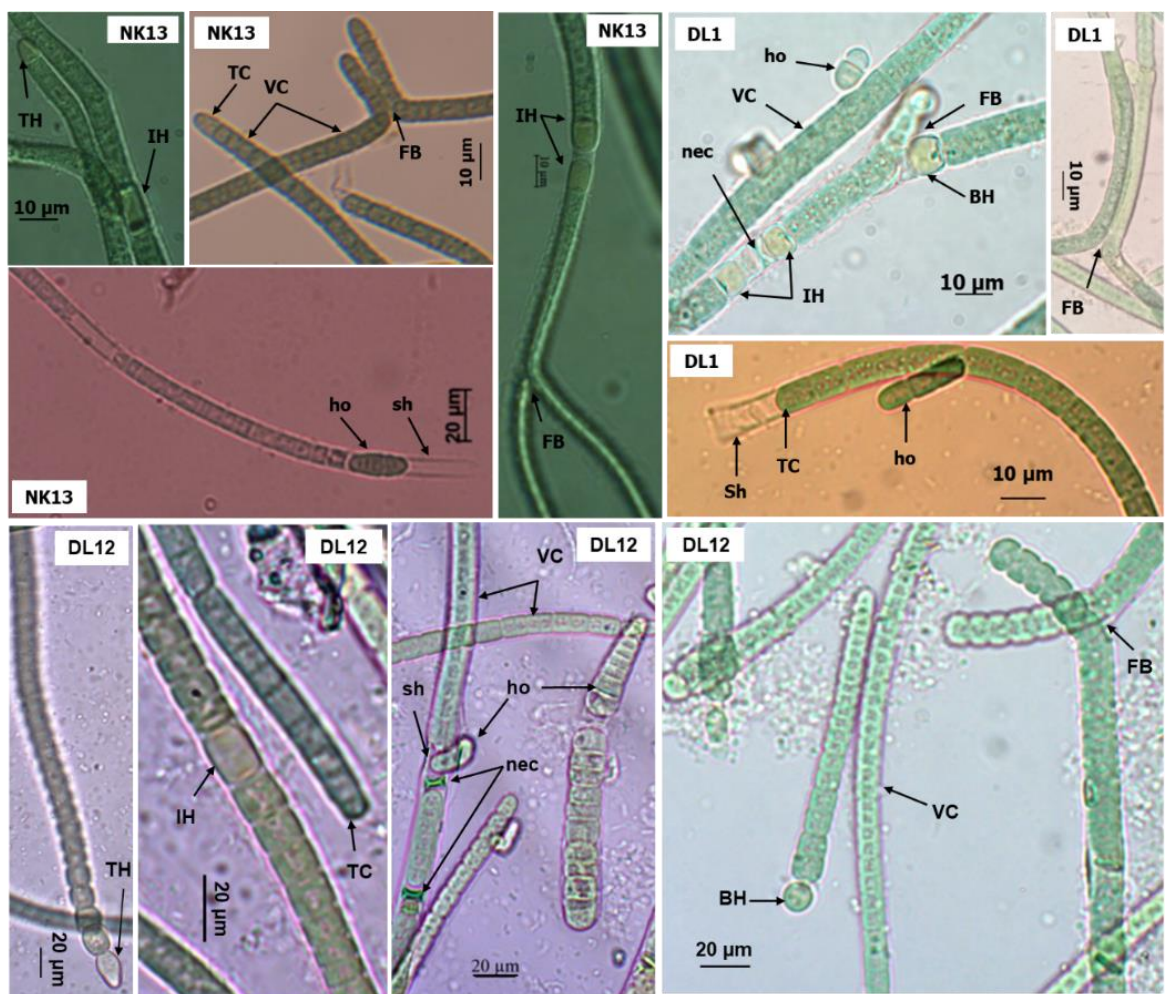
Hình 3.3. Hình thái của 21 chủng vi khuẩn lam thuộc nhóm I

Ak: Akinete cell (Tế bào nghỉ); *BH*: Basal heterocyst (Tế bào dị hình gốc); *Ho*: Hormogonia (Tảo đoạn); *IH*: Intercalary heterocyst (Tế bào dị hình xen kẽ); *TH*: Terminal heterocyst (Tế bào dị hình đầu chuỗi); *Sh*: Sheath (Lớp màng nhầy); *VC*: Vegetative cell (Tế bào sinh dưỡng)

Hình thái của 41 chủng VKL thuộc nhóm I đều có đặc điểm chung là cấu tạo dạng sợi dài, không phân nhánh, thẳng hoặc hơi cong, đôi khi các sợi được cuộn trong bào nhầy trong suốt (Hình 3.2; 3.3). Quan sát dưới kính hiển vi, các chủng này có màu sắc đa dạng từ màu xanh xám, xanh - o liu, xanh lam, màu xám nhạt hoặc màu nâu thẫm. Chúng có lớp màng nhầy phân tán hoặc mỏng, trong suốt bao quanh sợi. Tế bào sinh dưỡng trong các sợi non thường có dạng hình trụ, kích thước đồng đều, xếp chặt với nhau, có khả năng trượt trong môi trường. Tuy nhiên, khi trưởng thành, các sợi có xu hướng bị cuộn gập sợi trong bào nhầy, tế bào sinh dưỡng trở nên lớn hơn và có hình dạng thay đổi từ dạng hình thùng, hình cầu hoặc hình trụ, đôi khi có hình dạng không cố định, kích thước không đồng đều, có vách ngăn rõ giữa các tế bào, hơi thắt lại ở vách. Các tế bào dị hình có kích thước lớn, chủ yếu có hình cầu hoặc hình bầu dục, có thể xuất hiện đơn độc (chủng CAVN6515) hoặc thành chuỗi từ 2 đến 3 tế bào ở đầu sợi (chủng CAVN2441, CAVN8202), nằm xen kẽ trong chuỗi (CAVN8241), hay ở gốc sợi (chủng CAVN0801), đôi khi chúng xuất hiện ở trong chuỗi trước các tế bào nghỉ (chủng CAVN8233). Tế bào nghỉ chủ yếu có dạng hình bầu dục, hình cầu, hoặc hình trụ, kích thước lớn hơn nhiều so với tế bào sinh dưỡng. Chúng có thể xuất hiện thành chuỗi khoảng 10 - 20 tế bào nằm xen kẽ trong sợi (chủng CAVN2502), hoặc ở đầu sợi (CAVN8233), đôi khi chúng tạo thành chuỗi liên kết rời rạc (CAVN8241) hay xuất hiện đơn độc tách khỏi sợi (CAVN8204). Các tế bào nghỉ được quan sát thấy ở hầu hết các chủng VKL thuộc nhóm I có vai trò quan trọng trong quá trình sinh sản bên cạnh hình thức sinh sản bằng tạo đoạn.

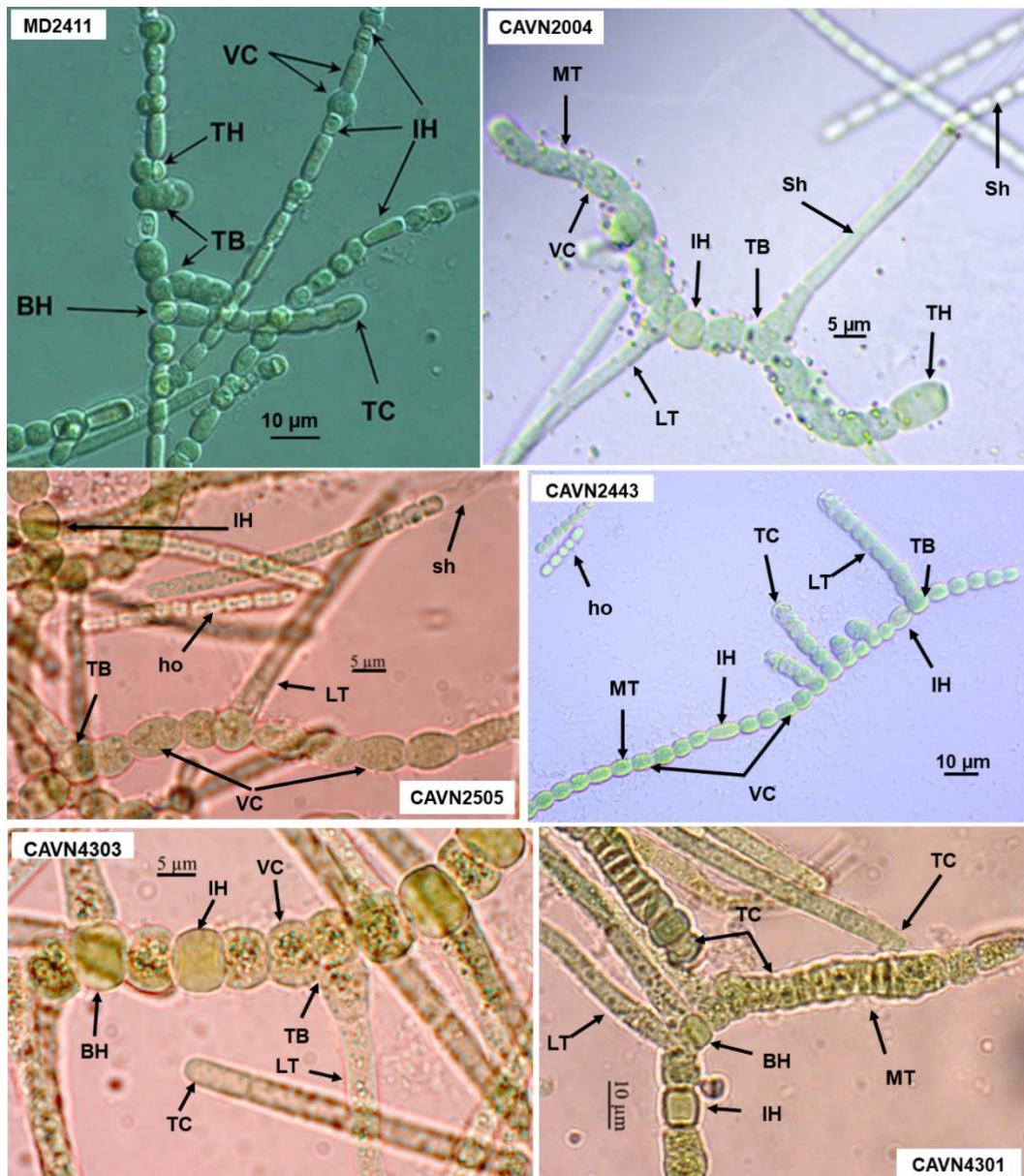
Nhóm II bao gồm ba chủng là DL1, DL12 và NK13 có dạng sợi phân nhánh giả, màu xanh lam đậm pha xanh lục, cấu trúc đẳng hướng hoặc dị hướng trong lớp bào nhầy mỏng không màu (Hình 3.4). Tế bào sinh dưỡng ở các sợi trưởng thành thường có hình trụ hoặc hình thùng xếp sát nhau, không rõ vách ngăn giữa các tế bào. Đối với các sợi non, tế bào sinh dưỡng gần như có dạng hình vuông; các tế bào sinh dưỡng ở đầu mút sợi thường thuôn nhọn tạo thành hình nón. Các tế bào dị hình chủ yếu xuất hiện đơn độc ở xen kẽ trong sợi hoặc ở đầu mút sợi, hiếm khi thành cặp ở giữa chuỗi hay ở gốc nhánh. Các tế bào dị hình ở đầu sợi thường thuôn dài, hình nón

tròn còn tế bào dị hình ở giữa chuỗi thường có hình trụ dài. Ở ba chủng này còn quan sát thấy sự hình thành của đĩa hoại tử và tảo đoạn để phân chia hình thành sợi mới; không quan sát thấy sự xuất hiện của tế bào tế bào nghỉ. Hai chủng DL1 và NK13 có hình thái điển của chi *Scytonema* với dạng sợi phân nhánh giả đơn hoặc kép. Trong khi đó, chủng DL12 mang đặc điểm hình thái điển hình của chi *Calothrix* với dạng sợi thuôn nhọn rõ rệt ở phần ngọn, phần gốc sợi phình rộng, tế bào dị hình chủ yếu xuất hiện ở gốc sợi có hình cầu hoặc bán cầu.



Hình 3.4. Hình thái của 3 chủng vi khuẩn lam thuộc nhóm II

BH: Basal heterocyst (Tế bào dị hình gốc); *Ho*: Hormogonia (Tảo đoạn); *IH*: Intercalary heterocyst (Tế bào dị hình xen kẽ); *TH*: Terminal heterocyst (Tế bào dị hình đầu chuỗi); *Sh*: Sheath (Lớp màng nhầy); *VC*: Vegetative cell (Tế bào sinh dưỡng); *Nec*: Necridia (Tế bào hoại tử); *FB*: False branching (Phân nhánh giả)



Hình 3.5. Hình thái của 6 chủng vi khuẩn lam thuộc nhóm III

BH: Basal heterocyst (Tế bào dị hình gốc); *Ho*: Hormogonia (Tảo đoạn); *IH*: Intercalary heterocyst (Tế bào dị hình xen kẽ); *TH*: Terminal heterocyst (Tế bào dị hình đầu chuỗi); *Sh*: Sheath (Lớp màng nhầy); *VC*: Vegetative cell (Tế bào sinh dưỡng); *Nec*: Necridia (Tế bào hoại tử); *TB*: True branching (Phân nhánh thật); *LT*: Lateral trichome (Nhánh bên); *MT*: Main trichome (nhánh chính)

Nhóm III gồm có 6 chủng VKL là MD2411, CAVN2404, CAVN2443, CAVN2505, CAVN4301 và CAVN4303 (Hình 3.5). Đây là các chủng VKL có cấu tạo dạng sợi phân nhánh thật kiểu chữ T hoặc chữ Y, màu xanh lam; nhánh bên có thể phát triển từ một phía hay cả hai phía so với nhánh chính. Các sợi được nằm trong

bao nhầy mỏng, trong suốt. Tế bào sinh dưỡng có hình dạng đa dạng từ hình thùng, hình cầu đến hình trụ, vách ngăn rõ ràng và bị thắt cạnh ở giữa các tế bào. Các tế bào sinh dưỡng ở cuối sợi thường có hình cầu hoặc hình trụ có phần cuối thuôn nhọn. Tế bào dị hình chủ yếu có dạng thùng, hình cầu hoặc hình trụ, thường xuất hiện đơn độc ở gốc sợi, xen kẽ trong sợi và đầu mút sợi ở cả nhánh chính và nhánh bên, đôi khi nó nằm xen kẽ giữa các tế bào nghỉ hay thành chuỗi hai tế bào. Không quan sát thấy tế bào nghỉ. Hình thức sinh sản của các chủng VKL thuộc nhóm III là hình thành tảo đoạn.

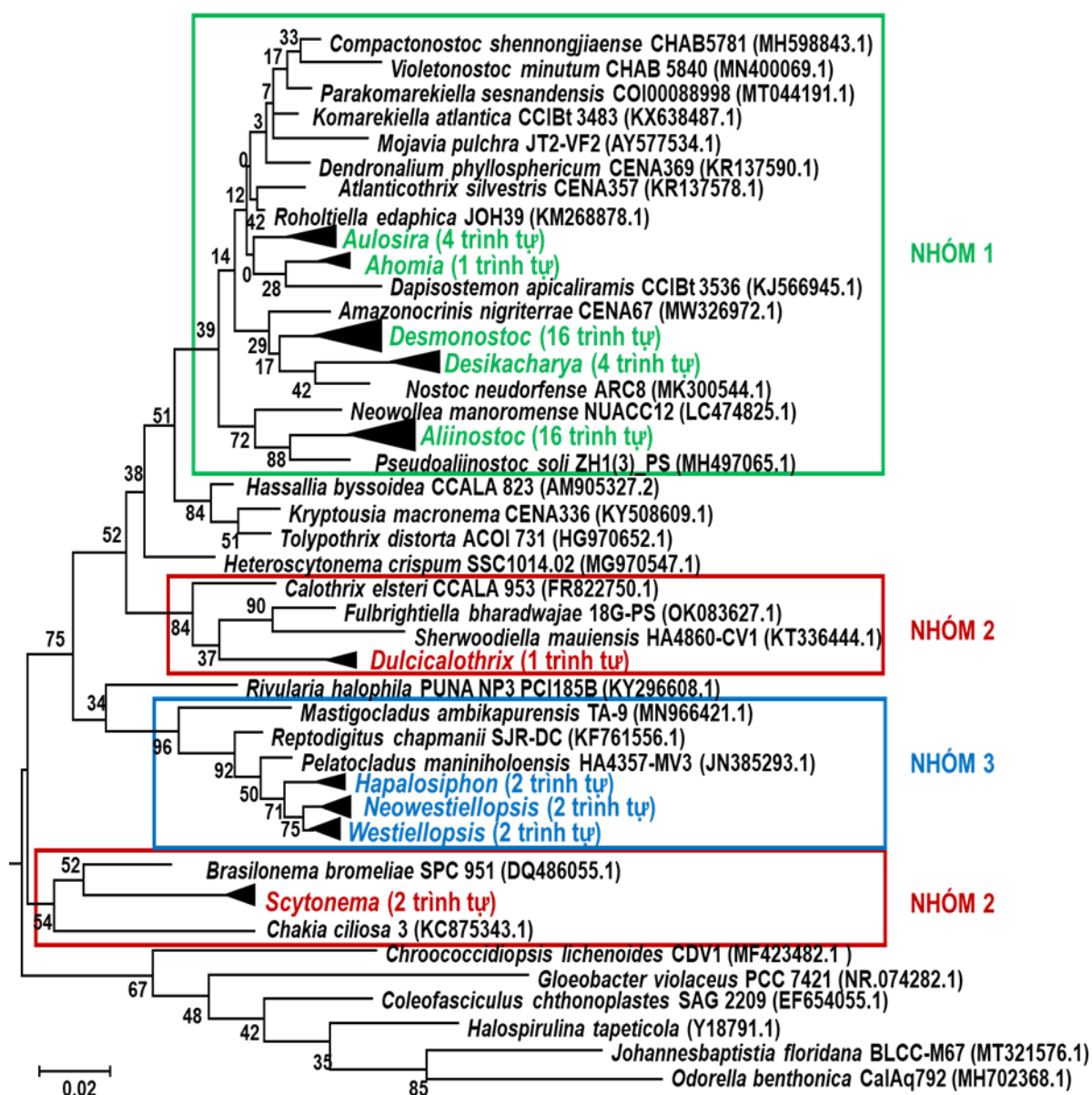
3.1.3. Phân tích trình tự đoạn gen 16S rRNA của các chủng vi khuẩn lam

3.1.3.1. Khuếch đại và giải trình tự đoạn gen 16S rRNA

Kết quả điện di sản phẩm PCR khuếch đại đoạn gen 16S rRNA của 50 chủng VKL trong nghiên cứu cho thấy, đoạn gen 16S rRNA của các chủng thu được đều có kích thước xấp xỉ 1000 bp với băng sáng, nét (Phụ lục 4). Sản phẩm PCR được giải trình tự tại công ty First Base (Malaysia). Trình tự đoạn gen 16S rRNA của mỗi chủng được trích xuất và phân tích bằng phần mềm SnapGene Viewer cho kích thước khoảng 950 bp (Phụ lục 5). Kết quả thu được đáp ứng được các tiêu chuẩn cần thiết về kích thước và khối lượng thông tin phù hợp của đoạn gen 16S rRNA để xây dựng cây phát sinh chủng - loại và đánh giá mức độ tương đồng về trình tự đoạn gen 16S rRNA của các chủng VKL trong nghiên cứu so với các chủng tham chiếu trên cơ sở dữ liệu của GenBank.

3.1.3.2. Mối quan hệ tiến hóa của các chủng vi khuẩn lam

Các chủng được xác định vị trí và mối quan hệ tiến hóa trên cây phát sinh chủng - loại dựa vào trình tự đoạn gen 16S rRNA. Kết quả cho thấy 50 chủng VKL trong nghiên cứu được xếp vào 10 chi, trong đó nhóm I bao gồm 5 chi là *Aulosira* (4 chủng), *Ahomia* (1 chủng), *Desmonostoc* (16 chủng), *Desikacharya* (4 chủng) và *Aliinostoc* (16 chủng); nhóm II bao gồm 2 chi là *Dulcicalothrix* (1 chủng) và *Scytonema* (2 chủng); nhóm III gồm 3 chi là *Hapalosiphon* (2 chủng), *Neowestiellopsis* (2 chủng) và *Westiellopsis* (2 chủng) (Hình 3.6).



Hình 3.6. Vị trí 3 nhóm hình thái trên cây phát sinh chủng - loại

Nhóm I: các chủng vi khuẩn lam dạng không phân nhánh; nhóm II: các chủng VKL dạng phân nhánh giả; nhóm III: các chủng VKL dạng phân nhánh thật

Sau khi xác định được vị trí của các nhóm hình thái trên cây phát sinh chủng - loại, trình tự đoạn gen 16S rRNA của từng chủng trong mỗi chi sẽ được phân tích chi tiết hơn trong các cây phát sinh chủng - loại riêng dựa trên phương pháp Maximum Likelihood với 1000 lần lặp lại để có thể xác định được danh pháp khoa học. Một chủng có thể được định danh đến loài khi đảm bảo cả hai tiêu chí sau: thứ nhất là chúng hình thành một nhánh đơn phát sinh với chủng chuẩn/chủng tham chiếu trên

cây phát sinh chủng - loại; thứ hai là chúng có trình tự đoạn gen 16S rRNA tương đồng trên 98,65% so với chủng chuẩn/ chủng tham chiếu [Kim M., 2014].

A. Nhóm hình thái I.

Nhóm I bao gồm 41 chủng VKL có dạng sợi thẳng không phân nhánh thuộc 5 chi lần lượt là *Aulosira* gồm 4 chủng (nhóm Aul.), *Ahomia* gồm 1 chủng (nhóm Aho.), *Desmonostoc* gồm 16 chủng (nhóm Dem.), *Desikacharya* gồm 4 chủng (nhóm Dei.) và *Aliinostoc* gồm 16 chủng (nhóm Ali.) (Hình 3.6).

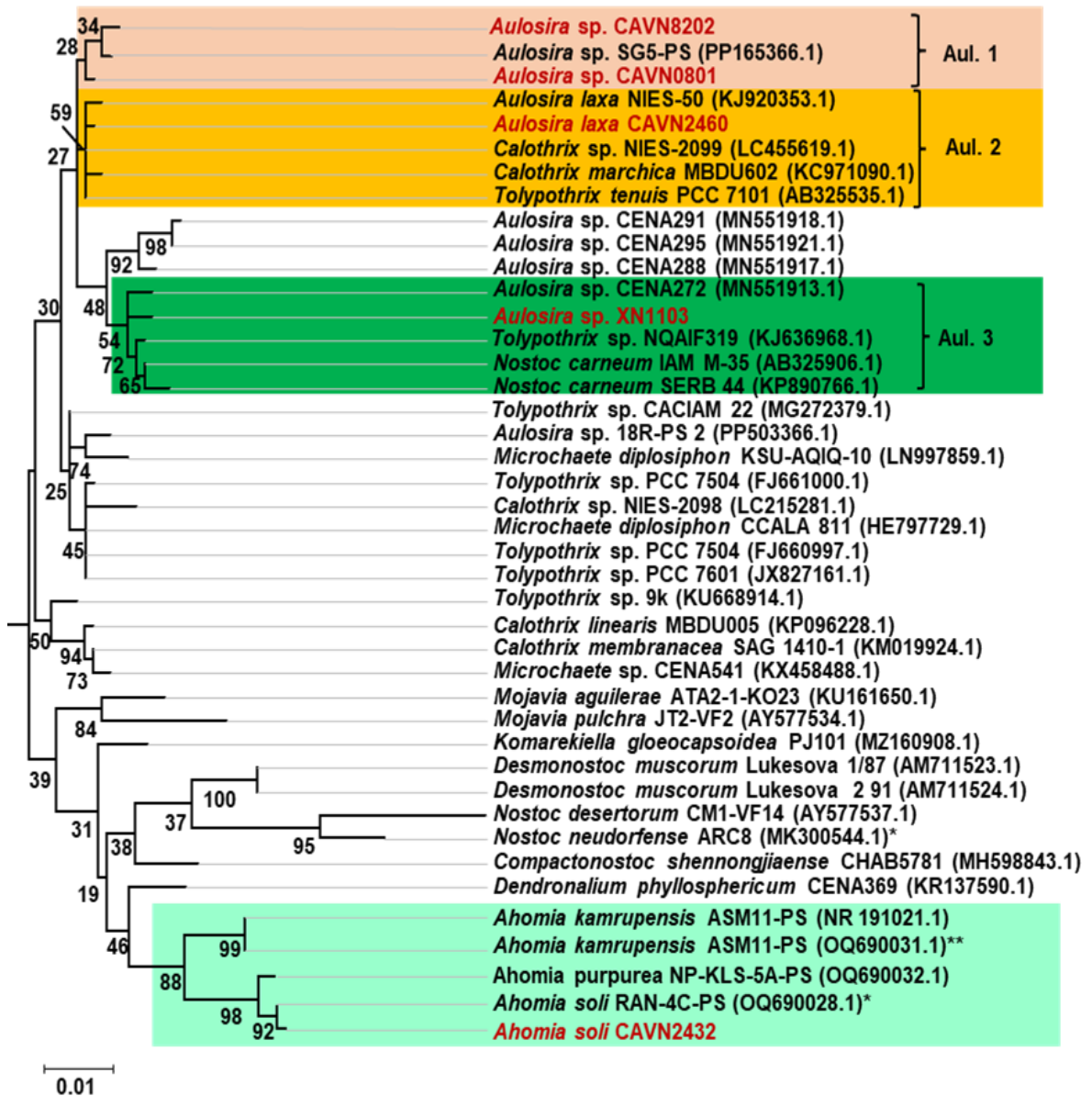
i. Chi *Aulosira*

Bốn chủng VKL bao gồm CAVN0801, CAVN2460, CAVN8202, XN1103 nằm ở ba nhánh đơn phát sinh thuộc chi *Aulosira* trên cây phát sinh chủng - loại (Hình 3.7) và mức độ tương đồng về trình tự đoạn gen 16S rRNA so với chủng *Aulosira laxa* NIES-50 (là chủng tham chiếu của loài chuẩn thuộc chi *Aulosira*) đạt từ 98,7% đến 99,6% (Bảng 3.1) [Hauer T., 2014].

Trong đó, chủng CAVN2460 thuộc nhánh Aul. 2 có độ tương đồng đạt 99,6% về trình tự đoạn gen 16S rRNA và nằm cùng nhánh đơn phát sinh so với chủng tham chiếu *Aulosira laxa* NIES-50 với giá trị bootstrap là 94% (Hình 3.7, Bảng 3.1). Hơn nữa, hình thái của chủng CAVN2460 có nhiều điểm tương đồng so với chủng *A. laxa* NIES-50 như: cả hai chủng đều dạng sợi thẳng, đối xứng hai đầu được bao bọc bởi lớp bao nhầy không màu; tế bào sinh dưỡng có hình trụ hoặc hình thùng, màu xám xanh pha nâu xẫm. Các tế bào dị hình chủ yếu hình cầu, bầu dục hoặc hình trụ. Ở các sợi non, tế bào dị hình có hình cầu hình thoi thường xuất ở đầu mút của sợi. Ngoài ra, hai chủng này đều được phân lập từ mẫu đất trồng lúa [Hauer T., 2014; Guiry, 2023]. Vì vậy, có thể xác định chủng CAVN2460 thuộc loài *Aulosira laxa* và được đặt tên là chủng *A. laxa* CAVN2460.

Mặt khác, ba chủng CAVN0801, CAVN8202 (nhánh Aul. 1) và XN1103 (nhánh Aul. 3) có mức độ tương đồng về trình tự đoạn gen 16S rRNA so với chủng tham chiếu *A. laxa* NIES-50 đạt từ 98,7% đến 99,4%, nhưng lại nằm ở hai nhánh đơn phát sinh tách biệt so với chủng *A. laxa* NIES-50 ở trên cây phát sinh chủng - loại, cho thấy chúng thuộc 2 loài khác nhau có quan hệ gần gũi với loài *A. laxa* (là loài

chuẩn của chi *Aulosira*) và được xếp vào loài chưa xác định là *Aulosira* sp. (Hình 3.7; Bảng 3.1).



Hình 3.7. Cây phát sinh chủng - loại của chi *Aulosira* và *Ahomia*

* biểu thị chủng chuẩn, ** biểu thị loài chuẩn

Tóm lại, 4 chủng thuộc chi *Aulosira* được định danh lần lượt là: chủng CAVN2460 thuộc loài *Aulosira laxa* với tên gọi là *A. laxa* CAVN2460, ba chủng CAVN0801, CAVN8202 và XN1103 thuộc hai loài chưa được xác định với tên gọi lần lượt là *Aulosira* sp. CAVN0801, *Aulosira* sp. CAVN8202 và *Aulosira* sp. XN1103.

Bảng 3.1. Tỷ lệ tương đồng (%) về trình tự đoạn gen 16S rRNA của các chủng thuộc chi *Aulosira* và *Ahomia*

	Chủng	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	CAVN0801											
2	CAVN2460	99,6										
3	CAVN8202	99,2	99,0									
4	XN1103	99,2	98,8	98,3								
5	<i>Aulosira laxa</i> NIES-50 (KJ920353.1)	99,5	99,6	98,9	98,7							
6	<i>Aulosira</i> sp. SG5-PS (PP165366.1)	99,5	99,4	99,4	98,7	99,3						
7	<i>Aulosira</i> sp. CENA272 (MN551913.1)	99,0	98,9	98,9	99,4	98,8	99,0					
8	<i>Nostoc carneum</i> IAM M-35 (AB325906.1)	98,9	99,0	98,6	99,5	98,7	98,9	99,4				
9	<i>Tolypothrix</i> sp. NQAIF319 (KJ636968.1)	98,9	99	98,3	99,5	98,7	98,7	99,4	99,8			
10	CAVN2432	96,8	96,7	96,6	97,3	96,4	96,9	97,3	97,1	97,1		
11	<i>Ahomia soli</i> RAN-4C-PS (OQ690028.1)*	96,9	96,7	96,7	97,4	96,6	97,1	97,4	97,1	97,1	99,9	

* biểu thị chủng chuẩn

ii. Chi *Ahomia*

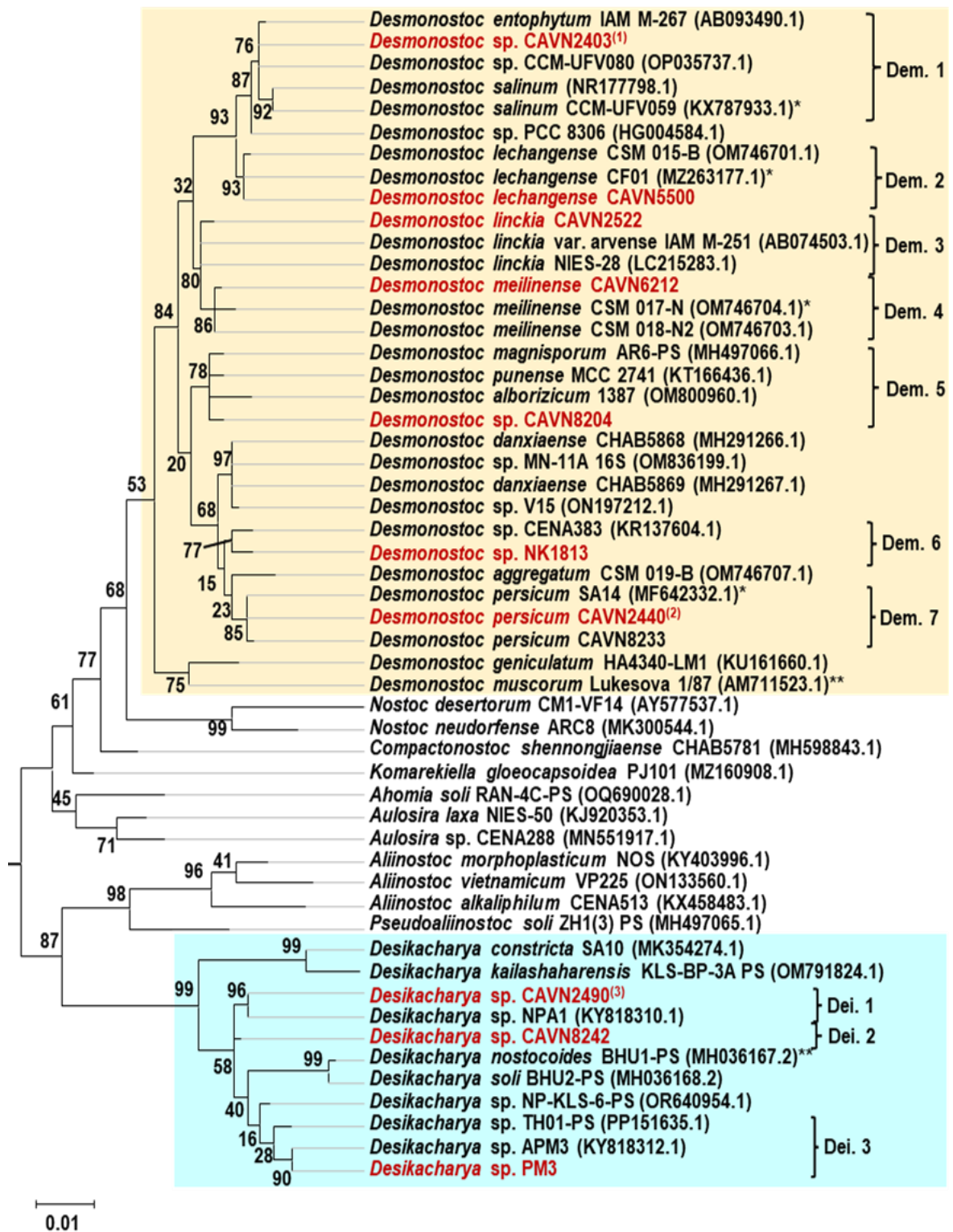
Chủng CAVN2432 có trình tự đoạn gen 16S rRNA tương đồng đến 99,9% so với chủng tham chiếu *Ahomia soli* RAN-4C-PS (Bảng 3.1). Trên cây phát sinh chủng - loại, chúng nằm cùng nhánh với các chủng tham chiếu thuộc chi *Ahomia* và có quan hệ tiến hóa gần nhất với chủng *Ahomia soli* RAN-4C-PS với giá trị bootstrap đạt 92% (Hình 3.7). Bên cạnh đó, hình thái của chủng *Ahomia soli* RAN-4C-PS có nhiều điểm tương đồng so với chủng CAVN2432 về kích thước và hình dạng các dạng tế bào. Cụ thể cả hai chủng đều có dạng sợi màu nâu, đối xứng hai đầu, tế bào sinh dưỡng có dạng hình trụ hoặc hình thùy thắt lại ở hai đầu, được xếp lỏng lẻo với nhau thành chuỗi; tế bào dị hình hình cầu hoặc bầu dục xuất hiện đơn lẻ nằm ở cả đầu sợi và xen kẽ trong sợi; sinh sản bằng hình thức nảy mầm của tế bào nghỉ có dạng hình bầu dục. Hơn nữa, cả hai chủng đều được phân lập từ bề mặt đất ẩm [Pal S., 2024]. Dựa vào sự tương đồng về trình tự đoạn gen 16S rRNA, vị trí phân loại trên cây phát sinh

chủng - loại và các đặc điểm hình thái, sinh thái có thể xác định chủng CAVN2432 thuộc loài *Ahomia soli* và được đặt tên là chủng *Ahomia soli* CAVN2432.

iii. Chi *Desmonostoc*

Mười sáu chủng VKL bao gồm CAVN8204, CAVN2503, CAVN8233, CAVN2441, CAVN2440, CAVN2442, CAVN6212, CAVN2522, CAVN5500, CAVN2403, CAVN2513, CAVN2525, CAVN8213, CAVN2560, CAVN6515 và NK1813 được xếp vào nhánh đơn phát sinh cùng các chủng tham chiếu thuộc chi *Desmonostoc* với giá trị bootstrap là 68% và được phân tách thành 7 nhánh đơn phát sinh tương ứng với 7 loài (Hình 3.8) cho thấy 16 chủng này thuộc 7 loài trong chi *Desmonostoc*.

Đầu tiên, chủng CAVN5500 (nhánh Dem. 2) nằm cùng nhánh đơn gốc với các chủng tham chiếu thuộc loài *Desmonostoc lechangense* với giá trị bootstrap là 93% (Hình 3.8). Ngoài ra trình tự đoạn gen 16S rRNA của chủng CAVN5500 tương đồng 100% so với chủng chuẩn *D. lechangense* CF01 (Bảng 3.3) [Pecundo M.H., 2021]. Vì vậy, chủng CAVN5500 có thể định danh thuộc loài *D. lechangense* và được gọi tên là chủng *D. lechangense* CAVN5500. Bên cạnh đó, chủng CAVN2522 (nhánh Dem. 3) được xác định thuộc loài *Desmonostoc linckia* do chúng nằm cùng nhánh đơn phát sinh cùng chủng *Desmonostoc linckia* IAM M-251 and *Desmonostoc linckia* NIES 28 với giá trị bootstrap đạt 80%, và có tỷ lệ tương đồng về trình tự đoạn gen 16S rRNA đạt 99,8% so với chủng tham chiếu *Desmonostoc linckia* NIES 28 [Hrouzek P., 2013]. Chủng CAVN6212 thuộc nhánh Dem. 4 nằm cùng nhánh đơn phát sinh với hai chủng tham chiếu thuộc loài *D. meilinense* với giá trị bootstrap đạt 96% ở trên cây phát sinh chủng - loài và có tỷ lệ tương đồng về trình tự đoạn gene 16S rRNA so với chủng chuẩn *D. meilinense* CSM 017-N đạt 99,5% (Hình 3.8; Bảng 3.1) [Pecundo M.H., 2023]. Do vậy, chủng CAVN6212 được xác định thuộc loài *D. meilinense* và được đặt tên là chủng *D. meilinense* CAVN6212.



Hình 3.8. Cây phát sinh chủng - loại của chi *Desmonostoc* và *Desikacharya*

⁽¹⁾ bao gồm các chủng CAVN2513, CAVN2525, CNVN2560, CAVN6515 và CAVN8213;

⁽²⁾ bao gồm các chủng CAVN2441, CAVN2442 và CAVN2503; ⁽³⁾ bao gồm chủng NS2000;

* biểu thị chủng chuẩn; ** biểu thị loài chuẩn

Bảng 3.2. Tỷ lệ tương đồng (%) về trình tự đoạn gen 16S rRNA của các chủng thuộc chi *Desmonostoc* và *Desikacharya*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
1 CAVN2403⁽¹⁾																												
2 <i>Desmonostoc entophytum</i> IAM_M-267 (AB093490.1)	99,9																											
3 <i>Desmonostoc salinum</i> (NR177798.1)	99,8	99,6																										
4 CAVN5500	99,5	99,4	99,3																									
5 <i>Desmonostoc lechangense</i> CF01 (MZ263177.1)*	99,5	99,4	99,3	100																								
6 CAVN2522	98,5	98,4	98,2	98,7	98,7																							
7 <i>Desmonostoc linckia</i> NIES-28 (LC215283.1)	98,8	98,6	98,5	99,0	99,0	99,8																						
8 CAVN6212	98,6	98,5	98,4	98,9	98,9	99,4	99,6																					
9 <i>D. meilinese</i> CSM018-N2 (OM746703.1)*	98,8	98,6	98,5	99,0	99,0	99,5	99,8	99,9																				
10 CAVN8204	98,1	98,0	97,9	98,4	98,4	98,6	98,9	98,5	98,6																			
11 <i>D. magnisporum</i> AR6-PS (MH497066.1)	98,1	98,0	97,9	98,4	98,4	98,6	98,9	98,5	98,6	99,5																		
12 <i>D. punense</i> MCC2741 (KT166436.1)	98,1	98,0	97,9	98,4	98,4	98,6	98,9	98,5	98,6	99,5	99,5																	
13 <i>D. alborizicum</i> 1387 (OM800960.1)	98,1	98,0	98,1	97,9	97,9	98,1	98,4	98,0	98,1	99,0	99,0	99,0																
14 NK1813	98,7	98,6	98,5	98,2	98,2	98,2	98,5	98,1	98,2	98,5	98,5	98,5	98,5															
15 <i>Desmonostoc</i> sp. CENA383 (KR137604.1)	98,4	98,2	98,1	98,4	98,4	98,4	98,6	98,2	98,4	98,7	98,9	98,7	98,2	99,3														
16 CAVN8233	99,0	98,9	98,7	99,0	99,0	98,7	99,0	98,6	98,7	98,6	98,6	98,6	98,1	99,0	99,0													
17 CAVN2440⁽²⁾	99,1	99,0	98,9	99,1	99,1	98,9	99,1	98,7	98,9	98,7	98,7	98,7	98,2	99,1	99,1	99,9												
18 <i>D. persicum</i> SA14 (MF642332.1)*	99,1	99,0	98,9	99,1	99,1	98,9	99,1	98,7	98,9	98,7	98,7	98,7	98,2	99,1	99,1	99,9	100											
19 <i>D. danxiaense</i> CHAB5868 (MH291266.1)	98,7	98,6	98,5	98,7	98,7	98,7	99,0	98,6	98,7	98,7	98,7	98,7	98,2	99,3	99,3	99,1	99,3	99,3										
20 <i>D. muscorum</i> Lukesova 1/87 (AM711523.1)**	97,9	97,7	97,6	97,9	97,9	98,4	98,6	98,2	98,4	98,5	98,2	98,2	98,0	98,0	97,9	97,9	98,0	98,0	98,2									
21 <i>Nostoc neudorfense</i> ARC8 (MK300544.1)	95,5	95,4	95,2	95,5	95,5	95,8	96,0	95,9	96,0	96,4	96,2	96,4	95,9	96,6	96,3	96,0	96,2	96,2	96,3	97,1								
22 CAVN2490⁽³⁾	94,3	94,2	94,3	94,2	94,2	94,5	94,6	94,5	94,6	94,4	94,7	94,2	93,9	94,7	94,4	94,3	94,5	94,5	94,7	95,8	95,1							
23 CAVN8242	94,5	94,3	94,5	94,3	94,3	94,6	94,7	94,6	94,7	94,6	94,8	94,3	94,0	94,8	94,6	94,4	94,6	94,6	94,8	95,9	94,7	99,6						
24 PM3	94,7	94,6	94,5	94,7	94,7	94,9	95,0	94,9	95,0	94,8	95,1	94,6	94,3	95,1	94,8	94,7	94,8	94,8	95,1	96,2	95,4	99,0	99,1					
25 <i>Nostoc</i> sp. NPA1 (KY818310.1)	94,3	94,2	94,3	94,2	94,2	94,5	94,6	94,5	94,6	94,4	94,7	94,2	93,9	94,7	94,4	94,3	94,5	94,5	94,7	95,8	95,1	100	99,6	99,0				
26 <i>Desikacharya nostocoides</i> BHU1-PS (MH036167.2)**	94,6	94,4	94,3	94,6	94,6	94,4	94,6	94,4	94,6	93,9	94,4	93,9	93,6	94,8	94,4	94,8	95,0	95,0	94,8	95,1	94,8	98,0	98,1	98,5	98,0			
27 <i>Desikacharya soli</i> BHU2-PS (MH036168.2)	94,7	94,6	94,4	94,7	94,7	94,6	94,7	94,6	94,7	94,0	94,6	94,0	93,8	95,0	94,6	95,0	95,1	95,1	95,0	95,2	95,0	98,1	98,2	98,6	98,1	99,9		
28 <i>Nostoc</i> sp. _APM3 (KY818312.1)	94,7	94,6	94,5	94,7	94,7	94,9	95,0	94,9	95,0	94,8	95,1	94,6	94,3	95,1	94,8	94,7	94,8	94,8	95,1	96,2	95,4	99	99,1	100	99,0	98,5	98,6	

⁽¹⁾ bao gồm các chủng *CAVN2513*, *CAVN2525*, *CNVN2560*, *CAVN6515* và *CAVN8213*; ⁽²⁾ bao gồm các chủng: *CAVN2441*, *CAVN2442* và

CAVN2503; ⁽³⁾ bao gồm chủng *NS2000*; * biểu thị chủng chuẩn; ** biểu thị loài chuẩn

Năm chủng CAVN2440, CAVN2441, CAVN2442, CAVN2503 và CAVN8233 thuộc nhánh Dem. 7 (Hình 3.8) có mức độ tương đồng về trình tự đoạn gen 16S rRNA so với chủng chuẩn *D. persicum* SA14 đạt từ 99,9 - 100% (Bảng 3.2). Hơn nữa, trên cây phát sinh chủng - loại, 5 chủng này nằm cùng nhánh đơn phát sinh với chủng tham chiếu *D. persicum* SA14 với giá trị bootstrap là 85% (Hình 3.8). Không chỉ vậy, chủng tham chiếu *D. persicum* SA14 được Kabirataj và cộng sự phân lập từ đất ruộng lúa ở miền Bắc Iran tương tự hệ sinh thái phân lập được 5 chủng VKL thuộc nhánh này. Chủng *D. persicum* SA14 cũng mang các đặc điểm hình thái tương tự 5 chủng trong nghiên cứu như có cấu chuỗi chuỗi dài màu xanh lam pha lục sáng đến thẫm, các sợi trưởng thành với xu hướng cuộn gập nhẹ; tế bào sinh dưỡng chủ yếu có dạng hình thùng, hình cầu đến cầu dẹt, lớp phân tán không màu bao quanh sợi; tế bào sinh dưỡng hình thùng hoặc hình trụ; tế bào dị hình gần như hình cầu với hai nốt cực có thể nhìn thấy rõ ràng nằm xen kẽ giữa sợi hoặc ở đầu sợi, màu vàng hoặc không màu [Kabirataj S., 2020]. Sự tương đồng về đặc điểm hình thái, sinh thái cũng như trình tự đoạn gen 16S rRNA cho thấy 5 chủng ở nhánh Dem.7 thuộc loài *D. persicum* và được định danh lần lượt là các chủng *D. persicum* CAVN2440, *D. persicum* CAVN2442, *D. persicum* CAVN2441, *D. persicum* CAVN2503 và *D. persicum* CAVN8233.

Đồng thời, 8 chủng VKL bao gồm CAVN2403, CAVN2525, CAVN2560, CAVN2513, CAVN6515 và CAVN8213 (nhánh Dem. 1), CAVN8204 (nhánh Dem. 5) và NK1813 (nhánh Dem. 6) không tạo thành nhánh đơn phát sinh với bất kỳ chủng tham chiếu nào ở trên cây phát sinh chủng - loại (Hình 3.9). Hơn nữa, các chủng này có tỷ lệ tương đồng về trình tự đoạn gen 16S rRNA so với chủng *Desmonostoc muscorum* Lukesova 1/87 từ 97,9 đến 98,5%, lớn hơn giới hạn xác định hai chủng cùng một chi theo Yaza và cộng sự (2014) [Yarza P., 2014]. Đây là chủng chuẩn thuộc loài *Desmonostoc muscorum* (là loài chuẩn của chi *Desmonostoc*) [Hrouzek P., 2013]. Vì vậy, 8 chủng trên được định danh thuộc ba loài chưa xác định trong chi *Desmonostoc* với tên gọi lần lượt là *Desmonostoc* sp. CAVN2403, *Desmonostoc* sp. CAVN2525, *Desmonostoc* sp. CAVN2560, *Desmonostoc* sp. CAVN2513,

Desmonostoc sp. CAVN6515, *Desmonostoc* sp. CAVN8213, *Desmonostoc* sp. CAVN8204 và *Desmonostoc* sp. NK1813.

Tóm lại, 16 chủng VKL thuộc chi *Desmonostoc* được xác định thuộc 7 loài bao gồm loài *D. lechangense* (1 chủng), *D. meilinense* (1 chủng), *D. persicum* (5 chủng), *D. linckia* (1 chủng) và 3 loài chưa xác định gọi tên là *Desmonostoc* sp. (8 chủng).

iv. Chi *Desikacharya*

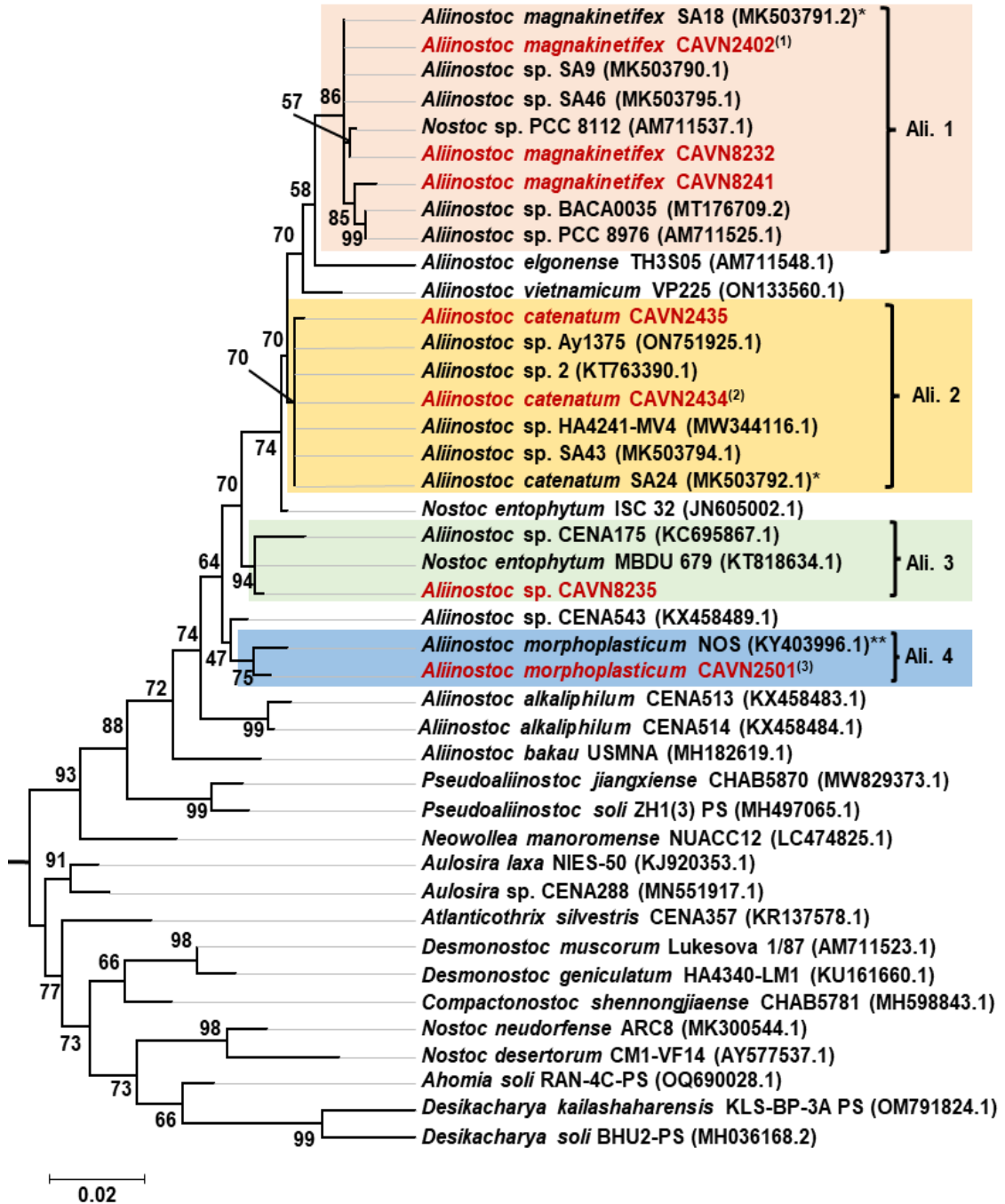
Dựa vào vị trí trên cây phát sinh chủng - loại thấy rằng bốn chủng CAVN2490, NS2000, CAVN8242 và PM3 nằm cùng nhánh đơn phát sinh với các chủng tham chiếu thuộc chi *Desikacharya* (Hình 3.8). Phân tích trình tự đoạn gen 16S rRNA cho thấy các chủng này có mức độ tương đồng từ 98,1% đến 98,5% so với chủng chuẩn BHU1-PS của loài *Desikacharya nostocoides* (là loài chuẩn của chi *Desikacharya*) (Bảng 3.2) [Saraf A.G., 2019]. Tỷ lệ này lớn hơn giá trị giới hạn chi nhưng lại nhỏ hơn giá trị giới hạn loài [Kim, 2014; Yarza P., 2014]. Không chỉ vậy, cả bốn chủng này có đặc điểm đặc trưng của chi *Desikacharya* theo mô tả của Saraf và cộng sự (2019) như tế sinh dưỡng ở đầu mút sợi có dạng hình cầu, tế bào sinh dưỡng chủ yếu có dạng thùng kích thước đều nhau, thắt lại ở giữa các tế bào; sợi có cấu trúc đẳng hướng, rất dài, màu xanh lam đậm [Saraf A.G., 2019]. Dựa vào vị trí trên cây phát sinh chủng - loại, tỷ lệ tương đồng của đồng về đoạn gen 16S rRNA và đặc điểm hình thái, cho thấy cả bốn chủng này đều thuộc chi *Desikacharya* và được đặt tên lần lượt là *Desikacharya* sp. CAVN2490, *Desikacharya* sp. CAVN8242, *Desikacharya* sp. NS2000 và *Desikacharya* sp. PM3.

Bên cạnh đó, chi *Desikacharya* được Saraf và cộng sự công bố năm 2019 tách từ chi *Nostoc* dựa vào phương pháp tiếp cận đa chiều. Do đó, những chủng tham khảo được công bố trước đó thuộc chi *Nostoc* mà nằm cùng nhánh với chi *Desikacharya* trên cây phát sinh chủng - loại như chủng *Nostoc* sp. NPA1, *Nostoc* sp. PCC 9426 và *Nostoc* sp. APM3 cần được định danh lại thuộc chi *Desikacharya* [Papaefthimiou D., 2008, Phạm T.L.H., 2017].

v. Chi *Aliinostoc*

Trên cây phát sinh chủng - loại, 16 chủng VKL bao gồm CAVN2402, CAVN2424, CAVN2435, CAVN2436, CAVN2437, CAVN2438, CAVN2439,

CAVN2463, CAVN2489, CAVN2501, CAVN2502, CAVN2512, CAVN 8232, CAVN8235, CAVN9301 VÀ CAVN8241 được xếp vào 4 nhánh đơn phát sinh thuộc chi *Aliinostoc* tương ứng với 4 loài (Hình 3.9).



Hình 3.9. Cây phát sinh chủng - loại của chi *Aliinostoc*

⁽¹⁾ bao gồm các chủng CAVN2437, CAVN2438, CAVN2489 và CAVN9301; ⁽²⁾ bao gồm chủng CAVN2436;

⁽³⁾ bao gồm các chủng CAVN2502, CAVN2512, CAVN2439, CAVN2436 và CAVN8235;

* biểu thị chủng chuẩn; ** biểu thị loài chuẩn

Nhánh Ali. 1 gồm có bảy chủng CAVN2402, CAVN2438, CAVN2437, CAVN2489, CAVN8232, CAVN8241 và CAVN9301 được nằm cùng nhánh đơn phát sinh với chủng *Aliinostoc magnakinetifex* SA18 (là chủng chuẩn của loài *A. magnakinetifex*) ở trên cây phát sinh chủng - loại với giá trị bootstrap đạt 88% (Hình 3.9). Đồng thời, 7 chủng này có mức độ tương đồng trình tự đoạn gen 16S rRNA đạt 98,8% - 100% so với chủng *A. magnakinetifex* SA18 (Bảng 3.3). Kết hợp sự tương đồng về các đặc điểm hình thái của các chủng này so với chủng *A. magnakinetifex* SA18 như: tế bào sinh dưỡng thường có dạng hình cầu, vuông hoặc hình trụ, hơi thắt ở vách tế bào, các sợi non có dạng thẳng, sợi già có xu hướng cuộn lại; tế bào dị hình thường có dạng hình cầu, xuất hiện ở đầu mút sợi hay xen kẽ trong sợi; tế bào nghỉ chủ yếu có hình cầu lớn, nằm xen kẽ hay tách rời khỏi sợi, chứa nhiều hạt dự trữ; tảo đoạn có thể xuất hiện tế bào dị hình ở đầu mút [Kabirataj S., 2020]; cho thấy 7 chủng này đều thuộc loài *A. magnakinetifex* và gọi tên lần lượt là *A. magnakinetifex* CAVN2402, *A. magnakinetifex* CAVN2437, *A. magnakinetifex* CAVN2438, *A. magnakinetifex* CAVN2489, *A. magnakinetifex* CAVN8232, *A. magnakinetifex* CAVN8241 và *A. magnakinetifex* CAVN9301.

Tiếp theo, nhánh Ali. 2 bao gồm ba chủng là CAVN2434, CAVN2435 và CAVN2436 nằm cùng nhánh đơn phát sinh với chủng *Aliinostoc catenatum* SA24 (là chủng chuẩn của loài *Aliinostoc catenatum*) với giá trị bootstrap là 70% (Hình 3.9). Ba chủng này có tỷ lệ tương đồng về trình tự đoạn gen 16S rRNA từ 99,8 đến 99,9% so với chủng *A. catenatum* SA24 (Bảng 3.3) [Kabirataj S., 2020]. Dựa vào các đặc điểm hình thái tương đồng của 3 chủng này với chủng *Aliinostoc catenatum* SA24 như: tế bào sinh dưỡng thường có hình trụ hoặc hình thừng, xếp lỏng lẻo thành dạng sợi với vách rõ ràng giữa các tế bào; các sợi non có màu nâu nhạt pha xanh lục, sau đó chuyển dần về màu nâu; các tế bào dị hình có hình cầu hay bầu dục; tế bào nghỉ có kích thước lớn, chứa nhiều hạt dự trữ, chủ yếu có hình bầu dục, xuất hiện đơn lẻ hoặc thành chuỗi [Kabirataj S., 2020]. Cho nên có thể xếp 3 chủng này thuộc loài *A. catenatum* với tên gọi lần lượt là *A. catenatum* CAVN2434, *A. catenatum* CAVN2435 và *A. catenatum* CAVN2436.

Bảng 3.3. Tỷ lệ tương đồng (%) về trình tự đoạn gen 16S rRNA của các chủng thuộc chi *Aliinostoc*

	Chủng	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1.	CAVN2402 ⁽¹⁾															
2.	CAVN8232	99,9														
3.	CAVN8241	98,8	98,7													
4.	<i>Aliinostoc magnakineticifex</i> SA18 (MK503791.2)*	100	99,9	98,8												
5.	CAVN2435	98,9	98,8	98,7	98,9											
6.	CAVN2434/	98,8	98,7	98,8	98,8	99,9										
7.	<i>Aliinostoc catenatum</i> SA24 (MK503792.1)*	98,7	98,6	98,7	98,7	99,8	99,9									
8.	CAVN8235	98,0	97,9	98,5	98,0	98,6	98,7	98,8								
9.	<i>Aliinostoc</i> sp. CENA175 (KC695867.1)	97,4	97,2	97,6	97,4	98,2	98,3	98,5	98,5							
10.	<i>Nostoc entophytum</i> MBDU 679 (KT818634.1)	98,1	98,0	98,6	98,1	98,7	98,8	98,9	99,9	98,6						
11.	CAVN2501 ⁽²⁾	97,9	98,0	97,4	97,9	98,2	98,1	98,0	98,5	97,4	98,6					
12.	<i>Aliinostoc morphoplasticum</i> NOS (KY403996.1)**	98,2	98,1	97,7	98,2	98,6	98,5	98,3	97,9	97,0	98,0	98,9				
13.	<i>Aliinostoc elgonense</i> TH3S05 (AM711548.1)	97,3	97,4	96,8	97,3	97,4	97,2	97,1	96,4	95,6	96,5	97,5	97,4			
14.	<i>Aliinostoc vietnamicum</i> VP225 (ON133560.1)	98,3	98,5	97,8	98,3	98,9	98,8	98,9	98,5	97,6	98,6	98,1	98,0	97,0		
15.	<i>Aliinostoc alkaliphilum</i> CENA513 (KX458483.1)	96,6	96,5	96,4	96,6	96,6	96,8	96,9	96,9	96,3	97,0	96,8	97,1	94,9	96,8	

⁽¹⁾ bao gồm các chủng CAVN2437, CAVN2438, CAVN2489 và CAVN9301; ⁽²⁾ bao gồm chủng CAVN2436; ⁽³⁾ bao gồm các chủng CAVN2502,

CAVN2512, CAVN2439, CAVN2436 và CAVN8235; * biểu thị chủng chuẩn, ** biểu thị loài chuẩn

Nhánh Ali.4 bao gồm 5 chủng là CAVN2501, CAVN2502, CAVN2439, CAVN2512, CAVN2463 có trình tự đoạn gen 16S rRNA tương đồng 100% so với nhau và 98,9% so với chủng *Aliinostoc morphoplasticum* NOS (là chủng chuẩn của loài *A. morphoplasticum*) (Bảng 3.4). Trên cây phát sinh chủng - loại dựa vào trình tự đoạn gen 16S rRNA, các chủng này cùng nằm một nhánh đơn phát sinh với giá trị bootstrap là 73% (Hình 3.9). Loài *A. morphoplasticum* là loài chuẩn thuộc chi *Aliinostoc* được Bagchi và cộng sự công bố vào năm 2017 [Bagchi S.N., 2017]. Thêm vào đó, năm chủng này có nhiều đặc điểm hình thái tương đồng so với chủng *A. morphoplasticum* NOS được miêu tả bởi Bagchi và cộng sự (2017) như là tế bào sinh dưỡng chủ yếu có dạng hình thùng, hình trụ, vách ngăn giữa các tế bào rõ ràng; tế bào dị hình có hình dạng đa dạng, các lỗ cực lớn có thể quan sát rõ ràng; tế bào nghỉ có thể xuất hiện đơn lẻ hoặc thành dạng chuỗi, thành dây, bên trong có hạt dự trữ màu nâu, bên ngoài có màu xanh lục [Bagchi S.N., 2017]. Do đó, năm chủng CAVN2501, CAVN2502, CAVN2439, CAVN2512, CAVN2463 được xác định thuộc loài *Aliinostoc morphoplasticum*.

Cuối cùng, chủng CAVN8235 (thuộc nhánh Ali. 3) xuất hiện trong nhánh đơn phát sinh cùng 2 chủng tham khảo *Aliinostoc* sp. CENA175 và *Nostoc entophytum* MBDU 679 với giá trị bootstrap là 94% (Hình 3.9). Chủng CAVN8235 có tỷ lệ tương đồng về trình tự đoạn gen 16S rRNA cao nhất so với chủng *Nostoc entophytum* MBDU 679 cho thấy đây là 2 chủng thuộc cùng 1 loài trong chi *Aliinostoc* (Bảng 3.3) do chúng có tỷ lệ tương đồng về trình tự đoạn gen 16S rRNA so với chủng *Aliinostoc morphoplasticum* NOS (chủng chuẩn của chi *Aliinostoc*) lần lượt là 97,9 và 98,0% (cao hơn so với tiêu chí xếp 2 chủng cùng chi) [Yarza P., 2014]. Vì vậy chủng CAVN8235 được xác định thuộc loài chưa xác định trong chi *Aliinostoc* với tên gọi là *Aliinostoc* sp. CAVN8235. Đồng thời chủng *Nostoc entophytum* MBDU 679 nằm cùng nhánh với các chủng tham chiếu thuộc chi *Aliinosotoc* ở trên cây phát sinh chủng - loại nên chủng này cần được định danh lại thuộc chi *Aliinosotoc* [Anahas A.M.P., 2018].

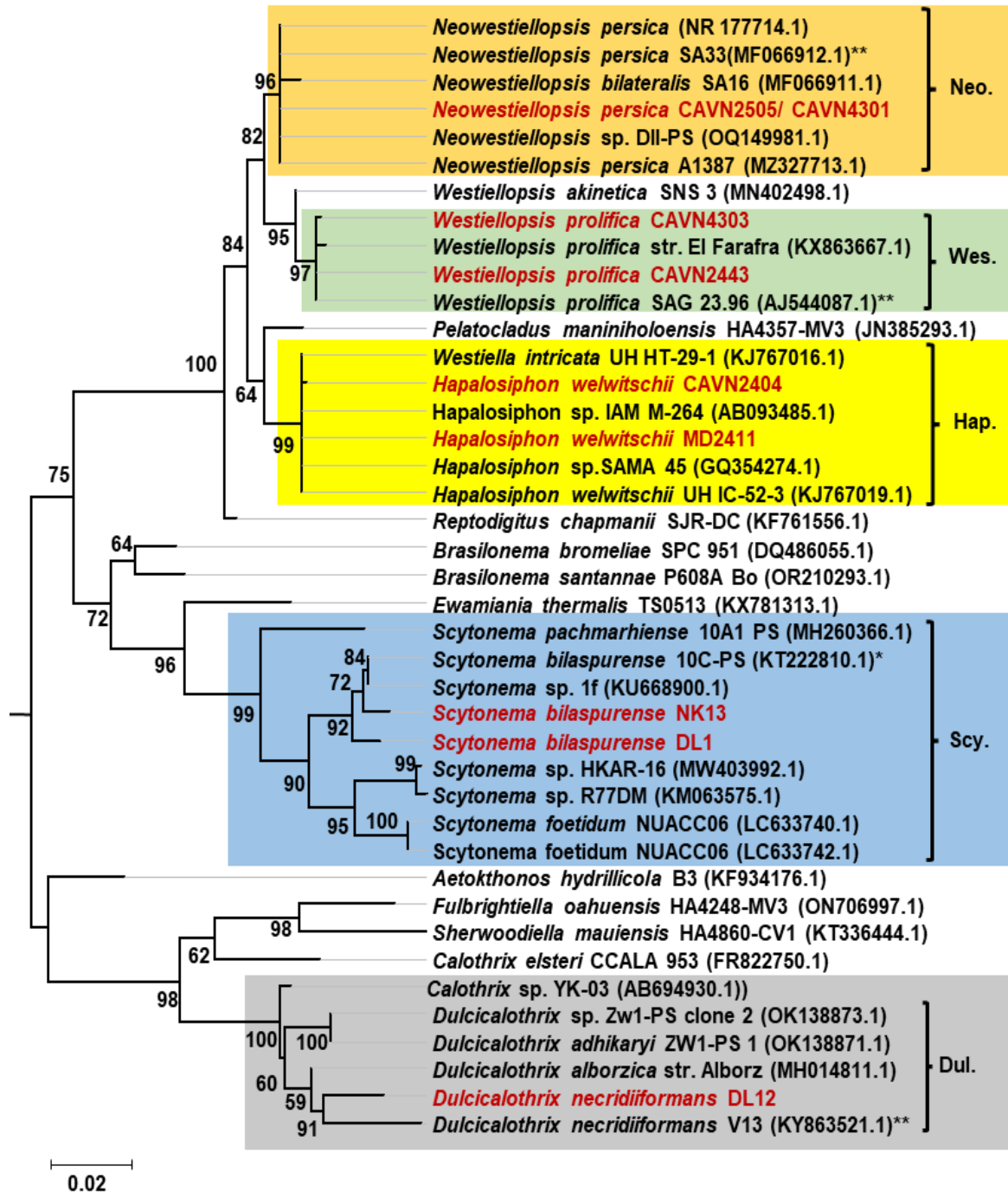
Tóm lại, 16 chủng VKL thuộc chi *Aliinostoc* được định danh thuộc 5 loài khác nhau, trong đó có 3 chủng được xếp vào loài *A. catenatum*, 5 chủng được xếp vào loài *A. morphoplasticum*, 7 chủng được xếp vào loài *A. magnakinetifex* và 1 chủng thuộc loài chưa xác định *Aliinostoc* sp.

B. Nhóm hình thái II

Trên cây phát sinh chủng - loại, nhóm hình thái II gồm có ba chủng DL12, DL1 và NK13 được xếp vào 2 nhánh là Dul. và Scy. (Hình 3.10). Trong đó, chủng DL12 (nhánh Dul.) nằm cùng nhánh đơn phát sinh với chủng chuẩn *Dulcicalothrix necridiiformans* V13 với giá trị bootstrap là 91% ở trên cây phát sinh chủng - loại (Hình 3.10) và có tỷ lệ độ tương đồng về trình tự đoạn gen 16S rRNA đạt 99,8% (Bảng 3.4). Hơn nữa, hai chủng này còn có nhiều nét tương đồng về đặc điểm hình thái như các sợi màu xanh lục có cấu trúc dị cực với một đầu thuôn nhọn (đỉnh), tế bào dị hình hình cầu xuất hiện ở đầu còn lại của sợi, có sự hình thành đĩa hoại tử và xuất hiện lớp bao nhầy khá dày, không màu bao quanh sợi, hở ở hai đầu trong giai đoạn sinh sản; các tế bào sinh dưỡng thường co hẹp dần về phía cuối sợi. Không chỉ vậy, chúng lại được phân lập từ mẫu đất ở cánh đồng lúa và cánh đồng bông [Saraf A., 2019]. Từ sự tương đồng về đặc điểm hình thái, sự tương đồng về trình tự đoạn gen 16S rRNA và vị trí trên cây phát sinh chủng - loại cũng như khu hệ sinh thái cho thấy chủng DL12 được xác định thuộc loài *D. necridiiformans* và được gọi tên là chủng *Dulcicalothrix necridiiformans* DL12.

Hai chủng DL1 và NK13 (nhánh Scy.) đã tạo thành nhánh đơn phát sinh cùng các chủng tham chiếu thuộc chi *Scytonema* với giá trị bootstrap là 90% và có mối quan hệ tiến hóa gần gũi nhất với hai chủng *Scytonema bilaspurense* 10C-PS và *Scytonema* sp. 1f (Hình 3.10). Phân tích về trình tự đoạn gen 16S rRNA thấy rằng, hai chủng DL1 và NK13 tương đồng 99,3% với nhau và có tỷ lệ tương đồng cao nhất (99,4% và 99,9%) so với chủng *Scytonema bilaspurense* 10C-PS và *Scytonema* sp. 1f (Bảng 3.4). Chủng *S. bilaspurense* 10C-PS được Singh và cộng sự phân lập năm 2016 tại một thủy vực nước ngọt ở Bilaspur, Chhattisgarh, Ấn Độ có đặc điểm tương đồng với chủng DL1 và NK13 về đặc điểm chuỗi, hình dạng, kích thước của tế bào

sinh dưỡng, tế bào dị hình [Singh P., 2016]. Vì vậy, hai chủng DL1 và NK13 được xác định cùng thuộc loài *Scytonema bilaspurense* và được đặt tên là *Scytonema bilaspurense* DL1 và *Scytonema bilaspurense* NK13.



Hình 3.10. Cây phát sinh chủng - loại của 5 chi *Neowestilopsis*, *Westilopsis*, *Hapalosiphon*, *Scytonema* và *Dulcicalothrix*

* biểu thị chủng chuẩn, ** biểu thị loài chuẩn

Bảng 3.4. Hệ số tương đồng về trình tự đoạn gen 16S rRNA của 5 chi *Neowestilopsis*, *Westilopsis*, *Hapalosiphon*, *Scytonema* và *Dulcicalothrix*

	Nhóm	Chủng	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
1	II	DL12															
2		<i>Dulcicalothrix necridiiformans</i> V13 (KY863521.1)**	99,7														
3		DL1	93,2	93,2													
4		NK13	93,3	93,3	99,2												
5		<i>Scytonema bilaspurense</i> 10C-PS (KT222810.1)*	93,5	93,5	99,4	99,9											
6		<i>Scytonema</i> sp. 1f (KU668900.1)	93,5	93,5	99,4	99,9	100										
7	III	MD2411	92,2	92,5	91,5	91,5	91,6	91,6									
8		CAVN2404	92,1	92,4	91,4	91,4	91,5	91,5	99,9								
9		<i>Hapalosiphon welwitschii</i> UH IC-52-3 (KJ767019.1)	92,2	92,5	91,5	91,5	91,6	91,6	100	99,9							
10		CAVN2443	91,1	91,2	91,0	90,8	90,6	90,6	98,6	98,5	98,6						
11		CAVN4303	90,9	91,1	90,8	90,7	90,5	90,5	98,5	98,3	98,5	100					
12		<i>Westilopsis prolifica</i> SAG 23.96 (AJ544087.1)**	91,1	91,2	91,0	90,8	90,6	90,6	98,6	98,5	98,6	100	99,9				
13		CAVN2505/ CAVN4301	90,8	91,1	91,4	91,2	91,1	91,1	98,3	98,2	98,3	99,0	98,6	98,7			
14		<i>Neowestilopsis persica</i> SA33 (MF066912.1)**	90,8	91,1	91,4	91,2	91,1	91,1	98,3	98,2	98,3	99,0	98,6	98,7	100		

* biểu thị chủng chuẩn; ** biểu thị loài chuẩn

C. Nhóm hình thái III

Dựa vào vị trí trên cây phát sinh chủng - loại thấy rằng 6 chủng VKL thuộc nhóm III được xếp vào 3 nhánh đơn phát sinh tương ứng với 3 chi là *Neowestiellopsis* (2 chủng), *Westiellopsis* (2 chủng) và *Hapalosiphon* (2 chủng).

Đầu tiên, nhánh Neo. gồm có 2 chủng là CAVN2505 và CAVN4301 được xác định thuộc loài *Neowestiellopsis persica* do chúng được nằm cùng nhánh đơn phát sinh cùng chủng *Neowestiellopsis persica* SA33 ở trên cây phát sinh chủng - loại với giá trị bootstrap là 96% và có độ tương đồng 100% về trình tự đoạn gen 16S rRNA so với chủng chuẩn SA33 (Hình 3.10 và Bảng 3.5). Loài *N. persica* là loài chuẩn của chi *Neowestiellopsis*. Ngoài ra chủng *N. persica* SA33 được Kabirnataj và cộng sự phân lập từ mẫu đất ruộng lúa ở tỉnh Mazandaran, Iran có nhiều nét tương đồng về đặc điểm hình thái, sinh thái so với hai chủng trong nghiên cứu [Kabirnataj S., 2018].

Thứ hai, nhánh Wes. bao gồm 2 chủng CAVN2443 và CAVN4303 được nằm cùng nhánh đơn phát sinh các chủng tham chiếu thuộc loài *Westiellopsis prolifica* (là loài chuẩn của chi *Westiellopsis*) với giá trị bootstrap đạt 97%. Đồng thời, trình tự đoạn gen 16S rRNA của hai chủng này tương đồng đến 99,9 % và 100% so với hai chủng tham chiếu *W. prolifica* SAG 23.96 (Hình 3.10, Bảng 3.5) [Gugger M.F., 2004]. Điều đó cho thấy chủng CAVN2443 và CAVN4303 thuộc loài *W. prolifica* và được đặt tên tương ứng là chủng *W. prolifica* CAVN2443 và *W. prolifica* CAVN4303.

Cuối cùng, hai chủng CAVN2404 và MD2411 (nhánh Hap.) nằm cùng nhánh phát sinh loài với ba chủng tham khảo thuộc chi *Hapalosiphon* (*Hapalosiphon welwitschii* UH IC-52-3, *Hapalosiphon* sp. IAM M-264 và *Hapalosiphon* sp. SAMA 45) với giá trị bootstrap đạt 99% (Hình 3.10). Trong đó, chủng *H. welwitschii* UH IC-52-3 cũng được phân lập từ mẫu đất ở Úc, cho thấy có môi trường sống tương đồng với của chủng CAVN2404 và MD2411 [Stratmann K., 1994]. Hơn nữa, trình tự đoạn gen 16S rRNA của chủng CAVN2404 và MD2411 tương đồng từ 99,9% đến 100% so với chủng tham chiếu *H. welwitschii* UH IC-52-3 (Bảng 3.4) cho nên hai chủng

này được xác định thuộc loài *Hapalosiphon welwitschii* với tên chủng là *H. welwitschii* CAVN2404 và *H. welwitschii* MD2411.

Bên cạnh đó, trên cây phát sinh chủng - loại, chủng *Westiella intricata* UH HT-29-1 có quan hệ gần gũi với với các chủng tham khảo thuộc chi *Hapalosiphon* (Hình 3.11). Đồng thời, Casamatta và cộng sự (2020) cũng chỉ ra rằng nhiều chủng VKL thuộc họ Hapalosiphonaceae được định danh sai chi do thiếu cơ sở dữ liệu về trên GenBank và các tài liệu khoa học liên quan. Vì vậy, dựa trên mối quan hệ tiến hóa của chủng *Westiella intricata* UH HT-29-1 trên cây phát sinh chủng - loại, chúng tôi đề xuất chủng này cần được định danh lại thuộc loài *Hapalosiphon welwitschia* [Casamatta D.A., 2020].

Tổng kết lại, 50 chủng vi khuẩn lam trong nghiên cứu được định danh vào 24 loài thuộc 10 chi. Trong đó có 34 chủng được xác định danh pháp đến cấp độ loài thuộc 14 loài bao gồm *Aulosira laxa* CAVN2460, *Ahomia soli* CAVN2432, *Desmonostoc lechangense* CAVN5500, *D. meilinense* CAVN6212, *D. linckia* CAVN2522, *D. persicum* CAVN2440, *D. persicum* CAVN2441, *D. persicum* CAVN2442, *D. persicum* CAVN2503, *D. persicum* CAVN8233, *Aliinostoc magnakinetifex* CAVN2402, *A. magnakinetifex* CAVN2437, *A. magnakinetifex* CAVN2438, *A. magnakinetifex* CAVN2489, *A. magnakinetifex* CAVN8241, *A. magnakinetifex* CAVN9301, *A. magnakinetifex* CAVN8232, *A. catenatum* CAVN2434, *A. catenatum* CAVN2435, *A. catenatum* CAVN2436, *A. morphoplasticum* CAVN2501, *A. morphoplasticum* CAVN2502, *A. morphoplasticum* CAVN2512, *A. morphoplasticum* CAVN2439, *A. morphoplasticum* CAVN2463, *Dulcicalothrix necridiiformans* DL12, *Scytonema bilaspurense* DL1, *S. bilaspurense* NK13, *Neowestiellopsis persica* CAVN2505, *N. persica* CAVN4301, *Westiellopsis prolifica* CAVN2443, *W. prolifica* CAVN4303, *Hapalosiphon welwitschii* CAVN2404 và *Hapalosiphon welwitschii* MD2411. Bên cạnh đó, 16 chủng còn lại được xếp vào 10 loài chưa xác định thuộc 4 chi là *Aulosira*, *Desmonostoc*, *Desikacharya* và *Aliinosotoc* do thiếu trình tự tham chiếu của các loài chuẩn. Kết quả này cho thấy tiềm năng đa dạng sinh học cao của VKL phân lập từ

mẫu đất ruộng lúa, đất ven sông ở nước ta, đồng thời đặt nền tảng cho các nghiên cứu sâu hơn về phân loại, hoạt tính sinh học và ứng dụng sau này.

3.2. Đánh giá hoạt tính sinh học của cao chiết tổng số từ vi khuẩn lam

3.2.1. Khối lượng sinh khối và cao chiết

Kết quả thể hiện trong Bảng 3.5 cho thấy sinh khối khô của 50 chủng VKL trong nghiên cứu dao động từ 1.000 mg đến 2.200 mg, trong đó chủng CAVN2512 có sinh khối thấp nhất, còn chủng XN1103 thu được lượng sinh khối nhiều nhất (Bảng 3.5).

Bảng 3.5. Sinh khối khô, khối lượng cao chiết và hiệu suất tách chiết

STT	Chủng	Sinh khối (mg)	Khối lượng cao chiết (mg)
1.	CAVN0801	1.900	302
2.	CAVN2460	1.900	172
3.	CAVN8202	1.400	250
4.	XN1103	2.200	202
5.	CAVN2432	1.700	186
6.	CAVN2403	1.200	256
7.	CAVN2513	1.700	245
8.	CAVN2525	1.300	203
9.	CAVN2560	1.100	197
10.	CAVN6515	2.000	260
11.	CAVN8213	1.700	166
12.	CAVN5500	2.100	224
13.	CAVN2522	1.000	132
14.	CAVN6212	1.700	308

STT	Chủng	Sinh khối (mg)	Khối lượng cao chiết (mg)
15.	CAVN8204	1.300	162
16.	NK1813	1.100	217
17.	CAVN2440	1.100	101
18.	CAVN2441	2.100	445
19.	CAVN2442	1.000	77
20.	CAVN8233	1.200	198
21.	CAVN2503	2.100	349
22.	CAVN2490	2.000	325
23.	NS2000	1.900	296
24.	CAVN8241	1.700	262
25.	PM3	2.100	325
26.	CAVN2437	1.800	172
27.	CAVN9301	1.800	273
28.	CAVN2438	1.100	239
29.	CAVN2489	1.400	270
30.	CAVN2402	1.600	281
31.	CAVN8232	1.300	167
32.	CAVN8241	1.400	131
33.	CAVN2434	2.000	172
34.	CAVN2435	1.600	205
35.	CAVN2436	1.800	198
36.	CAVN8235	2.000	290

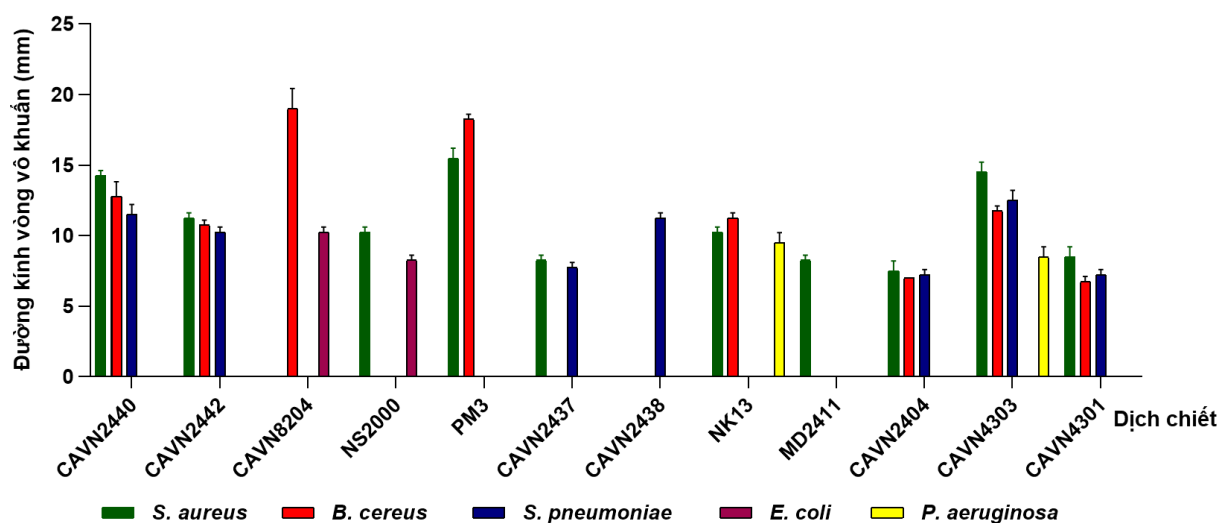
STT	Chủng	Sinh khối (mg)	Khối lượng cao chiết (mg)
37.	CAVN2512	1.000	99
38.	CAVN2439	1.400	159
39.	CAVN2501	2.000	261
40.	CAVN2502	1.900	247
41.	CAVN2463	1.900	167
42.	NK13	2.000	270
43.	DL1	1.100	214
44.	DL12	1.600	190
45.	MD2411	1.400	260
46.	CAVN2404	1.200	223
47.	CAVN2443	1.100	192
48.	CAVN4303	1.100	250
49.	CAVN2505	1.200	202
50.	CAVN4301	1.100	122

Sau đó, sinh khối khô của các chủng sẽ được tách chiết trong hỗn hợp dung môi EtOAc và MeOH (theo tỷ lệ 1:1) để thu dịch chiết tổng số. Sau đó, các dịch chiết được cô quay để loại bỏ dung môi để thu cao chiết tổng số của mỗi chủng. Khối lượng cao chiết tổng của các chủng có độ dao động lớn từ 77 mg (chủng CAVN2442) đến 445 mg (CAVN2441) (Bảng 3.5).

3.2.2. Hoạt tính kháng khuẩn của các cao chiết

Cao chiết tổng số từ 50 chủng VKL được đánh giá khả năng ức chế đối với 5 chủng vi khuẩn gây bệnh trên người bao gồm *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27852 bằng phương

pháp khuếch tán đĩa thạch ở hàm lượng 2 mg cao chiết/ đĩa giấy. Kết quả đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết tổng số từ các chủng VKL được thể hiện ở biểu đồ Hình 3.11 và Phụ lục 7.



Hình 3.11. Hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết tổng số từ 12 chủng VKL

Hoạt tính yếu: $6 \text{ mm} \leq D < 10 \text{ mm}$; Hoạt tính trung bình: $10 \text{ mm} \leq D < 15 \text{ mm}$;

Hoạt tính mạnh: $D \geq 15 \text{ mm}$ [Pham T.L.H., 2017]

Trong số 50 cao chiết tổng số có 12 cao chiết (tương ứng tỷ lệ 24%) thể hiện khả năng ức chế được ít nhất một chủng vi khuẩn kiểm định với đường kính vòng vô khuẩn dao động từ 6,8 đến 19,0 mm. Tỷ lệ này cao hơn 1,7 lần so với tỷ lệ 14% các chủng VKL có hoạt tính kháng khuẩn được ghi nhận trong nghiên cứu của Ghasemi và cộng sự (2003), khi sàng lọc hoạt tính kháng khuẩn của 150 chủng VKL phân lập từ mẫu đất ruộng lúa tại Iran [Ghasemi Y., 2003]. Đồng thời, nó cũng cao hơn 1,2 lần so với kết quả nghiên cứu của Jaki và cộng sự (1999) khi sàng lọc được 18 trong số 86 cao chiết từ 43 chủng VKL phân lập từ các hệ sinh thái khác nhau ở Thụy Điển có hoạt tính kháng khuẩn (chiếm 20,9%) [Jaki B., 1999].

Trong số 12 cao chiết có hoạt tính kháng khuẩn, cao chiết từ chủng *Westiellopsis prolifica* CAVN4303 có khả năng ức chế phổ rộng trên 4 chủng vi khuẩn kiểm định với đường kính vòng vô khuẩn từ 8,5 - 14,5 mm; tiếp theo cao chiết từ 5 chủng VKL *Desmonostoc persicum* CAVN2440, *D. persicum* CAVN2442, *Scytonema*

bilaspurensis NK13, *Hapalosiphon welwitschii* CAVN2404 và *Neowestiellopsis persica* CAVN4301 ức chế được 3 chủng vi khuẩn kiểm định; cao chiết từ 4 chủng bao gồm chủng *Desmonostoc* sp. CAVN8204, *Desikacharya* sp. NS2000; *Desikacharya* sp. PM3 và *Aliinostoc magnakinetifex* CAVN2437 ức chế được 2 chủng vi khuẩn và 2 cao chiết *A. magnakinetifex* CAVN2438, *Hapalosiphon welwitschii* MD2411 chỉ ức chế yếu vi khuẩn *S. aureus* với đường kính vòng vô khuẩn là 8,3 mm (Hình 3.11).

Đồng thời, kết quả Hình 3.11 cũng chỉ ra rằng cao chiết tổng số từ các chủng VKL thể hiện khả năng ức chế vi khuẩn Gram dương mạnh hơn so với vi khuẩn Gram âm. Cụ thể, có đến 10 cao chiết ức chế được vi khuẩn *S. aureus*, 8 cao chiết ức chế vi khuẩn *B. cereus* và 7 cao chiết ức chế vi khuẩn *S. pneumoniae*. Đáng chú ý là cao chiết từ chủng *Desmonostoc* sp. CAVN8204 thể hiện hoạt tính ức chế mạnh nhất vi khuẩn *B. cereus* với đường kính vòng vô khuẩn đạt 19,0 mm, cao chiết từ chủng *Desikacharya* sp. PM3 ức chế mạnh hai loại vi khuẩn *S. aureus* và *B. cereus* với đường kính vòng vô khuẩn từ 15,5 đến 18,0 mm. Ngược lại, chỉ có cao chiết từ 2 chủng VKL có hoạt tính ức chế yếu đối với vi khuẩn *P. aeruginosa* với đường kính vòng vô khuẩn từ 8,5 mm - 10,5 mm và 1 cao chiết ức chế vi khuẩn *E. coli* với đường kính vòng vô khuẩn đạt 8,3 mm (Hình 3.11). Kết quả này hoàn toàn tương đồng với nghiên cứu của Jaki (1999), Ghasemi (2003), Soltani (2005) [Jaki B., (1999); Ghasemi Y., 2003; Soltani N., 2005]. Theo Soltani và cộng sự (2005), vi khuẩn Gram dương thường nhạy cảm hơn với các hợp chất kháng khuẩn do cấu trúc thành tế bào của chúng chủ yếu bao gồm lớp peptidoglycan dày, nhưng không có lớp màng ngoài chứa LPS bảo vệ [Soltani N., 2005]. Ngược lại, tế bào của vi khuẩn Gram âm có lớp màng ngoài chứa LPS, giúp bảo vệ tế bào khỏi tác động của nhiều loại kháng sinh và hợp chất kháng khuẩn [Sciuto K., 2015]. Ngoài ra, một số hợp chất kháng khuẩn từ VKL có thể ức chế sự phát triển của vi khuẩn thông qua cơ chế phá vỡ tính toàn vẹn của màng tế bào, tác động trực tiếp lên lớp peptidoglycan hoặc màng tế bào. Do không có lớp màng ngoài bảo vệ nên vi khuẩn Gram dương dễ bị tác động hơn so với vi khuẩn Gram âm [Kar J., 2022].

3.2.3. Hoạt tính ức chế tế bào ung thư của các cao chiết

Cao chiết tổng số từ 50 chủng VKL được đánh giá mức độ tác động lên tỷ lệ sống của tế bào HeLa bằng phương pháp limit test. Kết quả cho thấy trong số 50 cao chiết tổng số có 7 cao chiết thể hiện hoạt tính gây độc lên tế bào HeLa, trong đó có 4 cao chiết tiềm năng là CAVN8204, NK13, CAVN4301, CAVN4303; 1 cao chiết ít tiềm năng (MD2411) và 2 cao chiết không gây chết đáng kể đối với tế bào HeLa (CAVN2440 và NS2000) (Bảng 3.6). Đồng thời, 43 cao chiết còn lại không ảnh hưởng đến khả năng sống của tế bào HeLa ở nồng độ 100 µg/ml (Phụ lục 7). Sau đó, 5 cao chiết tiềm năng và ít tiềm năng được pha loãng ở các dải nồng độ thích hợp để đánh giá độc tính trên dòng tế bào HeLa bằng thử nghiệm MTT để xác định giá trị IC₅₀ của mỗi cao chiết.

Bảng 3.6. Khả năng gây độc của cao chiết từ 7 chủng VKL lên tế bào HeLa

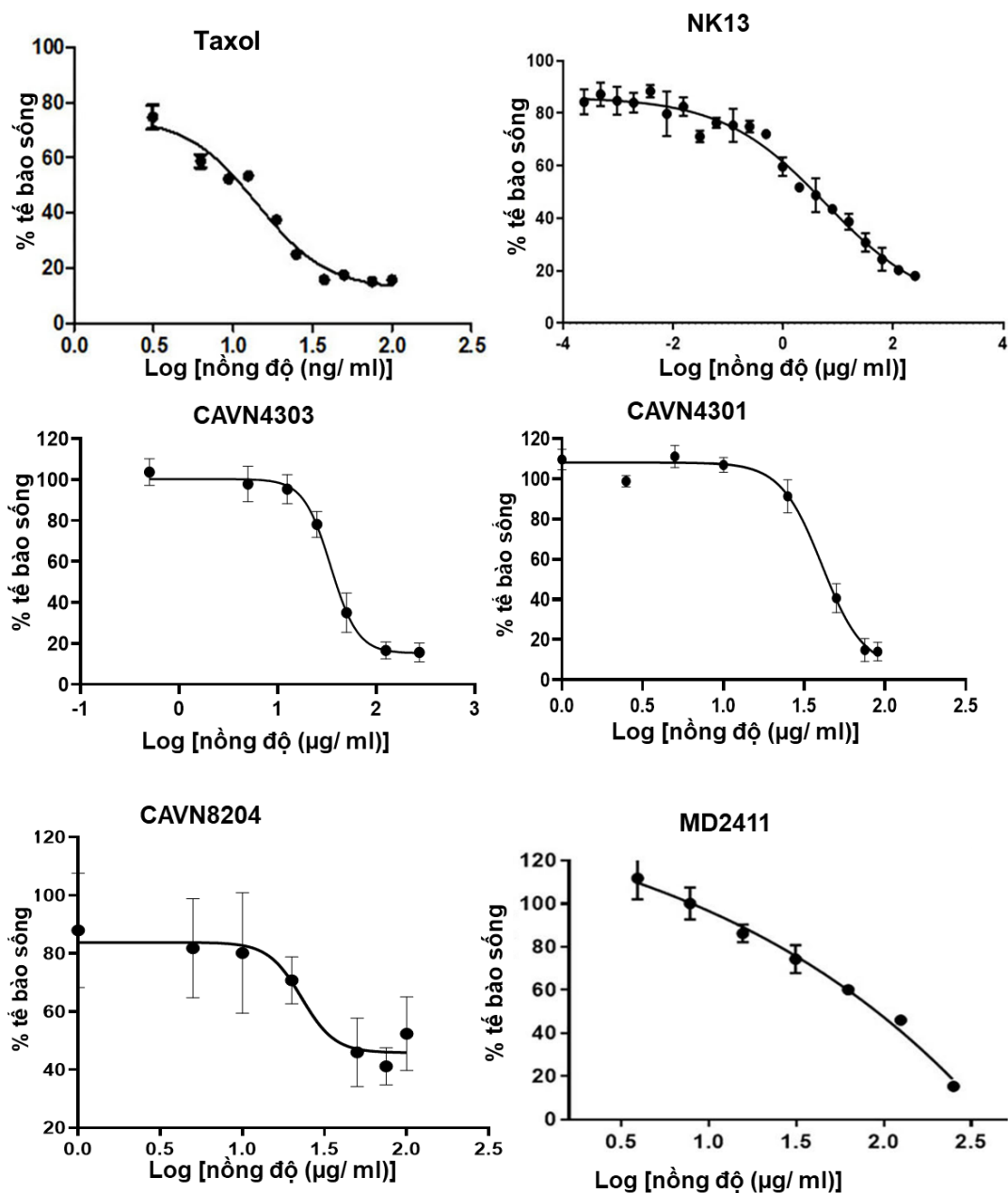
STT	Cao chiết	Nồng độ cao chiết (µg/ml)				Đánh giá
		1	10	50	100	
1.	NK13	++	+++	+++	+++	Tiềm năng
2.	CAVN4301	-	+	+++	+++	Tiềm năng
3.	CAVN4303	-	+	+++	+++	Tiềm năng
4.	CAVN8204	-	+	+++	+++	Tiềm năng
5.	MD2411	-	-	+	++	Ít tiềm năng
6.	CAVN2440	-	-	-	+	Không tiềm năng
7.	NS2000	-	-	-	+	Không tiềm năng

-: không tác động; +: < gây chết 10% tổng tế bào; ++: gây chết 10 - 60% tổng số tế bào;

+++ : gây chết > 60% tổng số tế bào

Kết quả thử nghiệm MTT cho thấy, cả 5 cao chiết đều gây độc cho tế bào HeLa với giá trị IC₅₀ dao động từ 3,8 µg/ml đến 91,1 µg/ml (Bảng 3.8; Hình 3.12). Độc tính của Taxol lên tế bào HeLa ở giá trị IC₅₀ là 12 ng/ml, kết quả này phù hợp với kết quả đã được công bố trong các nghiên cứu của Nguyen B.L.T. (2021) và Sun (2019).

Đáng chú ý là biểu đồ đường cong đáp ứng liều của cao chiết từ chủng *S. bilaspurens* NK13 lên tế bào HeLa có xu hướng tương tự như Taxol (Hình 3.12).



Hình 3.12. Độc tính của cao chiết từ 5 chủng VKL lên tế bào HeLa

Theo hướng dẫn phân loại cấp độ gây độc của hợp chất của Hệ thống hài hòa toàn cầu về phân loại và ghi nhãn hóa chất (GHS) của Liên hiệp quốc ban hành năm 2023 [UN, 2023] thấy rằng cao chiết tổng số từ hai chủng *Desmonostoc* sp. CAVN8204 và *H. welwitschii* MD2411 được xếp vào nhóm độc tính cấp 3 (mức độ

gây độc trung bình) trên tế bào HeLa với giá trị IC_{50} lần lượt là 67,9 và 91,1 $\mu\text{g/ml}$; cao chiết từ 2 chủng *W. prolifica* CAVN4303, *N. persica* CAVN4301 được xếp vào nhóm độc tính cấp 2 (mức độ gây độc mạnh) với giá trị IC_{50} lần lượt đạt 34,5 và 40,7 $\mu\text{g/ml}$; đặc biệt cao chiết từ chủng *S. bilaspurensis* NK13 được xếp vào nhóm độc tính cấp 1 (mức độ gây độc cực mạnh) với giá trị IC_{50} là 3,8 $\mu\text{g/ml}$ (Bảng 3.8). Đồng thời, theo tiêu chuẩn của Viện Ung thư Quốc gia Hoa Kỳ (NCI), một cao chiết được đánh giá là có độc tính mạnh khi giá trị $IC_{50} \leq 20 \mu\text{g/ml}$ [Suffness M., 1990], cho thấy cao chiết từ chủng *S. bilaspurensis* NK13 thể hiện độc tính tế bào rất mạnh lên tế bào HeLa.

Bảng 3.7. Giá trị IC_{50} của cao chiết từ 5 chủng VKL lên tế bào HeLa

STT	Cao chiết	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	Phân loại GSH
1.	Taxol	0,012 (14,05 nM)	Cat. 1
2.	NK13	3,8 \pm 0,7	Cat. 1
3.	CAVN4303	34,5 \pm 1,5	Cat. 2
4.	CAVN4301	40,7 \pm 1,4	Cat. 2
5.	CAVN8204	67,9 \pm 5,5	Cat. 3
6.	MD2411	91,1 \pm 5,7	Cat. 3

Cat. 1: $IC_{50} < 5 \mu\text{g/ml}$; Cat. 2: $5 \mu\text{g/ml} < IC_{50} < 50 \mu\text{g/ml}$;

Cat. 3: $50 \mu\text{g/ml} < IC_{50} < 300 \mu\text{g/ml}$.

Sau đó, cao chiết từ chủng *S. bilaspurensis* NK13 (gọi tắt là cao chiết NK13) tiếp tục được lựa chọn để đánh giá độc tính trên hai dòng tế bào ung thư OVCAR-8 (ung thư buồng trứng), A549 (ung thư phổi) và hai dòng tế bào thường là HaCaT và HEK293 để xác nhận lại hoạt tính gây độc mạnh của cao chiết này. Kết quả độc tính của cao chiết NK13 lên 4 dòng tế bào được thể hiện ở Hình 3.13 và Bảng 3.8.

Kết quả ở Hình 3.13 và Bảng 3.8 chỉ ra rằng, cao chiết NK13 đều có khả năng gây độc trên cả 4 dòng tế bào ở nhóm nguy cơ cấp 1 và nguy cơ cấp 2 dựa theo thang phân loại của GHS với giá trị IC_{50} dao động từ 0,6 đến 34,2 $\mu\text{g/ml}$. Điều đó cho thấy cao chiết từ chủng *S. bilaspurensis* NK13 có khả năng sinh hoạt chất gây độc mạnh trên phổ rộng với nhiều dòng tế bào. Đáng chú ý là cao chiết NK13 gây độc cực mạnh lên tế bào HEK293 với giá trị IC_{50} là 0,6 $\mu\text{g/ml}$ nhưng trong khoảng nồng độ từ 0,7 -

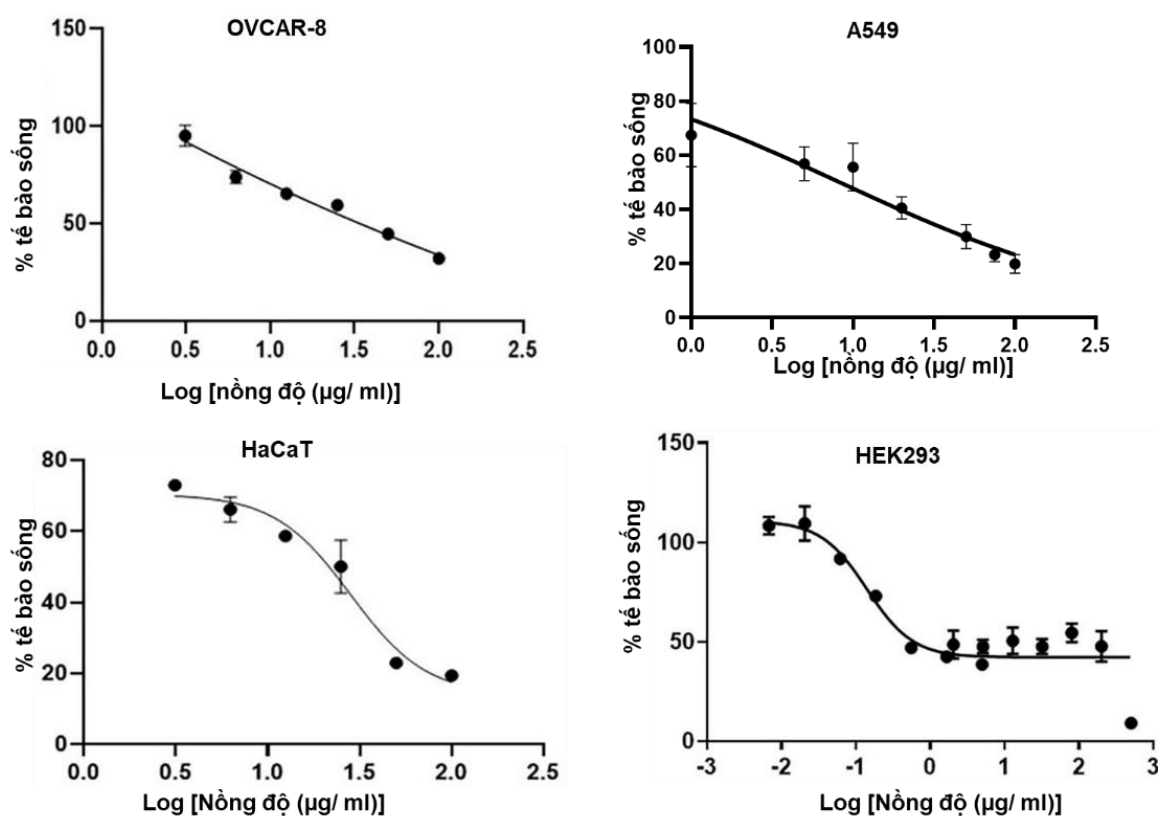
30,0 µg/ml, tỷ lệ sống sót của tế bào HEK293 luôn duy trì ở mức 42% cho thấy cao chiết NK13 có thể gây ra tác động lên sự tăng sinh của tế bào HEK293 trong khoảng nồng độ này (Hình 3.13).

Bảng 3.8. Giá trị IC₅₀ của cao chiết NK13 lên 5 dòng tế bào

Dòng tế bào	IC ₅₀ (µg/ml)	Phân loại GSH
HeLa	3,8 ± 0,7	Cat. 1
HEK293	0,6 ± 0,5	Cat. 1
A549	8,3 ± 0,9	Cat. 2
HaCaT	21,6 ± 3,2	Cat. 2
OVCAR-8	34,2 ± 2,7	Cat. 2

Cat. 1: IC₅₀ < 5 µg/ml; Cat. 2: 5 µg/ml < IC₅₀ < 50 µg/ml;

Cat. 3: 50 µg/ml < IC₅₀ < 300 µg/ml.



Hình 3.13. Độ độc tính của cao chiết NK13 lên 4 dòng tế bào

Kết quả trên cho thấy hoạt tính gây độc tế bào của cao chiết từ chủng *S. bilaspurensis* NK13 chưa thể hiện rõ tính tác động chọn lọc giữa tế bào ung thư và tế bào thường. Cụ thể, cao chiết NK13 gây độc mạnh trên tế bào HeLa ($IC_{50} = 3,8 \mu\text{g/ml}$), đồng thời cũng ức chế đáng kể các dòng tế bào ung thư khác như A549 và OVCAR-8 với giá trị IC_{50} lần lượt là 8,3 và 20,6 $\mu\text{g/ml}$; nhưng cao chiết này cũng gây độc mạnh trên các dòng tế bào thường HEK293 và HaCaT với IC_{50} tương ứng là 0,6 và 21,6 $\mu\text{g/ml}$. Điều này cho thấy cao chiết NK13 có phổ tác động gây độc tế bào rộng, song chưa chứng minh được khả năng ưu tiên tiêu diệt tế bào ung thư.

Trên cơ sở dữ liệu của CyanoMetDB phiên bản 3 (cập nhật đến tháng 9 năm 2024), đến nay đã có hơn 3.000 hợp chất được phát hiện từ VKL, trong đó có hơn 400 hợp chất phân lập từ các chủng VKL thuộc chi *Noctoc*; khoảng hơn 100 hợp chất phân lập từ hai chi *Hapalosiphon* và *Westiellopsis* và 75 hợp chất phân lập từ chi *Scytonema* [Janssen E.M.-L., 2024] cho thấy tiềm năng phát hiện hợp chất có hoạt tính sinh học mới từ các chủng VKL thuộc những chi này. Nhiều hợp chất như scytophycin, tolytoxin, tubercidin, nostodione A, scytonemide A, B và scytoscalarol thể hiện độc tính mạnh trên một số dòng tế bào ung thư khác nhau được phân lập từ một số loài thuộc chi *Scytonema* như *S. saleyeriense*, *S. ocellatum*, *S. mirabile*, *S. burmanicum* và *S. hofmannii* [Carmeli, S., 1990; Furusawa E., 1994; Patterson G.M., 1993; 1994; Shim S.H., 2008]. Thêm vào đó, nghiên cứu của Gigova và cộng sự (2011) đã chỉ ra rằng cao chiết tổng số từ chủng *Scytonema ocellatum* có khả năng ức chế tế bào HeLa với giá trị $IC_{50} < 30 \mu\text{g/ml}$ [Gigova L., 2011]. Nghiên cứu của Nehul và cộng sự (2024) cho thấy cao chiết nước từ chủng VKL thuộc loài *Scytonema schmidtii* phân lập ở mẫu đất tỉnh Ahmednagar, Ấn Độ thể hiện độc tính trên dòng tế bào HeLa với giá trị IC_{50} là 55 $\mu\text{g/ml}$ [Nehul J.N., 2024]. Tuy nhiên, cho đến nay chưa có nghiên cứu nào đánh giá hoạt tính gây độc tế bào từ loài *S. bilaspurensis* được công bố. Trong khi đó cao chiết tổng số từ chủng *S. bilaspurensis* NK13 trong nghiên cứu có độc tính trên tế bào ung thư HeLa ở giá trị IC_{50} là 3,8 $\mu\text{g/ml}$ mạnh hơn so với các cao chiết từ các loài khác thuộc chi *Scytonema* đã công bố.

Ngoài ra, nhiều nghiên cứu ở Việt Nam đã cho thấy tiềm năng phát hiện các chủng VKL có khả năng sinh tổng hợp các hợp chất có hoạt tính kháng khuẩn, kháng ung thư mạnh. Chẳng hạn, nghiên cứu của Phạm Lương Hằng và cộng sự (2017) đã

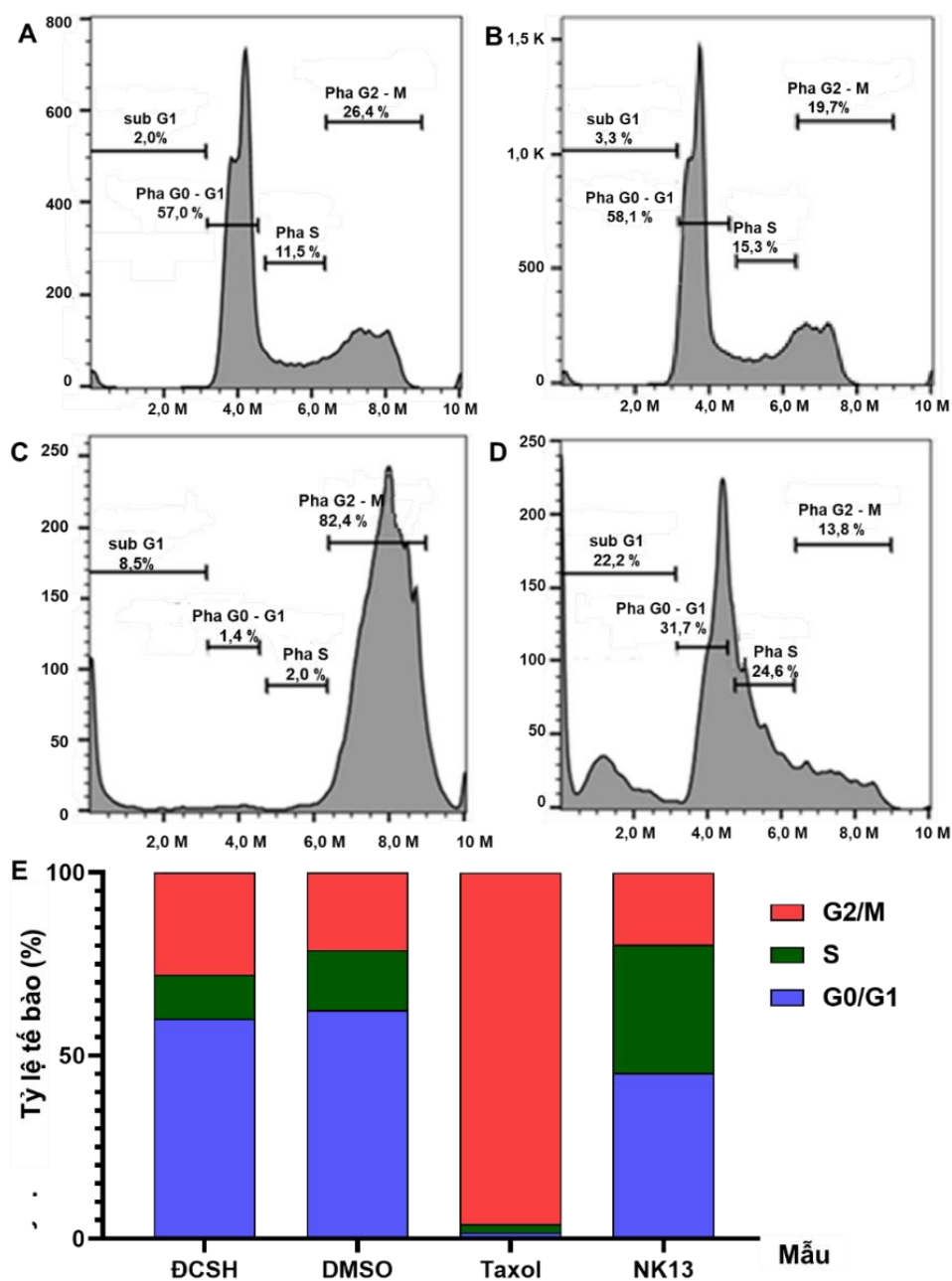
sàng lọc được 11 trong 13 chủng VKL thuộc họ *Nostoc* phân lập từ đất ruộng lúa có khả năng ức chế được cả vi khuẩn Gram dương và Gram âm và 3 chủng ức chế dòng tế bào ung thư vú và ung thư đại trực tràng với giá trị IC_{50} từ 47,8 $\mu\text{g/ml}$ đến 232 $\mu\text{g/ml}$ [Pham T.L.H., 2017]. Nhóm hợp chất Carbamidocyclophanes phát hiện từ chủng *Nostoc* sp. CAVN2 và *Nostoc* sp. CAVN10 phân lập ở Việt Nam thể hiện hoạt tính kháng khuẩn và gây độc tế bào mạnh [Bui H.T., 2007; Preisitsch M., 2015; 2016] cho thấy tiềm năng phát hiện những hợp chất mới có hoạt tính sinh học từ các chủng VKL bản địa.

Tổng hợp lại, nghiên cứu đã phát hiện được 12 chủng từ 50 chủng VKL đã phân lập có khả năng tổng hợp được hợp chất ức chế ít nhất một trong bốn chủng vi khuẩn gây bệnh phổ biến trên người, trong đó cao chiết tổng số từ chủng *Desmonostoc* sp. CAVN8204 thể hiện khả năng ức chế mạnh nhất trên chủng vi khuẩn *B. cereus* với đường kính vòng vô khuẩn đạt 19,0 mm. Cả bảy cao chiết có độc tính trên tế bào ung thư HeLa đều thể hiện hoạt tính kháng khuẩn. Cao chiết tổng số từ 5 chủng VKL *Desmonostoc* sp. CAVN8204, *H. welwitschii* MD2411, *N. persica* CAVN4301, *W. prolifica* CAVN4303 và *S. bilaspurensis* NK13 gây độc tế bào ung thư HeLa ở nhóm độc tính cấp 1 đến cấp 3. Nổi trội nhất là cao chiết tổng số từ chủng *S. bilaspurensis* NK13 gây độc trên tế bào HeLa với giá trị IC_{50} là 3,8 $\mu\text{g/ml}$, đồng thời kháng được cả vi khuẩn Gram dương và Gram âm với đường kính vòng vô khuẩn từ 9,5 - 11,3 mm. Cao chiết NK13 được lựa chọn để tiếp tục nghiên cứu làm sáng tỏ cơ chế gây chết đối với tế bào HeLa ở cấp độ phân tử và tế bào. Đồng thời, chủng *S. bilaspurensis* NK13 được nuôi sinh khối với thể tích lớn để đảm bảo thu đủ lượng sinh khối khô cho thí nghiệm phân tách và xác định thành phần hợp chất gây độc trên tế bào ung thư HeLa.

3.3. Cơ chế tác động của cao chiết NK13 lên tế bào HeLa

3.3.1. Tác động lên chu trình tế bào HeLa

Kết quả về tỷ lệ phần trăm tế bào ở các pha sub-G1, G0/G1, S và G2/M và tỷ lệ phần trăm tế bào phân bố ở mỗi pha trong chu trình tế bào trong quần thể singlet (tập hợp các tế bào đơn lẻ) được thể hiện ở Hình 3.14.

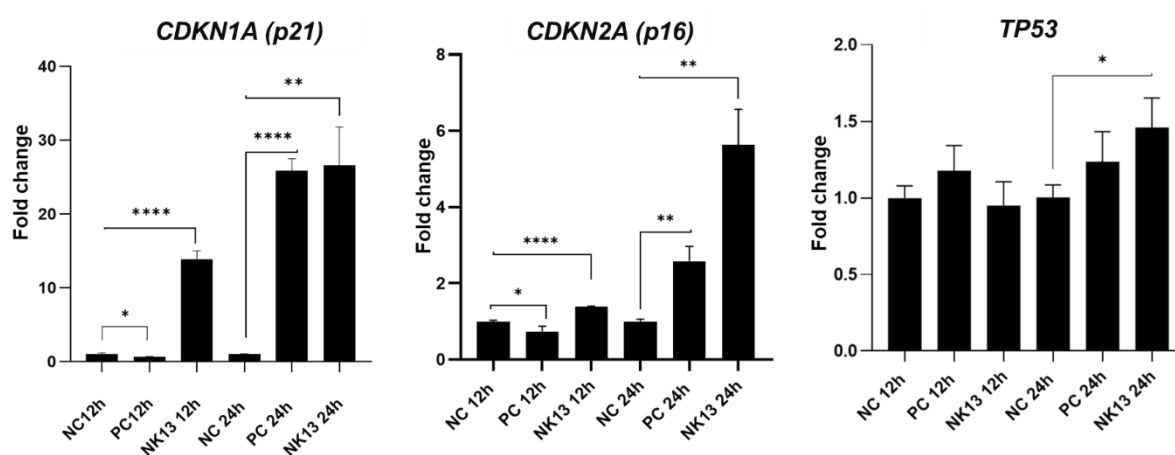


Hình 3.14. Tác động của cao chiết NK13 lên chu trình tế bào HeLa

Tỷ lệ tế bào HeLa trong các pha của chu trình tế bào ở mẫu ĐCSH (A), ủ với DMSO 0,1% (B), ủ với Taxol nồng độ 13,5 ng/ml (C), ủ với cao chiết NK13 ở nồng độ 3,8 µg/ml (D); so sánh tỷ lệ tế bào trong các pha G0/G1, S và G2/M giữa các mẫu (E)

Kết quả cho thấy cao chiết NK13 gây bắt giữ chu trình tế bào rõ rệt tại pha S với tỷ lệ tế bào bị giữ sau 48 giờ đạt 24,6%. Trong khi đó, tỷ lệ tế bào tại pha S ở các nhóm ĐCSH (tế bào không xử lý), xử lý với DMSO 0,1% và Taxol nồng độ 13,5 ng/ml (giá trị IC₅₀) lần lượt là 11,5%; 15,3% và 2,0%. Ngược lại, Taxol lại gây ức chế

quá trình phân bào bằng cách gây bắt giữ tế bào tại pha G2/M với tỷ lệ tế bào bị giữ lại đạt 82,6% cao hơn hẳn so với các nhóm còn lại. Ngoài ra, tỷ lệ tế bào tại pha sub-G1 trong mẫu tế bào ủ với cao chiết NK13 đạt 22,2% - cao hơn đáng kể so với nhóm tế bào không xử lý (2,0%) và tế bào ủ với DMSO (3,3%) (Hình 3.14). Mặc dù sự tăng tỷ lệ tế bào ở pha sub-G1 không thể sử dụng trực tiếp làm chỉ thị để xác định tế bào chết theo chương trình (apoptosis), nhưng kết quả này gợi ý khả năng quá trình apoptosis đang diễn ra.



Hình 3.15. Mức độ biểu hiện gen điều hòa chu trình tế bào HeLa

NC: đối chứng âm; PC: Taxol 1,8 ng/ml (Đối chứng dương);

*, **, *** mức độ tin cậy với giá trị $P < 0,05$; $0,01$; $0,001$

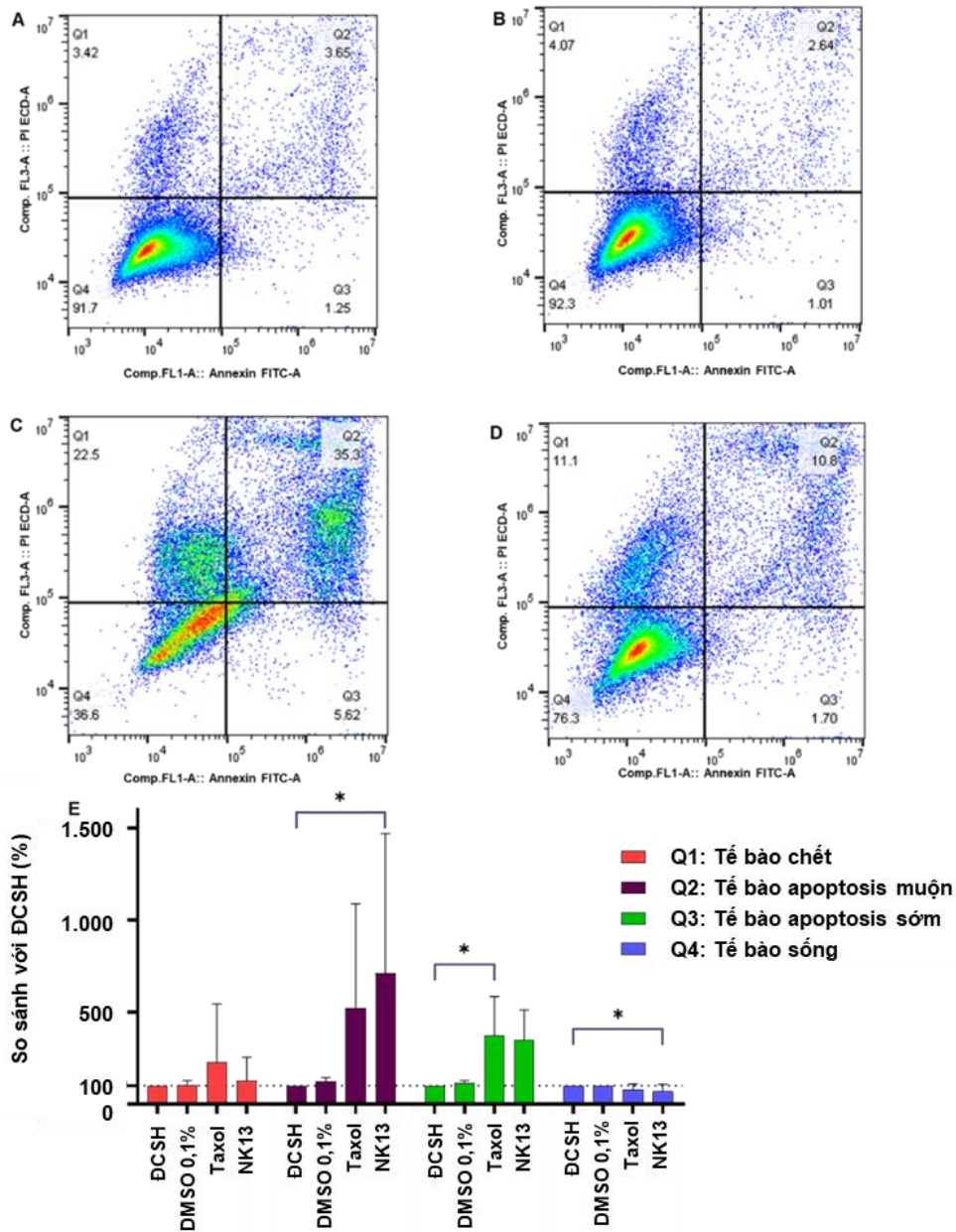
Bên cạnh đó, kết quả phân tích mức độ biểu hiện của các gen điều hòa chu trình tế bào cho thấy rằng mức độ biểu hiện của các gen *CDKN1A (p21)* và *CDKN2A (p16)* tăng lên đáng kể ở thời điểm 12 giờ và 24 giờ sau khi tế bào ủ với cao chiết NK13 ở nồng độ 0,12 $\mu\text{g/ml}$ (giá trị IC_{10}) tương ứng lần lượt 12 lần và 1,5 lần (tại thời điểm 12 giờ) và 27 lần và 5,7 lần (tại thời điểm 24 giờ) so với mẫu tế bào ủ với DMSO 0,1% (đối chứng âm) (Hình 3.15). Trong khi đó, mức độ biểu hiện của gen *TP53* không có sự khác biệt ở thời điểm 12 giờ giữa nhóm tế bào được xử lý với cao chiết NK13 và tế bào xử lý với DMSO 0,1%; tuy nhiên, sau 24 giờ, mức độ biểu hiện của gen *TP53* ở mẫu tế bào ủ với cao chiết NK13 tăng 1,4 lần so với mẫu đối chứng (Hình 3.15). Bên cạnh đó, biểu hiện của các gen này ở mẫu được ủ với Taxol (đối chứng dương) ở nồng độ 1,8 ng/ml không thấy có sự khác biệt so với mẫu đối chứng âm (NC) tại thời điểm 12 giờ. Tuy nhiên, đến thời điểm 24h ủ thuốc (Taxol), mức độ

phiên mã của gen *CDKN1A* (*p21*) và *CDKN2A* (*p16*) cao hơn so với mẫu đối chứng âm tương ứng là 28 lần và 2,8 lần; tuy nhiên không thấy sự khác biệt về biểu hiện của gen *TP53* (Hình 3.15). Kết quả này hoàn toàn phù hợp với kết quả đánh giá về tỷ lệ tế bào HeLa bị bất giữ các pha của chu trình tế bào. Qua đó có thể chứng minh cao chiết NK13 có tác động điều hòa chu trình tế bào thông qua việc kích hoạt các gen ức chế tăng sinh tế bào như gen *CDKN1A* (*p21*) và *CDKN2A* (*p16*). Sự khác biệt về mức độ biểu hiện của *TP53* giữa các thời điểm và giữa các mẫu cũng cho thấy khả năng cao chiết NK13 có thể điều hòa chu kỳ tế bào thông qua cơ chế riêng, không hoàn toàn phụ thuộc vào *TP53*.

Mặc dù p53 thường gây ngừng chu trình tế bào thông qua cảm ứng tổn thương DNA, trong nghiên cứu này, cao chiết NK13 và Taxol lại không ảnh hưởng đến mức độ biểu hiện của gen này. Tuy nhiên, cả hai chất này đều làm tăng mạnh biểu hiện của gen *CDKN1A* (*p21*) và *CDKN2A* (*p16*) là hai gen mã hóa protein ức chế kinase phụ thuộc cyclin (CDK), qua đó gây ngừng chu trình tế bào. Các protein cyclin và CDK cũng đóng vai trò quan trọng trong điều hòa chu trình tế bào, đặc biệt trong quá trình phân bào, và việc cảm ứng p21 và p16 có thể dẫn đến bất hoạt CDK, gây ngừng chu trình tại pha sớm (pha S). Một số nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng gen *CDKN1A* có thể được hoạt hóa và gây ngừng chu kỳ tế bào tại pha G1 thông qua cơ chế không phụ thuộc gen *TP53* [Ho C.J., 2019, Jeong J.H., 2010]. Bên cạnh đó, Koster và cộng sự (2011) cũng cho thấy Taxol có khả năng gây chết tế bào theo chương trình không phụ thuộc p53 [Koster R., 2011]. Vì vậy, từ kết quả nghiên cứu này có thể đưa giả thuyết rằng cao chiết NK13 điều hòa chu trình tế bào thông qua việc tăng mức độ biểu hiện gen *CDKN1A* và *CDKN2A* theo cơ chế không phụ thuộc *TP53*. Hai gen này có khả năng bất hoạt các kinase phụ thuộc cyclin (CDK), từ đó làm gián đoạn hoạt động của các cyclin cần thiết cho các pha trong chu trình tế bào, đặc biệt là ngăn cản quá trình nguyên phân, dẫn đến ngừng chu trình tế bào ở pha S.

3.3.2. Tác động lên con đường apoptosis của tế bào HeLa

Kết quả đánh giá tác động của dịch chiết NK13 lên sự chết theo chương trình của tế bào HeLa được thể hiện ở Hình 3.16.

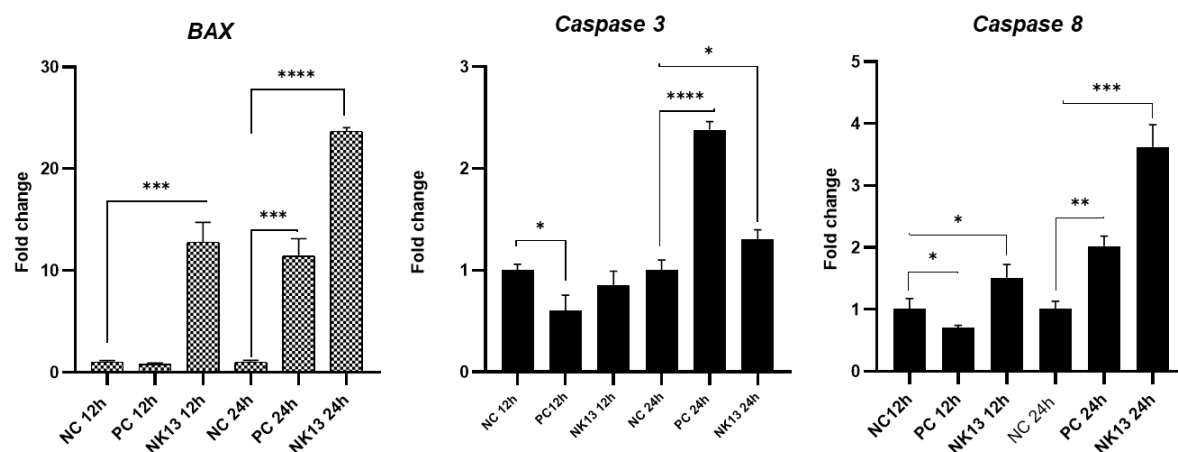


Hình 3.16. Tác động của cao chiết NK13 lên con đường apoptosis của tế bào HeLa
*A: Không xử lý; B: tế bào được ủ với DMSO 0,1% (ĐC âm); C: Taxol nồng độ 13,5 ng/ml; D: Cao chiết NK13 nồng độ 3,8 µg/ml; E: So sánh tỷ lệ tế bào chết ở các giai đoạn khi ủ với cao chiết NK13 so với mẫu đối chứng, * mức độ tin cậy với giá trị $P < 0,05$*

Cao chiết NK13 được đánh giá là có hiệu quả gây nên sự chết theo chương trình (apoptosis) của tế bào HeLa ở nồng độ 3,8 µg/ml (giá trị IC_{50}). Kết quả phân tích dòng chảy tế bào cho thấy tỷ lệ tế bào bị hoại tử (Q1), tế bào bị apoptosis muộn (Q2), apoptosis sớm (Q3) và tế bào sống (Q4) của tế bào HeLa khi được ủ với cao chiết NK13 lần lượt là 11,1%; 10,8%; 1,7% và 76,3% (Hình 3.18). Cao chiết NK13 thể

hiện tác động gây ra sự chết theo chương trình (apoptosis), thể hiện ở tỷ lệ tế bào HeLa trong giai đoạn apoptosis (Q2 và Q3) đạt 12,5% cao gấp 3 và 4 lần so với nhóm ĐCSH (tế bào không xử lý) và nhóm tế bào ủ DMSO 0,1%. Bên cạnh đó, Taxol lại thể hiện tác động gây apoptosis mạnh trên tế bào HeLa ở cả pha apoptosis sớm và apoptosis muộn; đặc biệt, tỷ lệ tế bào ở pha apoptosis muộn cao hơn lần lượt là 3,2; 13,1 và 9,8 lần so với các mẫu tế bào ủ với cao chiết NK13, DMSO 0,1% và không xử lý (Hình 3.16).

Quá trình apoptosis được diễn ra theo hai con đường là nội sinh và ngoại sinh. Con đường apoptosis nội sinh được khởi phát bởi sự hoạt hóa của protein tiền apoptosis BAX, dẫn đến sự giải phóng cytochrome C từ ty thể. Trong khi đó, con đường apoptosis ngoại sinh chủ yếu được kích hoạt bởi các tín hiệu ngoài tế bào, từ đó hoạt hóa enzyme CASPASE- 8. Cả hai con đường này đều dẫn đến sự hoạt hóa của CASPASE - 3 (caspase thực thi) - có chức năng phân giải DNA của tế bào, dẫn đến sự chết tế bào. Vì vậy, để làm rõ cơ chế tác động của cao chiết NK13 lên con đường apoptosis của dòng tế bào HeLa, mức độ phiên mã của các gen *BAX*, *CASPASE-3*, và *CASPASE-8* được phân tích bằng kỹ thuật RT - qPCR.



Hình 3.17. Mức độ biểu hiện của gen điều hòa con đường apoptosis của tế bào HeLa

NC: đối chứng âm; PC: Taxol 1,8 ng/ml (Đối chứng dương);

*, **, *** mức độ tin cậy với giá trị $P < 0,05; 0,01; 0,001$

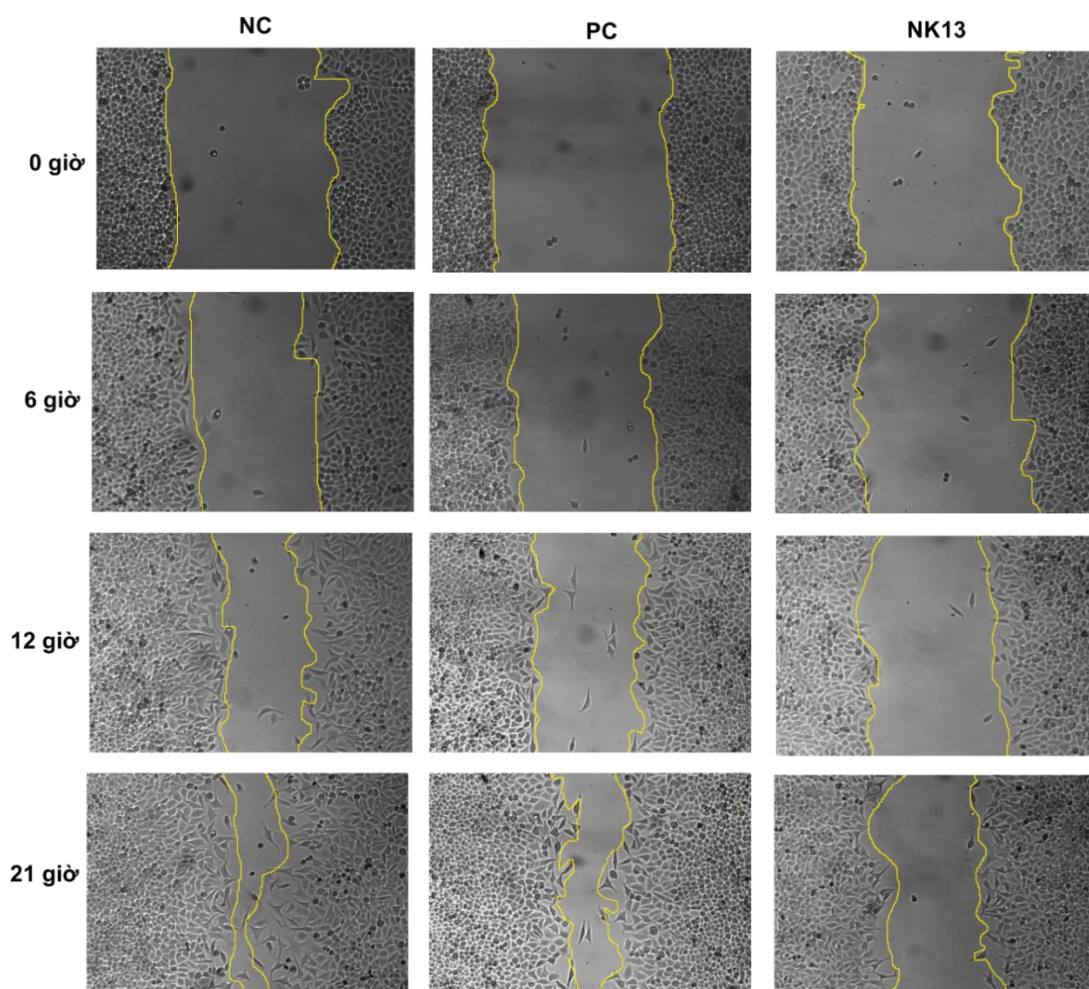
Kết quả cho thấy mức độ biểu hiện của các gen này trên tế bào HeLa đều tăng lên khi được ủ với cao chiết NK13 và sự tăng biểu hiện này có xu hướng phụ thuộc vào thời gian ủ mẫu. Tại thời điểm 12 giờ sau khi ủ mẫu, mức phiên mã của các gen

BAX, *CASPASE-3*, *CASPASE-8* tăng lần lượt 12,5; 0,9 và 1,4 lần so với nhóm tế bào xử lý với DMSO 0,1%. Đến thời điểm 24 giờ, mức độ phiên mã các gen này tăng lên lần lượt là 23,2; 1,3 và 3,8 lần so với mẫu đối chứng âm; và gấp 1,5 đến gần 2,0 lần so với thời điểm 12 giờ. Đáng chú ý là cao chiết NK13 đã kích hoạt con đường apoptosis của tế bào HeLa chủ yếu thông qua việc kích hoạt gen *BAX* và *CASPASE-8* tại thời điểm 12 giờ. Ngược lại, Taxol hầu như không tác động đến biểu hiện ở các gen này ở thời điểm 12 giờ, nhưng lại làm tăng mức độ phiên mã của chúng sau 24 giờ (Hình 3.17). Các kết quả này cho thấy cao chiết NK13 có khả năng kích hoạt cả hai con đường apoptosis nội sinh và ngoại sinh của tế bào HeLa thông qua việc tăng biểu hiện của các gen điều hòa kích hoạt con đường chết theo chương trình của tế bào. Tuy nhiên, cao chiết NK13 cho thấy tác động rõ ràng hơn lên con đường apoptosis nội sinh thông qua sự gia tăng rất nhanh mức độ phiên mã của gen *BAX*.

Một số nghiên cứu đã chứng minh dịch chiết/ hoạt chất phân lập từ VKL có tác động điều hòa mức độ biểu hiện gen liên quan kích hoạt quá trình apoptosis của tế bào ung thư. Chẳng hạn nghiên cứu của Goshtasbi và cộng sự (2025) cho thấy dịch chiết MeOH từ chủng *Chroococcus turgidus* KANI phân lập vùng đất ngập nước ở Iran đã tăng biểu hiện của *BAX* từ đó kích hoạt quá trình apoptosis của dòng tế bào ung thư đại tràng SW-480 [Goshtasbi H., 2025]. Bên cạnh đó, nghiên cứu của Heisnam và cộng sự (2022) chỉ ra rằng phycocyanin từ chủng *Westiellopsis* sp. kích hoạt con đường apoptosis của dòng tế bào ung thư vú MDA MB 231 thông qua hoạt hóa protein *CASPASE - 3* [Heisnam R., 2022]. Hợp chất Scytonemin phân lập từ chủng *Nostoc commune* kích hoạt con đường apoptosis nội sinh dòng tế bào bạch cầu (HL-60 và Jurkat) thông qua việc làm tăng tính thấm của màng ty thể, giải phóng cytochrome c và kích hoạt caspase-9 dẫn đến kích hoạt protein caspase-3/7 chỉ sau 6 giờ ủ mẫu [Zilakova S., 2025]. Mặc dù vậy, chưa có nghiên cứu nào đánh giá tác động của dịch chiết hay hợp chất phân lập từ vi khuẩn lam thuộc chi *Scytonema* lên mức độ biểu hiện của các gen điều hòa con đường apoptosis của tế bào ung thư.

3.3.3. Tác động ức chế khả năng di cư của tế bào HeLa

Kết quả đánh giá tác động của cao chiết NK13 lên khả năng ức chế sự di cư của tế bào HeLa tại thời điểm 6 giờ, 12 giờ và 21 giờ được thể hiện ở Hình 3.18 và 3.19.

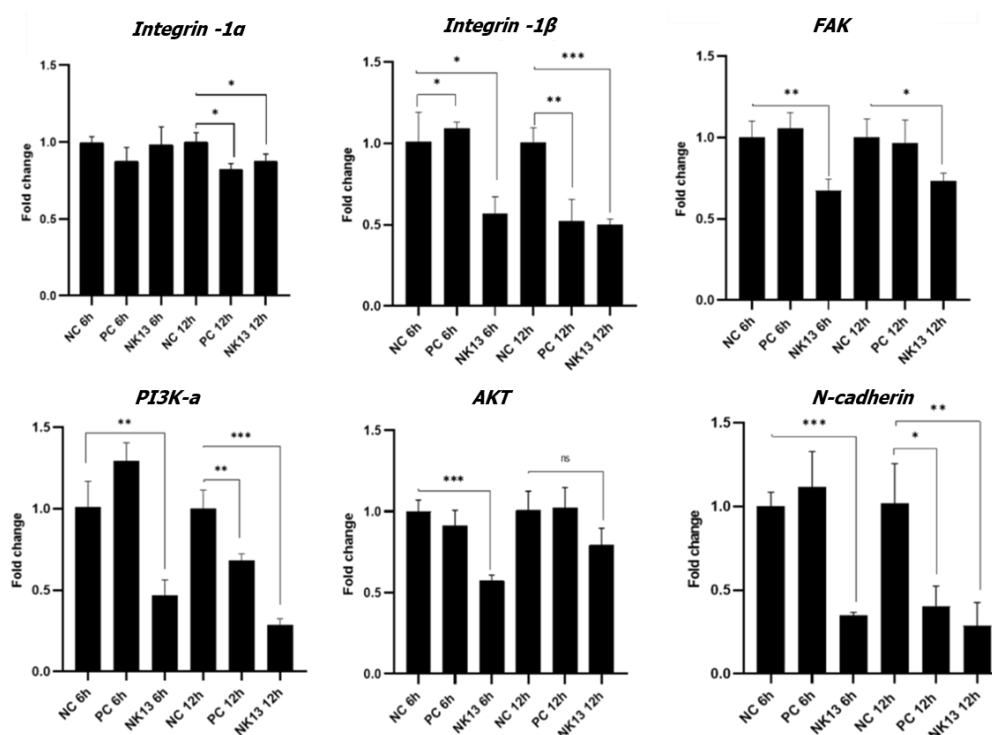


Hình 3.18. Tác động của cao chiết NK13 lên khả năng di cư của tế bào HeLa

NC: đối chứng âm (DMSO 0,1%); PC: Đối chứng dương (Taxol)

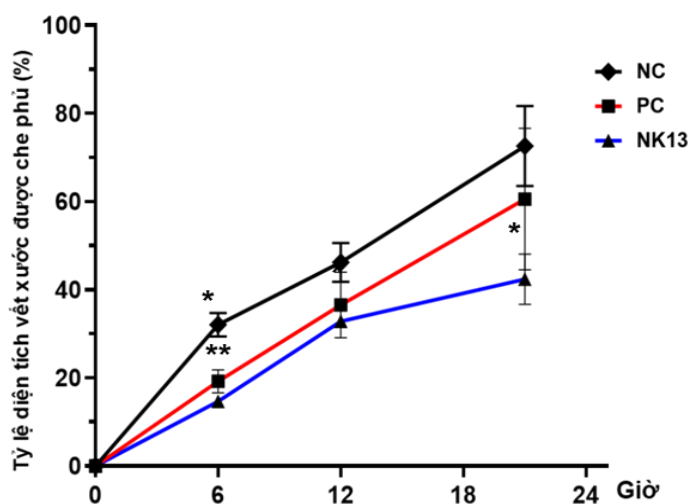
Kết quả chỉ ra rằng, cao chiết NK13 đã ức chế đáng kể khả năng di cư của tế bào HeLa. Tại thời điểm 6 giờ, 12 giờ và 21 giờ, vùng diện tích vết xước được che phủ bởi tế bào HeLa khi ủ với cao chiết NK13 nhỏ hơn lần lượt 2,1; 1,4 và 1,7 lần so với mẫu đối chứng âm. Đáng chú ý là hiệu quả ức chế sự di cư tế bào của tế bào HeLa khi được ủ với cao chiết NK13 tốt hơn so với mẫu tế bào ủ với Taxol (đối chứng dương - PC) thể hiện ở diện tích tế bào HeLa di cư nhỏ hơn khoảng 1,4 lần so với mẫu đối chứng dương tại thời điểm 21 giờ (Hình 3.18; 3.19).

Kết quả đánh giá tác động của cao chiết NK13 lên mức độ biểu hiện của 6 gen *Integrin 1 α* , *Integrin 1 β* , *N-cadherin*, *FAK*, *PI3K* và *AKT* được thể hiện ở Hình 3.19 và 3.20.



Hình 3.19. Mức độ biểu hiện các gen điều hòa quá trình di cư của tế bào HeLa

NC: đối chứng âm (DMSO 0,1%); PC: Đối chứng dương (Taxol)



Hình 3.20. Biểu đồ so sánh diện tích tế bào HeLa di cư

NC: đối chứng âm (DMSO 0,1%); PC: Đối chứng dương (Taxol)

*, ** mức độ tin cậy với giá trị $P < 0,05$; $0,01$

Từ hình 3.19 và 3.20 thấy rằng mức độ biểu hiện gen *Integrin-1 β* và *N-cadherin* ở các tế bào HeLa ủ với cao chiết NK13 đã giảm đáng kể sau 6 giờ và 12 giờ. Từ đó dẫn đến sự giảm biểu hiện của các phân tử tín hiệu *FAK*, *PI3K* và *AKT* (Hình 3.19). Đáng chú ý, tế bào sau 6 giờ ủ với cao chiết NK13, mức phiên mã của các gen *Integrin-1 β* , *N-cadherin*, *FAK*, *PI3K* và *AKT* giảm chỉ còn lần lượt là 50%, 30%, 70%, 50% và 60% so với nhóm đối chứng âm. Trong khi đó, mức độ biểu hiện của gen *Integrin-1 α* không bị ảnh hưởng. Đặc biệt, hiệu quả ức chế này vẫn được duy trì đến thời điểm 12 giờ sau xử lý, cho thấy tác động ổn định của cao chiết NK13 trong việc ức chế biểu hiện các gen này. Ngược lại, Taxol không gây ra sự thay đổi đáng kể nào trong biểu hiện các gen trên sau 6 giờ xử lý. Tuy nhiên, đến thời điểm 12 giờ, bắt đầu cho thấy hiệu quả ức chế của Taxol lên khả năng di cư của tế bào thông qua việc làm giảm mức biểu hiện của các gen *Integrin-1 β* , *N-cadherin*, *FAK*, *PI3K* và *AKT* lần lượt còn 50%, 45%, 80%, 75% và 90% so với nhóm đối chứng (Hình 3.19). Một số nghiên cứu trước đây đã chứng minh rằng quá trình di cư của tế bào ung thư được điều hòa thông qua con đường tín hiệu Integrin/ N-cadherin/ FAK/ PI3K/ AKT [Lien L.T., 2015; Ohgami N., 2015; Weinberg F., 2010]. Do đó, ức chế được mức độ biểu hiện của gen mã hóa cho các protein này có vai trò quan trọng điều trị tế bào ung thư. Cho đến nay, chưa có nhiều nghiên cứu đề cập đến khả năng ức chế di cư của các hợp chất hoặc cao chiết từ vi khuẩn lam [Miao C., 2016; Zhao X., 2024]. Do đó, kết quả nghiên cứu này cung cấp thêm thông tin đáng chú ý về cơ chế tín hiệu trong việc ức chế sự di cư của tế bào HeLa bởi cao chiết từ chủng *Scytonema bilaspurense* NK13.

3.4. Phân tách hoạt chất ức chế tế bào HeLa từ cao chiết tổng số NK13

3.4.1. Phân tách thành phần cao chiết NK13 bằng phương pháp chiết lỏng - lỏng

Chủng *S. bilaspurense* NK13 được nuôi sinh khối 4 lần với tổng thể tích 100 lít trong môi trường BG11 trong thời gian 7 tuần, sinh khối tươi được thu bằng phương pháp lọc qua túi lọc. Lượng sinh khối tươi được loại nước bằng phương pháp đông khô thu được 90g sinh khối khô. Sau đó, sinh khối khô được chiết 5 lần trong hỗn hợp

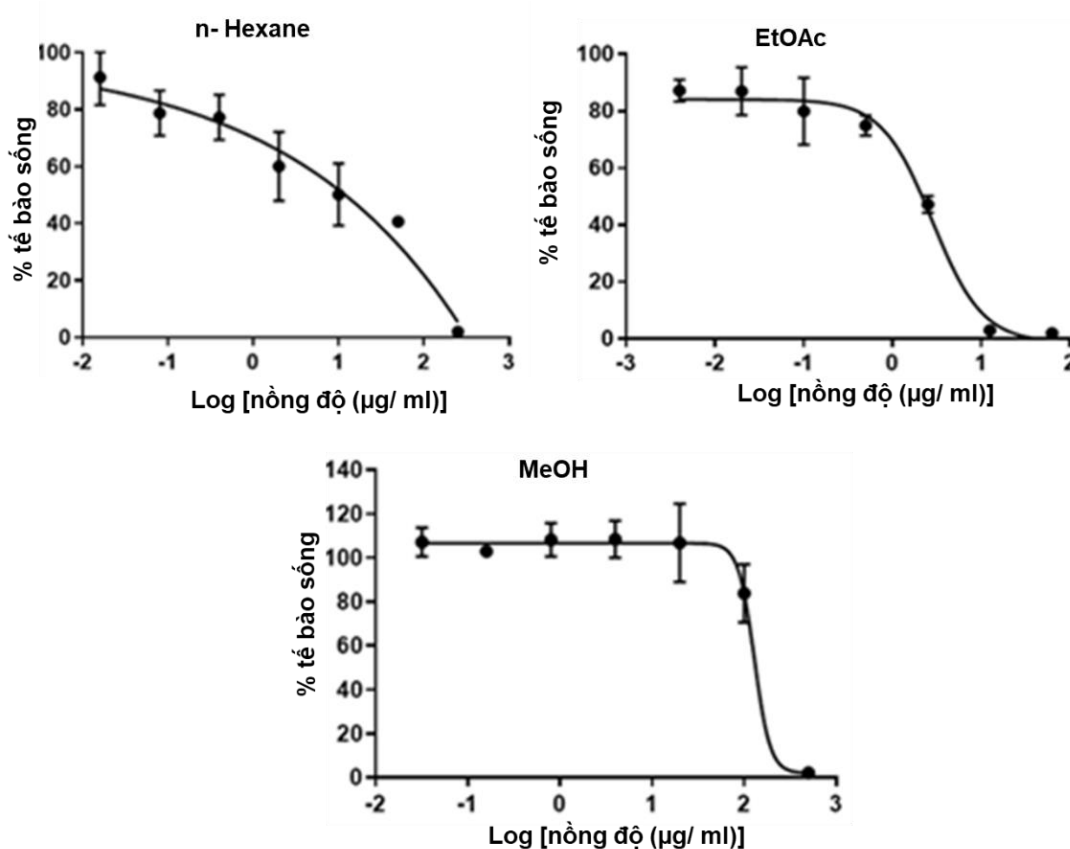
dung môi EtOAc và MeOH (tỷ lệ 1:1, v/v). Dịch chiết tổng số được cô quay để loại bỏ dung môi, thu được 13,9 g cao chiết tổng số.

Bảng 3.9. Khối lượng, hiệu suất chiết, độc tính trên tế bào HeLa của 4 cao chiết

STT	Cao chiết	Khối lượng (mg)	Hiệu suất chiết (%)	IC ₅₀ (μg/ml)	Phân loại GHS
1	n-hexane	7.100	51,1	12,0 ± 1,1	Cat. 2
2	EtOAc	2.300	16,5	2,2 ± 0,4	Cat. 1
3	MeOH	3.900	32,4	133,2 ± 2,1	Cat. 3
4	H ₂ O	600	4,3	-	-

Cat. 1: IC₅₀ < 5 μg/ml; Cat. 2: 5 μg/ml < IC₅₀ < 50 μg/ml;

Cat. 3: 50 μg/ml < IC₅₀ < 300 μg/ml.

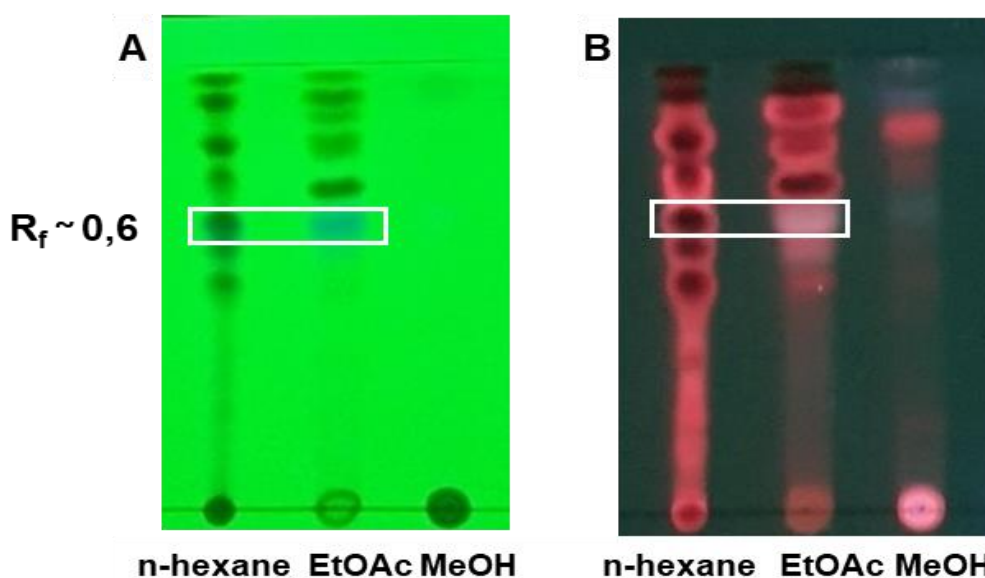


Hình 3.21. Độc tính của 3 phân lớp n-hexane, EtOAc, MeOH lên tế bào HeLa

Cao chiết NK13 được phân tách thành phần hợp chất theo phương pháp chiết lỏng - lỏng trong các dung môi có độ phân cực tăng dần để thu được 4 cao chiết tương

ứng là n-hexane, EtOAc, MeOH và nước. Khối lượng và hiệu suất phân tách của các cao chiết thể hiện ở Bảng 3.9 chỉ ra rằng cao chiết n-hexane chiếm khối lượng lớn nhất đạt 7.100 mg với hiệu suất phân tách là 51,1% cao gấp 1,8 lần so với cao chiết MeOH, gấp 3 lần so với cao chiết EtOAc. Điều đó chứng tỏ rằng, các hợp chất trong cao chiết NK13 chủ yếu thuộc nhóm hợp chất có độ phân cực thấp được hoà tan hầu hết trong dung môi n-hexane.

Đồng thời, 10 mg mỗi loại cao chiết được hòa tan trong DMSO 100% ở nồng độ 100 mg/ml để đánh giá độc tính trên dòng tế bào HeLa bằng thử nghiệm MTT. Kết quả cho thấy, cao chiết EtOAc và n-hexane thể hiện hoạt tính gây độc mạnh trên dòng tế bào HeLa dựa theo tiêu chuẩn của Viện ung thư quốc gia Hoa Kỳ (NCI) với giá trị IC_{50} lần lượt là 2,2 và 12,0 $\mu\text{g/ml}$ [Suffness M., 1990]; tiếp theo là cao chiết MeOH thể hiện độc tính trung bình trên dòng tế bào HeLa với giá trị IC_{50} là 133,2 $\mu\text{g/ml}$, trong khi phân lớp H_2O không gây độc cho tế bào HeLa (Bảng 3.9; Hình 3.21). Theo phân loại GHS, cao chiết EtOAc được xếp vào nhóm độc tính cấp 1; cao chiết n-hexane và MeOH lần lượt được xếp vào nhóm độc tính cấp 2 và cấp 3 [UN, 2023].



Hình 3.22. Sắc ký đồ TLC của ba cao chiết n-hexane, EtOAc, MeOH
quan sát ở bước sóng 254 nm (A) và bước sóng 365nm (B)

Thêm vào đó, thành phần hợp chất trong mỗi cao chiết được phân tích bằng phương pháp sắc ký bản mỏng (TLC). Kết quả sắc ký đồ TLC của 3 loại cao chiết

khi quan sát ở hai bước sóng 254nm và 365 nm thấy rằng số lượng vết chất có xu hướng giảm dần trong những cao chiết có độ phân cực tăng dần, trong đó cao chiết n-hexane có nhiều vết chất nhất cho thấy dung môi này đã hòa tan được phần lớn hợp chất thứ cấp trong cao chiết NK13. Ngoài ra, cao chiết n-hexane và EtOAc xuất hiện vết chất màu tím và màu trắng sáng ở vị trí R_f khoảng 0,6 trên sắc ký đồ TLC khi quan sát ở bước sóng 254 nm và 365 nm (Hình 3.22). Theo Bladt (2009), hợp chất này có thể thuộc nhóm alkaloid [Bladt S., 2009]. Bên cạnh đó, Demay và cộng sự (2019) đã chỉ ra rằng có 24 trong số 260 họ hợp chất phân lập từ VKL thuộc nhóm alkaloids thể hiện hoạt tính sinh học [Demay J., 2019]. Trong đó tiêu biểu là nhóm hợp chất hapalindoles phân lập từ nhiều loài VKL thuộc họ Hapalosiphonaceae có khả năng ức chế nhiều loài vi khuẩn, và gây độc tế bào; hợp chất didehydromirabazole phân lập từ *Scytonema mirabile* có hoạt tính kháng nấm và gây độc tế bào mạnh; hợp chất laucysteinamide A phân lập từ *Caldora penicillata* gây độc đối với dòng tế bào ung thư phổi H-460 [Demay J., 2019; Pattenden G., 1992; Zhang C.; 2017]. Đồng thời, trong các thí nghiệm thử hoạt tính gây độc tế bào ung thư, chúng tôi nhận thấy các cao chiết chứa vết chất màu tím khi quan sát ở bước sóng 254 nm (trên bản TLC) đều thể hiện hoạt tính gây độc tế bào mạnh. Vì vậy, chúng tôi xác định các vết chất màu tím này (có thể thuộc nhóm alkaloid) là mục tiêu để phân tách hoạt chất trong cao chiết n-hexane và EtOAc bằng các phương pháp sắc ký cột.

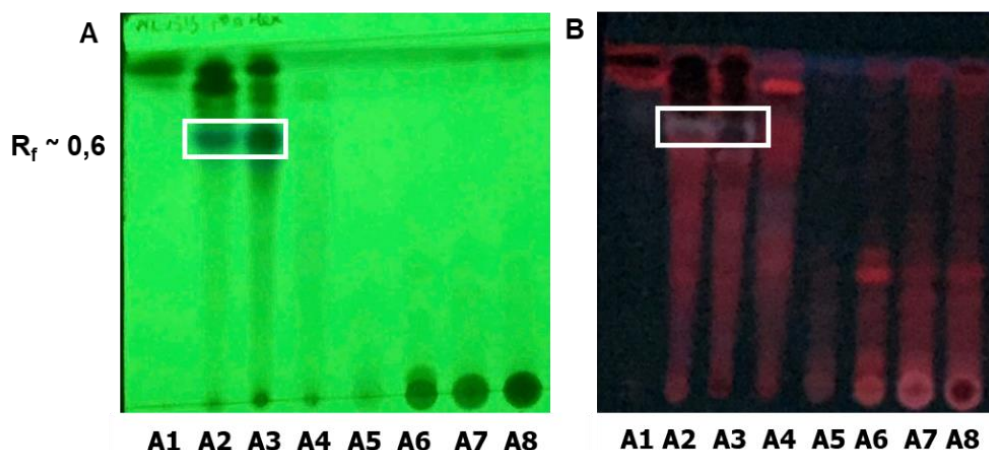
3.4.2. Phân tách phân lớp có hoạt tính bằng sắc ký cột

3.4.2.1. Phân đoạn cao chiết n-hexane bằng sắc ký cột silica gel

Cao chiết n-hexane chứa các hợp chất có độ phân cực thấp nên được phân tách bằng cột sắc ký với pha tĩnh là hạt silica gel (kích thước hạt 0,04 - 0,063 mm, Merck). Khoảng 7.100 mg cao chiết n-hexane được phân tách bằng cột sắc ký silica gel, được rửa giải trong 8 hệ dung môi để thu được 8 phân đoạn tương ứng ký hiệu là A1 - A8 với khối lượng được thể hiện ở Bảng 3.10. Trong đó, hai phân đoạn A2 và A3 xuất hiện vết chất màu tím khi quan sát ở bước sóng 254 nm với hệ số R_f khoảng 0,6 (Hình 3.23). Vì vậy, hai phân đoạn này được gộp lại thành **phân đoạn A₂₋₃** có khối lượng 500 mg.

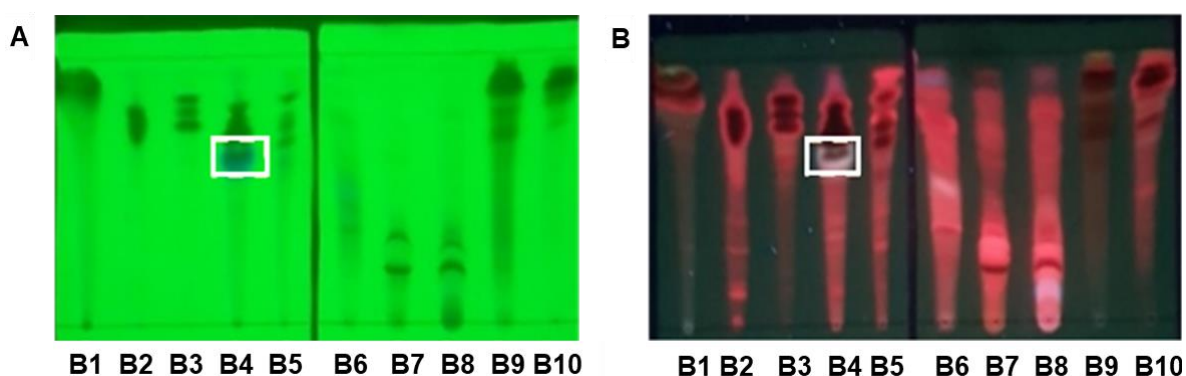
Bảng 3.10. Khối lượng các phân đoạn (A1-A8) từ cao chiết n-hexane

Phân đoạn	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
Khối lượng (mg)	1.100	300	200	200	1.100	1.500	900	500



Hình 3.23. Sắc ký đồ TLC của các phân đoạn (A1- A8) từ cao chiết n-hexane
quan sát ở bước sóng 254 nm (A) và 365 nm (B)

Phân đoạn A₂₋₃ tiếp tục được phân tách thành phần hợp chất thứ cấp bằng cột sắc ký silica gel lần 2. Tổng số 140 phân đoạn rửa giải (thể tích từ 3,0 - 4,0 ml/ phân đoạn) được thu lại và phân tích thành phần chất bằng sắc ký TLC. Dựa vào kết quả quan sát được trên sắc ký đồ TLC ở bước sóng 254 nm và 365 nm, 140 phân đoạn được gộp lại để thu còn 10 phân đoạn kí hiệu lần lượt là B1 - B10 (Hình 3.24). Khối lượng mỗi phân đoạn thể hiện ở Bảng 3.11.



Hình 3.24. Sắc ký đồ TLC của các phân đoạn (B1 - B10) từ phân đoạn A₂₋₃
quan sát ở bước sóng 254 nm (A) và 365 nm (B)

Bảng 3.11. Khối lượng của các phân đoạn (B1 - B10) từ phân đoạn A₂₋₃

Phân đoạn	Hệ dung môi rửa giải	Khối lượng (mg)
B1	n-hexane - EtOAc (7:3, v/v)	14,1
B2		42,3
B3		89,5
B4	n-hexane - EtOAc (5:5, v/v)	269,0
B5	n-hexane - EtOAc (2:8, v/v)	27,1
B6	EtOAc - MeOH (9:1, v/v)	11,0
B7	EtOAc - MeOH (7:3, v/v)	9,7
B8	EtOAc - MeOH (5:5, v/v)	15,1
B9	EtOAc - MeOH (2:8, v/v)	21,9
B10	MeOH	5,1

Đồng thời, kết quả từ sắc ký đồ TLC cũng cho thấy đã phân tách được phân đoạn B4 xuất hiện vết chất màu tím ở vị trí khoảng 0,6 khi quan sát ở bước sóng 254 nm với khối lượng là 269 mg (Bảng 3.11). Bên cạnh đó, phân đoạn B4 được rửa giải trong hệ dung môi n-hexane - EtOAc (5:5, v/v) cho thấy vết chất màu tím thuộc nhóm hợp chất ít phân cực và được hòa tan tốt nhất trong hệ dung môi này.

3.4.2.2. Phân tách phân lớp EtOAc bằng sắc ký cột sephadex LH20

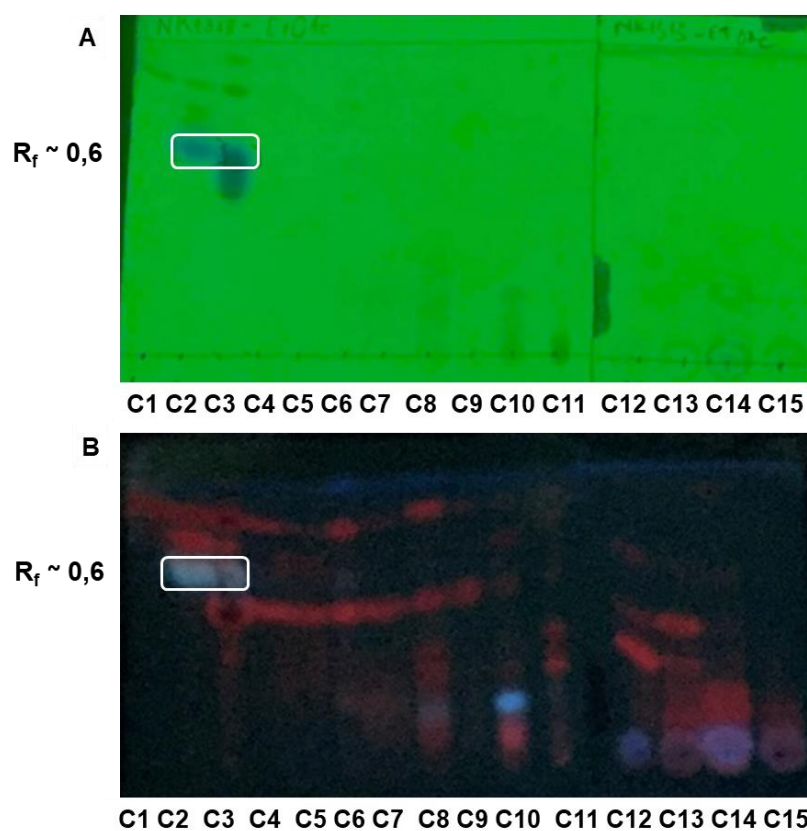
Các hợp chất thứ cấp trong cao chiết EtOAc có độ phân cực cao hơn so với các hợp chất trong phân lớp n-hex nên sẽ được phân tách bằng sắc ký cột với pha tĩnh là gel sephadex LH20 thay vì silica gel. Từ 2.300 mg cao chiết EtOAc được phân tách bằng cột sắc ký sephadex LH20, mỗi cột có khối lượng 500 mg và được rửa giải trong dung môi MeOH. Các phân đoạn thu hồi sau rửa giải được phân tích thành phần hợp chất bằng sắc ký TLC.

Dựa trên kết quả quan sát từ sắc ký đồ TLC ở bước sóng 254 nm và 365 nm, các phân đoạn có thành phần và vị trí vết chất tương tự nhau sẽ được gộp lại. Kết quả đã thu được 15 phân đoạn gộp từ 160 phân đoạn sau rửa giải ký hiệu tương ứng là C1 - C15 (Hình 3.25). Trong đó, hợp chất chứa vết chất màu tím tại vị trí R_f khoảng 0,6

được quan sát thấy ở phân đoạn C2, C3 với khối lượng lần lượt là 70 mg và 110 mg (Bảng 3.12).

Bảng 3.12. Khối lượng của các phân đoạn (C1 - C15) từ cao chiết EtOAc

STT	Phân đoạn	Khối lượng (mg)	STT	Phân đoạn	Khối lượng (mg)
1	C1	88,2	9	C9	23,6
2	C2	70,0	10	C10	35,2
3	C3	110,0	11	C11	89,6
4	C4	30,7	12	C12	77,5
5	C5	44,3	13	C13	8,9
6	C6	3,8	14	C14	15,6
7	C7	8,5	15	C15	7,6
8	C8	7,1			



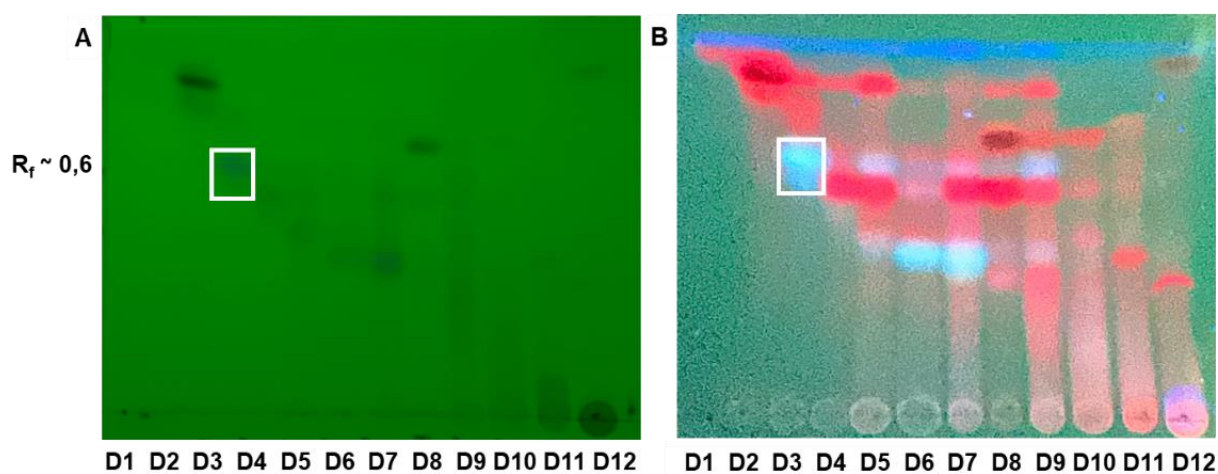
Hình 3.25. Sắc ký đồ TLC của các phân đoạn (C1 - C15) từ phân lớp EtOAc quan sát ở bước sóng 254nm (A) và 365 nm (B)

Ba phân đoạn bao gồm **B4** được rửa giải từ cao chiết n-hexane và **C2, C3** được rửa giải từ cao chiết EtOAc có chứa hợp chất hiện vết màu tím trên sắc ký đồ TLC khi quan sát ở bước sóng 254 nm với hệ số R_f khoảng 0,6 được gộp lại thành **phân đoạn BC₀** với tổng khối lượng đạt 449 mg. Từ kết quả trên sắc ký đồ TLC cho thấy các phân đoạn này vẫn còn chứa nhiều tạp chất. Vì vậy, phân đoạn BC₀ tiếp tục được phân tách tiếp bằng cột sắc ký silica gel lần 3.

3.4.2.3. Phân tách phân đoạn BC₀ bằng sắc ký cột silica gel

Phân đoạn BC₀ được rửa giải trong hệ dung môi n-hexane - EtOAc (5:5, v/v). Đồng thời hình ảnh trên sắc ký đồ TLC ở bước sóng 254 nm cho thấy vết chất màu tím xuất hiện ở vị trí R_f khoảng 0,6. Điều này chỉ ra rằng đây là hợp chất có độ phân cực yếu. Cho nên hệ dung môi rửa giải được sử dụng để phân tách hợp chất trong cột sắc ký silica gel lần 3 thay đổi có độ phân cực thấp hơn nhằm mục đích tăng khả năng phân tách được các hợp chất có độ phân cực yếu (Bảng 3.13).

Đầu tiên, 449 mg phân đoạn BC₀ được hòa trong 2,0 ml hệ dung môi 1 (n-hexane - EtOAc, 8:2, v/v), nạp lên cột silica gel và rửa giải trong 9 hệ dung môi để thu được 121 phân đoạn. Dựa trên sự tương đồng về thành phần và vị trí các vết chất của các phân đoạn khi quan sát sắc ký đồ TLC ở bước sóng 254 nm và 365 nm, 121 phân đoạn đã gộp lại còn 12 phân đoạn ký hiệu từ D1 đến D12 (Hình 3.26). Khối lượng của mỗi phân đoạn được thể hiện ở Bảng 3.13.



Hình 3.26. Sắc ký đồ TLC của các phân đoạn (D1 - D12) từ phân đoạn BC₀ quan sát ở bước sóng 254 nm (A) và 365 nm (B)

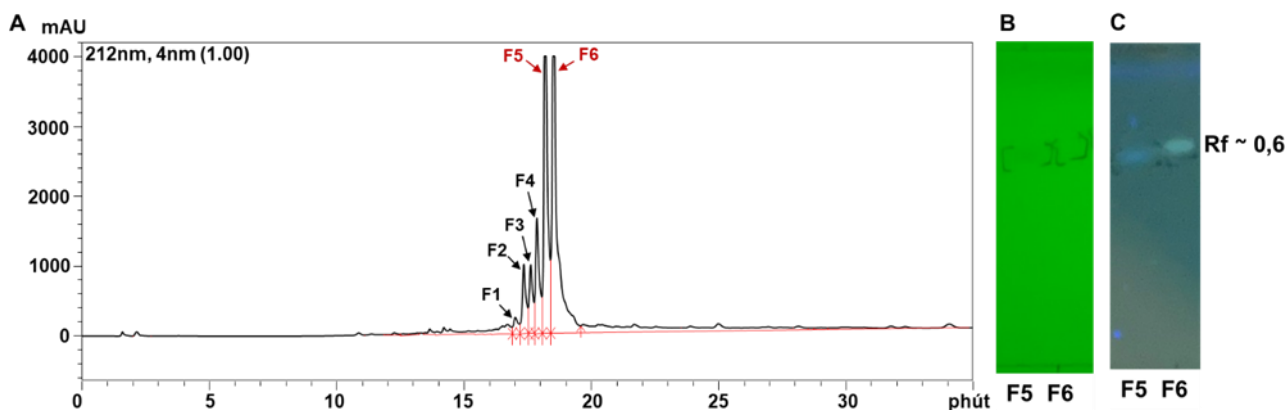
Bảng 3.13. Khối lượng các phân đoạn (D1- D12) từ phân đoạn BC₀

STT	Hệ dung môi rửa giải	Phân đoạn	Khối lượng (mg)
1.	n-hexane - EtOAc (8:2, v/v)	D1	21,2
2.	n-hexane - EtOAc (6: 4, v/v)	D2	11,5
		D3	33,0
		D4	87,7
3.	n-hexane - EtOAc (4:6, v/v)	D5	31,2
		D6	23,1
		D7	13,0
4.	n-hexane - EtOAc (2:8/ v/v)	D8	47,4
5.	EtOAc - MeOH (9:1, v/v)	D9	19,8
6.	EtOAc - MeOH (7:3, v/v)	D10	7,6
7.	EtOAc - MeOH (5:5, v/v)	D11	14,1
8.	EtOAc - MeOH (2:8, v/v)	D12	20,2
9.	MeOH		

Kết quả trên sắc ký đồ TLC quan sát ở bước sóng 254 nm và 365 nm chỉ ra rằng **phân đoạn D3** có khối lượng 33 mg xuất hiện vết chất màu tím ở vị trí R_f khoảng 0,6 và ít tạp chất nên phân đoạn này được dùng để tinh sạch hợp chất chứa vết chất màu tím ở bước sóng 254 nm bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) (Hình 3.26; Bảng 3.13).

3.4.3. Kết quả tinh sạch phân đoạn D3 bằng phương pháp HPLC

Kết quả tinh sạch thành phần hoạt chất trong phân đoạn D3 bằng phương pháp HPLC được thể hiện ở 3.27.



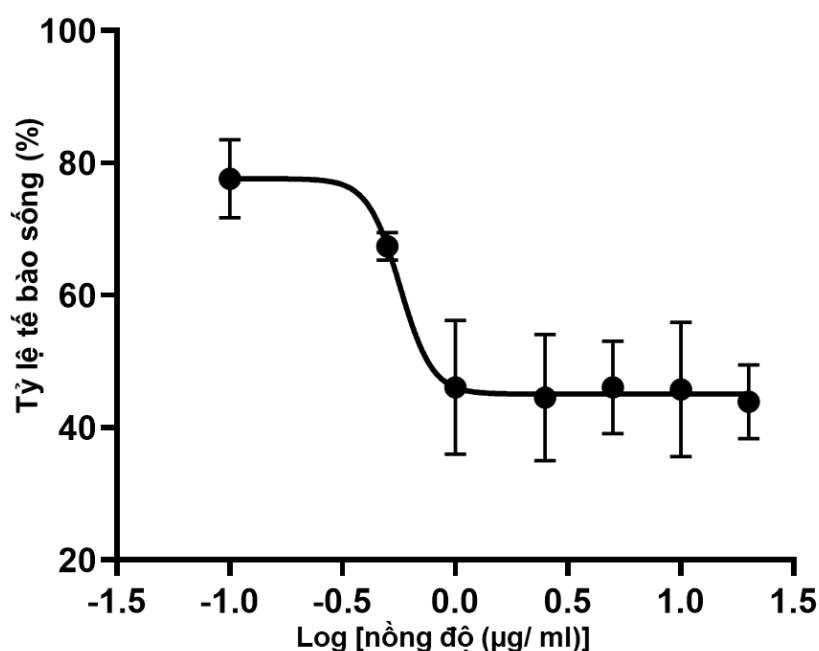
Hình 3.27. Sắc ký đồ HPLC của phân đoạn D3 (A) và TLC của phân đoạn F5, F6 (B, C) quan sát ở bước sóng 212 nm (A); 254 nm (B), 365 nm (C)

Dựa vào sắc ký đồ HPLC thấy rằng các hợp chất chính trong phân đoạn D3 quan sát ở bước sóng 212 nm đã thu được 6 phân đoạn sau rửa giải ký hiệu là F1 - F6, trong đó phân đoạn F5, F6 được rửa giải ở thời gian lưu 18,0 - 18,4 phút và 18,4 - 18,8 phút cho đỉnh cao nhất với khối lượng tương ứng là 1,1 mg và 2,4 mg (Hình 3.27A; Bảng 3.14). Điều đó chỉ ra rằng, đây là hai hợp chất chính có trong phân đoạn D3. Sau đó, phân đoạn F5 và F6 được phân tích thành phần chất bằng sắc ký TLC. Kết quả trên sắc ký đồ TLC cho thấy vết chất màu tím và màu trắng sáng tại vị trí R_f khoảng 0,6 khi quan sát ở bước sóng 254 nm và 365 nm xuất hiện ở cả hai phân đoạn F5, F6 (Hình 3.27 B, C).

Bảng 3.14. Thời gian lưu, khối lượng và độc tính của phân đoạn F5, F6

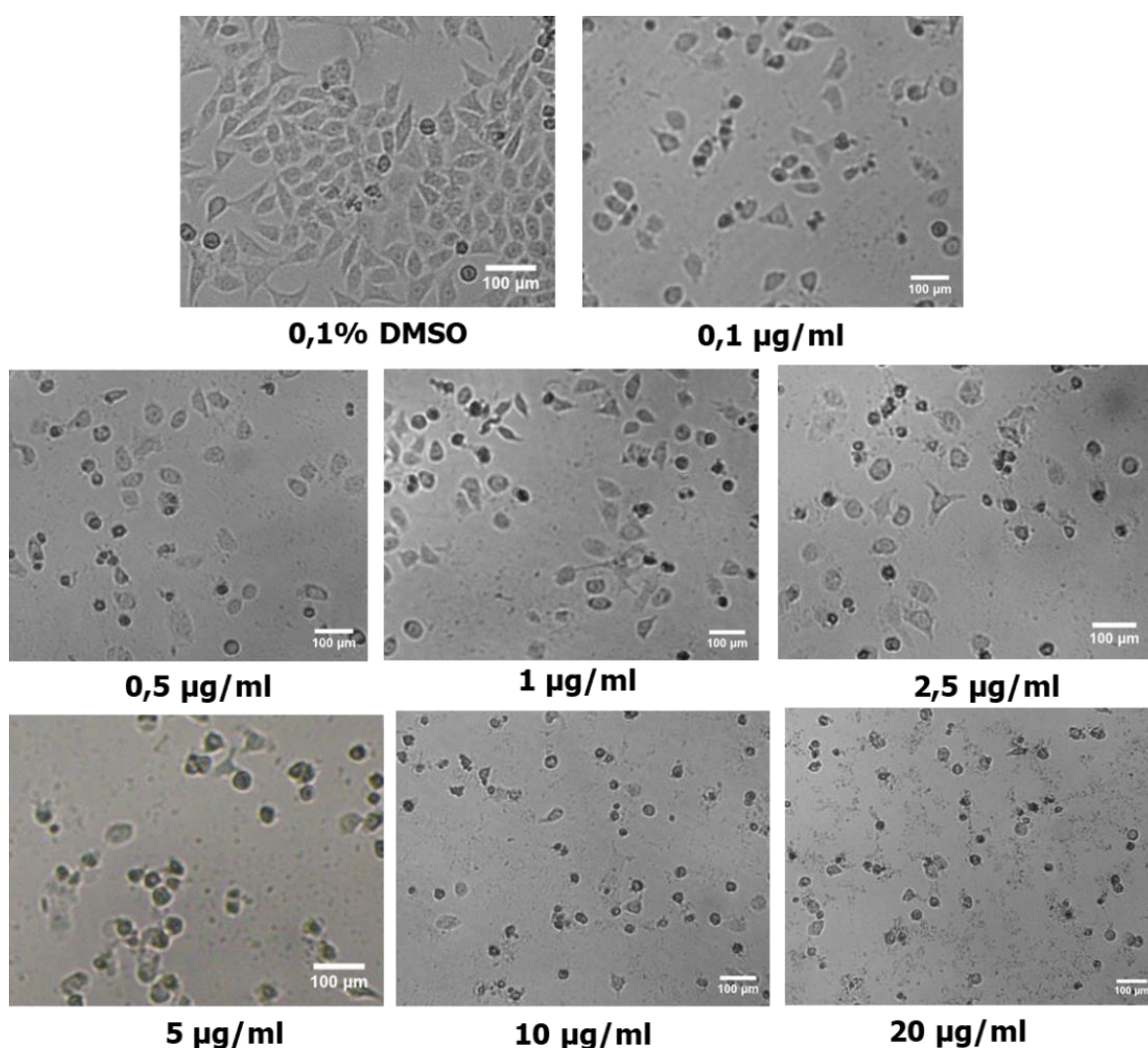
Phân đoạn	Thời gian lưu (phút)	Tỷ lệ MeOH (%)	Khối lượng (mg)
F5	18,0 - 18,4	100	1,1
F6	18,4 - 18,8	100	2,4

Sau đó, phân đoạn F5 và F6 được đánh giá hoạt tính gây độc trên tế bào HeLa, tuy nhiên do khối lượng của phân đoạn F5 thu được ít không đủ để thử hoạt tính, vì vậy chỉ có phân đoạn F6 được đánh giá độc tính trên tế bào HeLa.



Hình 3.28. Độc tính của phân đoạn F6 lên tế bào HeLa

Kết quả cho thấy, phân đoạn F6 ức chế tế bào HeLa với giá trị IC_{50} là 3,5 $\mu\text{g/ml}$, được xếp vào nhóm độc tính cấp 1 theo thang phân loại của GHS (Hình 3.28). Đồng thời quan sát dưới kính hiển vi thấy rằng hình thái của tế bào HeLa khi ủ với phân đoạn F6 ở nồng độ 0,1 $\mu\text{g/ml}$ đã bị thay đổi hình dạng, khoảng 30% - 40% tế bào bị co cụm, ảnh hưởng đến khả năng tăng sinh của chúng (Hình 3.28). Bên cạnh đó, tỷ lệ sống sót của tế bào duy trì từ 43% đến 45% trong khoảng nồng độ từ 1,0 đến 20 $\mu\text{g/ml}$; cho thấy rằng phân đoạn F6 có khả năng tác động lên hình thái tế bào ở dải nồng độ đang thử nghiệm mà không làm thay đổi tỷ lệ sống sót của tế bào. Điều này có thể lý giải là do tỷ lệ tăng sinh và tỷ lệ chết của tế bào cân bằng nhau hoặc có thể do phân đoạn F6 tác động lên bộ khung tế bào làm tế bào bị ức chế phân chia ở khoảng nồng độ này. Điều này phù hợp với hình thái tế bào HeLa ở Hình 3.28.



Hình 3.29. Tác động của phân đoạn F6 lên hình thái tế bào HeLa

Mặt khác, độc tính của phân đoạn F6 trên tế bào HeLa tương đương với độc tính của cao chiết tổng số từ chủng *Scytonema bilaspurene* NK13. Điều này có thể được giải thích hiện tượng này do trong cao chiết tổng số có chứa nhiều nhóm hoạt chất gây độc tế bào khác nhau có khả năng thể hiện tác động hiệp đồng giữa các nhóm hoạt chất trong cao chiết tổng số. Trong khi đó, các phân đoạn thu được sau quá trình tinh sạch đã loại bỏ đi nhiều tạp chất trong cao chiết tổng, dẫn đến hoạt chất trong phân đoạn tinh sạch thể hiện hoạt tính hoạt tính đơn lẻ, phản ánh được cơ chế tác động của một chất hoặc nhóm chất.

3.4.5. Phân tích thành phần hoạt chất trong phân đoạn F6 bằng LC-HRMS

Thành phần các hoạt chất trong phân đoạn F6 được phân tích bằng phương pháp sắc ký lỏng - khối phổ có độ phân giải cao (LC-HRMS) ở hai chế độ ion hóa dương $[M+H]^+$ và chế độ ion hóa âm $[M+H]^-$. Kết quả sắc ký đồ tổng ion (TIC) ở Hình 3.30 và 3.31 chỉ ra rằng các đỉnh sắc ký có cường độ tín hiệu mạnh chủ yếu tập trung trong khoảng thời gian từ 8,5 - 11,5 phút ở chế độ ion hóa dương, trong đó đỉnh sắc ký ở 10,18 phút có cường độ tín hiệu mạnh nhất, phản ánh sự hiện diện của một hoặc một số hợp chất chiếm tỷ lệ chính trong phân đoạn F6. Trong khi đó, ở chế độ ion hóa âm, các đỉnh sắc ký chủ yếu được phát hiện trong khoảng thời gian từ 9 - 12 phút.

Những khối lượng điện tích (mass-to-charge, m/z) có cường độ tín hiệu (TIC) lớn hơn 10^4 sẽ được phân tích để xác định KLPT đo được. Kết quả đo phổ khối lượng cho thấy có 46 KLPT đo được (Observed masses) ở chế độ ion hóa $[M+H]^+$ và 28 KLPT đo được ở chế độ ion hóa $[M+H]^-$ trong phân đoạn F6 (Bảng 3.15 và 3.16). Các hợp chất trong phân đoạn F6 được xác định dựa vào KLPT đo được (observed mass) và so sánh với cơ sở dữ liệu <http://dnpc.chemnetbase.com/> và <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> cập nhật vào tháng 10 năm 2025. Kết quả ở Bảng 3.15 và 3.16 chỉ ra rằng, phân đoạn F6 gồm có 46 và 28 hợp chất chính được phát hiện lần lượt ở chế độ ion hóa $[M+H]^+$ và $[M+H]^-$. Các hợp chất này thuộc nhiều nhóm chất như lipopeptide, phospholipid, polyketide/alkaloid, hợp chất chứa nhóm halogen, diterpenoid, glycoside chứa lưu huỳnh.

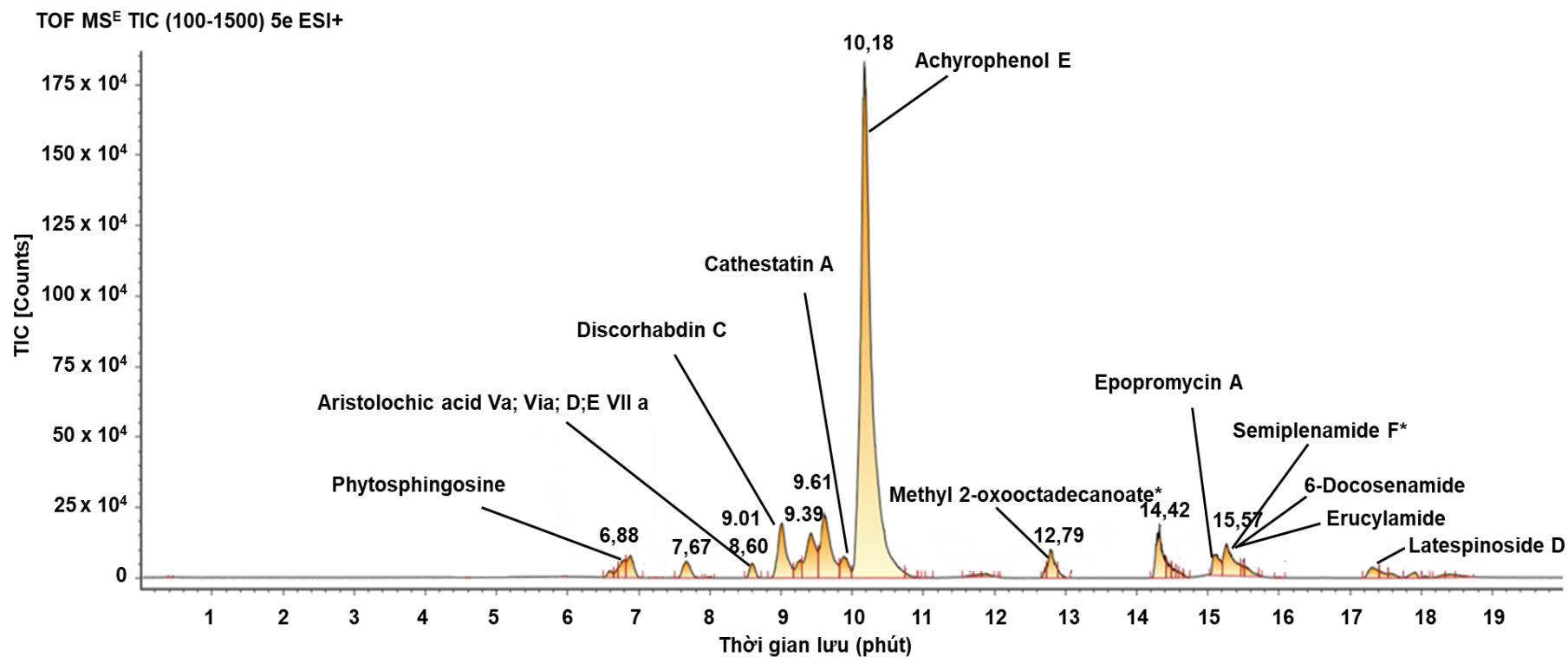
Trong 74 KLPT đã đo được, có 26 hợp chất thể hiện hoạt tính gây độc trên tế bào đã được phát hiện ở hai chế độ ion hóa dương và ion hóa âm bao gồm phytosphingosine; aristolochic acid Va/ Via/ D/ E/ VIIa; cathestatin A; achyrophenol E; epopromycin A; 6-Docosenamide; erucylamide; latespinoside D; 14-Bromoreticulatine; kobusine; dysideanone B; phomopoxide C/ D/ E; plakorstatin 1/ 2; manadoperoxide B/ isomanadoperoxide B; photeroid B; ochocinone A; ophiobolin T; knepachycarpanol C (Hình 3.30; 3.31). Trong đó, nổi bật một số hợp chất có độc tính mạnh trên một số dòng tế bào ung thư như hợp chất dysideanone B phân lập từ loài bọt biển *Dysidea avara* và hợp chất Phomopoxide C/ D/ E phân lập từ nấm

men *Phomopsis* sp. YE3250 ức chế mạnh trên một số dòng tế bào ung thư ở người như HeLa, HepG2, H460, MCF7 [Jiao W.H., 2014; Huang R., 2018], hợp chất Ophiobolin T ức chế mạnh tế bào ung thư HepG2 và KB với giá trị IC_{50} lần lượt là 0,24 μ M và 3,01 μ M, đồng thời có khả năng kháng vi khuẩn *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* kháng meticillin (MRSA) và vi khuẩn lao BCG [Wang Q.X., 2013]; hợp chất 6-Docosenamide có độc tính mạnh trên tế bào A549, MCF-7 và HT-29 với giá trị $LC_{50} < 3,16 \mu$ g/ml (nồng độ gây chết 50%). Tuy nhiên những hợp chất này chưa từng được phát hiện ở bất kỳ loài vi khuẩn lam nào. Cho thấy tiềm năng phát hiện những hợp chất gây độc tế bào mới có nguồn gốc từ chủng *S. bilaspurene* NK13.

Bên cạnh đó, có 03 hợp chất bao gồm Methyl 2-oxooctadecanoate có CTPT: $C_{19}H_{36}O_3$ (STT: 32, Bảng 3.15); semiplenamamide F có CTPT là $C_{22}H_{43}NO$ (STT: 39, Bảng 3.15) và 20-Nor-3 α -acetoxy-12-hydroxy-abieta-5,7,9,11,13-pentaene có CTPT: $C_{21}H_{26}O$ (STT 20, Bảng 3.16) đã được phát hiện ở các loài vi khuẩn lam khác như *Arthrospira platensis*, *Lyngbya semiplena*, *Microcoleus lacustris* (Hình 3.30; 3.31) [Mohammed H., 2025; Han B., 2003; Pérez Gutiérrez R.M., 2008]. Hợp chất Semiplenamamide F được phân lập từ loài *Lyngbya semiplena* thể hiện độc tính yếu trên dòng tế bào ung thư nguyên bào thần kinh chuột N18TG2 [Han B., 2003]. Hai hợp chất còn lại chỉ thể hiện hoạt tính kháng khuẩn, kháng oxy hóa mà không thể hiện độc tính trên tế bào ung thư. So sánh với giá trị IC_{50} là 3,5 μ g/ml của phân đoạn F6 lên tế bào HeLa có thể suy luận rằng phân đoạn F6 có thể chứa các hợp chất kháng ung thư có công thức cấu tạo khác với 03 chất có cùng khối lượng phân tử nêu trên. Đây có thể là các hợp chất chưa từng được ghi nhận ở vi khuẩn lam.

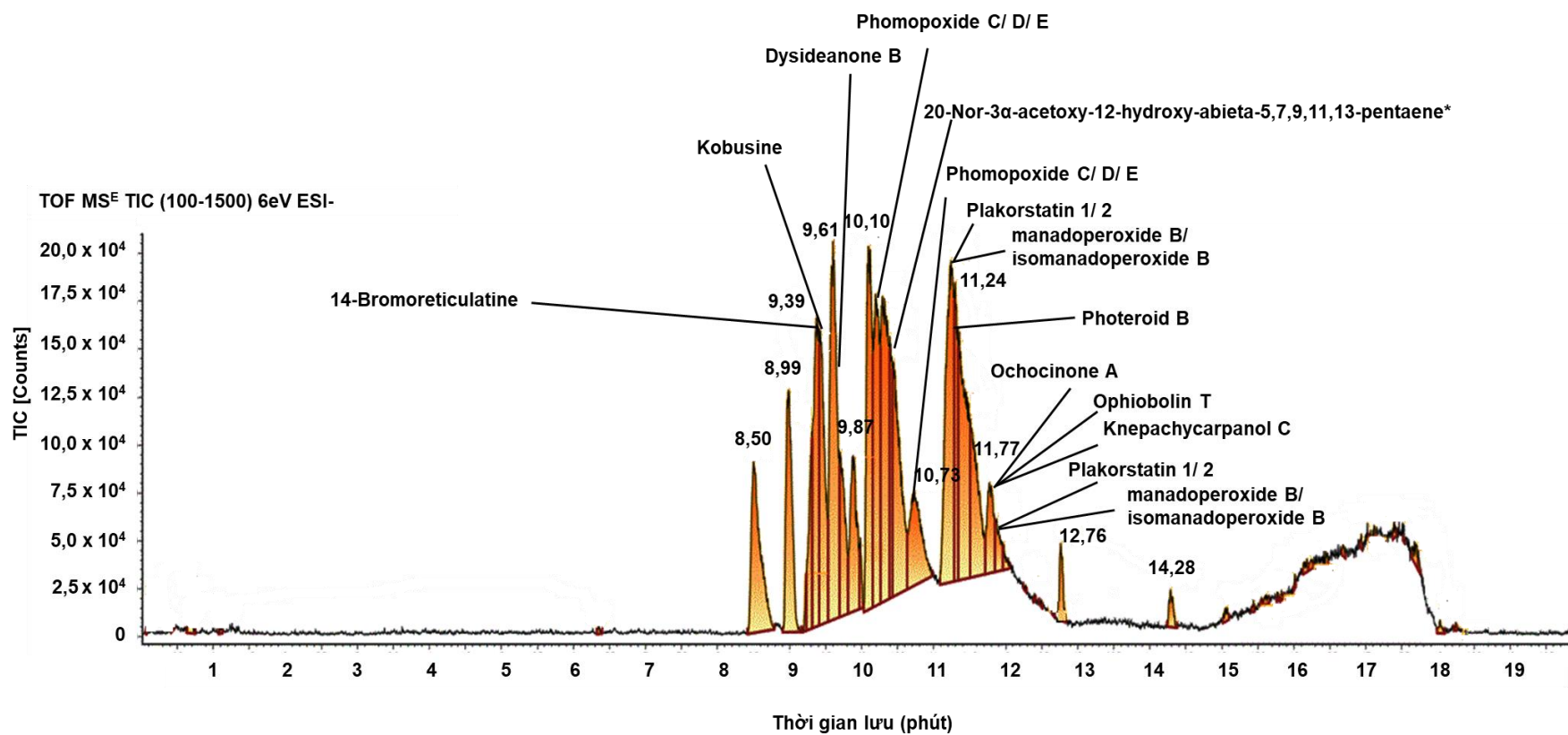
Ngoài ra, 2 hợp chất có CTPT đo được $C_{12}H_{14}N_5O_8P$ (STT: 22, Bảng 3.15) và $C_{11}H_{19}NO_{10}S_2$ (STT: 23, Bảng 3.15) được phát hiện ở thời gian lưu 10,19 phút có cường độ tín hiệu lớn nhất trong phân đoạn F6 cho thấy đây là hai hợp chất chiếm tỷ lệ cao nhất trong phân đoạn F6. Tuy nhiên, chưa xác định được hợp chất nào có hoạt tính gây độc tế bào từ hai CTPT đo được này. Vì vậy có thể dự đoán rằng đây là hai hợp chất trong phân đoạn F6 có CTPT là $C_{12}H_{14}N_5O_8P$ và $C_{11}H_{19}NO_{10}S_2$ nhưng có

công thức cấu tạo khác so với những hợp chất tự nhiên đã được phát hiện. Có thể dự đoán khả năng gây độc mạnh trên tế bào HeLa của phân đoạn F6 là kết quả tác động hiệp đồng của nhiều hợp chất thứ cấp chưa được xác định. Để xác định được rõ hợp chất gây độc chính trong phân đoạn F6 cần tiếp tục tinh sạch và xác định công thức cấu tạo bằng phương pháp cộng hưởng từ (NMR).



Hình 3.30. Sắc ký đồ tổng ion của phân đoạn F6 ở chế độ ion hóa $[M+H]^+$

* biểu thị hợp chất được phân lập từ vi khuẩn lam



Hình 3.31. Sắc ký đồ tổng ion của phân đoạn F6 ở chế độ ion hóa $[M+H]^+$

* biểu thị hợp chất được phân lập từ vi khuẩn lam

Bảng 3.15. Thành phần hợp chất trong phân đoạn F6 ở chế độ ion hóa [M+H]⁺

STT	CTPT	Thời gian lưu (phút)	Đếm đầu dò (Detector counts)	Cường độ tín hiệu (Response)	KLPT lý thuyết (Expected mass) (Da)	KLPT đo được (Da)	Số khối (m/z)	Sai số KLPT (Mass error) (ppm)	Hợp chất có hoạt tính gây độc tế bào hoặc đã phát hiện ở VKL	Nguồn gốc	TLTK
1	C ₁₅ H ₂₉ NO	6,60	12.562	12.562	239,2249	239,2236	240,2314	-5,5	N/A		
2	C ₁₆ H ₃₅ NO ₂	6,73	38.619	38.619	273,2668	273,2646	274,2724	8,0	N/A		
3	C ₁₈ H ₃₉ NO ₃	6,82	55.203	55.203	317,2930	317,2883	318,2962	14,7	N/A		
4	C ₁₆ H ₃₅ NO ₃	6,90	18.919	18.919	289,2617	289,2602	290,2680	-5,2	N/A		
5	C ₂₀ H ₄₃ NO ₄	6,90	16.976	16.976	361,3192	361,3165	362,3244	-7,5	N/A		
6	C ₁₈ H ₃₀ N ₄ O ₇	7,67	59.244	59.244	414,2114	414,2038	415,2116	18,5	N/A		
7	C ₂₃ H ₂₉ ClO ₇	7,67	11.998	11.998	452,1602	452,1585	453,1663	3,8	N/A		
8	C ₁₀ H ₁₇ NO ₉ S ₂	8,60	20.305	20.305	359,0345	359,0437	360,0515	25,6	N/A		
9	C ₁₇ H ₁₁ NO ₈	8,60	23.220	23.220	357,0485	357,0435	358,0514	-13,8	Aristolochic acid Va; Via; D; E VII a	<i>Aristolochia</i>	Michl J. 2014
10	C ₁₈ H ₁₆ BrN ₃ O ₂	9,01	126.959	126.959	387,0337	387,0366	388,0445	7,5	Discorhabdin Y	<i>Latrunculia</i>	Perry N.B., 1986
	C ₁₈ H ₁₆ BrN ₃ O ₂	9,01	125.002	125.002	385,0426	385,0400	386,0478	-6,8			
11	C ₁₇ H ₁₈ Cl ₃ NO ₃	9,01	23.091	23.091	389,0352	389,0369	390,0447	4,3	N/A		
12	C ₁₈ H ₁₆ BrN ₃ O ₂	9,26	35.723	35.723	387,0337	387,0363	388,0442	6,7	Discorhabdin Y	<i>Latrunculia</i>	Perry N.B., 1986
	C ₁₈ H ₁₆ BrN ₃ O ₂	9,26	43.509	43.509	385,0426	385,0207	386,0285				
13	C ₁₈ H ₁₂ BrN ₃ O ₂	9,41	91.326	91.326	383,0092	383,0058	384,0136	-8,9	N/A		
	C ₁₈ H ₁₂ BrN ₃ O ₂	9,41	88.296	88.296	381,0113	381,0074	382,0152	-10,2	N/A		

14	C ₁₅ H ₂₇ N ₃ O ₄	9,47	48.206	48.206	313,2002	313,2022	314,2101	6,6	N/A		
15	C ₁₆ H ₂₃ Br ₂ NO ₂	9,62	247.960	175.487	421,0075	420,9965	422,0043	-7,5	N/A		
	C ₁₆ H ₂₃ Br ₂ NO ₂	9,62	137.381	137.381	419,0096	418,9992	420,0071	-24,7	N/A		
16	C ₁₂ H ₁₄ BrN ₅ O ₅ S	9,89	41.347	41.347	421,0025	420,9919	421,9997	-25,1	N/A		
	C ₁₂ H ₁₄ BrN ₅ O ₅ S	9,89	55.824	55.824	418,9899	418,9893	419,9971	-1,5	N/A		
17	C ₂₁ H ₂₁ N ₃ O ₂	10,11	314.067	218.255	347,1634	347,1637	348,1715	0,9	N/A		
18	C₁₇H₂₃N₃O₅	10,11	58.442	58.442	349,1638	349,1624	350,1702	-4,0	Cathestatin A	<i>Penicillium citrinum</i>	Woo J.T., 1995
19	C ₁₈ H ₂₄ N ₂ O ₅	10,11	37.592	37.592	348,1685	348,1669	349,1747	-4,7	N/A		
20	C ₂₃ H ₁₉ N ₃ O ₂	10,15	22.057	22.057	369,1477	369,1461	370,1539	-4,5	N/A		
21	C ₁₇ H ₂₄ BrClO ₃	10,19	135.404	135.404	390,0597	390,0606	391,0684	2,2	N/A		
22	C ₁₂ H ₁₄ N ₅ O ₈ P	10,19	2.396.936	902.979	387,0580	387,0571	388,0649	-2,3	N/A		
23	C ₁₁ H ₁₉ NO ₁₀ S ₂	10,19	1.072.294	936.891	389,0450	389,0531	390,0609	20,7	N/A		
24	C ₁₉ H ₁₆ O ₇ S	10,19	150.593	150.593	388,0617	388,0610	389,0688	-1,8	N/A		
25	C ₁₁ H ₂₁ NO ₁₀ S ₂	10,19	275.592	275.592	391,0607	391,0525	392,0603	-21,0	N/A		
26	C ₁₉ H ₁₇ ClO ₇	10,19	22.999	22.999	392,0663	392,0620	393,0698	-11,0	N/A		
27	C₂₄H₃₆O₄	10,19	22.311	22.311	388,2614	388,2601	389,2679	-3,3	Achyrophenol E	<i>Achyrocline satureioides</i>	Wang S., 2021
28	C ₂₈ H ₅₄	10,19	33.398	33.398	390,4226	390,4281	391,4359	14,1	N/A		
29	C ₂₄ H ₃₇ NO ₃	10,19	29.148	29.148	387,2773	387,2758	388,2836	-4,0	N/A		
30	C ₂₀ H ₃₈ O ₇	10,19	40.506	40.506	390,2618	390,2597	391,2675	-5,3	N/A		
31	C ₂₁ H ₃₅ N ₅ O ₂	10,19	37.015	37.015	389,2791	389,2786	390,2864	1,2	N/A		
32	C₁₉H₃₆O₃	12,75	49.455	49.455	312,2664	312,2643	313,2722	-6,7	Methyl 2-oxooctadecanoate	<i>Arthrospira platensis*</i>	Mohammed, H., 2025

33	C ₃₀ H ₅₂ O ₁₀ S ₂	12,81	102.209	93.808	636,3002	636,2993	637,3072	-1,3	N/A		
34	C ₂₁ H ₄₀ O ₃	14,31	242.559	213.727	340,2977	340,2959	341,3037	-5,4	N/A		
35	C ₂₀ H ₃₉ NO ₃	14,32	28.874	28.874	341,2930	341,2974	342,3053	12,9	N/A		
36	C ₈ H ₄ O ₃	15,12	24.851	24.851	148,0160	148,0138	149,0217	-15,1	N/A		
37	C₂₁H₃₆N₂O₆	15,12	80.994	80.994	412,2573	412,2579	413,2657	1,2	Epopromycin A	<i>Streptomyces</i> sp. NK04000	Tsuchiya K., 1997
38	C ₄₂ H ₆₃ O ₄ P	15,14	30.135	30.135	662,4464	662,4471	663,4549	1,1	N/A		
39	C ₂₂ H ₄₃ NO	15,28	127.722	115.644	337,3345	337,3341	338,3420	-0,9	Semiplenamide F	<i>Lyngbya</i> <i>sempilena*</i>	Han B., 2003
									6-Docosenamide	<i>Asimina</i> <i>parvifloa</i>	Ratnayake S., 1992
									erucylamide	<i>Penicillium</i> <i>chrysogenum</i>	El-Gazzar, N., 2025
40	C ₄₂ H ₆₃ O ₄ P	15,36	33.691	33.691	662,4464	662,4483	663,4561	2,9	N/A		
41	C ₄₂ H ₆₃ O ₄ P	15,52	108.447	108.447	662,4464	662,4486	663,4564	3,3	N/A		
42	C ₃₄ H ₆₀ N ₄ O ₁₀	15,57	34.630	34.630	684,4309	684,4304	685,4382	-0,8	N/A		
43	C ₂₈ H ₃₃ O ₁₅	17,32	99.327	89.100	609,1819	609,1780	610,1859	-6,4	N/A		
44	C₂₅H₃₈O₁₃S₂	17,32	10.236	10.236	610,1754	610,1792	611,8706	6,3	Latespinoside D	<i>Asteropecten</i> <i>latespinosus</i>	Higuchi R., 1996
45	C ₂₈ H ₃₃ O ₁₅	17,59	28.656	28.656	609,1820	609,1770	610,1848	-8,1	N/A		
46	C ₂₈ H ₃₇ N ₅ O ₇	17,91	27.381	27.381	555,2693	555,2704	556,2782	2,0	N/A		

* biểu thị thuộc nhóm vi khuẩn lam

Bảng 3.16. Thành phần hợp chất trong phân đoạn F6 ở chế độ ion hóa [M+H]⁻

STT	CTPT	Thời gian lưu (phút)	Đếm đầu dò (Detector counts)	Cường độ tín hiệu (Response)	KLPT lý thuyết (Expected mass) (Da)	KLPT đo được (Da)	Số khối (m/z)	Sai số KLPT (Mass error) (ppm)	Hợp chất có hoạt tính gây độc tế bào hoặc đã phát hiện ở VKL	Nguồn gốc	TLTK
1	C ₁₂ H ₂₆ O ₆	8,51	82.088	82.088	266,1729	266,1718	265,1640	-4,2	N/A		
2	C ₁₂ H ₁₄ N ₅ O ₈ P	8,99	55.332	55.332	387,0580	387,0529	386,0450	-13,3	N/A		
3	C ₁₆ H ₂₃ Cl ₄ NO	8,99	54.593	54.593	385,0534	385,0537	384,0459	0,9	N/A		
6	C ₁₆ H ₂₆ N ₂ O ₄	9,32	31.849	31.849	310,1893	310,1877	309,1799	-4,9	N/A		
7	C ₁₃ H ₂₄ N ₆ O ₃	9,32	166.512	166.512	312,1910	312,1898	311,1820	-3,9	N/A		
8	C ₁₉ H ₁₄ BrN ₂ O ₂	9,40	46.224	46.224	383,0218	383,0310	382,0232	24,1	14-Bromoreticulatine	<i>Fascaplysinopsis reticulata</i> ; <i>Didemnum</i> sp.	Segraves N.L., 2003
	C ₁₉ H ₁₄ BrN ₂ O ₂	9,40	45.360	45.360	381,0239	381,0328	380,0250	23,4			
9	C ₂₀ H ₂₇ NO ₂	9,45	15.657	15.657	313,2042	313,2089	312,2011	15,0	Kobusine	<i>Aconitum yesoense</i> var. <i>macroyesoense</i>	Yamashita H., 2020
10	C ₁₃ H ₂₄ N ₆ O ₃	9,49	98.640	98.640	312,1910	312,1898	311,1820	-3,8	N/A		
11	C ₁₆ H ₂₃ Br ₂ NO ₂	9,60	91.176	91.176	421,0075	421,0141	420,0062	15,6	N/A		
	C ₁₆ H ₂₃ Br ₂ NO ₂	9,60	66.082	66.082	419,0096	419,0185	418,0106	21,3	N/A		
12	C ₂₀ H ₁₄ BrN ₃ O ₃	9,61	32.191	32.191	423,0219	423,0119	422,0041	23,5	N/A		
13	C ₂₃ H ₃₀ O ₃	9,74	17.265	17.265	354,2195	354,2237	353,2159	12,0	Dysideanone B	<i>Dysidea avara</i>	Jiao W.H., 2014

14	C ₁₃ H ₂₄ N ₆ O ₃	9,75	83.012	83.012	312,1910	312,1904	311,1826	-1,9	N/A		
15	C ₁₂ H ₁₄ BrN ₅ O ₅ S	9,88	17.724	17.724	421,0025	421,0041	419,9963	3,8	N/A		
	C ₁₂ H ₁₄ BrN ₅ O ₅ S	9,88	32.273	32.273	418,9899	418,9892	417,9814	-1,7	N/A		
17	C ₁₈ H ₂₅ N ₃ O ₄	10,10	178.705	130.108	347,1845	347,1814	346,1736	-8,9	N/A		
18	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₂	10,10	19.124	19.124	348,1838	348,1816	347,1738	-6,1	N/A		
19	C ₁₈ H ₃₀ O ₅	10,22	449.671	406.394	326,2093	326,2084	325,2005	-2,9	Phomopoxide C/D/E	<i>Phomopsis</i> sp. YE3250	Huang R., 2018
20	C ₂₁ H ₂₆ O	10,34	62.460	62.460	294,1984	294,1988	293,1909	1,3	20-Nor-3 α -acetoxy- 12-hydroxy-abieta- 5,7,9,11,13-pentaene	<i>Microcoleus</i> <i>lacustris</i> *	Pérez Gutiérrez R.M., 2008
21	C ₁₈ H ₃₀ O ₅	10,43	192.601	192.601	326,2093	326,2083	325,2005	-3,2	Phomopoxide C/D/E	<i>Phomopsis</i> sp. YE3250	Huang R., 2018
22	C ₁₈ H ₃₀ O ₅	10,74	158.798	158.798	326,2093	326,2088	325,2009	-1,7	Phomopoxide C/D/E	<i>Phomopsis</i> sp. YE3250	Huang R., 2018
23	C ₁₉ H ₃₂ O ₅	11,21	603.003	520.711	340,2250	340,2235	339,2156	-4,4	Plakorstatin 1/ 2	<i>Plakortis nigra</i>	Pettit G. R., 2004
									manadoperoxide B/ isomanadoperoxide B	<i>Plakortis</i> cfr. <i>lita</i>	Fattorusso C., 2010
24	C ₂₃ H ₃₀ O ₂	11,27	30.822	30.822	338,2246	338,2263	337,2185	5,1	Photeroid B	<i>Phomopsis tersa</i>	Chen S., 2020
25	C ₂₅ H ₃₄ O ₃	11,78	15.968	15.968	382,2508	382,2516	381,2438	2,1	Ochocinone A	<i>Scyphocephalum</i> <i>ochocoa</i>	Foundikou H., 2018

									Ophiobolin T	<i>Ulocladium sp.</i>	Wang Q.X., 2013
									Knepachycarpanol C	<i>Knema pachycarpa</i>	Giap T.H., 2019
26	C ₁₉ H ₃₂ O ₅	11,84	160.017	160.017	340,2250	340,2238	339,2160	-3,4	Plakorstatin 1/ 2	<i>Plakortis nigra</i>	Pettit G. R., 2004
									manadoperoxide B/ isomanadoperoxide B	<i>Plakortis cfr. lita</i>	Fattorusso C., 2010
27	C ₃₅ H ₅₄ O ₁₁ S	12,77	23.120	23.120	682,3387	682,3392	681,3314	0,8	N/A		
28	C ₂₆ H ₃₈ N ₂ O	14,29	12.037	12.037	394,2984	394,2989	393,2911	1,2	N/A		
29	C ₁₉ H ₃₂ O ₅	16,15	65.114	65.114	340,2250	340,2241	339,2163	-2,6	Plakorstatin 1/ 2	<i>Plakortis nigra</i>	Pettit G. R., 2004
									manadoperoxide B/ isomanadoperoxide B	<i>Plakortis cfr. lita</i>	Fattorusso C., 2010

* biểu thị thuộc nhóm vi khuẩn lam

KẾT LUẬN

1. Đã định danh đến cấp độ loài của 34 chủng vi khuẩn lam trong số 50 chủng phân lập tại một số địa phương ở Việt Nam thuộc 14 loài: *Aulosira laxa*; *Ahomia soli*; *Desmonostoc lechangense*; *D. meilinense*; *D. persicum*; *Aliinostoc magnakinatifex*; *A. catenatum*; *A. morphoplasticum*; *Dulcicalothrix necridiiformans*; *Scytonema bilaspurense*; *Neowestiellopsis persica*; *Westiellopsis prolifica* và *Hapalosiphon welwitschia*; 16 chủng còn lại được định danh đến cấp độ chi thuộc 4 chi là *Aulosira*, *Desmonostoc*, *Desikacharya* và *Aliinostoc*, trong đó chúng thuộc 10 loài chưa được đặt tên trong hệ thống vi khuẩn lam.
2. Đã phát hiện được cao chiết tổng số của 12 trong 50 chủng vi khuẩn lam có hoạt tính kháng khuẩn, trong đó cao chiết từ chủng CAVN8204 ức chế mạnh vi khuẩn *Bacillus cereus* với đường kính vòng vô khuẩn đạt 19,0 mm. Cao chiết của 7 trong số 12 chủng vi khuẩn lam này thể hiện hoạt tính ức chế tế bào ung thư, trong đó cao chiết của chủng *Scytonema bilaspurense* NK13 thể hiện độc tính mạnh trên tế bào ung thư HeLa với giá trị IC₅₀ là 3,8 µg/ml.
3. Cao chiết tổng số từ chủng *Scytonema bilaspurense* NK13 có khả năng gây chết tế bào ung thư cổ tử cung HeLa thông qua kích hoạt apoptosis, gây ngừng chu kỳ tế bào tại pha S (theo cơ chế không phụ thuộc p53) và ức chế quá trình di cư (với sự điều hòa biểu hiện của các gen BAX, CASP, CDKN, N-cadherin, Integrin, FAK, PI3K, AKT). Đồng thời, đã phân tách một phân đoạn có khả năng ức chế mạnh tế bào HeLa với giá trị IC₅₀ là 3,5 µg/ml. Phân đoạn này được đặt tên là F6 chứa 2,4 mg từ 13,9 g cao chiết tổng số từ chủng *S. bilaspurense* NK13 và đã được phân tích thành phần chất dựa vào phương pháp khối phổ độ phân giải cao.

KIẾN NGHỊ

- ✓ Tinh sạch và xác định cấu trúc cấu tạo của hoạt chất trong phân đoạn F6 của chủng *Scytonema bilaspurense* NK13 bằng phương pháp cộng hưởng từ hạt nhân (NMR).
- ✓ Đánh giá cơ chế tác động của các chất tinh sạch trong phân đoạn F6 lên tế bào ung thư HeLa.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

I. Bài báo đăng trên tạp chí quốc tế thuộc danh mục ISI/SCOPUS: 03

1. Pham, H. T.L.*, **Ngo, T.T.**, Tran, T. V., Duong, T. A., Tran, L. D., Tran, A. T.T., Nguyen, V.T.H. & Nguyen, S. V. (2025) “Classification of *Nostoc*-like Morphology Cyanobacteria Isolated from Paddy Soil into *Aliinostoc*, *Aulosira* and *Desmonostoc*”. *Frontiers in Microbiology*, 16, 1581725. doi: 10.3389/fmicb.2025.1581725 (Tạp chí Q1; impact factor: 4,5)
2. **Trang, N. T.**, Bich-Loan, N. T., Kien, K. T., Thanh, N. L., Luong Hang, P.T.*, & Dinh Thang, N.*(2025) Extract of *Scytonema bilaspurense* NK13 strongly exhibits anticancer activities on cervical cancer HeLa cells. *Applied Phycology*, 6(1), 210-222. (Tạp chí Q2, impact factor: 3,0)
3. **Ngo, T. T.**, Nguyen, B. L. T., Duong, T. A., Nguyen, T. H. T., Nguyen, T. L., Kieu, K. T., Do, M.H.T., Nguyen, S.V., Nguyen, T.D. & Pham, H. L.T.*(2022) Polyphasic evaluation and cytotoxic investigation of isolated cyanobacteria with an emphasis on potent activities of a *Scytonema* strain. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1025755. (Tạp chí Q1, impact factor: 6,0)

II. Bằng độc quyền sáng chế: 01

1. Phạm Thị Lương Hằng, **Ngô Thị Trang**, Nguyễn Thị Bích Loan, Nguyễn Đình Thắng (2023) “Chủng vi khuẩn lam *Scytonema* sp. NK1313 thuần khiết về mặt sinh học có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất gây ức chế tăng sinh tế bào ung thư, kích hoạt sự chết của tế bào ung thư theo chương trình và kháng khuẩn”. Bằng độc quyền sáng chế, số 37732, Cục Sở hữu Trí tuệ, Bộ Khoa học và Công nghệ, quyết định số 89837/QĐ-SHTT ngày 30/10/2023.

III. Báo cáo trình bày tại hội nghị quốc tế: 01

1. **Trang T. Ngo**, Hang T. L. Pham*, Tuan A. Duong, Thu-Huyen T. Nguyen, Thang V. Tran, Thanh L. Nguyen, Lien T. Nguyen (2022) “Classification of cyanobacteria isolated in Hanoi based on polyphasic approach”. Presentation at 22nd Symposium of the International Association of Cyanophyte/Cyanobacteria

Research, 14th - 18th August 2022, University of South Bohemia in České Budějovice, Faculty of Science, České Budějovice, Czech Republic.

IV. Báo cáo đăng trong kỷ yếu hội nghị trong nước: 01

1. **Ngô Thị Trang**, Nguyễn Thị Thu Hà, Bùi Lê Đăng Minh, Nguyễn Thị Thu Huyền, Trần Thị Thùy Anh, Phạm Thị Lương Hằng* (2022) “Định danh và đánh giá hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm của hai chủng vi khuẩn lam DL1 và DL12.” tr. 467- 473 in: Báo cáo khoa học Hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc 2022, Đại học Tây Nguyên, Đak Lak, 4/11/2022, Nhà xuất bản Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, 1390tr.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

I. Tiếng Việt

1. Nguyễn Đức Bách, Chu Đức Hà, Vũ Lê Diệu Hương & Phí Thị Cẩm Miện (2021), “Định danh và xác định đặc điểm sinh trưởng của chủng vi khuẩn lam *Arthrospira platensis* phân lập từ hồ Văn Quán”, *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, số 19 (5), trang 672 - 683.
2. Nguyễn Đức Diện, Nguyễn Lê Ái Vĩnh, Võ Hành (2018), “Danh lục các loài vi khuẩn lam có tế bào dị hình (*Heterocytous cyanobacteria*) trong đất trồng ở Việt Nam theo hệ thống phân loại của J. Komárek (2013)”, trang 84-90 trong: Kỷ yếu Hội nghị Khoa học toàn quốc về Sinh thái và Tài nguyên sinh vật lần thứ 7.
3. Hoàng Phương Hà, Trần Văn Nhị, Lê Quang Huân (2003), “Đặc điểm của một số loài VKL thuộc chi *Anabeana* phân lập từ ruộng lúa Việt Nam”, tr. 81 – 85 trong: Tuyển tập những Vấn đề nghiên cứu cơ bản trong Khoa học sự sống.
4. Võ Hành, Hồ Sỹ Hành, Lê Nhất, T. & Dương Đức Tiến (2006), “Kết quả phân lập một số loài Vi khuẩn lam (cyanobacteria) có tế bào dị hình trong đất trồng ở tỉnh Đắk Lắk”, *Tạp chí Khoa học, Đại học Quốc gia Hà Nội: KHTN&CN*, số 22 (1), trang 57-63.
5. Hồ Sỹ Hạnh và Võ Hành (2006), “Sử dụng kỹ thuật RAPD-PCR để xác định quan hệ di truyền của một số loài thuộc chi *Calothrix* phân lập từ đất trồng lúa tỉnh Đắk Lắk”, *Tạp chí Sinh học*, số 28 (1), trang 68 - 74.
6. Phạm Thị Lương Hằng, Trần Văn Thắng, Trương Quỳnh Chi, Ngô Thị Trang, Lê Văn Nhật Anh & Lê Văn Khoa (2025), “Tác dụng ức chế của màng vi tảo đối với vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*”, *Tạp chí Khoa học, Đại học Quốc gia Hà Nội: Khoa học tự nhiên và Công nghệ*, Số 41 (1), trang 81 - 88.
7. Cao Thị Huệ, Lê Thị Ngọc Quỳnh, Nguyễn Thị Lan Hương, Nguyễn Thị Kim Cúc & Đặng Diễm Hồng (2020), “Đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của các cận chiết từ chủng vi khuẩn lam *Spirulina platensis* BM”, trang 274 - 276 trong: Tuyển tập Hội nghị Khoa học thường niên năm 2020.

8. Nguyễn Văn Kiên, Trương Quỳnh Chi, Ngô Thị Trang, Nguyễn Thị Nhâm, Lê Văn Khoa, Phạm Thị Lương Hằng (2022), “Nghiên cứu khả năng ức chế vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* bởi một số chủng vi khuẩn lam”, trang 729 - 734 trong: Báo cáo khoa học Hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc 2022, Đại học Tây Nguyên, Đak Lak, 4/11/2022, Nhà xuất bản Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, 1390tr.
9. Nguyễn Thị Thu Liên, Lê Thị Tuyết Nhân, Nguyễn Hồng Sơn, Nguyễn Thị Huệ, Phạm Thị Diễm Thi (2017), “Đa dạng thành phần loài vi khuẩn lam tiềm năng sinh học chất kháng khuẩn, kháng nấm từ đất ruộng lúa huyện Phú Vang, Thừa Thiên Huế”, *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, số 126 (3D), tr. 97-107.
10. Phạm Thị Bình Nguyên và Ngô Thanh Phong (2020), “Đa dạng vi khuẩn lam ở một số thủy vực thuộc tỉnh Trà Vinh”, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, số 56 (Số chuyên đề: Khoa học tự nhiên) (2), trang 115-123.
11. Dương Đức Tiến (1996), Phân loại vi khuẩn lam ở Việt Nam, Nhà xuất bản Nông nghiệp, 220 trang.
12. Ngô Thị Trang, Đoàn Thị Quế, Nguyễn Thùy Liên và Phạm Thị Lương Hằng (2012), “Phân lập một số chủng vi khuẩn lam trên địa bàn Hà Nội phục vụ cho nghiên cứu hoạt tính kháng khuẩn”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, số 50 (3C), trang 525 - 529.
13. Ngo T.T., Tong T.N.A., Lai N.K., Tran T.H., Nguyen T.B.L., Tran T.T. A. & Pham T.L.H. (2021), “Investigation of Cytotoxic Activity of Cyanobacterial Strains Isolated from Water and Soil Samples Collected in Hanoi”, *VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology*, số. 37 (3), trang 26 - 36.
14. Lê Thị Ánh Tuyết, Nguyễn Thị Giang An, Hồ Sĩ Hạnh, Đặng Diễm Hồng, Nguyễn Anh Dũng, Mundt S. (2011), “Flourensadiol - hợp chất kháng sinh tách từ vi khuẩn lam *Angaena* sp.”, *Y học Việt Nam*, số. 2, trang 194 - 199.

II. Tiếng Anh

15. Acuña U.M., Zi, J., Orjala J., de Blanco E.J.C. (2015), “Ambiguine I isonitrile from *Fischerella ambigua* induces caspase-independent cell death in MCF-7 hormone dependent breast cancer cells”, *International journal of cancer research*, Vol. 49 (1), pp. 1655.
16. Agustini N.W.S. & Wijayanto Y. (2020), “Isolation, identification of fatty acids from *Spirulina platensis* as antibacterial”, *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, Vol. 457 (1), pp. 012033.
17. Allakhverdiev S.I., Kreslavski V.D., Zharmukhamedov S.K., Voloshin R.A., Korol’Kova D.V., Tomo T. & Shen J.R. (2016), “Chlorophylls d and f and their role in primary photosynthetic processes of cyanobacteria”, *Biochemistry (Moscow)*, Vol. 81 (3), pp. 201-212.
18. Andersen R.A. & Kawachi M. (2005), *Traditional microalgae isolation techniques*. Trang 83 - 100 trong: Andersen, R.A. (Ed.), *Algal Culturing Techniques*, 578 trang. Elsevier, Amsterdam
19. Anahas A.M.P. & Muralitharan G. (2018), “Characterization of heterocystous cyanobacterial strains for biodiesel production based on fatty acid content analysis and hydrocarbon production”, *Energy Conversion and Management*, Vol. 157, pp. 423-437.
20. Anjum K., Abbas S.Q., Akhter N., Shagufta B.I., Shah S.A.A., Hassan S.S.U. (2017), “Emerging biopharmaceuticals from bioactive peptides derived from marine organisms”. *Chemical biology & drug design*, Vol. 90 (1), pp. 12-30.
21. Bagchi S.N., Dubey N., Singh P. (2017), “Phylogenetically distant clade of *Nostoc*-like taxa with the description of *Aliinostoc* gen. nov. and *Aliinostoc morphoplasticum* sp. nov.”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 67 (9), pp. 3329-3338.
22. Bain P., Shaw G. & Patel B. (2007), “Induction of p53-regulated gene expression in human cell lines exposed to the cyanobacterial toxin

- cylindrospermopsin”, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, Vol. 70 (19), pp. 1687-1693.
23. Bennett A.C., Murugapiran S.K. & Hamilton T.L. (2020), “Temperature impacts community structure and function of phototrophic Chloroflexi and Cyanobacteria in two alkaline hot springs in Yellowstone National Park”, *Environmental microbiology reports*, Vol. 12 (5), pp. 503-513.
 24. Bergsland K.J. & Haselkorn R.O.B.E.R.T. (1991), “Evolutionary relationships among eubacteria, cyanobacteria, and chloroplasts: evidence from the *rpoC1* gene of *Anabaena* sp. strain PCC 7120”, *Journal of bacteriology*, Vol. 173 (11), pp. 3446-3455.
 25. Bladt S. (2009), *Plant Drug Analysis: A thin layer chromatography atlas*. Springer Science & Business Media.
 26. Blunt J.W., Munro M.G., Battershill C.N., Copp B.R., McCombs J.D. & Perry N.B. (1990), “From the Antarctic to the Antipodes; 45 of marine chemistry”, *New journal of chemistry*, Vol. 14 (10), pp. 761-775.
 27. Bombe K. (2020), “Spirulina market worth \$629.6 million by 2025”, Exclusive report by Meticulous research and EABA. <https://www.meticulousresearch.com/pressrelease/271/spirulina-market-2028>.
 28. Boyer S.L., Flechtner V.R. & Johansen J.R. (2001), “Is the 16S–23S rRNA internal transcribed spacer region a good tool for use in molecular systematics and population genetics? A case study in cyanobacteria”, *Molecular biology and evolution*, Vol. 18 (6), pp. 1057-1069.
 29. Boyer S.L., Johansen J.R., Flechtner V.R., Howard G.L. (2002), “Phylogeny and genetic variance in terrestrial Microcoleus (cyanophyceae) species based on sequence analysis of the 16s rRNA gene and associated 16s - 23S ITS region 1”, *Journal of phycology*, Vol. 38 (6), pp. 1222-1235.
 30. Brilisauer K., Rapp J., Rath P., Schöllhorn A., Bleul L., Weiß E., Stahl M., Grond S. & Forchhammer K. (2019), “Cyanobacterial antimetabolite 7-deoxy-

- sedoheptulose blocks the shikimate pathway to inhibit the growth of prototrophic organisms”, *Nature communications*, Vol. 10 (1), pp. 1-11.
31. Brumley D., Spencer K.A., Gunasekera S.P., Sauvage T., Biggs J., Paul V.J., Luesch H. (2018), “Isolation and characterization of Anaephenes A - C, alkylphenols from a filamentous cyanobacterium (*Hormoscilla* sp., Oscillatoriales)”, *Journal of natural products*, Vol. 81 (12), pp. 2716-2721.
 32. Bui H.T., Jansen R., Pham H.T. & Mundt S. (2007), “Carbamidocyclophanes A - E, Chlorinated Paracyclophanes with Cytotoxic and Antibiotic Activity from the Vietnamese Cyanobacterium *Nostoc* sp.”, *Journal of natural products*, Vol. 70 (4), pp. 499-503.
 33. Cabanillas A.H., Tena Perez V., Maderuelo Corral S., Rosero Valencia D.F., Martel Quintana A., Ortega Domenech M. & Rumbero Sanchez A. (2018), “Cybastacines A and B: antibiotic sesterterpenes from a *Nostoc* sp. cyanobacterium”, *Journal of Natural Products*, Vol. 81(2), pp. 410 - 413.
 34. Cagide E., Becher P.G., Louzao M.C., Espiña B., Vieytes M.R., Jüttner F., Botana L.M. (2014), “Hapalindoles from the cyanobacterium *Fischerella*: Potential sodium channel modulators”, *Chemical Research in Toxicology*, Vol. 27 (10), pp. 1696-1706.
 35. Cardllina J.H., Moore R.E., Arnold E.V., Clardy J. (1979), “Structure and absolute configuration of malyngolide, an antibiotic from the marine blue-green alga *Lyngbya majuscula* Gomont”, *Journal of Organic Chemistry*, Vol. 44 (23), pp. 4039-4042.
 36. Carmeli S., Moore R.E. & Patterson G.M. (1990) “Tolytoxin and new scytonemins from three species of *Scytonema*”, *Journal of natural products*, Vol. 53 (6), pp. 1533-1542.
 37. Carpine R., Sieber S. (2021), “Antibacterial and antiviral metabolites from cyanobacteria: Their application and their impact on human health”, *Current Research in Biotechnology*, Vol. 3, pp. 65-81.

38. Casamatta D.A., Villanueva C.D., Garvey A.D., Stocks H.S., Vaccarino M., Dvořák P., Hašler P., Johansen J.R. (2020), "*Reptodigitus chapmanii* (Nostocales, hapalosiphonaceae) gen. Nov.: A unique nostocalean (cyanobacteria) genus based on a polyphasic Approach", *Journal of phycology*, Vol. 56 (2), pp. 425 - 436.
39. Catassi A., Cesario A., Arzani D., Menichini P., Alama A., Bruzzo C., Imperatori A., Rotolo N., Granone P., Russo P. (2006), "Characterization of apoptosis induced by marine natural products in non small cell lung cancer A549 cells", *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, Vol. 63 (19), pp. 2377-2386.
40. Cavalcante G.C., Schaan A.P., Cabral G.F., Santana-da-Silva M.N., Pinto P., Vidal A.F. & Ribeiro-dos-Santos Â. (2019), "A cell's fate: an overview of the molecular biology and genetics of apoptosis", *International journal of molecular sciences*, Vol. 20 (17), pp. 4133.
41. Chang T.T., More S.V., Lu I.H., Hsu J.C., Chen T.J., Jen Y.C., Lu C-K. & Li W.S. (2011), "Isomalyngamide A, A-1 and their analogs suppress cancer cell migration in vitro", *European journal of medicinal chemistry*, Vol. 46 (9), pp. 3810-3819.
42. Chen S., Liu Z., Tan H., Chen Y., Zhu S., Liu H. & Zhang W. (2020) "Photeroids A and B, unique phenol–sesquiterpene meroterpenoids from the deep-sea-derived fungus *Phomopsis tersa*", *Organic & Biomolecular Chemistry*, Vol. 18 (4), pp. 642-645.
43. Chen X., Smith G.D., Waring P. (2003), "Human cancer cell (Jurkat) killing by the cyanobacterial metabolite calothrixin A", *Journal of applied phycology*, Vol. 15, pp. 269-277.
44. Choi H., Engen N., Smith J.E., Preskitt L.B., Gerwick W.H. (2010), "Crossbyanols A - D, toxic brominated polyphenyl ethers from the Hawai'ian bloom-forming Cyanobacterium *Leptolyngbya crossbyana*", *Journal of natural products*, Vol. 73 (4), pp. 517-522.

45. Choi H., Mascuch S.J., Villa F.A., Byrum T., Teasdale M.E., Smith J.E., Gerwick W.H. (2012), "Honaucins A - C, potent inhibitors of inflammation and bacterial quorum sensing: synthetic derivatives and structure-activity relationships", *Chemistry & biology*, Vol. 19 (5), pp. 589-598.
46. Comte K., Šabacká M., Carré-Mlouka A., Elster J., Komárek J. (2007), "Relationships between the Arctic and the Antarctic cyanobacteria; three *Phormidium*-like strains evaluated by a polyphasic approach", *FEMS microbiology ecology*, Vol. 59 (2), pp. 366-376.
47. Darzynkiewicz Z., Huang X. & Zhao H. (2017), "Analysis of cellular DNA content by flow cytometry", *Current protocols in immunology*, Vol. 119 (1), pp. 5-7.
48. Demay J., Bernard C., Reinhardt A. & Marie, B. (2019), "Natural products from cyanobacteria: Focus on beneficial activities", *Marine drugs*, Vol. 17 (6), pp. 320.
49. Derikvand P., Llewellyn C.A. & Purton S. (2017), "Cyanobacterial metabolites as a source of sunscreens and moisturizers: a comparison with current synthetic compounds", *European Journal of Phycology*, Vol. 52 (1), pp. 43-56.
50. Deyab M.A., El-Sheekh M.M., Hasan R.S., Elsadany A.Y. & Abu Ahmed S.E.S. (2021), "Phytochemical components of two cyanobacterial local strains", *Scientific Journal for Damietta Faculty of Science*, Vol. 11 (1), pp. 67-75.
51. Doan T.N., Rickards R.W., Rothschild J.M. & Smith G.D. (2000), "Allelopathic actions of the alkaloid 12-epi-hapalindole E isonitrile and calothrixin A from cyanobacteria of the genera *Fischerella* and *Calothrix*", *Journal of Applied Phycology*, Vol. 12, pp. 409-416.
52. Dobretsov S., Teplitski M., Alagely A., Gunasekera S.P. & Paul V.J. (2010), "Malyngolide from the cyanobacterium *Lyngbya majuscula* interferes with quorum sensing circuitry", *Environmental microbiology reports*, Vol. 2 (6), pp. 739-744.

53. Drew L., Fine R.L., Do T.N., Douglas G.P. & Petrylak D.P. (2002), "The novel antimicrotubule agent cryptophycin 52 (LY355703) induces apoptosis via multiple pathways in human prostate cancer cells", *Clin. Cancer Res.*, Vol. 8, pp. 3922 - 3932.
54. Dvořák P., Hašler P. & Pouličková A. (2012), "Phylogeography of the *Microcoleus vaginatus* (cyanobacteria) from three continents - a spatial and temporal characterization", *PLoS One*, Vol. 7 (6), pp. e40153.
55. Dvořák P., Pouličková A., Hašler P., Belli M., Casamatta D.A. & Papini A. (2015), "Species concepts and speciation factors in cyanobacteria, with connection to the problems of diversity and classification", *Biodiversity and Conservation*, Vol. 24, pp. 739-757.
56. El-Gazzar, N., Said, L., Al-Otibi, F. O., AbdelGawwad, M. R., & Rabie, G. (2025). Antimicrobial and cytotoxic activities of natural (Z)-13-docosenamide derived from *Penicillium chrysogenum*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 15, 1529104.
57. Fan T. J., Han L. H., Cong R.S. & Liang J. (2005), "Caspase family proteases and apoptosis", *Acta biochimica et biophysica Sinica*, Vol. 37 (11), pp. 719-727.
58. Fattorusso C., Persico M., Calcinaì B., Cerrano C., Parapini S., Taramelli D., Novellino E., Romano A., Scala F., Ernesto Fattorusso E. & Tagliatalata-Scafati O. (2010), "Manadoperoxides A– D from the Indonesian sponge *Plakortis* cfr. *simplex*. Further insights on the structure - activity relationships of simple 1, 2-dioxane antimalarials", *Journal of natural products*, Vol. 73 (6), pp. 1138-1145.
59. Felsenstein J. (1981), "Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach". *Journal of molecular evolution*, Vol. 17, pp. 368 - 376.
60. Felsenstein J. (1985), "Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap". *Evolution*, Vol. 39, pp. 783-791.
61. Flombaum P, Gallegos J.L., Gordillo R.A., Rincón J., Zabala L.L. & Jiao N. (2013), "Present and future global distributions of the marine Cyanobacteria

- Prochlorococcus* and *Synechococcus*”, *Proc Natl Acad Sci.*, Vol. 110, pp. 9824 - 9829.
62. Foundikou, H., Mbiantcha, M., Bankeu Kezetas, J. J., Tchouankeu, J. C., Shaheen, F., Choudhary M.I., Lebibi J. & Feuya Tchouya G.R. (2018) “Two new alkylresorcinol derivatives from the leaves of *Scyphocephalum ochocoa*”, *Zeitschrift für Naturforschung B*, Vol. 73 (6), pp. 381-388.
 63. Fukuda K., Ogawa M., Taniguchi H. & Saito M. (2016), “Molecular approaches to studying microbial communities: targeting the 16S ribosomal RNA gen”. *Journal of UOEH*, Vol. 38(3), pp.223-232.
 64. Furmaniak M.A., Misztak A.E., Franczuk M.D., Wilmotte A., Waleron M. & Waleron K.F. (2017), “Edible cyanobacterial genus *Arthrospira*: Actual state of the art in cultivation methods, genetics, and application in medicine”, *Frontiers in Microbiology*, Vol. 8, pp. 2541.
 65. Furusawa E., Moore R.E., Mynderse J.S., Norton T.R. & Patterson G.M.L. (1994), “New purified culture of *Scytonema pseudohofmanni* ATCC 53141 is used to produce scytophycins A, B, C, D and E, which are potent cytotoxins and antineoplastic agents”. USA Patent, 5281533.
 66. Gaysina L.A., Bohunická M., Hazuková V. & Johansen J.R. (2018), “Biodiversity of terrestrial cyanobacteria of the South Ural region”, *Cryptogamie, Algologie*, Vol. 39 (2), 167-198.
 67. Ghasemi Y., Yazdi M.T., Shokravi S. & Zarrini G. (2003), “Antifungal and antibacterial activity of paddy-fields cyanobacteria from the north of Iran”, *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran*, Vol. 14 (3), pp. 203-209.
 68. Giap T.H., Thoa H.T., Oanh V.T.K., Hang N.T.M., Dang N.H., Thuc D.N., Hung N.V. & Thanh L.N. (2019), “New acetophenone and cardanol derivatives from *Knema pachycarpa*”, *Natural Product Communications*, Vol. 14 (6), 1934578X19850046.
 69. Gigova L., Toshkova R., Gardeva E., Gachev G., Ivanova N., Yossifova L. & Petkov G.D. (2011), “Growth inhibitory activity of selected microalgae and

- cyanobacteria towards human cervical carcinoma cells (HeLa)”, *J. Pharm. Res.*, Vol. 4 (12), pp. 4702-4707.
70. Gonzalez-Esquer C.R., Smarda J., Rippka R., Axen S.D., Guglielmi G., Gugger M. & Kerfeld C.A. (2016), “Cyanobacterial ultrastructure in light of genomic sequence data”, *Photosynthesis Research*, Vol. 129, pp. 147-157.
 71. Goshtasbi H., Safary A., Movafeghi A., Barar J., Akbarzadeh-Khiavi M. & Omidi Y. (2025), “Anticancer impacts of the unicellular cyanobacterium *Chroococcus turgidus* bioactive compounds in colorectal adenocarcinoma”, *BioImpacts: BI*, Vol. 15, pp. 30867.
 72. Grada A., Otero-Vinas M., Prieto-Castrillo F., Obagi Z. & Falanga V. (2017), “Research techniques made simple: analysis of collective cell migration using the wound healing assay”, *Journal of Investigative Dermatology*, Vol. 137 (2), pp. 11-16.
 73. Graham J.L., Loftin K.A., Ziegler A.C. & Meyer M.T. (2008), “Guidelines for design and sampling for cyanobacterial toxin and taste-and-odor studies in lakes and reservoirs”, U.S. Geological Survey, Scientific Investigations Report, No. 2008 - 5038, 39 p.
 74. Gugger M.F. & Hoffmann L. (2004), “Polyphyly of true branching cyanobacteria (Stigonematales)”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 54 (2), pp. 349-357.
 75. Guiry M.D. & Guiry G.M. (2023), *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Available online at: <https://www.algaebase.org/search/species/?name=aulosira> (Accessed September 9, 2025).
 76. Guo M., Ding G.B., Yang P., Zhang L., Wu H., Li H. & Li Z. (2016) “Migration suppression of small cell lung cancer by polysaccharides from *Nostoc commune* Vaucher”, *Journal of agricultural and food chemistry*, Vol. 64 (32), pp. 6277-6285.

77. Han B., McPhail K.L., Ligresti A., Di Marzo V. & Gerwick W.H. (2003), “Semiplenamides A - G, fatty acid amides from a papua New Guinea collection of the marine cyanobacterium *Lyngbya semiplena*”, *Journal of Natural Products*, Vol. 66 (10), pp.1364-1368.
78. Hauer T., Bohunická M., Johansen J.R., Mareš J. & Berrendero-Gomez E. (2014), “Reassessment of the cyanobacterial family Microchaetaceae and establishment of new families Tolypothrichaceae and Godleyaceae”. *Journal of Phycology*, Vol. 50 (6), 1089-1100.
79. Heisnam R., Keithellakpam O.S., Kshetrimayum V., Mukherjee P.K. & Sharma N. (2022), “Phycocyanin purified from *Westiellopsis* sp. induces caspase 3 mediated apoptosis in breast cancer cell line MDA-MB-231”, *Algal Research*, Vol. 68, pp. 102852.
80. Higuchi, R., Fujita, M., Matsumoto, S., Yamada, K., Miyamoto, T., & Sasaki, T. (1996). Biologically Active Glycosides from Asteroidea, 35. Isolation and Structure of Four New Steroid Glycoside Di-O-sulfates from the Starfish *Asteropecten latespinosus*. *Liebigs Annalen*, 1996(5), 837-840.
81. Ho C.J., Lin R.W., Zhu W.H., Wen T.K., Hu C.J., Lee Y.L., Hung T.I., Wang C. (2019), “Transcription-independent and-dependent p53-mediated apoptosis in response to genotoxic and non-genotoxic stress”, *Cell death discovery*, Vol. 5 (1), p.131.
82. Hoffmann L., Komárek J., Kaštovský J. (2005), “System of cyanoprokaryotes (cyanobacteria) - state in 2004”, *Algol. Stud.*, Vol. 117, pp. 95–115.
83. Hrouzek P., Lukešová A., Mareš J., Ventura S. (2013), “Description of the cyanobacterial genus *Desmonostoc* gen. nov. including *D. muscorum* comb. nov. as a distinct, phylogenetically coherent taxon related to the genus *Nostoc*”, *Fottea*, Vol. 13 (2), pp.201-213.
84. Hu Z., Chen H., Pang C. & Lin Q. (2008) “The expression of p53 and p16 in the course of microcystin-LR inducing of liver tumor”, *The Chinese-German Journal of Clinical Oncology*, Vol. 7 (12), pp. 690-693.

85. Huang R., Jiang B.G., Li X.N., Wang Y.T., Liu S.S., Zheng K.X., He J. & Wu S.H. (2018), "Polyoxygenated cyclohexenoids with promising α -glycosidase inhibitory activity produced by *Phomopsis* sp. YE3250, an endophytic fungus derived from *Paeonia delavayi*", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 66 (5), pp. 1140-1146.
86. Itean I., Rippka R., Tandeau de Marsac N., Herdman M. (2000), "Comparison of conserved structural and regulatory domains within divergent 16S rRNA–23S rRNA spacer sequences of cyanobacteria", *Microbiology*, Vol. 146(6), pp.1275-1286.
87. Jaki B., Orjala J., Bürgi H.R., Sticher O. (1999), "Biological screening of cyanobacteria for antimicrobial and molluscicidal activity, brine shrimp lethality, and cytotoxicity", *Pharmaceutical biology*, Vol. 37 (2), pp.138-143.
88. Janssen E.M.-L., Jones M.R., Pinto E., Dörr F., Rios Jacinavicius F., Mazur-Marzec H., Szubert K., Konkel R. Tartaglione L., Dell'Aversano C., Miglione A., Beach D.G., McCarron P., Miles C.O., Sivonen K., Fewer D.P., Jokela J., Wahlsten M., Niedermeyer T., Schanbacher F., Leão P., Preto M., D'Agostino P.M., Baunach M., Dittmann E., Miguel-Gordo M., Reher R. & Sieber S. (2024), *Dataset- CyanoMetDB, Comprehensive database of secondary metabolites from cyanobacteria*, [Zenodo, S75. DIO 10.5281/zenodo.13854577](https://zenodo.org/record/13854577).
89. Jeong J.H., Kang S.S., Park K.K., Chang H.W., Magae J. & Chang, Y.C. (2010), "p53-independent induction of G1 arrest and p21WAF1/CIP1 expression by ascofuranone, an isoprenoid antibiotic, through downregulation of c-Myc", *Molecular cancer therapeutics*, Vol. 9 (7), pp. 2102-2113.
90. Jiao W.H., Xu T.T., Yu H.B., Chen G.D., Huang X.J., Yang F., Li Y.S., Han B.N., Liu B.N. & Lin H.W. (2014), "Dysideanones A–C, unusual sesquiterpene quinones from the south china sea sponge *Dysidea avara*", *Journal of Natural Products*, Vol. 77 (2), pp. 346-350.
91. Jones M.R., Pinto E., Torres M.A., Dörr F., Mazur-Marzec H., Szubert K., Tartaglione L., Dell'Aversano C., Miles C.O., Beach D.G., McCarron P.,

- Suvibwb K., Fewer D.P., Jokela J. & Janssen E.M.L. (2021) “CyanoMetDB, a comprehensive public database of secondary metabolites from cyanobacteria”, *Water Research*, 196, 117017.
92. Kabirnataj S., Nematzadeh G.A., Talebi A.F., Saraf A., Suradkar A., Tabatabaei M. & Singh P. (2020), “Description of novel species of *Aliinostoc*, *Desikacharya* and *Desmonostoc* using a polyphasic approach”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 70 (5), pp.3413-3426.
 93. Kabirnataj S., Nematzadeh G.A., Talebi A.F., Tabatabaei M. & Singh P. (2018), “*Neowestiellopsis* gen. nov, a new genus of true branched cyanobacteria with the description of *Neowestiellopsis persica* sp. nov. and *Neowestiellopsis bilateralis* sp. nov., isolated from Iran”, *Plant Systematics and Evolution*, Vol. 304, pp. 501-510.
 94. Kalemkerian G.P., Ou X.L., Adil M.R., Rosati R., Khouliani M.M., Madan S.K. & Pettit G.R. (1999), “Activity of dolastatin 10 against small-cell lung cancer in vitro and in vivo: Induction of apoptosis and bcl-2 modification”, *Cancer Chemother. Pharm.*, Vol. 43, pp. 507 -515.
 95. Kallifidas D., Dhakal D., Chen M., Chen Q.Y., Kokkaliari S., Colon Rosa N. A. & Luesch H. (2024), “Biosynthesis of Dolastatin 10 in marine cyanobacteria, a prototype for multiple approved Cancer drugs”, *Organic letters*, Vol. 26 (7), pp.1321-1325.
 96. Kaneko T., Sato S., Kotani H., Tanaka A., Asamizu E., Nakamura Y., Miyajima N., Hirosawa M., Sugiura M., Sasamoto S., Kimura T. & Tabata S. (1996), “Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions”, *DNA research*, Vol. 3 (3), pp. 109-136.
 97. Kapli P., Yang Z. & Telford M.J. (2020), “Phylogentic tree building in the genomic age”, *Nature Reviews Genetics*, Vol. 21 (7), pp. 428-444.

98. Kar J., Ramrao D.P., Zomuansangi R., Lalbiakluangi C., Singh S.M., Joshi N.C. & Singh P.K. (2022), “Revisiting the role of cyanobacteria-derived metabolites as antimicrobial agent: A 21st century perspective”, *Frontiers in Microbiology*, Vol. 13, pp. 1034471.
99. Katoh K. & Standley D.M. (2013), “MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability”, *Molecular biology and evolution*, Vol. 30 (4), pp. 772-780.
100. Kawaguchi M., Satake M., Zhang B.T., Xiao Y.Y., Fukuoka M., Uchida H. & Nagai H. (2020), “Neo-aplysiatoxin A isolated from Okinawan cyanobacterium *Moorea producens*”, *Molecules*, Vol. 25 (3), pp. 457.
101. Kim M., Oh H.S., Park S.C. & Chun J. (2014) “Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gen sequence similarity for species demarcation of prokaryotes”, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, Vol. 64(Pt 2), pp. 346–351.
102. Kim W.Y. & Sharpless N.E. (2006) “The regulation of INK4/ARF in cancer and aging”, *Cell*, Vol. 127 (2), pp. 265-275.
103. Komárek J., Kaštovský J., Mareš J. & Johansen J.R. (2014), “Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach”, *Preslia*, Vol. 86(4), pp. 295-335.
104. Koster R., Timmer-Bosscha H., Bischoff R., Gietema J.A. & de Jong S. (2011), “Disruption of the MDM2 - p53 interaction strongly potentiates p53-dependent apoptosis in cisplatin-resistant human testicular carcinoma cells via the Fas/FasL pathway”, *Cell death & disease*, Vol. 2 (4), e148-e148.
105. Kumar D., Kaštánek P. & Adhikary S.P. (2018), “Exopolysaccharides from cyanobacteria and microalgae and their commercial application”, *Current Science*, Vol. 115 (2), 234-241.
106. Kumar S., Stecher G., Suleski M., Sanderford M., Sharma S. & Tamura K. (2024), “MEGA12: Molecular Evolutionary Genetic Analysis version 12 for

- adaptive and green computing”. *Molecular Biology and Evolution*, 41(12), msae263.
107. Kwan J.C., Meickle T., Ladwa D., Teplitski M., Paul V. & Luesch H. (2011) “Lyngbyoic acid, a “tagged” fatty acid from a marine cyanobacterium, disrupts quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*”, *Molecular Biosystem*, Vol. 7, pp. 1205–1216.
 108. Larsson J., Nylander J.A. & Bergman B. (2011) “Genome fluctuations in cyanobacteria reflect evolutionary, developmental and adaptive traits”, *BMC evolutionary biology*, Vol. 11 (1), pp. 187.
 109. Liang X., Matthew S., Chen Q.Y., Kwan J.C., Paul V.J. & Luesch H. (2019), “Discovery and total synthesis of doscadenamide A: A quorum sensing signaling molecule from a marine cyanobacterium”, *Organic letters*, Vol. 21 (18), pp. 7274-7278.
 110. Lien L.T., Tho N.T., Ha D.M., Hang P.L., Nghia P.T. & Thang N.D. (2015), “Influence of phytochemicals in piper betle linn leaf extract on wound healing”, *Burns & trauma*, 3.
 111. Liu X.J. (2003), “Cell differentiation and colony alteration of *Nostoc flagelliforme*, an edible terrestrial cyanobacterium in different liquid suspension culture”, *Folia Microbiol.*, Vol. 48, pp. 619-625.
 112. Luesch H., Yoshida W.Y., Moore R.E. & Paul V.J. (2000), “Isolation and Structure of the Cytotoxin Lyngbyabellin B and Absolute Configuration of Lyngbyapeptin A from the Marine Cyanobacterium *Lyngbya majuscula*”, *Journal of natural products*, Vol. 63 (10), pp.1437-1439.
 113. Ma D., Zou B., Cai G., Hu X. & Liu J.O. (2006) “Total synthesis of the cyclodepsipeptide apratoxin A and its analogues and assessment of their biological activities”, *Chemistry - A European Journal*, Vol. 12 (29), pp. 7615-7626.
 114. Maltseva S., Kezlya E., Krivova Z., Gusev E., Kulikovskiy M. & Maltsev Y. (2022), “Phylogeny and fatty acid profiles of *Aliinostoc vietnamicum* sp. nov.

- (cyanobacteria) from the soils of Vietnam”, *Journal of Phycology*, Vol. 58 (6), pp. 789-803.
115. Mazard S., Penesyanyan A., Ostrowski M., Paulsen I.T. & Egan S. (2016), “Tiny microbes with a big impact: the role of cyanobacteria and their metabolites in shaping our future”, *Marine drugs*, Vol. 14 (5), pp. 97.
116. Mazzola P.G., Lopes A.M., Hasmann F.A., Jozala A.F., Penna T.C., Magalhaes P.O., & Pessoa Jr A. (2008) “Liquid–liquid extraction of biomolecules: an overview and update of the main techniques”, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, Vol. 83 (2), pp. 143-157.
117. Miao C., Ren Y., Chen M., Wang Z. & Wang T. (2016), “Microcystin-LR promotes migration and invasion of colorectal cancer through matrix metalloproteinase-13 up-regulation”, *Molecular carcinogenesis*, Vol. 55 (5), pp.514-524.
118. Michl, J., Ingrouille, M. J., Simmonds, M. S., & Heinrich, M. (2014). Naturally occurring aristolochic acid analogues and their toxicities. *Natural product reports*, 31(5), 676-693.
119. Mitra S.K. & Schlaepfer D.D. (2006) “Integrin-regulated FAK–Src signaling in normal and cancer cells”, *Current opinion in cell biology*, Vol. 18 (5), pp.516-523.
120. Mo S., Kronic A., Pegan S.D., Franzblau S.G. & Orjala J. (2009), “An antimicrobial guanidine-bearing sesterterpene from the cultured cyanobacterium *Scytonema* sp.”, *Journal of Natural Products*, Vol. 72 (11), pp. 2043-2045.
121. Mohammed H., Appah J., Muhammad B.B., Egbe N.E. & Imhoitsike D.T. (2025), “In vitro Anti-Sickling Effect of *Arthrospira Platensis* Thallus Extract”, *International Journal of Pure and Applied Science Research*, Vol. 12 (1), pp. 181-193.

122. Mooberry S.L., Busquets L. & Tien G. (1997), "Induction of apoptosis by cryptophycin 1, a new antimicrotubule agent", *International journal of cancer*, Vol. 73 (3), pp. 440 - 448.
123. Mooberry S.L., Leal R.M., Tinley T.L., Luesch H., Moore R.E. & Corbett T.H. (2003), "The molecular pharmacology of symplostatin 1: A new antimitotic dolastatin 10 analog", *International journal of cancer*, Vol. 104 (4), pp.512-521.
124. Moore R.E. (1982), "Toxins, anticancer agents, and tumor promoters from marine prokaryotes", *Pure and applied chemistry*, Vol. 54(10), pp. 1919-1934.
125. Mosmann T. (1983) "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays", *Journal of immunological methods*, Vol. 65 (1-2), pp.55-63.
126. Na M., Ding Y., Wang B., Tekwani B.L., Schinazi R.F., Franzblau S., Kelly M., Stone R., Li X-C., Ferreira D. & Hamann M.T. (2010), "Anti-infective discorhabdins from a deep-water Alaskan sponge of the genus *Latrunculia*", *Journal of natural products*, Vol. 73 (3), pp. 383-387.
127. Nehul J.N. (2024), "Screening of extracts of a cyanobacterium *Scytonema schmidtii* gom for antineoplastic activity". *African Journal of Biomedical Research*, Vol. 27 (1S), pp. 1221 - 1225.
128. Nguyen B.L. T., Kieu K. T., Nguyen T.L., Nguyen K-T.T., Nguyen H.Q., Pham T.H., Muller M. Nachtergaele A., Duez P. & Nguyen T.D. (2021), "Toxicity and anti-proliferative properties of anisomeles indica ethanol extract on cervical cancer hela cells and zebrafish embryos", *Life*, Vol. 11 (3), pp. 257.
129. Nguyen T.D., Duong T.T., Le T.P.Q., Le M.H., Dang D.K., Lee J.J. & Bourguet-Kondracki M.L. (2011), "Inhibitory effects on nuclear factor κ B of the Vietnamese freshwater cyanobacteria", *Medicinal Chemistry Research*, Vol. 20 (6), pp. 790-793.
130. Oftedal L., Selheim F., Wahlsten M., Sivonen K., Døskeland S.O. & Herfindal L. (2010), "Marine benthic cyanobacteria contain apoptosis-inducing activity

- synergizing with daunorubicin to kill leukemia cells, but not cardiomyocytes”, *Marine drugs*, Vol. 8 (10), pp. 2659-2672.
131. Ohgami N., Yamanoshita O., Thang N.D., Yajima I., Nakano C., Wenting W., Ohnuma S. & Kato M. (2015), “Carcinogenic risk of chromium, copper and arsenic in CCA-treated wood”. *Environmental Pollution*, Vol. 206, pp.456-460.
 132. Olsson-Francis K., de La Torre R., Towner M.C. & Cockell C.S. (2009) “Survival of akinetes (resting-state cells of cyanobacteria) in low Earth orbit and simulated extraterrestrial conditions”, *Origins of Life and Evolution of Biospheres*, Vol. 39, pp. 565-579.
 133. Osorio-Santos K., Pietrasiak N., Bohunická M., Miscoe L.H., Kováčik L., Martin M.P. & Johansen J.R. (2014), “Seven new species of *Oculatella* (Pseudanabaenales, Cyanobacteria): taxonomically recognizing cryptic diversification”, *European journal of phycology*, Vol. 49(4), pp. 450 - 470.
 134. Pal S., Saraf A., Kumar N. & Singh P. (2024), “Igniting taxonomic curiosity: The amazing story of *Amazonocrinis* with the description of a new genus *Ahomia* gen. nov. and novel species of *Ahomia*, *Amazonocrinis*, and *Dendronalium* from the biodiversity-rich northeast region of India”, *Journal of Phycology*, Vol. 60 (2), pp. 387-408.
 135. Papaefthimiou D., Hrouzek P., Mugnai M.A., Lukesova A., Turicchia S., Rasmussen U. & Ventura S. (2008), “Differential patterns of evolution and distribution of the symbiotic behaviour in nostocacean cyanobacteria”, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, Vol. 58 (3), pp. 553 - 564.
 136. Pattenden G. & Thom S.M. (1992), “Cytotoxic Alkaloids from Blue-Green Algae: A Total Synthesis of (-)-Didehydromirabazole A”, *Synlett*, Vol. 1992 (06), pp.533-534.
 137. Patterson G.M. & Bolis C.M. (1994), “Scytonycin production by axenic cultures of the cyanobacterium *Scytonema ocellatum*”, *Natural Toxins*, Vol. 2 (5), pp. 280-285.

138. Patterson G.M., Smith C.D., Kimura L.H., Britton B.A. & Carmeli S. (1993), “Action of tolytoxin on cell morphology, cytoskeletal organization, and actin polymerization”, *Cell Motility and the Cytoskeleton*, Vol. 24 (1), pp. 39-48.
139. Pecundo M.H., Cai F., Chang A.C.G., Ren H., Li N., Li R. & Chen, T. (2021), “Polyphasic approach identifies two new species of *Desmonostoc* (Nostocales, Cyanobacteria) in the coralloid roots of *Cycas fairylakea* (Cycadales)”, *Phycologia*, Vol. 60 (6), pp.653-668.
140. Pecundo M.H., Chen T., dela Cruz T.E.E., Griffith M.P., Hu Z., Chen H. & Li N. (2023), “Discovery of cyanobacteria associated with cycads and description of three novel species in *Desmonostoc* (Nostocaceae)”, *Diversity*, Vol. 15(11), pp.1132.
141. Pérez Gutiérrez R.M., Martínez Flores A., Vargas Solís R. & Carmona Jimenez J. (2008), “Two new antibacterial norabietane diterpenoids from cyanobacteria, *Microcoleous lacustris*”, *Journal of natural medicines*, Vol. 62 (3), pp. 328-331.
142. Pettit G.R., Nogawa T., Knight J.C., Doubek D.L. & Hooper J.N.A. (2004), “Antineoplastic agents. 535. Isolation and structure of plakorstatins 1 and 2 from the Indo-Pacific sponge *Plakortis nigra*”, *Journal of natural products*, Vol. 67 (9), pp. 1611-1613.
143. Pham H.T.L., Nguyen L.T., Duong T.A., Bui D.T., Doan Q.T., Nguyen H.T. & Mundt S. (2017), “Diversity and bioactivities of nostocacean cyanobacteria isolated from paddy soil in Vietnam”, *Systematic and applied microbiology*, Vol. 40 (8), pp. 470-481.
144. Phan U.T.T., Nguyen H.D., Nguyen T.K.O., Tran T.H., Le T.H. & Tran T.T.P. (2024), “Anti-inflammatory effect of *Piper longum* L. fruit methanolic extract on lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 murine macrophages”, *Heliyon*, Vol. 10 (4).

145. Preisitsch M., Bui H.T.N., Bäcker C. & Mundt S. (2006) “Impact of temperature on the biosynthesis of cytotoxically active carbamidocyclophanes A–E in *Nostoc* sp. CAVN10”. *Journal of Applied Phycology*, Vol 28 (2), pp.951-963.
146. Preisitsch M., Harmrolfs K., Pham H.T., Heiden S.E., Füssel A., Wiesner C., Pretsch A., Swiatecka-Hagenbruch M., Niedermeyer T.H. & Müller R.S. (2015) “Anti-MRSA-acting carbamidocyclophanes H–L from the Vietnamese cyanobacterium *Nostoc* sp. CAVN2”, *The Journal of Antibiotics*, Vol. 68 (3), pp.165-177.
147. Ramaswamy A.V., Sorrels C.M. & Gerwick W.H. (2007), “Cloning and biochemical characterization of the hectochlorin biosynthetic gene cluster from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*”, *Journal of Natural Products*, Vol. 70 (12), pp. 1977-1986.
148. Ratnayake, S., Fang, X. P., Anderson, J. E., McLaughlin, J. L., & Evert, D. R. (1992). Bioactive constituents from the twigs of *Asimina parviflora*. *Journal of natural products*, 55(10), 1462-1467.
149. Rippka R., Deruelles J., Waterbury J.B., Herdman M. & Stanier R.Y. (1979) “Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria”, *Microbiology*, Vol. 111 (1), pp. 1-61.
150. Saraf A., Suradkar A., Dawda H.G., Gaysina L.A., Gabidullin Y., Kumat A. & Singh P. (2019), “Phylogenetic complexities of the members of Rivulariaceae with the re-creation of the family Calothrichaceae and description of *Dulcicalothrix necridiiformans* gen nov., sp nov., and reclassification of *Calothrix desertica*”, *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 366 (17), pp. fnz219.
151. Saraf A.G., Dawda H. G. & Singh P. (2019), “*Desikacharya* gen. nov., a phylogenetically distinct genus of Cyanobacteria along with the description of two new species, *Desikacharya nostocoides* sp. nov. and *Desikacharya soli* sp. nov., and reclassification of *Nostoc thermotolerans* to *Desikacharya thermotolerans* comb. Nov”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 69 (2), pp. 307-315.

152. Schopf J.W. & Packer B.M. (1987) “Early Archean (3.3-billion to 3.5-billion-year-old) microfossils from Warrawoona Group, Australia”. *Science*, 237 (4810), 70-73.
153. Schutte B., Nuydens R., Geerts H. & Ramaekers F. (1998) “Annexin V binding assay as a tool to measure apoptosis in differentiated neuronal cells”, *Journal of neuroscience methods*, Vol. 86 (1), pp.63-69.
154. Sciuto K. & Moro I., (2015), “Cyanobacteria: the bright and dark sides of a charming group”, *Biodiversity and Conservation*, Vol. 24, pp. 711-738.
155. Segraves N.L., Lopez S., Johnson T.A., Said S.A., Fu X., Schmitz F.J., Pietraszkiewicz H., Valeriote F.A. & Crews P. (2003). Structures and cytotoxicities of faspaplysin and related alkaloids from two marine phyla—Faspaplysinopsis sponges and Didemnum tunicates. *Tetrahedron Letters*, 44(17), 3471-3475.
156. Serrano M., Hannon G.J. & Beach D. (1993) “A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4”, *Nature*, Vol. 366 (6456), pp. 704-707.
157. Serrill J.D., Wan X., Hau A.M., Jang H.S., Coleman D.J., Indra A.K. & Ishmael J.E. (2016) “Coibamide A, a natural lariat depsipeptide, inhibits VEGFA/VEGFR2 expression and suppresses tumor growth in glioblastoma xenografts”, *Investigational new drugs*, Vol. 34 (1), pp. 24-40.
158. Shariatmadari Z., Riahi H. & Sonboli A. (2014), “Morphometric and phylogenetic analyses of *Anabaena* strains (Cyanoprokaryota) from terrestrial habitats of Iran”, *The Iranian Journal of Botany*, Vol. 20 (1), pp. 119-129.
159. Shashirekha S., Uma L. & Subramanian G. (1997), “Phenol degradation by the marine cyanobacterium *Phormidium valderianum* BDU 30501”, *Journal of Industrial microbiology and biotechnology*, Vol. 19(2), pp. 130-133.
160. Shim S.H., Chlipala G. & Orjala J., (2008), “Isolation and structure determination of a proteasome inhibitory metabolite from a culture of

- Scytonema hofmanni*”, *Journal of microbiology and biotechnology*, Vol. 18 (10), p.1655.
161. Simpkin V.L., Renwick M.J., Kelly R. & Mossialos E. (2017), “Incentivising innovation in antibiotic drug discovery and development: progress, challenges and next steps”, *The Journal of antibiotics*, Vol. 70 (12), pp.1087-1096.
 162. Singh P., Fatma A. & Mishra A.K. (2015), “Molecular phylogeny and evogenomics of heterocystous cyanobacteria using *rbc L* gen sequence data”, *Annals of Microbiology*, Vol. 65, pp. 799-807.
 163. Singh P., Minj R.A., Kunui K., Shaikh Z.M., Suradkar A., Shouche Y.S., Mishra A.K. & Singh S.S. (2016), “A new species of *Scytonema* isolated from Bilaspur, Chhattisgarh, India”, *Journal of Systematics and evolution*, Vol. 54 (5), pp.519-527.
 164. Soltani N., Khavari-Nejad R.A., Tabatabaei Yazdi M., Shokravi S. & Fernández-Valiente E. (2005), “Screening of soil cyanobacteria for antifungal and antibacterial activity”, *Pharmaceutical biology*, Vol. 43 (5), pp.455-459.
 165. Stamatakis A., Ott M. & Ludwig T. (2005), "RAxML-OMP: an efficient program for phylogenetic inference on SMPs", *International Conference on Parallel Computing Technologies*, pp. 288-302.
 166. Stanier R.Y., Kunisawa R., Mandel M.C.B.G. & Cohen-Bazire G. (1971) “Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales)”, *Bacteriological reviews*, Vol. 35 (2), pp. 171-205.
 167. Stratmann K., Moore R.E., Bonjouklian R., Deeter J.B., Patterson G.M., Shaffer S., Smith C.D. & Smitka T.A. (1994) “Welwitindolinones, unusual alkaloids from the blue-green algae *Hapalosiphon welwitschii* and *Westiella intricata*. Relationship to fischerindoles and hapalinodoles”, *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 116 (22), pp.9935-9942.
 168. Strunecký O., Ivanova A.P. & Mareš J. (2023), “An updated classification of cyanobacterial orders and families based on phylogenomic and polyphasic analysis”, *Journal of Phycology*, Vol. 59 (1), pp. 12-51.

169. Sturdy M., Krunic A., Cho S., Franzblau S. & Orjala, J. (2010) "Eucapsitrione, an Anti-*Mycobacterium tuberculosis* Anthraquinone Derivative from the Cultured Freshwater Cyanobacterium *Eucapsis* sp.", *Journal of Natural Products*, Vol. 73 (8), pp 1441-1443.
170. Suffness M. & Pezzuto J.M. (1990), "Assays related to cancer drug discovery", pp.71-133 in: *Methods in plant biochemistry: assays for bioactivity*, Vol. 6,
171. Swain S.S., Padhy R.N. & Singh P.K. (2015) "Anticancer compounds from cyanobacterium *Lyngbya* species: a review", *Antonie Van Leeuwenhoek*, Vol. 108, pp. 223-265.
172. Swain S.S., Paidesetty S.K. & Padhy R.N. (2017) "Antibacterial, antifungal and antimycobacterial compounds from cyanobacteria", *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Vol. 90, pp. 760-776.
173. Torregrosa-Crespo J., Montero Z., Fuentes J.L., Reig Garcia-Galbis M., Garbayo I., Vílchez C. & Martínez-Espinosa R.M. (2018), "Exploring the valuable carotenoids for the large-scale production by marine microorganisms", *Marine Drugs*, Vol. 16 (6), pp. 203.
174. Tsuchiya K., Kobayashi S., Nishkiori T., Nakagawa T. & Tatsuta K. (1997). Epopromycins, novel cell wall synthesis inhibitors of plant protoplast produced by *Streptomyces* sp. NK04000. *The Journal of antibiotics*, 50(3), 261-263.
175. UN (2023), "Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals". United Nations (UN), New York and Geneva, 586p.
176. Van de Peer Y. & Salemi M. (2003), "Phylogeny inference based on distance methods". *The Phylogenetic Handbook, a Practical Approach to DNA and Protein Phylogeny*, 101 - 136.
177. Verma S., Thapa S., Siddiqui N. & Chakdar H. (2022), "Cyanobacterial secondary metabolites towards improved commercial significance through multiomics approaches", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol. 38(6), pp. 100.

178. Vincent W.F. (2000) "Cyanobacterial dominance in the polar regions". pp. 321-340 In: *The ecology of cyanobacteria: Their diversity in time and space*. Dordrecht: Springer Netherlands.
179. Wang M., Zhang J., He S. & Yan X. (2017), "A review study on macrolides isolated from cyanobacteria", *Marine drugs*, Vol. 15 (5), pp. 126.
180. Wang Q.X., Bao L., Yang X.L., Liu D.L., Guo H., Dai H.Q., Song F.H., Zhang L.X., Guo L.D., Li S.J. & Liu H.W. (2013) "Ophiobolins P–T, five new cytotoxic and antibacterial sesterterpenes from the endolichenic fungus *Ulocladium* sp.", *Fitoterapia*, Vol. 90, pp. 220-227.
181. Wang X.W., Zhan Q., Coursen J.D., Khan M.A., Kontny H.U., Yu L. Hollander, M.C., O'Connor P.M., Fornace A.J., Jr. & Harris C.C. (1999) "GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 96 (7), pp. 3706-3711.
182. Wang, S., Zhang, D., Zhu, J., Liu, H., Li, B., & Huang, L. (2021). Achyrophenols A–F: polycyclic polyphenol lactone skeletons and a nor-ursane-type triterpenoid from achyrocline satureioides. *The Journal of Organic Chemistry*, 86(18), 12813-12820.
183. Weinberg F., Hamanaka R., Wheaton W.W., Weinberg S., Joseph J., Lopez M. & Chandel N.S. (2010) "Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 107 (19), pp. 8788-8793
184. Weiss C., Figueras E., Borbely A.N. & Sewald N. (2017), "Cryptophycins: Cytotoxic cyclodepsipeptides with potential for tumor targeting", *Journal of Peptide science*, Vol. 23 (7-8), pp. 514-531.
185. Whitton B.A. & Potts M. (2007), *The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space*. Springer Science & Business Media.
186. Woo, J. T., Ono, H., & Tsuji, T. (1995). Cathestatins, new cysteine protease inhibitors produced by *Penicillium citrinum*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 59(2), 350-352.

187. Wrasidlo W., Mielgo A., Torres V.A., Barbero S., Stoletov K., Suyama T. L. & Stupack D.G. (2008), "The marine lipopeptide somocystinamide A triggers apoptosis via caspase 8", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 105 (7), pp. 2313-2318.
188. Wu L.C., Wen Z.S., Qiu Y.T., Chen X.Q., Chen H.B., Wei M.M. & Zhou G. B. (2013), "Largazole arrests cell cycle at G1 phase and triggers proteasomal degradation of E2F1 in lung cancer cells", *ACS Medicinal Chemistry Letters*, Vol. 4 (10), pp. 921-926.
189. Xiao Y., Liu L., Li Z. & Cheng Y. (2020), "The role of cyanobacterial external layers in mass transfer: evidence from temperature shock experiments by noninvasive microtest technology". *Microorganisms*, Vol. 8(6), pp. 861.
190. Xu S., Nijampatnam B., Dutta S. & Velu S.E. (2016), "Cyanobacterial metabolite calothrixins: recent advances in synthesis and biological evaluation", *Marine Drugs*, Vol. 14 (1), pp. 17.
191. Yamashita H., Miyao M., Hiramori K., Kobayashi D., Suzuki Y., Mizukami M. & Wada K. (2020), "Cytotoxic diterpenoid alkaloid from *Aconitum japonicum* subsp. *Subcuneatum*", *Journal of natural medicines*, Vol. 74 (1), pp. 83-89.
192. Yarza P., Yilmaz P., Pruesse E., Glöckner F.O., Ludwig W., Schleifer K.H., Whitman W.B., Euzéby J., Amann R. & Rosselló-Móra R. (2014), "Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gen sequences", *Nature Reviews Microbiology*, Vol. 12 (9), pp.635-645.
193. Yonezawa T., Mase N., Sasaki H., Teruya T., Hasegawa S.I., Cha B Y., Yagasaki K., Suenage K., Nagai K. & Woo J.T. (2012), "Biselyngbyaside, isolated from marine cyanobacteria, inhibits osteoclastogenesis and induces apoptosis in mature osteoclasts", *Journal of cellular biochemistry*, Vol. 113 (2), pp. 440-448.
194. Zehr J.P., Jenkins B.D., Short S.M. & Steward G.F. (2003), "Nitrogenase gen diversity and microbial community structure: a cross-system comparison", *Environmental Microbiology*, Vol. 5(7), pp. 539–554.

195. Zhang C., Naman C.B., Engen N. & Gerwick W.H. (2017), "Laucysteinamide A, a hybrid PKS/NRPS metabolite from a Saipan Cyanobacterium, cf. *Caldora penicillata*", *Marine drugs*, Vol. 15 (4), pp.121.
196. Zhang C-Y., Wang X., Su T., Ma C-M., Wen Y-J., Shang M-Y., Li X-M., Liu G-X. & Cai S-Q. (2005) "New aristolochic acid, aristololactam and renal cytotoxic constituents from the stem and leaves of *Aristolochia contorta*", *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 60 (10), pp. 785-788.
197. Zhao X., Xi X., Zhang M., Lv M., Zhang X., Lu Y., Wang L. & Chen Y. (2024), "Structure-activity relationship study of majusculamide D: Overcoming metabolic instability and severe toxicity with a fluoro analogue", *Marine Drugs*, Vol. 22 (12), p.537.
198. Zilakova S., Gavurova M., Sebova D., Goga M., Backor M., Medvecova V., Kecsey D. & Kello M. (2025), "*Nostoc commune*-derived scytonemin induced mitochondrial cell death in leukemia models", *Medical Oncology*, Vol. 42 (8), pp. 1-17.

III. Website

199. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
200. <http://dnp.chemnetbase.com>
201. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>
202. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/?taxon=1117>

PHỤ LỤC

Phụ lục 1. Thành phần môi trường BG11 [Rippka, 1979]

STT	Thành phần	Stock (g/100mL)	Thể tích cần trong 1L môi trường (mL)
1	NaNO ₃	15	10
2	MgSO ₄ .7H ₂ O	7,5	1
3	K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	4	1
4	CaCl ₂ .2H ₂ O	3,6	1
5	Na ₂ CO ₃	2	1
6	C ₆ H ₈ FeNO ₇	0,6	1
7	Acid Citric	0,6	1
8	Na ₂ Mg-EDTA	0,1	1
9	*[Vi lượng A5+Co]		1
10	H ₂ O		982

* Thành phần vi lượng A5+Co

STT	Thành phần	Stock (mg/100mL)	Thể tích cần trong 1L môi trường (mL)
1	H ₃ BO ₃	286	1
2	MnSO ₄ .H ₂ O	154,5	
3	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	39	
4	ZnSO ₄ .7H ₂ O	22,2	
5	CuSO ₄ .5H ₂ O	7,9	
6	Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	4,04	
7	H ₂ O	100mL	

Phụ lục 2. Danh sách môi sử dụng cho phân tích RT- qPCR

Gen	Môi	Trình tự (5'-3')
<i>TP53</i>	Xuôi (Fw)	5-CCTCAGCATCTTATCCGAGTGG-3
	Ngược (Rv)	5-TGGATGGTGGTACAGTCAGAGC-3
<i>CASP3</i>	Xuôi (Fw)	5-GGAAGCGAATCAATGGACTCTGG-3
	Ngược (Rv)	5-GCATCGACATCTGTACCAGACC-3
<i>CASP8</i>	Xuôi (Fw)	5-AGAAGAGGGTCATCCTGGGAGA-3
	Ngược (Rv)	5-TCAGGACTTCCTTCAAGGCTGC-3
<i>BAX</i>	Xuôi (Fw)	5-TGACGGCAACTTCAACTGGG-3
	Ngược (Rv)	5-AGCACTCCCGCCACAAAGA-3
<i>CDKN1A</i> (<i>p21^{Cip1}</i>)	Xuôi (Fw)	5-AAGTCAGTTCCTTGTGGAGC-3
	Ngược (Rv)	5-ATTAGCGCATCACAGTCGCG-3
<i>CDKN2A</i> (<i>p16^{INK4A}</i>)	Xuôi (Fw)	5- CAACGCACCGAATAGTTACG-3
	Ngược (Rv)	5- TGCCCATCATCATGACCTGG-3
<i>Integrin-1-α</i>	Xuôi (Fw)	5-CCGAAGAGGTACTTGTTCAGC-3
	Ngược (Rv)	5-GGCTTCCGTGAATGCCTCCTTT-3
<i>Integrin-1-β</i>	Xuôi (Fw)	5-GGATTCTCCAGAAGGTGGTTTCG-3
	Ngược (Rv)	5-TGCCACCAAGTTTCCCATCTCC-3
<i>FAK</i>	Xuôi (Fw)	5-GCCTTATGACGAAATGCTGGGC-3
	Ngược (Rv)	5-CCTGTCTTCTGGACTCCATCCT-3
<i>AKT</i>	Xuôi (Fw)	5-TGGACTIONCCTGCACTCGGAGAA-3
	Ngược (Rv)	5-GTGCCGCAAAAGGTCTTCATGG-3
<i>PI3K</i>	Xuôi (Fw)	5-GAAGCACCTGAATAGGCAAGTCG-3
	Ngược (Rv)	5-GAGCATCCATGAAATCTGGTCGC-3
<i>N-cadherin</i>	Xuôi (Fw)	5-CCTCCAGAGTTTACTGCCATGAC-3
	Ngược (Rv)	5-GTAGGATCTCCGCCACTGATTC-3
TBP (gen nội chuẩn)	Xuôi (Fw)	5-CACGAACCACGGCACTGATT-3
	Ngược (Rv)	5-TTTTCTTGCTGCCAGTCTGGAC-3

Phụ lục 3. Đặc điểm hình thái và kích thước tế bào của các chủng vi khuẩn lam đã phân lập

ST T	Nhóm hình thái	Tên chủng	Ký hiệu trên Genebank	Màu sắc sợi	Cấu trúc chuỗi	Bao nhầy	Đặc điểm tế bào										Hệ sinh thái
							Tế bào sinh dưỡng			Tế bào dị hình				Tế bào nghỉ			
							Dài (μm)	Rộng (μm)	Hình dạng	Dài (μm)	Rộng (μm)	Hình dạng	Vị trí	Dài (μm)	Rộng (μm)	Hình dạng	
1.	I	CAVN2403	PQ538921	Xanh lam nhạt	I	Mỏng, trong suốt	3,1 - 6,4	4,3 - 5,0	I	4,3 - 7,6	3,6 - 5,7	O/ S	I/ T	4,3 - 9,3	5,3 - 7,9	O/ S	Đất cát ven sông
2.		CAVN2560	PQ538923	Xanh lam nhạt	I	Mỏng, trong suốt	2,5 - 6,3	3,8 - 5,0	I	3,1 - 6,2	3,8 - 6,2	O/ S	I/ T	4,6 - 6,9	5,3 - 6,9	O/ S	Đất ruộng lúa
3.		CAVN6515	PQ538919	Xanh lam nhạt	I	Mỏng, trong suốt	2,5 - 6,5	3,8 - 5,0	B/S	3,8 - 6,0	3,8 - 5,0	O/ S	I/ T	4,0 - 7,5	4,0 - 10	O/ S	Đất cát ven sông
4.		CAVN5500	PQ538917	Xanh lam nhạt	I	Dày, trong suốt	2,5 - 5,0	4,3 - 5,0	B	2,5 - 5,6	3,5 - 5,0	O/ S	I/ T	7,0 - 14,5	5,5 - 10	O/ S	Đất cát ven sông
5.		CAVN8213	PQ538920	Xanh lam nhạt	I	Mỏng, trong suốt	2,4 - 6,7	4,0 - 6,2	B/I	3,8 - 7,1	4,3 - 5,0	O/ S	I/ T	4,8 - 5,5	4,5 - 6,7	O/S	Đất ruộng lúa

ST T	Nhóm hình thái	Tên chủng	Ký hiệu trên Genebank	Màu sắc sợi	Cấu trúc chuỗi	Bao nhầy	Đặc điểm tế bào										Hệ sinh thái
							Tế bào sinh dưỡng			Tế bào dị hình				Tế bào nghỉ			
							Dài (μm)	Rộng (μm)	Hình dạng	Dài (μm)	Rộng (μm)	Hình dạng	Vị trí	Dài (μm)	Rộng (μm)	Hình dạng	
6.	I	CAVN2513	PQ538918	Xanh lam nhạt	I	Mỏng, trong suốt	2,9 - 6,1	3,6 - 5,0	B/S	3,0 - 6,3	3,9 - 6,1	O/ S	I/ T	4,2 - 8,2	5,0 - 8,2	O/ I	Đất ruộng lúa
7.		CAVN2440	-	Xanh xám	I	Mỏng, trong suốt	3,1 - 8,8	5,7- 10	B/ I	7,5- 10,6	7,5 - 10	O/ S	I/T	6,2 - 9,4	8,6- 11,3	O	Đất ruộng lúa
8.		CAVN2442	-	Xanh xám	I	Mỏng, trong suốt	4,4 - 11,3	5,0 - 6,3	B/C	7,6 - 11,7	6,7 - 8,3	O	I/T	7,5 - 15	4,7 - 12,5	I	Đất ruộng lúa
9.		CAVN2441	PQ538914	Xanh xám	I	Mỏng, trong suốt	3,7 - 7,4	5,6 - 6,3	B	6,7 - 14,8	6,7 - 10,4	O/S	I/T	6,7 - 11,1	6,3 - 9,6	O	Đất ruộng lúa
10.		CAVN2503	PQ538913	Xanh xám	I	Mỏng, trong suốt	4,0 - 6,5	6,3 - 7,0	B	5,0 - 9,7	5,0 - 10	O/S	I/T	7,5 - 12,5	6,9 - 11,3	O	Đất ruộng lúa

ST T	Nhóm hình thái	Tên chủng	Ký hiệu trên Genebank	Màu sắc sợi	Cấu trúc chuỗi	Bao nhảy	Đặc điểm tế bào										Hệ sinh thái
							Tế bào sinh dưỡng			Tế bào dị hình				Tế bào nghỉ			
							Dài (μm)	Rộng (μm)	Hình dạng	Dài (μm)	Rộng (μm)	Hình dạng	Vị trí	Dài (μm)	Rộng (μm)	Hình dạng	
11.	I	CAVN8233	PQ538912	Xanh ô liu	I	Mỏng, trong suốt	2,5- 10	6,3 - 7,5	B	5,0 - 8,8	6,3 - 10	O/S	I/T	5,0 - 12,5	6,3 - 13,8	O/B	Đất ruộng lúa
12.		CAVN8204	PQ538915	Xanh xám	I	Mỏng trong suốt	3,8 - 8,0	5,0 - 6,0	B	3,0 - 9,0	4,0 - 7,5	O/S	I/T	7,5 - 15	4,5 - 6,9	C	Đất ruộng lúa
13.		CAVN6212	-	Xanh lam	I	Mỏng, trong suốt	2,1 - 5,2	3,3 - 5,2	I	3,2 - 5,2	3,6 - 5,6	O/ S	I/ T	4,8 - 7,2	4,3 - 5,0	O/ S	Đất cát ven sông
14.		NK1813	OP106434	Xanh ô liu	I	Mỏng, không màu	5,2 - 7,2	5,0 - 7,1	B/O/ S	10 - 13,5	8,3 - 10,8	O	I/T	11,8 - 18,6	5,2 - 9,6	O	Đất ruộng lúa
15.		CAVN2525	PQ538922	Xanh lam nhạt	I	Mỏng, không màu	2,7- 4,5	4,5- 5,4	I	4,1- 5,4	4,5- 5,4	O/S	I/T	4,5- 5,4	5,4- 6,4	I	Đất ruộng lúa

ST T	Nhóm hình thái	Tên chủng	Ký hiệu trên Genebank	Màu sắc sợi	Cấu trúc chuỗi	Bao nhảy	Đặc điểm tế bào										Hệ sinh thái
							Tế bào sinh dưỡng			Tế bào dị hình				Tế bào nghỉ			
							Dài (μm)	Rộng (μm)	Hình dạng	Dài (μm)	Rộng (μm)	Hình dạng	Vị trí	Dài (μm)	Rộng (μm)	Hình dạng	
16.	I	CAVN2522	PQ538916	Xanh lam nhạt	I	Dày, không màu	2,5- 4,5	4,0- 6,4	I	2,7- 4,5	2,7- 5,4	S	I/T	4,3- 7,2	3,9- 5,7	S	Đất ruộng lúa
17.		CAVN8242		Xanh lam đậm	I	Mỏng, phân tán	3,1- 5,9	3,5 - 4,0	B/C/ S	3,5 - 7,5	3,5 - 5,7	O/S/ P	I/T	3,9 - 12,1	4,3 - 8,6	O	Đất ruộng lúa
18.		PM3		Xanh lam đậm	I	Mỏng, phân tán	2,8 - 5,0	2,5 - 5,0	I	5,0 - 6,3	4,5 - 6,3	O/S	I/T	4,9 - 5,7	4,6 - 5,7	O	Đất ruộng lúa
19.		CAVN2490		Xanh lam đậm	I	Mỏng, phân tán	3,2 - 6,5	3,4 - 4,5	B/C/ S	3,1- 6,2	4,5- 5,5	O/S/ P	I/T	-	-		Đất cát ven sông
20.		NS2000	OP106435	Xanh lam đậm	I	Phân tán, mỏng	3,0 - 5,3	3,4 - 4,9	B/C/ S	5,2 - 7,3	4,5 - 6,2	O/S/ P	I/T	-	-		Đất ruộng lúa

ST T	Nhóm hình thái	Tên chủng	Ký hiệu trên Genebank	Màu sắc sợi	Cấu trúc chuỗi	Bao nhầy	Đặc điểm tế bào										Hệ sinh thái
							Tế bào sinh dưỡng			Tế bào dị hình				Tế bào nghỉ			
							Dài (μ m)	Rộng (μ m)	Hình dạng	Dài (μ m)	Rộng (μ m)	Hình dạng	Vị trí	Dài (μ m)	Rộng (μ m)	Hình dạng	
21.	I	CAVN2437	PQ538897	Xám nhạt	I	Mỏng, phân tán	2,2 - 5,9	3,0 - 4,4	B/C	3,7 - 7,4	3,7 - 5,9	O/S	I/T	5,9 - 10	5,9 - 7,0	O	Đất ruộng lúa
22.		CAVN9301	PQ538902	Xám	I	Mỏng, phân tán	2,3 - 5,0	3,3 - 3,8	B/C	2,0 - 5,0	3,5 - 5,0	O/S	I/T	3,0 - 5,0	3,0 - 4,0	O	Đất ven sông
23.		CAVN2402	PQ538899	Xám nhạt	I	Phân tán	3,0 - 5,0	2,5 - 3,5	B/C	4,0 - 6,0	3,5 - 4,5	O/S	I/T	4,3 - 7,1	4,3 - 5,0	O/S	Đất ven sông
24.		CAVN2438	PQ538898	Xám nhạt	I	Mỏng, trong suốt	3,7 - 7,0	3,3 - 3,7	B/C	3,0 - 7,7	3,0 - 6,7	O/S	I/T	3,7 - 9,6	4,4 - 8,9	O/S	Đất ruộng lúa
25.		CAVN2489	PQ538900	Xám nhạt	I	Mỏng, trong suốt	2,3 - 5,0	2,8 - 3,5	B/C/ S	3,0 - 5,0	3,0 - 4,0	O/S	I/T	5,0 - 7,5	6,0 - 7,0	O/S	Đất ven sông

ST T	Nhóm hình thái	Tên chủng	Ký hiệu trên Genebank	Màu sắc sợi	Cấu trúc chuỗi	Bao nhảy	Đặc điểm tế bào										Hệ sinh thái
							Tế bào sinh dưỡng			Tế bào dị hình				Tế bào nghỉ			
							Dài (μm)	Rộng (μm)	Hình dạng	Dài (μm)	Rộng (μm)	Hình dạng	Vị trí	Dài (μm)	Rộng (μm)	Hình dạng	
26.	I	CAVN8232	PQ538901	Xám	I	Mỏng, phân tán	2,0 - 5,0	3,0 - 4,0	B/C	3,5 - 6,0	3,5 - 4,5	O/S	I/T	4,5 - 6,5	3,5 - 4,0	O/S	Đất ruộng lúa
27.		CAVN8241	PQ538896	Xám nhạt	I	Mỏng, phân tán	2,0 - 5,0	3,0 - 4,8	B/C	2,8 - 6,5	3,5 - 5,3	O/S	I/T	4,5 - 6,0	3,3 - 4,5	O/S	Đất ruộng lúa
28.		CAVN2435	PQ538893	Xám	I	Mỏng, phân tán	2,2 - 6,1	2,4 - 3,7	B/C	3,7 - 7,8	2,4 - 5,2	O/S/ P	I/T	4,4 - 6,5	3,7 - 4,4	O/S	Đất ruộng lúa
29.		CAVN2434	PQ538894	Xám	I	Mỏng, phân tán	3,7- 7,6	3,2- 3,8	B/C	2,6- 4,4	2,9- 3,4	O/S	I/T	5,9- 6,5	5,0- 5,3	O	Đất ruộng lúa
30.		CAVN2436	PQ538895	Xám	I	Mỏng, phân tán	3,2- 7,4	2,6 - 4,1	B/C	2,4- 6,8	2,4- 3,8	O/S	I/T	5,9- 9,3	4,1- 5,3	S/O	Đất ruộng lúa

ST T	Nhóm hình thái	Tên chủng	Ký hiệu trên Genebank	Màu sắc sợi	Cấu trúc chuỗi	Bao nhầy	Đặc điểm tế bào										Hệ sinh thái
							Tế bào sinh dưỡng			Tế bào dị hình				Tế bào nghỉ			
							Dài (μm)	Rộng (μm)	Hình dạng	Dài (μm)	Rộng (μm)	Hình dạng	Vị trí	Dài (μm)	Rộng (μm)	Hình dạng	
31.	I	CAVN2501	PQ538905	Nâu nhạt	I	Mỏng, phân tán	2,8- 6,8	2,3- 3,7	B	2,6- 4,7	2,7- 3,9	O/S	I/T	4,6- 6,5	3,0- 4,9	S	Đất ruộng lúa
32.		CAVN2502	PQ538904	Nâu nhạt	I	Mỏng, phân tán	2,6 - 6,7	2,4 - 3,6	B/I	2,4 - 4,8	2,4 - 4,0	O/S	I/T	4,8 - 6,7	2,6 - 5,2	S/O	Đất ruộng lúa
33.		CAVN2439	PQ538908	Nâu nhạt	I	Phân tán	1,7 - 4,3	2,9 - 3,3	B/I	2,1 - 5,2	2,9 - 4,3	O/S	I/T	3,8 - 4,8	2,9 - 4,8	S/O	Đất ruộng lúa
34.		CAVN2463	PQ538910	Nâu nhạt	I	Mỏng, phân tán	2,3 - 7,7	2,7 - 3,6	B/I	3,6 - 7,7	2,7 - 4,5	O/S	I/T	5,5- 7,3	5,5 - 6,4	S	Đất ruộng lúa
35.		CAVN2512	PQ538909	Nâu nhạt	I	Phân tán	2,4 - 4,8	3,1 - 4,3	B/I	4,3 - 9,5	3,8 - 6,0	O/S	I/T	8,1 - 11,4	4,0 - 6,2	I	Đất ruộng lúa
36.		CAVN8235	PQ538903	Xám thẫm	I	Phân tán	2,8 - 6,9	3,8 - 4,8	B/C	5,7 - 8,6	3,8 - 6,7	O/S/ P	I/T	7,6 - 10,4	5,2 - 7,1	S/O	Đất ruộng lúa

ST T	Nhóm hình thái	Tên chủng	Ký hiệu trên Genebank	Màu sắc sợi	Cấu trúc chuỗi	Bao nhảy	Đặc điểm tế bào										Hệ sinh thái
							Tế bào sinh dưỡng			Tế bào dị hình				Tế bào nghỉ			
							Dài (μm)	Rộng (μm)	Hình dạng	Dài (μm)	Rộng (μm)	Hình dạng	Vị trí	Dài (μm)	Rộng (μm)	Hình dạng	
37.	I	CAVN2432	-	Xám nhạt	I	Mỏng, phân tán	3,5 - 8,5	3,4 - 5,4	B	3,1 - 10,8	4,2 - 6,2	O/S	I/T	5,4 - 9,2	4,6 - 9,2	O/S	Đất ruộng lúa
38.		XN1103	OP106433	Xám	H/ F	Dày, không màu	4,2 - 7,1	4,5 - 7,2	C/B/ P	5,0 - 7,6	5,5 - 6,6	S/H S	B	-	-		Đất ruộng lúa
39.		CAVN8202	PQ538892	Xanh lam	I/ F	Dày, không màu	2,0 - 9,0	4,0 - 7,5	C/B	2,0 - 7,5	4,4 - 7,0	S/H S/C	B/I	-	-		Đất ruộng lúa
40.		CAVN0801	PQ538890	Xám	H	Dày, không màu	2,0 - 10,5	4,0 - 6,8	C/B	2,0 - 7,5	2,5 - 7,8	S/H S/C	B/I	-	-		Đất ruộng lúa
41.		CAVN2460	PQ538889	Xanh ô liu	H	Dày, không màu	3,8 - 11,1	5,0 - 11,8	C/B/ S	2,3 - 10,5	5,5 - 8,0	S/H S/C	B/I	-	-		Đất ruộng lúa

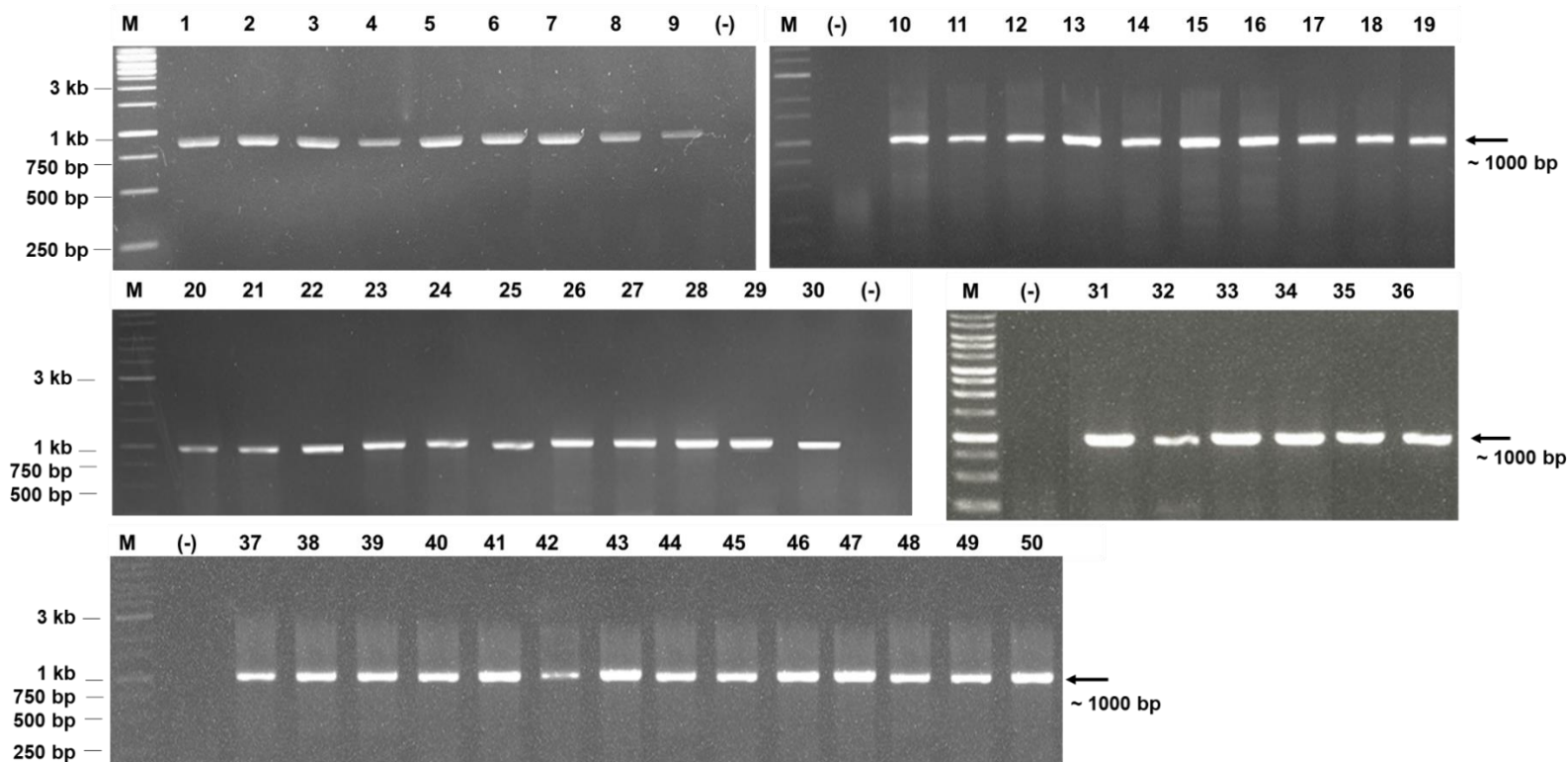
ST T	Nhóm hình thái	Tên chủng	Ký hiệu trên Genebank	Màu sắc sợi	Cấu trúc chuỗi	Bao nhảy	Đặc điểm tế bào										Hệ sinh thái
							Tế bào sinh dưỡng			Tế bào dị hình				Tế bào nghỉ			
							Dài (μm)	Rộng (μm)	Hình dạng	Dài (μm)	Rộng (μm)	Hình dạng	Vị trí	Dài (μm)	Rộng (μm)	Hình dạng	
42.	II	DL12		Xanh lam đậm	H/F	Dày, phân tán	2,3 - 6,8	4,5 - 10,9	C/P	4,1 - 7,7	4,1 - 11,4	S/H S/C	B/I	-	-		Đất trồng bông
43.		DL1		Xanh lam	I/ F	Mỏng, không màu	6,3 - 18,8	4,3 - 7,6	B/C	8,7 - 17,5	6,8 - 13,3	C	B/I/ T	-	-		Đất ruộng lúa
44.		NK13	MZ593485	Xanh lam	I - H/F	Mỏng, không màu	5,5 - 6,7	5,2 - 7,1	B/C	8,3 - 12,7	6,7 - 8,2	C	B/I/ T	-	-		Đất ruộng lúa
45.	III	MD2411	OP106432	Xanh lam	H/T	Mỏng, trong suốt	3,3 - 11,7	3,3 - 7,7	I	3,0 - 11,1	3,2 - 5,0	HS/ S/C	B/I/ T	-	-		Đất ruộng lúa
46.		CAVN2404		Xanh lam	H/T	Mỏng, trong suốt	3,2 - 10,7	3,5 - 7,4	I	3,1 - 11,5	3,2 - 5,4	HS/ S/C	B/I/ T	-	-		Đất ruộng lúa

ST T	Nhóm hình thái	Tên chủng	Ký hiệu trên Genebank	Màu sắc sợi	Cấu trúc chuỗi	Bao nhảy	Đặc điểm tế bào										Hệ sinh thái
							Tế bào sinh dưỡng			Tế bào dị hình				Tế bào nghỉ			
							Dài (μm)	Rộng (μm)	Hình dạng	Dài (μm)	Rộng (μm)	Hình dạng	Vị trí	Dài (μm)	Rộng (μm)	Hình dạng	
47.	III	CAVN2443		Xanh lam	H/T	Mỏng, trong suốt	4,5 - 15,9	3,6 - 10,9	I	6,4 - 15,5	4,1 - 10,9	I	B/I/ T	-	-	-	Đất ruộng lúa
48.		CAVN4303		Xanh lam	H/T	Mỏng, trong suốt	4,3 - 13,6	2,9 - 7,1	I	4,3 - 11,4	2,9 - 10	HS/ S/C	B/I/ T	-	-	-	Đất ruộng lúa
49.		CAVN2505		Xanh lam	H/T	Mỏng, trong suốt	4,2 - 16,2	3,4 - 7,6	I	3,9 - 18,6	4,4 - 8,8	I	B/I/ T	-	-	-	Đất ruộng lúa
50.		CAVN4301		Xanh lam	H/T	Mỏng, trong suốt	2,0 - 12,3	2,5 - 7,8	I	2,5 - 16,2	3,4 - 6,4	I	B/I/ T	-	-	-	Đất ruộng lúa

Chú thích: Cấu trúc chuỗi: H (Heteropolar) - Chuỗi phân cực, I (Isopolar) - chuỗi đẳng cực; F (False-branching) - phân nhánh giả, T (True-branching) - phân nhánh thật;

Hình dạng: B (Barrel-shaped) hình thùng, C (Cylindrical) hình trụ, I (Irregular) không đồng đều, S (Spherical) hình cầu, O (Oval) bầu dục; Vị trí: B (Basal) gốc, I (Intercalar) xen kẽ, T (Terminal) tận cùng.

Phụ lục 4. Kết quả điện di sản phẩm PCR đoạn gen 16S rRNA của 50 chủng VKL



Chú thích: M: marker 1kb; (-) Đối chứng âm; 1: CAVN2512, 2: CAVN2439, 3: CAVN2501, 4: CAVN2463, 5: CAVN2432; 6: CAVN2435; 7: CAVN2436; 8: CAVN8237; 9: CAVN2438; 10: NS2000; 11: NK13; 12: DL1; 13: CAVN2440; 14: CAVN2441; 15: CAVN2403; 16: CAVN5500; 17: CAVN8213; 18: CAVN2505; 19: MD2411; 20: CAVN2560; 21: CAVN6515; 22: CAVN2513; 23: CAVN2503; 24: CAVN2442; 25: NK1813; 26: CAVN2525; 27: CAVN8233; 28: CAVN8204; 29: CAVN6212; 30: CAVN8242; 31: PM3; 32: CAVN2490; 33: CAVN2522; 34: XN1103; 35: CAVN8235; 36: CAVN2502; 37: CAVN8202; 38: CAVN0801; 39: DL12; 40: CAVN2460; 41: CAVN2404; 42: CAVN4303; 43: CAVN4303; 44: CAVN4301; 45: CAVN4301; 46: CAVN2402; 47: CAVN2489; 48: CAVN8232; 49: CAVN8241; 50: CAVN2434.

Phụ lục 5. Trình tự đoạn gen 16S rRNA của 50 chủng vi khuẩn lam

STT	Tên chủng	Trình tự đoạn gen 16S rRNA
1.	CAVN2403	CCCAAGGAATCCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAACCTCTTTTCTCAGGGAAGAACAATGACGGTACCTGAGGAATCAGC ATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCTG TGTAAGTCTGCTGTCAAAGAGCAAAGCTCAACTTTGTAAAGGCAGTGGAACTACACGGCTAGAGTGCCTTCGGGGCAGAGGGAATTCC TGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGCTCTGCTAGGCCGCAACTGACACTGAGGGACGAAA GCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCCAGTAGTCCTAGCTGTAAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCG TAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAG TATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGTCGCGAACTCTTCTGAAAGGAAGAGGTGCCTTCGGGAGC GCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTAGTTG CCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGCC TTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGACAGAGGGCAGCAAGCTAGCGATAGCAAGCTAATCCATAAACCGTGGCTCAGTTCAGAT CGAAGGCTGCAACTCGCCTTCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTCAGCATACTGCAGTGAATTCGTTCCCGGGCCTTGTACAC ACCGCCCCTCACACCATGGAAGCTGGCAACGCCGAAGTCATTACTCCAACCTTTCGAGGGGGAGGATGCCTAAGGCAGTGCTGGTGACT GGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAG
2.	CAVN2560	TGGGACAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGGATGTGCCGGAAGGTGAAAGGCTTGCTGCCTGAAGATGAGCTCGCGTCCGATTAGCT AGTAGGTGGGGTAAGAGCCTACCTAGGCGACGATCGGTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGA CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTT GTAAACCTCTTTTCTCAGGGAAGAACAATGACGGTACCTGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGA GGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCTGTGTAAGTCTGCTGTCAAAGAGCAAAGCTCAACTTTGTA AAGGCAGTGGAACTACACGGCTAGAGTGCCTTCGGGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACA CCGGTGGCGAAGGCGCTCTGCTAGGCCGCAACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCCAGTAGTCCT AGCTGTAAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCAC

STT	Tên chủng	Trình tự đoạn gen 16S rRNA
		<p>GCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCA AGGCTTGACATGTCGCGAACTCTTCTGAAAGGAAGAGGTGCCTTCGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGT CGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTG ACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGCCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGACAGAGGG CAGCAAGCTAGCGATAGCAAGCTAATCCATAAACCGTGGCTCAGTTCAGATCGAAGGCTGCA</p>
3.	CAVN6515	<p>ATTTTTCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCAGGGAAGAAC ACAATGACGGTACCTGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATT GGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCTGTGTAAGTCTGCTGTCAAAGAGCAAAGCTCAACTTTGTAAAGGCAGTGGAAGTACACGGCTAG AGTGCGTTCGGGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGCTCTGCTAGG CCGCAACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCTAGCTGTAAACGATGGATACTAGGCGT GGCTTGATCGACCCGAGCCGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTG ACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCAAGGCTTGACATGTCGCGAACTCTTCT GAAAGGAAGAGGTGCCTTCGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA ACGAGCGCAACCCTCGTTTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGA CGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGCCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGACAGAGGGCAGCAAGCTAGCGATAGCAAGCTAAT CCCATAAACCGTGGCTCAGTC</p>
4.	CAVN5500	<p>TTTGGGGATTTTTTCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCAG GGAAGAACAAAATGACGGTACCTGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCG GAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCTGTGTAAGTCTGCTGTCAAAGAGCGAAGCTCAACTTCGTAAAGGCAGTGGAAGTAC ACGGCTAGAGTGCGTTCGGGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGCT CTGCTAGGCCGCAACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCTAGCTGTAAACGATGGATA CTAGGCGTGGCTTGATCGACCCGAGCCGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAA</p>

STT	Tên chủng	Trình tự đoạn gen 16S rRNA
		AGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGTCGCGA ACTTTTCTGAAAGGAAGAGGTGCCTTCGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAG TCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTATGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTG GGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCCCTTACGCCTTGGGCTACACACGTACTIONTACAATGCTACGGACAGAGGGCAGCAAGCTAGCGATAGCA AGCTAATCCATAAACCGTGGCTC
5.	CAVN8213	GAAGTCGGTCTGGGAAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGGATGTGCCGGAAGGTGAAAGGCTTGCTGCCTGAAGATGAGCTCGCGT CCGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAAGAGCCTACCTAGGCGACGATCGGTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGGACTGAGACA CGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGG CTCTTGGGTGTAAACCTCTTTTCTCAGGGAAGAACAATGACGGTACCTGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCG GTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCTGTGTAAGTCTGCTGTCAAAGAGCAAAGCT CAACTTTGTAAAGGCAGTGGAAACTACACGGCTAGAGTGCCTTCGGGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATC AGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGCTCTGCTAGGCCGCAACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACC CCAGTAGTCCTAGCTGTAAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGG GGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAA GAACCTTACCAAGGCTTGACATGTCGCGAACTCTTCTGAAAGGAAGAGGTGCCTTCGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCTG TCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTATGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTAGAGAG ACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCCCTTACGCCTTGGGCTA
6.	CAVN2513	GTCTGGGCAACACTGGGAACGGTGGCTAATACCGGATGTGCCGGAAGGTGAAAGGCTTGCTGCCTGAAGATGAGCTCGCGTCCGATTAGC TAGTAGGTGGGGTAAGAGCCTACCTAGGCGACGATCGGTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGT TGTAACCTCTTTTCTCAGGGAAGAACAATGACGGTACCTGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGG AGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCTGTGTAAGTCTGCTGTCAAAGAGCAAAGCTCAACTTTGT

STT	Tên chủng	Trình tự đoạn gen 16S rRNA
		AAAGGCAGTGGAAACTACACGGCTAGAGTGCCTTCGGGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAAC ACCGGTGGCGAAGGCGCTCTGCTAGGCCGCAACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCC TAGCTGTAAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCA CGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACC AAGGCTTGACATGTCGCGAACTCTTCTGAAAGGAAGAGGTGCCTTCGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTG TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGT GACAAACCGGAGGAAGGGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGCCTTGGGCTAC
7.	CAVN2440	CCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCAGGGAAGAACAACAATGACGGTACCTGAGGAATCAGCATCGGCTAAC TCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCTGTGTAAGTCTG CTGTCAAAGAGCGAAGCTCAACTTCGTAAAGGCAGTGGAAACTACACGGCTAGAGTGCCTTCGGGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCG GTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGCTCTGCTAGGCCGCAACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAG CGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCCTAGCTGTAAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGTAGCTAACGC GTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTA ATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCAAGGCTTGACATGTCGCGAACCCCTGTGAAAGGTGGGGTGCCTTCGGGAGCGCGAACACAG GTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTAGTTGCCAGCATTAAAG TTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGCCTTGGGCTACAC ACGTAACAATGCTACGGACAGAGGGCAGCAAGCTAGCGATAGCAAGCTAATCCAGAAACCGTGGCTCAGTTCAGATCGAAGGCTGCA ACTCGCCTTCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTCAGCATACTGCAGTGAATTCGTTCCCGGGCC
8.	CAVN2442	AGGCTCTTGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCAGGGAAGAACAACAATGACGGTACCTGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCC GCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCTGTGTAAGTCTGCTGTCAAAGAGCGAA GCTCAACTTCGTAAAGGCAGTGGAAACTACACGGCTAGAGTGCCTTCGGGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAG ATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGCTCTGCTAGGCCGCAACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATA

STT	Tên chủng	Trình tự đoạn gen 16S rRNA
		CCCCAGTAGTCCTAGCTGTAAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGTAGCTAACCGGTTAAGTATCCCGCCT GGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCG AAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGTCGCGAACCCCTGCTGAAAGGTGGGGGTGCCTTCGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGT CGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGAG AGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGCCTTGGGCTACACACGTAATAACAATGCTA CGGACAGAGGGCAGCAAGCTAGCGATAGCAAGCTAATCCCAGAAACCGTGGCTCAGTTCAGATCGAAGGAGTTCAGATCGAAGGCTGCA ACTCGCCTTCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTCAGCATACTGCAGTGAATTCGTTCCCGGGCCTTGTAC
9.	CAVN2441	CCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAACCTCTTTTCTCAGGGAAGAACAATGACGGTACCTGAGGAATCAGCATCGGCTAACT CCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCTGTGTAAGTCTGC TGTCAAAGAGCGAAGCTCAACTTCGTAAAGGCAGTGGAAACTACACGGCTAGAGTGCCTTCGGGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGG TGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGCTCTGCTAGGCCGCAACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGC GAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCCCTAGCTGTAAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGTAGCTAACCGG TTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAA TTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGTCGCGAACCCCTGCTGAAAGGTGGGGGTGCCTTCGGGAGCGCGAACACAGG TGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTAGTTGCCAGCATTAAAGT TGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGCCTTGGGCTACACA CGTACTACAATGCTACGGACAGAGGGCAGCAAGCTAGCGATAGCAAGCTAATCCCAGAAACCGTGGCTCAGTTCAGATCGAAGGCTGCAA CTCGCCTTCGTGAAGGAGGAATCGCTAA
10.	CAVN2503	GGACAACCACTGAAACGGTGGCTAATACCGGATGTGCCGAAAGGTGAAAGGCTTGCTGCCTGAAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAG TTGGTGGGGTAAAAGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACT CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGT AAACCTCTTTTCTCAGGGAAGAACAATGACGGTACCTGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGG

STT	Tên chủng	Trình tự đoạn gen 16S rRNA
		ATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCTGTGTAAGTCTGCTGTCAAAGAGCGAAGCTCAACTTCGTAAA GGCAGTGGAACTACACGGCTAGAGTGC GTTCGGGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACC GGTGGCGAAGGCGCTCTGCTAGGCCGCAACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCCTAG CTGTAAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGC AAGTGTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAG GCTTGACATGTCGCGAACCCCTGCTGAAAGGTGGGGTGCCTTCGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTG TGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGAC AAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGCCTTGGGCTACACACGTA CTACTACAATGCTACGGACAGAGGGCA GCAAGCTAGCGATAGCAAGCTAATCCAGAAACCGTGGCTCAGTTCAGATCGAAGGCTGCA
11.	CAVN8233	GAAGCCTGACGGAGCAATACCGGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCAGGGAAGAACAATGACGGTACCTG AGGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCG CAGGTGGCTGTGTAAGTCTGCTGTCAAAGAGCGAAGCTCAACTTCGTAAAGGCAGTGGAACTACACGGCTAGAGTGC GTTCGGGGCAG AGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGCTCTGCTAGGCCGCAACTGACACTGA GGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCCTAGCTGTAAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCGACCCG AGCCGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACA AGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGTCGCGAACCCCTGCTGAAAGGTGGGGTGC CTTCGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCG TTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCC CCTTACGCCTTGGGCTACACACGTA CTACTACAATGCTACGGACAGAGGGCAGCAAGCTAGCGATAGCAAGCTAATCCAGAAACCGTGGCTC ATTTCA
12.	CAVN8204	ATTTAGCTTCAGGTCTAGGACAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACTGGATGTGCCGGAAGTGAAAGGCTTGCTGCCTGAAGATGAGCTC GCGTCTGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAAGAGCCTACCTAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGA

STT	Tên chủng	Trình tự đoạn gen 16S rRNA
		<p>GACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGG AAGGCTCTTGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCAGGGAAGAACAATGACGGTACCTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGC CGCGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCTGTGTAAGTCTGCTGTCAAAGAGCGA AGCTCAACTTCGTAAAGGCAGTGGAACACTACACGGCTAGAGTGCCTTCGGGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA GATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGCTCTGCTAGGCCGCAACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGAT ACCCCAGTAGTCCTAGCTGTAAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCC TGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTTCGATGCAACGC GAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGTCGCAATCTGATTGAAAGGTCAGAGTGCCTTCGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTG TCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTTTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGA GAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGCCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCT ACGGACAGAGGGCAGCAAGATAGCGATGTCAAGCTAATCCATAAACCGTGGCTCAGTTCAGATCGAAGGCTGCATTCT</p>
13.	CAVN6212	<p>GTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAA TGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCAGGGAAGAACAATGACGG TACCTGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAG CGTCCGCAGGTGGCTGTGTAAGTCTGCTGTCAAAGAGCGAAGCTCAACTTCGTAAAGGCAGTGGAACACTACACAGCTAGAGTGCCTTCG GGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGCTCTGCTAGGCCGCAACTGA CACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCCAGTAGTCCTAGCTGTAAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCG ACCCGAGCCGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC GCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGTCGCGAACTTTCTTGAAAGAGAAG GATGCCTTCGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC CCTCGTTTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGC ATGCCCCCTACGCCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGACAGAGGGCAGCAAGCTAGC</p>

STT	Tên chủng	Trình tự đoạn gen 16S rRNA
14.	NK1813	CCTCTTTTCTCAGGGAAGAACAACAATGACGGTACCTGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATG CAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCTGTGTAAGTCTGCTGTCAAAGAGCAAAGCTTAACTTTGTAAAGGC AGTGAAACTACACGGCTAGAGTGC GTTCGGGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGT GGCGAAGGCGCTCTGCTAGGCCGCAACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCCAGTAGTCCTAGCTG TAAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAG TGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTT GACATGTCGCGAATCCTGGTGAAAGCTGGGAGTGCCTTCGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAG ATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAAC CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGCCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGACAGAGGGCAGCAA GCTAGCGATAGCAAGCAAATCCCATAAACCGTGGCTCAGTTCAGATCGAAGGCTGCAACTCGCCTTCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAAT TGCAGGTCAGC
15.	CAVN2525	TGGGACAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGGATGTGCCGGAAGTGAAAGGCTTGCTGCCTGAAGATGAGCTCGCGTCCGATTAGCTA GTAGGTGGGGTAAGAGCCTACCTAGGCGACGATCGGTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGAC TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTG TAAACCTCTTTTCTCAGGGAAGAACAACAATGACGGTACCTGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAG GATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCTGTGTAAGTCTGCTGTCAAAGAGCAAAGCTCAACTTTGTAA AGGCAGTGGAACTACACGGCTAGAGTGC GTTCGGGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACAC CGGTGGCGAAGGCGCTCTGCTAGGCCGCAACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCCAGTAGTCCTA GCTGTAAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACG CAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAA GGCTTGACATGTCGCGAACTCTTCTGAAAGGAAGAGGTGCCTTCGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTG GTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGA

STT	Tên chủng	Trình tự đoạn gen 16S rRNA
		CAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGCCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGACAGAGGGC AGCAAGCTAGCGATAGCAAGCTAATCCCATAAACCGTGGCTCAGTTCAGATCGAAGGCTGCA
16.	CAVN2522	CCTCTTTTCTCAGGGAAGAACAATGACGGTACCTGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATG CAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCTGTGTAAGTCTGCTGTCAAAGAGCGAAGCTCAACTTCGTAAAGGC AGTGAAACTACACGGCTAGAGTGC GTTCGGGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGT GGCGAAGGCGCTCTGCTAGGCCGCAACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCCTAGCTG TAAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAG TGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTT GACATGTCGCGAACCTTCTTGAAAGAGAAGGGTGCCTTCGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAG ATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAAC CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGCCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGACAGAGGGCAGCTAA CTAGCGATAGCAAGCTAATCCCATAAACCGTGGCTCAGTTCAGATCGAAGGCTGCAACTCGCCTTCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTG CAGGTCAGCATACTGCAGTGAATTCGTTCCCGGGCCTTGT
17.	CAVN8242	TGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCAAGGAATAAGTTCTGAAGGTA CTTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCG TCCGCAGGTGGCTGTGTAAGTCTGCTGTTAAAGAGTCTAGCTTAACTAGATAAAAGCAGTGGAAGTACATAGCTAGAGTGC GTTCGGGGT AGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGCTCTACTAGGCCGCAACTGACACT GAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGCTTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTTGCGAGTATCGACC CTCGCAGTGCCGGAGCCAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCA CAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTGACATGTCGCGAGTCCTTCTTGAAAGGGAGGAGT GCCTTCGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCT CGTTTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATG

STT	Tên chủng	Trình tự đoạn gen 16S rRNA
		CCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTAACAATGCTCCGAACAGAGGGCAGCGAGCTAGCGATAGCAAGCAAATCCCGGAAATCGGAGC TCAGTCAGATCGAA
18.	PM3	GAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCAAGGAAGAAGAATGACGGTACTTGA GGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGC AGGTGGCTGTGTAAGTCTGCTGTAAAGAGTCTAGCTTAACTAGATAAAAGCAGTGGAAGTACATAGCTAGAGTGC GTTCGGGGTAGAG GGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGCTCTACTAGGCCGCAACTGACACTGAGG GACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTTGCGAGTATCGACCCTCGC AGTGCCGGAGCCAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGC GGTGGAGTATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTGACATGTCGCGAATCCTCTTGAAAGGGAGGAGTGCCTT CGGGAGCGGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTT TTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCC TTACGTCTTGGGCTACACACGTAACAATGCTCCGAACAGAGGGCAGCGAGCGTGCGAACGCAAGCAAATCCCGGAAATCGGAGCTCA GTTTCAGATCGAAGGCTGCAACTCGCCTTCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTCAGCATACTGCAGTGAATTCGTTCCCGGG
19.	CAVN2490	AAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCAAGGAATAAGTTCTGAAGGTACTTGAG GAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGCA GGTGGCTGTGTAAGTCTGCTGTAAAGAGTCTAGCTTAACTAGATAAAAGCAGTGGAAGTACATAGCTAGAGTACGTTTCGGGGTAGAGG GAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGCTCTACTAGGCCGTAAGTACACTGAGGG ACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTTGCGAGTATCGACCCTCGCA GTGCCGGAGCCAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCG GTGGAGTATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTGACATGTCGCGAATCCTCTTGAAAGGGAGGAGTGCCTTC GGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTT TAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCT

STT	Tên chủng	Trình tự đoạn gen 16S rRNA
		TACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCTCCGAACAGAGGGCAGCGAGCTAGCGATAGCAAGCAAATCCCGGAAATCGGAGCTCAGT TCAGATCGAAGGCTGCAACTCGCCTTCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTCAGCATACTGCAGTGAATTCGTTCCCGGGCTTGT
20.	NS2000	ACTACTGGGAACGGTGGCTAATACCGGATGTGCCGAAAGGTGAAAGGCTTGTGCCTGAAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGT GTGGTAAGAGCGCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTAC GGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACC TCTTTTCTCAAGGAATAAGTTCTGAAGGTAATTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAA GCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCTGTGTAAGTCTGCTGTAAAGAGTCTAGCTTAACTAGATAAAAGCAGTG GAACTACATAGCTAGAGTACGTTCCGGGTAGAGGGAATCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCG AAGGCGCTCTACTAGGCCGTAAGTACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCCTAGCCGTAAAC GATGGATACTAGGCGTTGCGAGTATCGACCCTCGCAGTGCCGGAGCCAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTG AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTGAC ATGTGCGAATCCTCTTGAAAGGGAGGAGTGCCTTCGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGT TGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGA GGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCTCCGAACAGAGGGCAGCGAGCTAG CGATAGCAAGCAAATCCCGGAAATCGGA
21.	CAVN2437	CCTCTTTTCTCAGGGAATAAGAACTGAAGGTACCTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGC AAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGGGTCCGCAGGTGGCCTTGTAAGTCTGCTGTAAAGAGTGAGGCTTAACCTCATAAAAGCA GTGGAAACTACAAAGCTAGAGTGCCTTCGGGGTAGCAGGAATCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTG GCGAAAGCGTGCTACTAGGCCGTAAGTACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCCTAGCCGTA AACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGGAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGT GTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTT GACATGTCGCGAATCCTCTTGAAAGGGAGGAGTGCCTTCGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAG

STT	Tên chủng	Trình tự đoạn gen 16S rRNA
		ATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGGAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGA AACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTGACAT GTCGCGAATCCTCTTGAAAGGGAGGAGTGCCTTCGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTG GGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGG AAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTAATAAATGCTACGGACAAAGGGCAGCTACACAGCG ATGTGATGCAAATCTCAGAAACCGTAGCTCAGTTCAGATCGAAGCTTGCA
24.	CAVN2438	CCTCTTTTCTCAGGGAATAAGAAGTGAAGGTACCTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGC AAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGGGTCCGCAGGTGGCCTTGTAAGTCTGCTGTTAAAGAGTGAGGCTTAACCTCATAAAAGCA GTGAAACTACAAAGCTAGAGTGCCTTCGGGGTAGCAGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTG GCGAAAGCGTGCTACTAGGCCGTAAGTACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCCTAGCCGTA AACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGGAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGT GTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTT GACATGTCGCGAATCCTCTTGAAAGGGAGGAGTGCCTTCGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAG ATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAAC CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTAATAAATGCTACGGACAAAGGGCAGCTAC ACAGCGATGTGATGCAAATCTCAGAAACCGTAGCTCAGTTCAGATCGAAGCTTGCAACTCAGCTTCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATT GCAGGTCAGC
25.	CAVN2489	TTTGGGGGATTTTTCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAACCTCTTTTCTCAG GGAATAAGAAGTGAAGGTACCTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGG AATGATTGGGCGTAAAGGGTCCGCAGGTGGCCTTGTAAGTCTGCTGTTAAAGAGTGAGGCTTAACCTCATAAAAGCAGTGGAAACTACAA AGCTAGAGTGCCTTCGGGGTAGCAGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGTGCT ACTAGGCCGTAAGTACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCCTAGCCGTAACGATGGATACT

STT	Tên chủng	Trình tự đoạn gen 16S rRNA
		AGGCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGGAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAG GAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTGACATGTCGCGAAT CCTCTTGAAAGGGAGGAGTGCCTTCGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTC CCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGG GATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGACAAAGGGCAGCTACACAGCGATGTGATG CAAATCTCAGAAACCGTAGCTCAGTTCAGATCGAAGCTTGCAACTCAGCTTCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTCAGCATA TGCAGTGAATTCGTTCCCGGGCCTTGTACCACCCGGC
26.	CAVN8232	GCGAAGCCGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCAGGGAATAAGTACTGAAGGTACCTGA GGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGGGTCCGC AGGTGGCCTTGTAAGTCTGCTGTTAAAGAGTGAGGCTTAACCTCATAAAAGCAGTGGAAGTACAAAGCTAGAGTGCGTTTCGGGGTAGCA GGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGTGCTACTAGGCCGTAAGTACTGACACTGAGG GACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGATCGACCCGAG CCGTGCCGGAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAG CGGTGGAGTATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTGACATGTCGCGAATCCTCTTGAAAGGGAGGAGTGCCT TCGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTT TTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCC CTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGACAAAGGGCAGCTACACAGCGATGTGATGCAAATCTCAGAAACCGTAGCTCA GTTTCAGATCGAAGCTTGCAACTCAGCTTCGTGAAGGAGGAT
27.	CAVN8241	GGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCAAGGAATAAAAAAATGAAGGTA CTTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGGG TCCGCAGGTGGCACTGTAAGTCTGCTGTTAAAGAGTGAGGCTTAACCTCATAAGAGCAGTGGAAGTACAGAGCTAGAGTGCGTTTCGGG TAGCAGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGTGCTACTAGGCCGTAAGTACTGACGC

STT	Tên chủng	Trình tự đoạn gen 16S rRNA
		TGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCCTAGCCGTAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCGAC CCGAGCCGTGCCGGAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGC ACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCAAGACTTGACATGTCGCGAATCCTCTTGAAAGGGAGGAG TGCCTTCGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC TCGTTTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCAT GCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTAACAATGCTACGGACAAAGGGCAGCTACACAGCGATGTGATGCAAATCTCATAAACCGTAGC TC
28.	CAVN2435	CCTCTTTTCTCAAGGAATAAGAAGTGAAGTACTTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGC AAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGGGTCCGCAGGTGGCCCTGTAAGTCTGCTGTTAAAGAGTGAGGCTTAACCTCATAAAAGCA GTGGAAACTACAGAGCTAGAGTGCCTTCGGGGTAGCAGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTG GCGAAAGCGTGCTACTAGGCCGTAAGTACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCCTAGCCGTA AACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGGAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGT GTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCAAGACTT GACATGTCGCGAATCCTTCTGAAAGGAAGGAGTGCCTTAGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAG ATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAAC CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTAACAATGCTACGGACAAAGGGCAGCTAC ACAGCGATGTGATGCTAATCTCAGAAACCGTAGCTCAGTTCAGATCGAAGGCTGCAACTCGCCTTCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATT GCAGGTCAGCATACTGCAGTGAATTCGTTCCCGGGCC
29.	CAVN2434	CCTCTTTTCTCAAGGAATAAGAAAGTGAAGTACTTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATG CAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGGGTCCGCAGGTGGCCCTGTAAGTCTGCTGTTAAAGAGTGAGGCTTAACCTCATAAAAGC AGTGAAACTACAGAGCTAGAGTGCCTTCGGGGTAGCAGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGT GGCGAAAGCGTGCTACTAGGCCGTAAGTACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCCTAGCCGT

STT	Tên chủng	Trình tự đoạn gen 16S rRNA
		AAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGGAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAG TGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTT GACATGTCGCGAATCCTTCTGAAAGGAAGGAGTGCCTTAGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAG ATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAAC CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGACAAAGGGCAGCTAC ACAGCGATGTGATGCTAATCTCAGAAACCGTAGCTCAGTTCAGATCGAAGGCTGCAACTCGCCTTCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATT GCAGGTCAGCATACTGCAGTGAATTCGTTCCCGGGCC
30.	CAVN2436	CCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCAAGGAATAAGAAAGTGAAGGTACTTGAGGAATAAGCATCGGCTAAC TCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGGGTCCGCAGGTGGCCCTGTAAGTCTG CTGTTAAAGAGTGAGGCTTAACCTCATAAAAGCAGTGGAAGTACAGAGCTAGAGTGCCTTCGGGGTAGCAGGAATTCCTGGTGTAGCGG TGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACCCGGTGGCGAAAGCGTGCTACTAGGCCGTAAGTACTGACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGC GAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGGAGCTAACGCG TTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAA TTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTGACATGTCGCGAATCCTTCTGAAAGGAAGGAGTGCCTTAGGGAGCGCGAACACAGG TGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTAGTTGCCAGCATTAAAGT TGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGTCTTGGGCTACACA CGTACTACAATGCTACGGACAAAGGGCAGCTACACAGCGATGTGATGCTAATCTCAGAAACCGTAGCTCAGTTCAGATCGAAGGCTGCAA CTCGCCTTCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAAT
31.	CAVN2501	AGGTCGGGGACAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGGATAAGCCGTGAGGTAAAAGATTTATTGCCTAGAGATGAGCTCGCGTCTGAT TAGCTAGTTGGTGTGGTAAGAGCGCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGC CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTT GGGTTGTAAACCTCTTTTCTCAAGGAATAAGTTCTGAAGGTACTTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC

STT	Tên chủng	Trình tự đoạn gen 16S rRNA
		GGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGGGTCCGCAGGTGGCATTGAAAAGTCTGCTGTAAAGAGTGAGGCTTAACCTC ATAAAAGCAGTGGAAGCTACAAAGCTAGAGTGCCTTCGGGGTAGCAGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGA ACACCGGTGGCGAAAGCGTGCTACTAGGCCGTAAGTACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGT CCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGGAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACG CACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTA CCAAGACTTGACATGTCGCGAACTTTTCTGAAAGGAAGAGGTGCCTTAGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCG TGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTCTTTAGTTGCCAGCATTAAAGATGGGAACTCTAGAGAGACTGCCG GTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTAACAATGCTACGGACAAAAG GGCAGCTACACAGCGATGTGATGCAAATCTCAGAAACCGTAGCTCAGTTCAGATCGAAGCTGCACTCC
32.	CAVN2502	TAGGTCGGGGACAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGGATAAGCCGTGAGGTAAGAAAGATTTATTGCCTAGAGATGAGCTCGCGTCTGA TTAGCTAGTTGGTGTGGTAAGAGCGCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGG CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCT TGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCAAGGAATAAGTTCTGAAGGTAAGTCTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATA CGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGGGTCCGCAGGTGGCATTGAAAAGTCTGCTGTAAAGAGTGAGGCTTAACCT CATAAAAGCAGTGGAAGCTACAAAGCTAGAGTGCCTTCGGGGTAGCAGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAG AACACCGGTGGCGAAAGCGTGCTACTAGGCCGTAAGTACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAG TCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGGAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTAC GCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTT ACCAAGACTTGACATGTCGCGAACTTTTCTGAAAGGAAGAGGTGCCTTAGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTC GTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTCTTTAGTTGCCAGCATTAAAGATGGGAACTCTAGAGAGACTGCC GGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTAACAATGCTACGGACAAA GGCAGCTACACAGCGATGTGATGCAAATCTCAGAAACCGTAGCTCAGTTCAGATCGAAGGCTGCACTCGCTTCTGA

STT	Tên chủng	Trình tự đoạn gen 16S rRNA
33.	CAVN2439	CCTCTTTTCTCAAGGAATAAGTTCTGAAGGTA CTTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCA AGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGGGTCCGCAGGTGGCATTGAAAGTCTGCTGTAAAGAGTGAGGCTTAACCTCATAAAAGCAG TGAAACTACAAAGCTAGAGTGC GTTCGGGGTAGCAGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCCGGTGG CGAAAGCGTGCTACTAGGCCGTA ACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCCTAGCCGTAA ACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGGAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTG TGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTG ACATGTCGCGAACTTTTCTGAAAGGAAGAGGTGCCTTAGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGAT GTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTCTTTAGTTGCCAGCATTAAAGATGGGAACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCG GAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGACAAAGGGCAGCTACAC AGCGATGTGATGCAAATCTCAGAAACCGTAGCTCAGTTCAGATCGAAGGCTGCAACTCGCCTTCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGC AGGTCAGCATACTGCAGTGAATTCGTTCCCGGG
34.	CAVN2463	CGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCAAGGAATAAGTTCTGAAGGTA CTTGAGGAATAAGCA TCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGGGTCCGCAGGTGGCATT GAAAGTCTGCTGTAAAGAGTGAGGCTTAACCTCATAAAAGCAGTGGA AACTACAAAGCTAGAGTGC GTTCGGGGTAGCAGGAATTCCTG GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCCGGTGGCGAAAGCGTGCTACTAGGCCGTA ACTGACACTGAGGGACGAAAGCT AGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGGA GCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGTA TGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTGACATGTCGCGAACTTTTCTGAAAGGAAGAGGTGCCTTAGGGAGCGC GAACACAGGTGGTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTCTTTAGTTGCC AGCATTAAAGATGGGAACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCCTTACGTCTT GGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGACAAAGGGCAGCTACACAGCGATGTGATGCAAATCTCAGAAACCGTAGCTCAGTTCAGATCG AAGGCTGCAACTCGCCTTCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTCAGC

STT	Tên chủng	Trình tự đoạn gen 16S rRNA
35.	CAVN2512	GGGACAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGGATAAGCCGTGAGGTAAAAGATTTATTGCCTAGAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAG TTGGTGTGGTAAGAGCGCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACT CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGT AAACCTCTTTTCTCAAGGAATAAGTTCTGAAGGTACTTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGAT GCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGGGTCCGCAGGTGGCATTGAAAGTCTGCTGTAAAGAGTGAGGCTTAACCTCATAAAAG CAGTGGAAGCTACAAAGCTAGAGTGC GTTCGGGGTAGCAGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGG TGGCGAAAGCGTGCTACTAGGCCGTAAGTACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCCTAGCCG TAAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGGAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGAGTACGCACGCAA GTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCCTACCAAGAC TTGACATGTCGCGAACTTTTCTGAAAGGAAGAGGTGCCTTAGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTAGCTCGTGTGCTGA GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTCTTTAGTTGCCAGCATTAAAGATGGGAACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAA CCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGACAAAGGGCAGCTA CACAGCGATGTGATGCAAATCTCAGAAACCGTAGCTCAGTTCAGATCGAAGGCTGCA
36.	CAVN8235	TTAGGTCGGGGACAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGGATGAGCCGAAAGGTAAAAGATTAATTGCCTAGAGATGAGCTCGCGTCTG ATTAGCTAGTTGGTGTGGTAAGAGCGCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACG GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTC TTGGGTTGTAACCTCTTTTCTCAAGGAATAAGAAAGTGAAGGTACTTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTA ATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGGGTCCGCAGGTGGCACTGAAAGTCTGCTGTAAAGAGTGAGGCTCAA CCTCATAAGAGCAGTGGAAACTACAGAGCTAGAGTGC GTTCGGGGTAGCAGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGA AGAACACCGGTGGCGAAAGCGTGCTACTAGGCCGTAAGTACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGT AGTCTAGCCGTAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGGAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGT ACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACC

STT	Tên chủng	Trình tự đoạn gen 16S rRNA
		TTACCAAGACTTGACATGTCGCGAATCTTTCTGAAAAGGAGGAGTGCCTTAGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCT CGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTCGTCTTTAGTTGCCAGCATTAAAGATGGGAACTCTAGAGAGACTGC CGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTA CTACAATGCTACGGACAA AGGGCAGCTACACAGCGATGTGATGCAAATCTCAGAAACCGTAGCTCAGTTCAGATCGAAGGCTGCA
37.	CAVN2432	CCTCTTTTCTCAAGGAAGAACAATGACGGTACTTGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATG CAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCGATGTAAGTCTGCTGTTAAAGAGTGAGGCTCAACCTCATAAGAGC AGTGGAACACTACATAGCTAGAGTGC GTTCGGGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGT GGGCAAAGCGCTCTGCTAGGCCGCAACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCCTAGCCG TAAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTG TATCGACCCGAGCCGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAG TGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTT GACATGTCGCGAACTTTGGTGAAAGCTAAAGGTGCCTTCGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAG ATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGT TTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAAC CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTA CTACAATGCTTTGGACAGAGGGCAGCAA GCCGCAACGGCAAGCAAATCCCGTAAACCAAAGCTCAGTTCAGATCGCAGGCTGCAACTCGCCTGCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAA TTGCAGGTCAGCA
38.	XN1103	CCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCAGGGAAGAACAATAATGACGGTACCTGAGGAATAAGCATCGGCTAAC TCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCTATGTAAGTCTG CTGTTAAAGAGTGAGGCTCAACCTCATAAGAGCAGTGGAACACTACATAGCTAGAGTGC GTTCGGGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGG TGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGCTCTGCTAGGCCGCAACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGC GAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTG TATCGACCCGAGCCGTGCCGGAGCTAACGCG TTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAA TTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTGACATGTCGCGAACTTTTCTGAAAGGAAAAGGTGCCTTCGGGAGCGCGAACACAGG

STT	Tên chủng	Trình tự đoạn gen 16S rRNA
		TGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTAGTTGCCAGCATTAAAGT TGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAGTCAGCATGCCCCTTACGTCTTGGGCTACACA CGTACTACAATGCTACGGACAAAGGGCAGCGAGCTAGCGATAGCAAGCAAATCTCATAAACCGTGGCTCAGTTCAGATCGCAGGCTGCAA CTCGCCTGCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTCAGCA
39.	CAVN8202	CTGGAAACGGTGGCTAATACCGGATGTGCCGAGAGGTAAGGCTTGCTGCCTGAAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTAGGTGTGG TAAGAGCGCACCTAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGA GGCAGCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACCTCTT TTCTCAAGGAAGAAGAGATGACGGTACTTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGATGCAAGCGT TATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCTATGTAAGTCTGCTGTAAAGAGTGAGGCTCAACCTCATAAAGCAGTGGA ACTACATAGCTAGAGTGCCTCGGGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAA GCGCTCTGCTAGGCCGCAACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCCTAGCCGTAAACGAT GGATACTAGGCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGGAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAA CTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTGACATGT CGCGAACCTCTTGAAAGGGAGGGGTGCCTTCGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGG GTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGA AGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGACAAAGGGCAGCGAGCTAGTGA TAGCAAGCAAATCTCATAAACCGTGGCTCAGTTCAGATCGCAGGCTGCA
40.	CAVN0801	CTGGAAACGGTGGCTAATACCGGATGTGCCGAAAGGTGAAAGATTTATTGCCTGAAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTAGGTGTGGT AAGAGCGCACCTAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAG GCAGCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACCTCTTTT CTCAGGGAAGAACATAATGACGGTACCTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGATGCAAGCGTT ATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCTATGTAAGTCTGCTGTAAAGAGTGAGGCTCAACCTCATAAGAGCAGTGGA

STT	Tên chủng	Trình tự đoạn gen 16S rRNA
		CTACATAGCTAGAGTGC GTTCGGGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAAAG CGCTCTGCTAGGCCGCAACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCCTAGCCGTAAACGATG GATACTAGGCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGGAGCTAACGCGTAAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAAC TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTGACATGTC GCGAACCCCTCTTGAAAGGGAGGGGTGCCTTCGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGG TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAA GGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTAACAATGCTACGGACAAAGGGCAGCGAGCTAGCGAT AGCAAGCAAATCTCATAAACCGTGGCTCAGTTCAGATCGCAGGCTGC
41.	CAVN2460	CGCATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCAGGGAAGAAAAAATG ACGGTACCTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGT AAAGCGTCCGCAGGTGGCAATGTAAGTCTGCTGTTAAAGAGTGAGGCTCAACCTCATAAGAGCAGTGGAACACTACATAGCTAGAGTGCCT TCGGGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGCTCTGCTAGGCCGCAAC TGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGT ATCGACCCGAGCCGTGCCGGAGCTAACGCGTAAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGG GCCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTGACATGTCGCGAACCCCTCTGGAAAGG GAGGGGTGCCTTCGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGC GCAACCCTCGTTTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA GTCAGCATGCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTAACAATGCTACGGACAAAGGGCAGCGAGCTAGCGATAGCAAGCAAATCTCATAA ACCGTGGCTCAGTTCAGATCGCAGGCTGCAACTCGCCTGCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAA
42.	DL12	AAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGACGAAGGCTTTTGGGTCGTAAACCTCTTTTCTCAAGGAAGAAGTAGACGGTACTTGAGG AATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAG GTGGTTTTGTAAAGTCTGCTGTTAAAGCGTTAGGCTCAACCTAATAAGGGCAGTGGAACCTATGAGACTAGAGTATGTTAGGGGTAGAGGGA

STT	Tên chủng	Trình tự đoạn gen 16S rRNA
		ATTCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTGGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGCTCTGCTAGGACAATACTGACACTGAGGGAC GAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTTGCCCGTATCGACCCGGGCATT GTCGTAGCTAACCGTAAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGT GGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGACTTGACATGTCGCGAATCCTTGTGAAAGCAGGGTGTGCCTTCGG GAGCGCAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTA GTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTA CGTCTGGGCTACACACGTACTACAATGCGACGAACAAAGGGCAGCTAGTTAGCAATAACATGCAAATCTCAGAAATCGTCGCTCAGTTC AGATTGAAGGCTGCAACTCGCCTTCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTCAGCATACTGCAGTGAATTCGTTCCCGGGCCTTGTA
43.	DL1	GAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTGTAAACCTCTTTTCTCAAGGAATAATAAGTTGAAGGTACTTG AGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCG CAGGTGGTTTTGTCAAGTCTGCTGTCAAAGCGTCTGGCTTAAGTAGATAAAGGCAGTGGAACTGAGAGACTGGAGTATGGTAGGGGTAGA GGAATTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGCTCTGCTGGACCATAACTGACACTGAG GGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTTACGCGTATCGACCCGC GTAGTGCCGGAGCCAACCGTAAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAA GCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGCTTGACATGTCGCGAATCCCGATGAAAGTTGGGAGTGCC TTAGGGAGCGCAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTCGT ACTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGAACTCTAAGAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCC CTTACGTCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTGTGGACAGAGGGCAGCAAGCTAGTGATAGCAAGCAAATCTCACAACCACGGCTCA GTTCAGATCGCAGGCTGCAACTCGCCTGCGTGAAGGTGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTCAGCATACTGCAGTGAATTCGTTCCCGGGGCT TGTA
44.	NK13	GACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTGTAACTCTTTTCTCAGGGAATAATAAGTTGAAGGTACCTGAGGAATAAG CATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGTT

STT	Tên chủng	Trình tự đoạn gen 16S rRNA
		<p>TATCAAGTCTGCTGTCAAAGCGTCTGGCTTAACTAGATAAAGGCAGTGGAACTGAGAGACTGGAGTATGGTAGGGGTAGAGGGAATTCC CGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGCTCTGCTGGACCATAACTGACACTGAGGGACGAAAG CTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTTACGCGTATCGACCCGCGTAGTGCCGG AGCCAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGT ATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGCTTGACATGTCGCGAATCTCTCTGAAAGGAGAGAGTGCCTTAGGGAGCG CGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTACTTAGTTGC CATCATTAAAGTTGGGAACCTAAGAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGTCCT GGGCTACACACGTACTIONACAATGCTGTGGACAGAGGGCAGCAAGCTAGTGATAGCAAGCAAATCTCACAACCACGGCTCAGTTCAGATCG CAGGCTGCAACTCGCCTGCGTGAAGGTGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTCAGCATACTGCAGTGAATTCC</p>
45.	MD2411	<p>ACCACTGGGAACGGTGGCTAATACCGGATGTGCCTGTGGGTGAAAGGTAACTGCCTGGAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGT GGTGTAAAGGGACTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTAC GGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACC TCTTTTCTCAAGGAAGAATGATGACGGTACTTGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAG CGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTGGCTGTGTGTGTCTATTGTTAAAGAGTTTGGCTCAACCAAATAAGGGCGGTAG AAACTACACAGCTAGAGTGCGTTCGGGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGA AAGCGCTCTGCTAGGCCGCAACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCTAGCCGTAAAC GATGGATACTAGGCGTTGAGAGTATCGACCCTCTCAGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGA AACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGCTTGACAT GTCTGGAATCTCTGGAAACTAGAGAGTGCCTTCGGGAGCCAGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTG GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTACTTAGTTGCCAGCATTAGGATGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAG GAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGTCCTGGGCTACACACGTACTIONACAATGCTACGGACAAAGGGCAGCGAGACTGC GAAGTTAAGCAAATCTCAGAAACCGTGGCTCAGTTCAGATCGCAG</p>

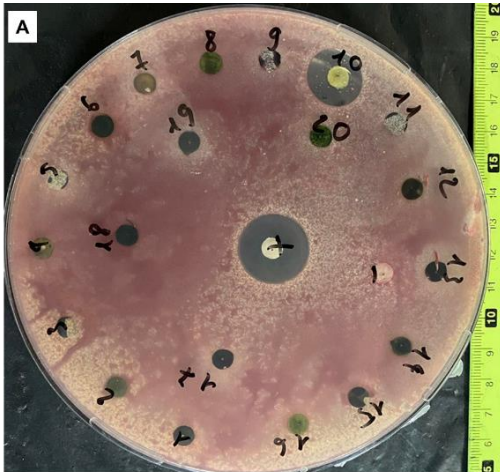
STT	Tên chủng	Trình tự đoạn gen 16S rRNA
46.	CAVN2404	CGGTGGCTAATACCGGATGTGCCTGTGGGTGAAAGGTAACTGCCTGGAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGTGTAAAGGA CTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA GTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCAAG GAAGAATGATGACGGTACTTGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAA TGATTGGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTGGCTGTGTGTGTCTATTGTAAAGAGTTTGGCTCAACCAAATAAGGGCGGTAGAACTACACAG CTAGAGTGCCTTCGGGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGCTCTGC TAGGCCGCAACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAG GCGTTGAGAGTATCGACCCTCTCAGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAACTCAAAGGA ATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGCTTGACATGTCTGGAATCT CTGGGAAACTAGAGAGTGCCTTCGGGAGCCAGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTCGTACTTAGTTGCCAGCATTTAGGATGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGG ATGAC
47.	CAVN2443	CGGTGGCTAATACCGGGTATGCCGAGAGGTGAAAGGTAACTGCCTGGAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGTGTAAAGGA CTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA GTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCAGG GAATAAGCAAGTGAAGGTACCTGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGG AATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTGGCTGTGTGTGTCTATTGTAAAGAGTTTGGCTCAACCAAATAAGGGCGGTAGAACTACACA GCTAGAGTGCCTTCGGGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGCTCTG CTAGGCCGCAACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTA GGCGTTGAGAGTATCGACCCTCTCAGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAACTCAAAGG AATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGCTTGACATGTCTGGAACT CTGGGGAAACTCGGAGGTGCCTTCGGGAGCCAGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTC

STT	Tên chủng	Trình tự đoạn gen 16S rRNA
		CCGCAACGAGCGCAACCCTCGTACTTAGTTGCCAGCATTTCGGATGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAAGGAAGGTG GGGATGAC
48.	CAVN4303	CGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTT CCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCAGGGAATAAGCAAG TGAAGGTACCTGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGC GTAAAGCGTCCGTAGGTGGCTGTGTGTCTATTGTAAAGAGTTTGGCTCAACCAAATAAGGGCGGTAGAACTACACAGCTAGAGTGC GTTCCGGGCGAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGCTCTGCTAGGCCGCA ACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTTGAGA GTATCGACCCTCTCAGTGCCGTAGCTAACCGGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGG GGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGCTTGACATGTCTGGAACCTCTGGGAAAC TCGGAGGTGCCTTCGGGAGCCAGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGC GCAACCCTCGTACTTAGTTGCCAGCATTTCGGATGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCA AGTCAGCATGCCCCCTACGTCCTGGGCTACACACGTAACAATGCTACGGACAAAGGGCAGCGAGACTGCGAAGTCAAGCAAATCTCAG AAACC
49.	CAVN2505	CGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAACCTCTTTTCTCAGGGAATAAGCAAGTGAAGGTACCTGAGGAATCAGCATCGGCTAACTC CGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTAGCAGTGTGTGTCTATTG TTAAAGAGTTTGGCTTAACCAAATAAAGGCGGTAGAACTACACAGCTAGAGTGCCTTCGGGCGAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGA AATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGCTCTGCTAGGCCGCAACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAA TGGGATTAGATACCCAGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTTGAGAGTATCGACCCTCTCAGTGCCGTAGCTAACCGGTTA AGTATCCCGCCTGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTC GATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGCTTGACATGTCTGGAATCTTGGGAAACTCAAGAGTGCCTTCGGGAGCCAGAACACAGGTGG TGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTACTTAGTTGCCAGCACTTCGGGTG

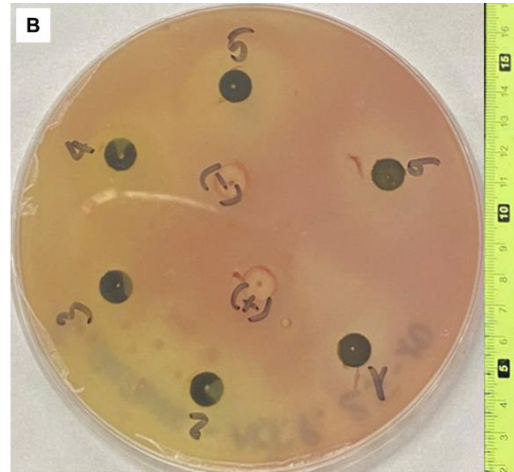
STT	Tên chủng	Trình tự đoạn gen 16S rRNA
		GGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGTCCTGGGCTACACACG TACTACAATGCTACGGACAAAGGGCAGCGAGACTGCGAAGTTAAGCAAATCTCAGAAACCGTAGCTCAGTTCAGATCGCAGGCTGCAACT CGCCTGCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTCAGCATACTGCAGTGAATTCGTTCCCGGGCC
50.	CAVN4301	AGGAGGCTCTTGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCAGGGAATAAGCAAGTGAAGGTACCTGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCA GCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGGCTAAAGCGTCCGTAGGTAGCAGTGTGTGTCTATTGTTAAAGAGTT TGGCTTAACCAAATAAAGGCGGTAGAACTACACAGCTAGAGTGC GTTCGGGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA GATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGCTCTGCTAGGCCGCAACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGAT ACCCCAGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTTGAGAGTATCGACCCTCTCAGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCC TGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTGATGCAACGC GAAGAACCTTACCAGGGCTTGACATGTCTGGAATCTTGGGGAACTCAAGAGTGCCTTCGGGAGCCAGAACACAGGTGGTGCATGGCTG TCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTCGTACTTAGTTGCCAGCACTTCGGGTGGGCACTCTA AGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGTCCTGGGCTACACACGTAATAAT GCTACGGACAAAGGGCAGCGAGACTGCGAAGTTAAGCAAATCTCAGAAACCGTAGCTCAGTTCAGATCGCAGGCTGCAACTCGCCTGCG TGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTCAGCATACTGCAGTGAATTCGTTCCCGGCCTGANCCCC

Phụ lục 6. Hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết tổng số từ các chủng VKL

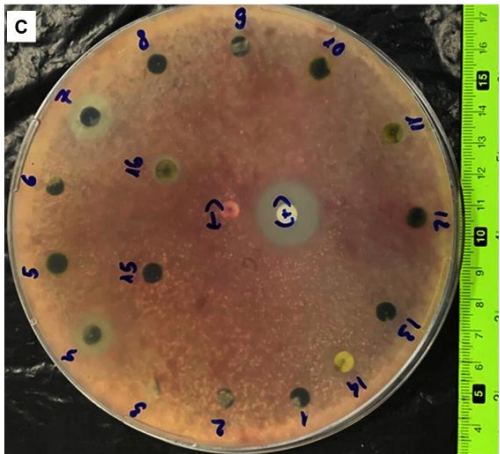
I. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923



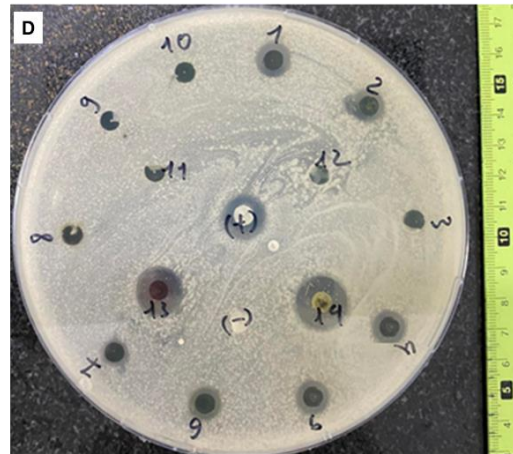
CAVN2403 (1); CAVN2560 (2); CAVN2513 (3); CAVN6515 (4); CAVN5500 (5); CAVN8213 (6); CAVN2489 (8); CAVN2441 (7); CAVN2490 (9); PM3 (10); CAVN9301 (11); CAVN2402 (12); CAVN2438 (13); CAVN2525 (14); ĐC dương (+); ĐC âm (-)



CAVN2503 (1); CAVN8233 (2); CAVN8242 (3); CAVN8235 (4); CAVN8202 (5); CAVN8204 (6); ĐC dương (+); ĐC âm (-)

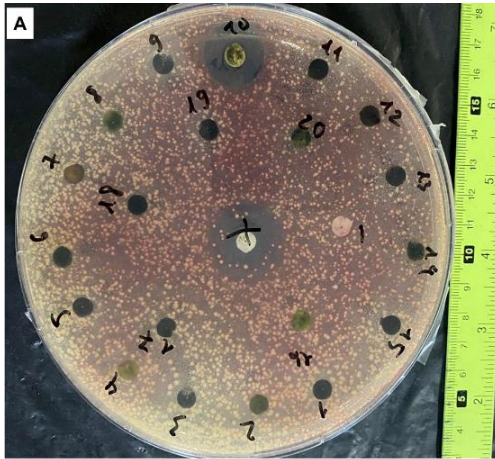


CAVN2501 (1); CAVN2502 (2); CAVN2443 (3); CAVN2442 (4); DL1 (5); DL12 (6); NK13 (7); NK1813 (8); CAVN2512 (9); CAVN2522 (10); CAVN2434 (11); CAVN2435 (12); CAVN2436 (13); CAVN2505 (14); CAVN0801 (15); XN1103 (16); ĐC dương (+); ĐC âm (-)

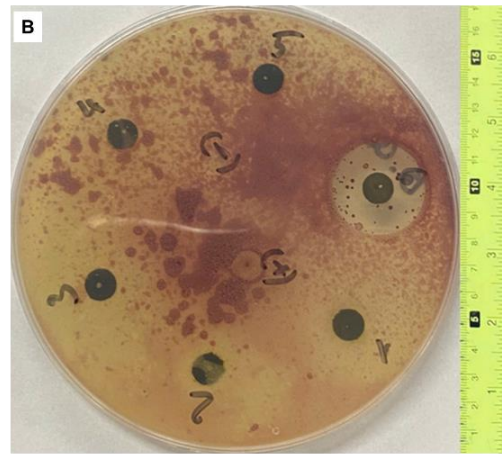


CAVN2404 (1); MD2411 (2); CAVN2439 (3) CAVN4301 (4); CAVN2437 (5); NS2000 (6); CAVN2432 (7); CAVN2460 (8); CAVN2463 (9); CAVN6212 (10); CAVN8232 (11); CAVN8241 (12); CAVN2440 (13); CAVN4303 (14); ĐC dương (+); ĐC âm (-)

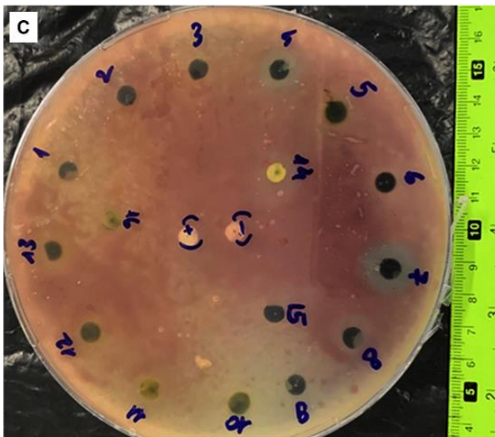
II. *Bacillus cereus* ATCC 14579



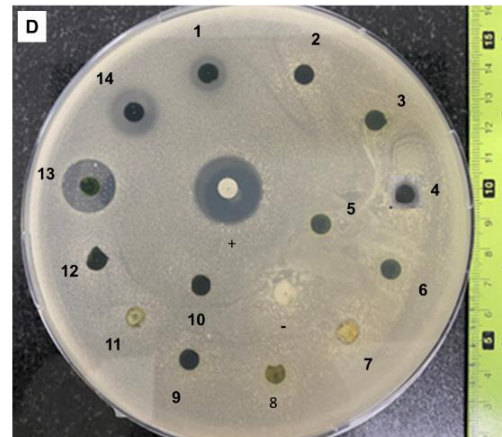
CAVN2403 (1); CAVN2560 (2); CAVN2513 (3);
CAVN6515 (4); CAVN5500 (5); CAVN8213 (6);
CAVN2489 (8); CAVN2441 (7); CAVN2490 (9); PM3 (10);
CAVN9301 (11); CAVN2402 (12); CAVN2438 (13);
CAVN2525 (14); ĐC dương (+); ĐC âm (-)



CAVN2503 (1); CAVN8233 (2); CAVN8242 (3);
CAVN8235 (4); CAVN8202 (5); CAVN8204 (6); ĐC
dương (+); ĐC âm (-)

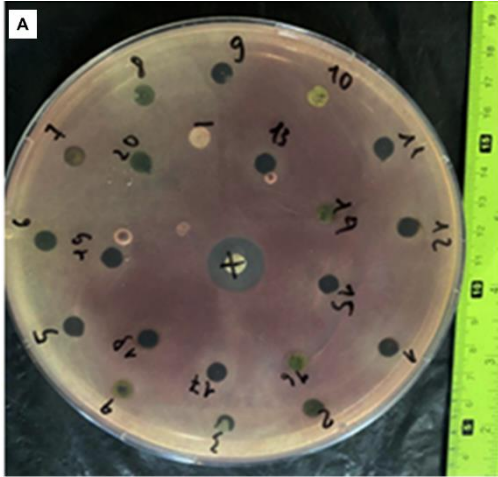


CAVN2501 (1); CAVN2502 (2); CAVN2443 (3);
CAVN2442 (4); DL1 (5); DL12 (6); NK13 (7); NK1813
(8); CAVN2512 (9); CAVN2522 (10); CAVN2434 (11);
CAVN2435 (12); CAVN2436 (13); CAVN2505 (14);
CAVN0801 (15); XN1103 (16); ĐC dương (+); ĐC âm (-)

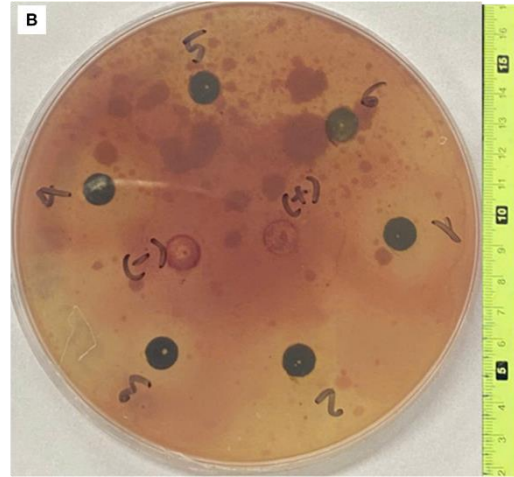


CAVN2404 (1); MD2411 (2); CAVN2439 (3) CAVN4301
(4); CAVN2437 (5); NS2000 (6); CAVN2432 (7);
CAVN2460 (8); CAVN2463 (9); CAVN6212 (10);
CAVN8232 (11); CAVN8241 (12); CAVN2440 (13);
CAVN4303 (14); ĐC dương (+); ĐC âm (-)

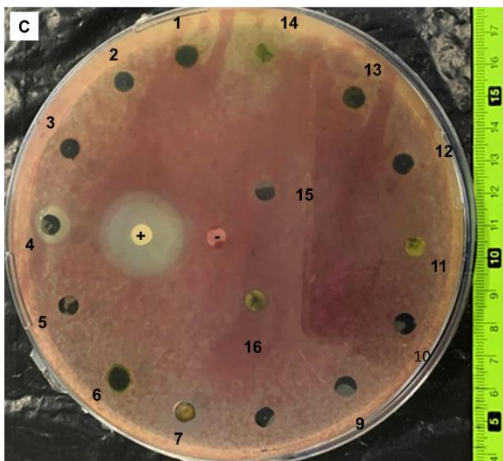
III. *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619



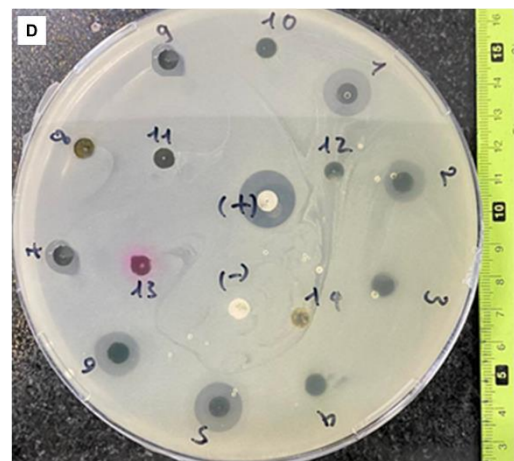
CAVN2403 (1); CAVN2560 (2); CAVN2513 (3);
CAVN6515 (4); CAVN5500 (5); CAVN8213 (6);
CAVN2489 (8); CAVN2441 (7); CAVN2490 (9); PM3 (10);
CAVN9301 (11); CAVN2402 (12); CAVN2438 (13);
CAVN2525 (14); ĐC dương (+); ĐC âm (-)



CAVN2503 (1); CAVN8233 (2); CAVN8242 (3);
CAVN8235 (4); CAVN8202 (5); CAVN8204 (6); ĐC
dương (+); ĐC âm (-)

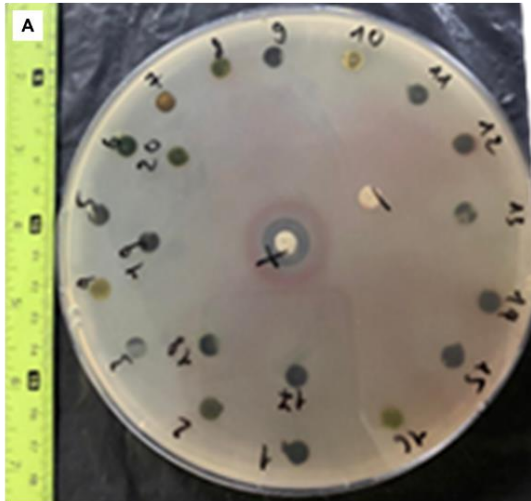


CAVN2501 (1); CAVN2502 (2); CAVN2443 (3);
CAVN2442 (4); DL1 (5); DL12 (6); NK13 (7); NK1813
(8); CAVN2512 (9); CAVN2522 (10); CAVN2434 (11);
CAVN2435 (12); CAVN2436 (13); CAVN2505 (14);
CAVN0801 (15); XN1103 (16); ĐC dương (+); ĐC âm (-)

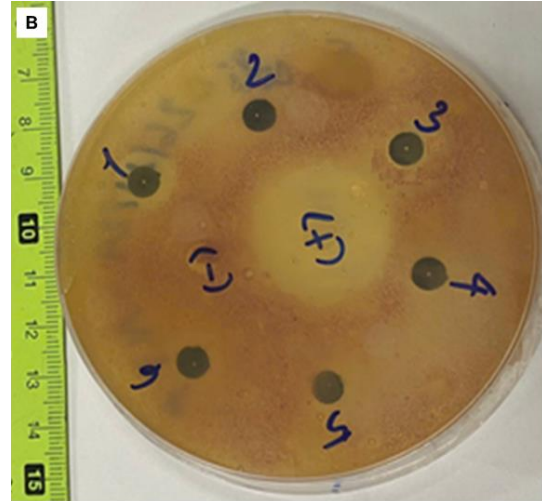


CAVN2404 (1); MD2411 (2); CAVN2439 (3) CAVN4301
(4); CAVN2437 (5); NS2000 (6); CAVN2432 (7);
CAVN2460 (8); CAVN2463 (9); CAVN6212 (10);
CAVN8232 (11); CAVN8241 (12); CAVN2440 (13);
CAVN4303 (14); ĐC dương (+); ĐC âm (-)

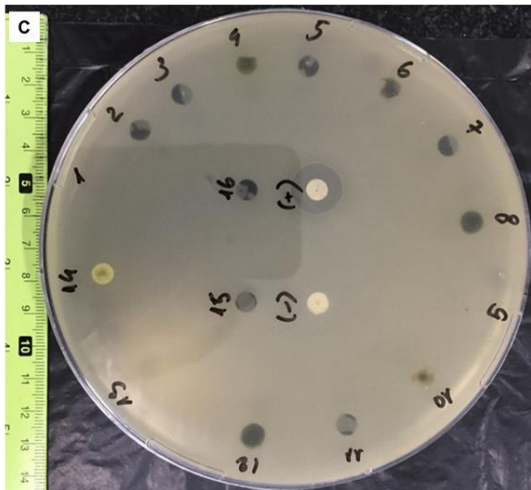
IV. *Escherichia coli* ATCC 25922



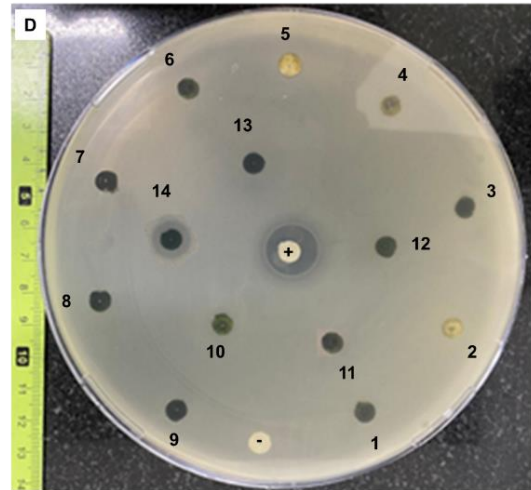
CAVN2403 (1); CAVN2560 (2); CAVN2513 (3);
CAVN6515 (4); CAVN5500 (5); CAVN8213 (6);
CAVN2489 (8); CAVN2441 (7); CAVN2490 (9); PM3 (10);
CAVN9301 (11); CAVN2402 (12); CAVN2438 (13);
CAVN2525 (14); ĐC dương (+); ĐC âm (-)



CAVN8204 (1); CAVN8233 (2); CAVN8242 (3);
CAVN8235 (4); CAVN8202 (5); CAVN2503 (6); ĐC
dương (+); ĐC âm (-)

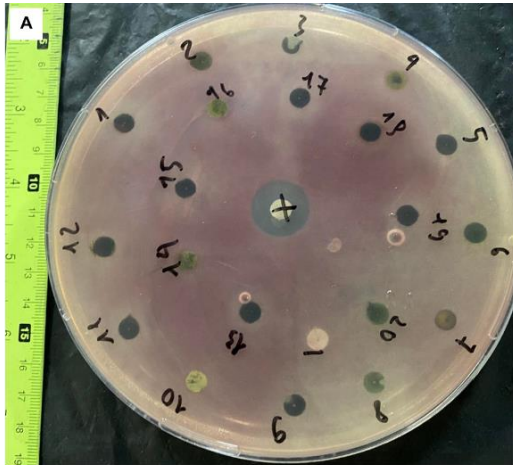


CAVN2501 (1); CAVN2502 (2); CAVN2443 (3);
CAVN2442 (4); CAVN2512 (5); CAVN2522 (6);
CAVN2435 (7); NK1813 (8); NK13 (9); (10); CAVN2434
(11); DL12 (12); CAVN2436 (13); CAVN2505 (14);
CAVN0801 (15); XN1103 (16); ĐC dương (+); ĐC âm (-)
) DL1

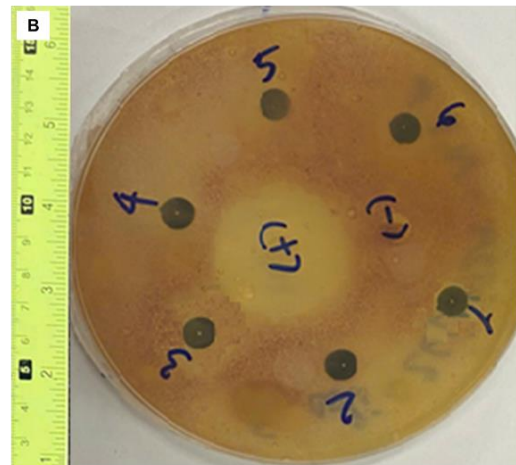


CAVN2404 (1); CAVN2437 (2); CAVN2439 (3);
CAVN2432 (4); CAVN2460 (5); CAVN2463 (6);
CAVN2440 (7); CAVN4301 (8); CAVN4303 (9);
CAVN6212 (10); CAVN8232 (11); CAVN8241 (12);
MD2411(13); NS2000 (14); ĐC dương (+); ĐC âm (-)

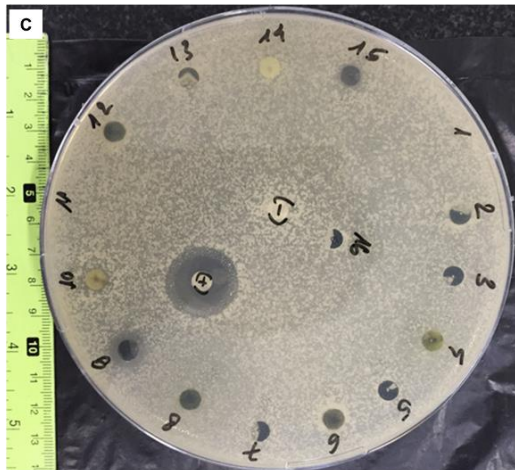
V. Pseudomonas aeruginosa ATCC 27852



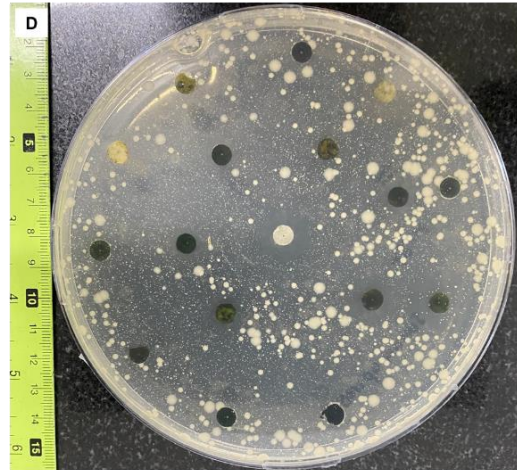
CAVN2403 (1); CAVN2560 (2); CAVN2513 (3);
CAVN6515 (4); CAVN5500 (5); CAVN8213 (6);
CAVN2489 (8); CAVN2441 (7); CAVN2490 (9); PM3 (10);
CAVN9301 (11); CAVN2402 (12); CAVN2438 (13);
CAVN2525 (14); DC dương (+); DC âm (-)



CAVN8204 (1); CAVN8233 (2); CAVN8242 (3);
CAVN8235 (4); CAVN8202 (5); CAVN2503 (6); DC
dương (+); DC âm (-)



CAVN2501 (1); CAVN2502 (2); CAVN2443 (3);
CAVN2442 (4); CAVN2512 (5); CAVN2522 (6);
CAVN2435 (7); NK1813 (8); NK13 (9); CAVN2434 (10);
DL1 (11); DL12 (12); CAVN2436 (13); CAVN2505 (14);
CAVN0801 (15); XN1103 (16); DC dương (+); DC âm (-)



CAVN2404 (3); CAVN2437 (4); CAVN2439 (5);
CAVN2432 (6); CAVN2460 (7); CAVN2463 (8);
CAVN2440 (9); CAVN4301 (10); CAVN4303 (11);
CAVN6212 (12); CAVN8232 (13); CAVN8241 (14);
MD2411(15); NS2000 (16); DC dương (+); DC âm (-)

Phụ lục 7. Kết quả Limit test của cao chiết tổng số từ 50 chủng VKL

STT	Cao chiết	Nồng độ cao chiết (µg/ml)				Đánh giá
		1	10	50	100	
1.	NK13	++	+++	+++	+++	Tiềm năng
2.	CAVN4301	-	+	+++	+++	Tiềm năng
3.	CAVN4303	-	+	+++	+++	Tiềm năng
4.	CAVN8204	-	+	+++	+++	Tiềm năng
5.	MD2411	-	-	+	++	Ít tiềm năng
6.	CAVN2440	-	-	-	+	Không tiềm năng
7.	NS2000	-	-	-	+	Không tiềm năng
8.	CAVN2403	-	-	-	-	Không ảnh hưởng
9.	CAVN2560	-	-	-	-	Không ảnh hưởng
10.	CAVN6515	-	-	-	-	Không ảnh hưởng
11.	CAVN5500	-	-	-	-	Không ảnh hưởng
12.	CAVN8213	-	-	-	-	Không ảnh hưởng
13.	CAVN2513	-	-	-	-	Không ảnh hưởng
14.	CAVN2442	-	-	-	-	Không ảnh hưởng
15.	CAVN2441	-	-	-	-	Không ảnh hưởng
16.	CAVN2503	-	-	-	-	Không ảnh hưởng
17.	CAVN8233	-	-	-	-	Không ảnh hưởng
18.	CAVN6212	-	-	-	-	Không ảnh hưởng
19.	NK1813	-	-	-	-	Không ảnh hưởng
20.	CAVN2525	-	-	-	-	Không ảnh hưởng
21.	CAVN2522	-	-	-	-	Không ảnh hưởng
22.	CAVN8242	-	-	-	-	Không ảnh hưởng
23.	PM3	-	-	-	-	Không ảnh hưởng
24.	CAVN2490	-	-	-	-	Không ảnh hưởng
25.	CAVN2437	-	-	-	-	Không ảnh hưởng

26.	CAVN9301	-	-	-	-	Không ảnh hưởng
27.	CAVN2402	-	-	-	-	Không ảnh hưởng
28.	CAVN2438	-	-	-	-	Không ảnh hưởng
29.	CAVN2489	-	-	-	-	Không ảnh hưởng
30.	CAVN8232	-	-	-	-	Không ảnh hưởng
31.	CAVN8241	-	-	-	-	Không ảnh hưởng
32.	CAVN2435	-	-	-	-	Không ảnh hưởng
33.	CAVN2434	-	-	-	-	Không ảnh hưởng
34.	CAVN2436	-	-	-	-	Không ảnh hưởng
35.	CAVN2501	-	-	-	-	Không ảnh hưởng
36.	CAVN2502	-	-	-	-	Không ảnh hưởng
37.	CAVN2439	-	-	-	-	Không ảnh hưởng
38.	CAVN2463	-	-	-	-	Không ảnh hưởng
39.	CAVN2512	-	-	-	-	Không ảnh hưởng
40.	CAVN8235	-	-	-	-	Không ảnh hưởng
41.	CAVN2432	-	-	-	-	Không ảnh hưởng
42.	XN1103	-	-	-	-	Không ảnh hưởng
43.	CAVN8202	-	-	-	-	Không ảnh hưởng
44.	CAVN0801	-	-	-	-	Không ảnh hưởng
45.	CAVN2460	-	-	-	-	Không ảnh hưởng
46.	DL12	-	-	-	-	Không ảnh hưởng
47.	DL1	-	-	-	-	Không ảnh hưởng
48.	CAVN2404	-	-	-	-	Không ảnh hưởng
49.	CAVN2443	-	-	-	-	Không ảnh hưởng
50.	CAVN2505	-	-	-	-	Không ảnh hưởng

-: không tác động; +: < gây chết 10% tổng tế bào; ++: gây chết 10 - 60% tổng số tế bào; +++: gây chết > 60% tổng số tế bào