

Tạp chí Công nghệ Sinh học **14**(3): 539-547, 2016

PHÂN LẬP, SÀNG LỌC VÀ ĐỊNH DANH CÁC CHỦNG VI SINH VẬT CÓ HOẠT TÍNH KHÁNG SINH TỪ VÙNG BIỂN ĐÔNG BẮC VIỆT NAM

Lê Thị Hồng Minh¹, Vũ Thị Quyên¹, Nguyễn Mai Anh¹, Đoàn Thị Mai Hương¹, Brian T Murphy², Châu Văn Minh¹, Phạm Văn Cường¹

¹Viện Hóa sinh Biển, Viện Hàn lâm khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Trường Đại học Dược, Đại học Illinois Chicago, Hoa Kỳ

Ngày nhận bài: 29.02.2016

Ngày nhận đăng: 20.8.2016

TÓM TẮT

Vi sinh vật được đặc biệt quan tâm là do khả năng sinh tổng hợp ra các hợp chất thứ cấp có giá trị ứng dụng cao. Các chất có hoạt tính sinh học có thể cung cấp cho chúng ta các cấu trúc hoá học đa dạng và mới lạ. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành phân lập được 143 chủng vi khuẩn và xạ khuẩn từ 161 mẫu gồm: trầm tích, hải miên, san hô mềm, da gai, sao biển thu thập từ ba vùng biển Hạ Long - Cát Bà, Cô Tô - Thanh Lân và Bái Tử Long. Các chủng được lên men trong môi trường A1, dịch lên men được xử lý tạo cặn chiết và tiến hành sàng lọc cặn chiết của vi khuẩn với 7 chủng vi sinh vật kiểm định dẫn đến lựa chọn 15 chủng vi sinh vật có hoạt tính sinh học cao nhất, thể hiện khả năng ức chế khá mạnh đối với 2 chủng vi khuẩn Gram (+) *Enterococcus faecalis* ATCC29212; *Bacillus cereus* ATCC13245 và chủng nấm men *Candida albicans* ATCC10231 với các giá trị MIC nhỏ hơn hoặc bằng giá trị MIC của các kháng sinh đối chứng. Ngoài ra, chủng G057 còn có khả năng kháng *S. enterica* ATCC13076 và chủng G002 kháng *E. coli* ATCC25922 với giá trị tương ứng MIC_{G057} = 8 µg/ml, MIC_{G002} = 256 µg/ml. Ba chủng G115, G119, G120 có khả năng kháng *P. aeruginosa* ATCC27853 với giá trị tương ứng MIC_{G115} = 64 µg/ml, MIC_{G119} = 32 µg/ml và MIC_{G120} = 32 µg/ml. Nghiên cứu đặc điểm hình thái và phân tích trình tự gen mã hóa tiểu phần rRNA 16S cho thấy 9 trong số 15 chủng (G016, G017, G019, G043, G044, G047, G068, G119, G120) thuộc chi *Micromonospora*, hai chủng G039, G065 thuộc chi *Streptomyces*, chủng G002 thuộc chi *Bacillus*, G057 thuộc chi *Nocardioopsis*, chủng G115 thuộc chi *Photobacterium* và chủng G121 thuộc chi *Oceanisphaera*.

Từ khóa: Xạ khuẩn biển, Hoạt tính kháng vi sinh vật, MIC, Trình tự 16S rRNA

MỞ ĐẦU

Môi trường biển chiếm khoảng 70% bề mặt trái đất và là nguồn đa dạng sinh học lớn. Vi sinh vật biển mang nhiều đặc tính riêng biệt vì chúng cần phải thích ứng với điều kiện môi trường khắc nghiệt như nhiệt độ thấp, áp suất cao và cơ chất giới hạn trong môi trường nước sâu. Các vi sinh vật biển tuy nhiên lại có tiềm năng ứng dụng trong công nghệ sinh học lớn, sản sinh nhiều enzyme và hoạt chất sinh học làm dược phẩm quý (Debnath *et al.*, 2007).

Trong số các hợp chất tự nhiên có nguồn gốc vi sinh vật sinh đã được công bố sử dụng trên thế giới thì 45% được sinh ra từ xạ khuẩn, 38% từ nấm và 17% từ vi khuẩn (Arnold, Sergio, 2009). Xạ khuẩn biển được đánh giá là nguồn quan trọng trong việc sản xuất thuốc kháng sinh, một số hợp chất có hoạt

tính sinh học mới được phát hiện từ chúng. Trong đó chi *Micromonospora* cùng với chi *Streptomyces* được biết đến nhiều nhất để tổng hợp kháng sinh. Các chất kháng sinh khác nhau có nguồn gốc của xạ khuẩn đã được nghiên cứu bao gồm: aminoglycoside, anthracyclin, lycopetide, β -lactam, macrolides, nucleoside, peptide, polyene, polyester, polyketide, actinomycin và tetracycline (Goodfellow *et al.*, 1996).

Để khai thác tiềm năng của vi sinh vật biển cho các mục đích phát triển dược phẩm, trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành phân lập các chủng vi sinh vật từ trầm tích biển, hải miên, san hô mềm... thu thập từ ba vùng biển Hạ Long - Cát Bà; Cô Tô - Thanh Lân và Bái Tử Long. Trong khuôn khổ bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả về nuôi cấy, sàng lọc hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định và định danh các chủng vi sinh vật có hoạt tính đáng chú ý.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Các môi trường sử dụng trong nghiên cứu được tham khảo bởi (Stanley và Holt, 1989) có cải tiến của Khoa Hoá dược phẩm và Dược liệu học, Đại học Dược, Đại học Illinois Chicago, Hoa Kỳ: A1 (soluble starch: 10 g/l; yeast extract: 4 g/l; peptone: 2 g/l; Instant ocean: 30 g/l; Agar: 15 g/l; Nước cất: 1 lít), M1 (soluble starch: 5 g/l; yeast extract: 2 g/l; peptone: 1 g/l; instant ocean: 30 g/l; Agar: 15 g/l; Nước cất: 1 lít), SWA (instant ocean: 30 g/l; Agar: 15 g/l; Nước cất: 1 lít), A⁺ (soluble starch: 10 g/l; yeast extract: 4 g/l; peptone: 2 g/l; instant ocean: 30 g/l; CaCO₃: 1 g/l; Agar: 15 g/l; Nước cất: 1 lít), SCA (soluble starch: 10 g/l; K₂HPO₄: 2 g/l; KNO₃: 2 g/l; casitone: 300 mg/l; MgSO₄·7H₂O: 50 mg/l; FeSO₄·7H₂O: 10 mg/l; instant ocean: 30 g/l; CaCO₃: 2 mg/l; Agar: 15 g/l; Nước cất: 1 lít), NZSG (soluble starch: 20 g/l; yeast extract: 5 g/l; glucose: 10 g/l; NZ Amine A: 5 g/l; Instant ocean: 30 g/l; Agar: 15 g/l; Nước cất: 1 lít) và ISP1 (soluble starch: 5 g/l; yeast extract: 2 g/l; casitone: 5 g/l; instant ocean: 30 g/l; Agar: 15 g/l; Nước cất: 1 lít), ISP2 (soluble starch: 5 g/l; yeast extract: 2 g/l; malt extract: 10 g/l; glucose: 10 g/l; instant ocean: 30 g/l; Agar: 15 g/l; Nước cất: 1 lít).

Kit tách DNA tổng số của hãng Madison (Mỹ), PCR-master mix của hãng Bioneer, Hàn Quốc, bộ BigDyeR Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) sử dụng cho phản ứng giải trình tự DNA; chỉ thị DNACHuẩn (Invitrogen); Taq DNA polymerase, các cặp mồi để khuếch đại gen 16S rRNA (16sF: 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG3'; 16sR: 5'-AAGGAGGTGATCCAACC3').

Các chủng vi sinh vật kiểm định: 3 chủng vi khuẩn Gram âm (-): *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Salmonella enterica* ATCC13076; 3 chủng vi khuẩn Gram dương (+): *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC 13245; 1 chủng Nấm men *Candida albicans* ATCC10231 (Microbiologies, Mỹ).

Phương pháp nghiên cứu

Thu thập mẫu

Các mẫu được thu thập tại các độ sâu khác nhau (từ 3mét - 26mét) thuộc vùng biển Hạ Long – Cát

Bà, Cô Tô – Thanh Lân và Bái Tử Long. Mẫu được lưu giữ trong các ống Eppendorf vô trùng, được bảo quản lạnh trong thời gian vận chuyển về phòng thí nghiệm và được tiến hành phân lập ngay.

Phân lập các chủng vi sinh vật

Đối với trầm tích: Tiến hành cân 0,5 g trầm tích vào ống fancel, sau đó bổ sung 4,5 ml nước cất vô trùng, đảo đều mẫu bằng thanh inox đã khử trùng. Tiến hành sốc nhiệt ở nhiệt độ 60°C trong 8 phút, hút 50 µl dịch trong ống đã được sốc nhiệt vào một ống Eppendorf khác có chứa 450 µl nước cất đã khử trùng, tiếp tục trộn đều mẫu và hút 50 µl dịch cấy trải vào các đĩa có chứa 6 loại môi trường đã chuẩn bị (A1; M1; SWA; NZSG; SCA; ISP2). Các đĩa được nuôi trong tủ ẩm ở 28-30°C sau 7- 30 ngày lựa chọn các khuẩn lạc cấy chuyển làm sạch sang môi trường ISP2.

Đối với hải miên, san hô mềm và một số vật liệu khác: Tiến hành cân 0,5 g mẫu vào ống fancel, bổ sung 4,5 ml nước cất vô trùng, nghiền mẫu bằng thanh inox vô trùng đến khi thấy dịch trong ống đục. Tiến hành sốc nhiệt ở nhiệt độ 60°C trong 8 phút, hút 50 µl dịch trong ống đã được sốc nhiệt vào một ống Eppendorf khác có chứa 450 µl nước cất đã khử trùng, tiếp tục trộn đều mẫu và hút 50 µl dịch cấy trải vào các đĩa có chứa 6 loại môi trường đã chuẩn bị. Các đĩa được nuôi trong tủ ẩm ở 28-30°C, 7- 30 ngày. Các khuẩn lạc sau đó được cấy chuyển làm sạch sang môi trường ISP2 (William, Davies, 1965; William, Cross, 1971).

Tạo cặn chiết thô từ dịch nuôi cấy

Các chủng vi sinh vật được nuôi trên môi trường A1+, ở điều kiện 28°C lắc 170 vòng/phút trong 7 ngày, dịch lên men được chiết xuất với ethyl acetate (5 lần). Dịch chiết xuất được làm bay hơi dưới áp suất giảm để loại dung môi thu cặn chiết thô (Cédric *et al.*, 2013).

Phương pháp xác định hoạt tính kháng khuẩn

Hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định được xác định theo phương pháp pha loãng đa nồng độ của Hadacek và Greger (2000). Đây là phương pháp thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định và nhằm đánh giá mức độ kháng khuẩn mạnh yếu của các mẫu thử thông qua các giá trị thể hiện hoạt tính là MIC (nồng độ ức chế tối thiểu). Mẫu cặn thô ban đầu được pha loãng trong DMSO và các kháng sinh được pha trong nước cất vô trùng ở dải nồng độ giảm dần:

256 µg/ml, 128 µg/ml, 64 µg/ml, 32 µg/ml, 16 µg/ml, 8 µg/ml, 4 µg/ml và 2 µg/ml với số thí nghiệm lặp lại N=2. Bổ sung 50 µl dung dịch vi khuẩn và nấm kiểm định ở nồng độ 5.10^5 CFU/ml, ủ ở 37°C. Sau 24 h, đọc giá trị MIC là giá trị tại giếng có nồng độ chất thử thấp nhất ức chế hoàn toàn sự phát triển của vi sinh vật kiểm định sau 24 giờ nuôi và được xác định chính xác dựa trên số liệu đo độ đục tế bào bằng máy quang phổ Biotek, sử dụng phần mềm GraphPad Prism data. Đối chứng là kháng sinh streptomycin và tetracyclin cho các chủng vi khuẩn và cycloheximide cho nấm men.

Phương pháp định danh các chủng vi khuẩn và xạ khuẩn

Ba chủng vi khuẩn G002; G115 và G121 được nuôi trên môi trường phân lập A1, sau 24 h nuôi cấy quan sát hình thái khuẩn lạc. Mười ba chủng xạ khuẩn còn lại được nuôi cấy trong 14 ngày ở 30 °C trên môi trường thạch (ISP2) và kiểm tra bằng kính hiển vi điện tử quét SEM (scanning electron microscopy) model JSM-5410 LV; JEOL. Việc chuẩn bị mẫu được tiến hành như mô tả của Itoh và đồng tác giả. Đặc điểm hình thái của chủng xạ khuẩn được xác định dựa trên các đặc điểm nuôi cấy bao gồm: màu sắc của khuẩn ty khí sinh; khuẩn ty cơ chất; hình thái khuẩn lạc (Arai, 1975; Trener *et al.*, 1963).

Phản ứng khuếch đại gen được thực hiện trong một thể tích hỗn hợp 25 µl chứa 16,3 µl H₂O khử ion vô trùng, 2,5 µl đệm 10×, 1,5 µl 25 mM MgCl₂, 0,5 µl 10 mM dNTP, 0,2 µl của Taq polymerase, 1,0 µl mỗi với nồng độ 0,05 mM 16sF (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG3') ; 16sR (5'-AAGGAGGTGATCCAACC3') (Rajesh M *et al.*, 2013) và 2,0 µl DNA tổng số. Chu trình nhiệt của PCR là: 94°C/2 phút (94°C/1 phút, 58°C/1 phút, 72°C/1 phút 20 giây) x 30 chu kỳ, 72°C/ 8 phút và giữ mẫu ở 8°C. Ước tính kích thước sản phẩm là khoảng 1500 bp. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng kit tinh sạch của hãng Invitrogen. Trình tự gen 16S rRNA được giải mã bằng máy giải trình tự tự động ABI PRISM 3100 của hãng Bioscience. Trình tự được xử lý bởi chương trình BioEdit v.2.7.5. và so sánh với dữ liệu ngân hàng gen của NCBI. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng bằng chương trình MEGA version 4.1 (Saitou, Nei, 1987).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập các chủng vi sinh vật

Phân lập được tiến hành trên 76 mẫu ở Cô Tô -

Thanh Lân (gồm 28 mẫu trầm tích, 06 mẫu san hô mềm, 14 mẫu thân mềm, 20 mẫu hải miên, 3 mẫu da gai, 1 mẫu sao biển và 4 loại khác), 76 mẫu ở Bái Tử Long (gồm 11 mẫu trầm tích, 10 mẫu san hô mềm, 4 mẫu thân mềm, 39 mẫu hải miên, 7 mẫu da gai, 2 mẫu sao biển và 3 loại khác) và 09 mẫu trầm tích ở Hạ Long- Cát Bà.

Từ các mẫu thu thập, tổng số 143 chủng thuần khiết đã được phân lập dựa trên các đặc điểm khác biệt về vị trí, hình thái và màu sắc khuẩn lạc. Trong đó 39 chủng từ vịnh Hạ Long - Cát Bà, 39 chủng từ Đảo Cô Tô - Thanh Lân và 65 chủng từ vịnh Bái Tử Long.

Nuôi cấy, tạo cặn chiết và thử hoạt tính kháng vi sinh vật

Từ 143 chủng phân lập được tiến hành nuôi cấy trong môi trường A1, dịch nuôi cấy được chiết với dung môi ethyl acetate (5 lần) thu được cặn thô. Thí nghiệm xác định hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định với cặn thô thu được cho thấy hầu hết 143 chủng phân lập đều có hoạt tính ức chế các chủng vi sinh vật kiểm định, trong đó 33 chủng phân lập có hoạt tính kháng từ 3 chủng VSV kiểm định trở lên. Ngoài ra, 11/143 chủng phân lập có hoạt tính kháng vi khuẩn kiểm định Gram âm. Nguyên nhân về mức độ nhạy cảm với kháng sinh của các vi khuẩn Gram âm và Gram dương khác nhau là do sự khác biệt về hình thái, cấu trúc của thành tế bào vi khuẩn. Vi khuẩn Gram âm có màng ngoài gồm các thành phần lipopolysaccharide, đặc biệt hàm lượng lipid và lipoprotein cao, Cấu trúc này giúp cho thành tế bào khó bị tác động. Trong khi đó, các chủng Gram dương nhạy cảm với kháng sinh hơn do chỉ có một lớp peptidoglycan bên ngoài, cấu trúc này không phải là một hàng rào ngăn cản hiệu quả sự thâm thấu các tác nhân bên ngoài vào thành tế bào (Basilio *et al.*, 2003; Oskay *et al.*, 2004).

Chúng tôi đã lựa chọn 15 chủng phân lập có hoạt tính tốt nhất để thực hiện cho các nghiên cứu tiếp theo. Mười lăm chủng này đều có khả năng kháng 2 chủng kiểm định Gram dương là *E faecalis* ATCC29212 và *B cereus* ATCC13245 với các giá trị MIC nhỏ hơn hoặc bằng giá trị MIC của các kháng sinh đối chứng. Ngoài ra, 14/15 chủng nghiên cứu còn có khả năng ức chế khá mạnh chủng nấm *C albicans* ATCC10231 (trừ chủng G016) với các giá trị MIC rất nhỏ như MIC_{G017; G068} = 2 µg/ml; MIC_{G047; G065} = 2 µg/ml. Đặc tính này rất đáng quan tâm vì *Candida albicans* là tác nhân gây nhiều bệnh, đặc biệt là niêm mạc miệng, lưỡi, dạ dày, hành tá tràng,

đường ruột, niệu đạo và đường sinh dục. Hiện nay 25 % bệnh tai mũi, họng do *Candida albicans* trở nên không kiểm soát nổi do đã đề kháng với các kháng sinh chống nấm hiện có như amphotericin B, vaclotrimazole, 5-fluorocytosine (Nguyễn Vĩnh Hà *et al.*, 2002). Đối với các chủng vi sinh vật kiểm định Gram âm, trong 15 chủng chọn lọc chỉ có chủng G057 là có khả năng kháng *S. enterica* ATCC13076 và

G002 kháng *E. coli* ATCC25922 với giá trị tương ứng $MIC_{G057} = 8 \mu\text{g/ml}$, $MIC_{G002} = 256 \mu\text{g/ml}$; và 3 chủng G115, G119, G120 có khả năng kháng *P. aeruginosa* ATCC27853 với giá trị tương ứng $MIC_{G115} = 64 \mu\text{g/ml}$, $MIC_{G119} = 32 \mu\text{g/ml}$ và $MIC_{G120} = 32 \mu\text{g/ml}$. Kết quả kiểm tra hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của 15 chủng chọn lọc được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Giá trị MIC của cặn chiết EtOAc của 15 chủng có hoạt tính đã lựa chọn.

TT	Chủng	Gram dương (+)			Gram âm (-)		Nấm men
		<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>B. cereus</i> ATCC 13245	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	
Vùng vịnh Hạ Long - Cát Bà							
	Nồng độ	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)
1	G002	64	-	256	256	-	32
2	G016	64	256	128	-	-	-
3	G017	128	-	128	-	-	2
4	G019	64	-	128	-	-	8
5	G039	64	128	-	-	-	64
Vùng đảo Cô Tô - Thanh Lân							
6	G043	64	-	32	-	-	16
7	G044	64	-	64	-	-	16
8	G047	256	-	128	-	-	4
9	G057	256	-	-	-	8	8
10	G065	32	-	64	-	-	4
11	G068	256	-	-	-	-	2
Vùng vịnh Bái Tử Long							
12	G115	64	-	32	-	64	16
13	G119	64	64	32	-	32	32
14	G120	64	-	32	-	32	32
15	G121	64	-	32	-	-	16
	Streptomycin	256	256	128	32	256	128
	Tetracyclin	4	128	256	8	256	256
	Cycloheximide	-	-	-	-	-	32

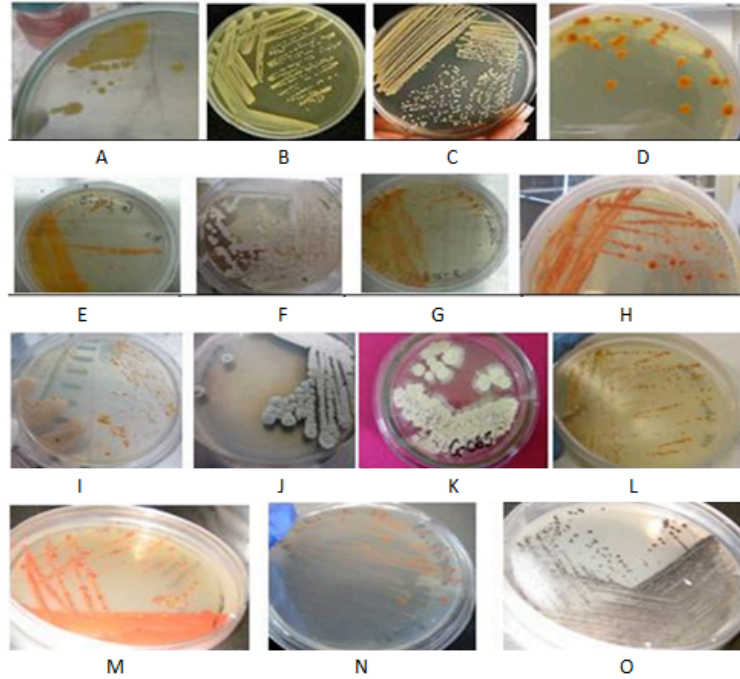
Định danh 15 chủng đã sàng lọc

Ba chủng vi khuẩn G002, G115 và G121 được nuôi trên môi trường phân lập A1, quan sát hình thái khuẩn lạc sau 24 h cho thấy: chủng G002 có kích thước khuẩn lạc khoảng 3 mm, bề mặt hơi sấp, màu ngả vàng nhạt; chủng G115 và G121 có kích thước khoảng 1-2 mm, bề mặt bóng hơn, khuẩn lạc có màu trắng đục. Mười ba chủng xạ khuẩn còn lại được nuôi cấy trong 14 ngày ở 30°C trên môi trường thạch

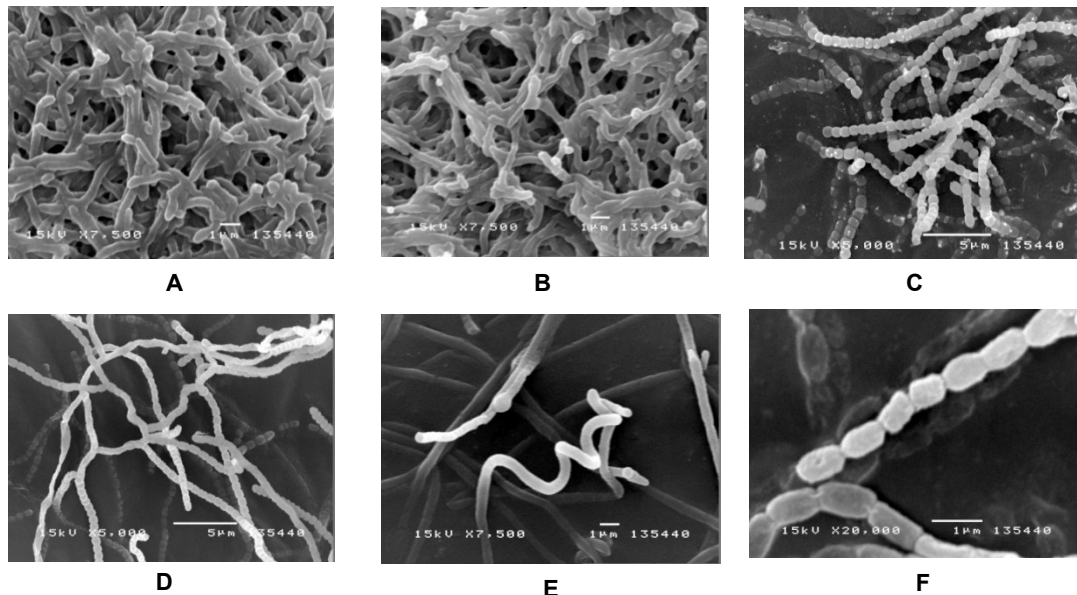
(ISP2), kết quả cho thấy sợi khuẩn ty cơ chất phát triển tốt trên nền cơ chất của môi trường, nhưng sợi khuẩn ty khí sinh thì yếu hơn. Màu sắc của các sợi khí sinh rất phong phú, từ vàng, trắng sang màu cam hoặc từ nâu đen sang màu đen sau khi hình thành bào tử (Hình 1). Quan sát hình thái bào tử của một số chủng xạ khuẩn dưới kính hiển vi điện tử SEM cho thấy bào tử được sinh ra đơn lẻ, có đường kính khoảng 0,5-1 μm . Các bào tử có dạng nốt và mịn

trên bề mặt và không di chuyển được (Hình 2). Các đặc điểm này được coi là những đặc điểm quan trọng

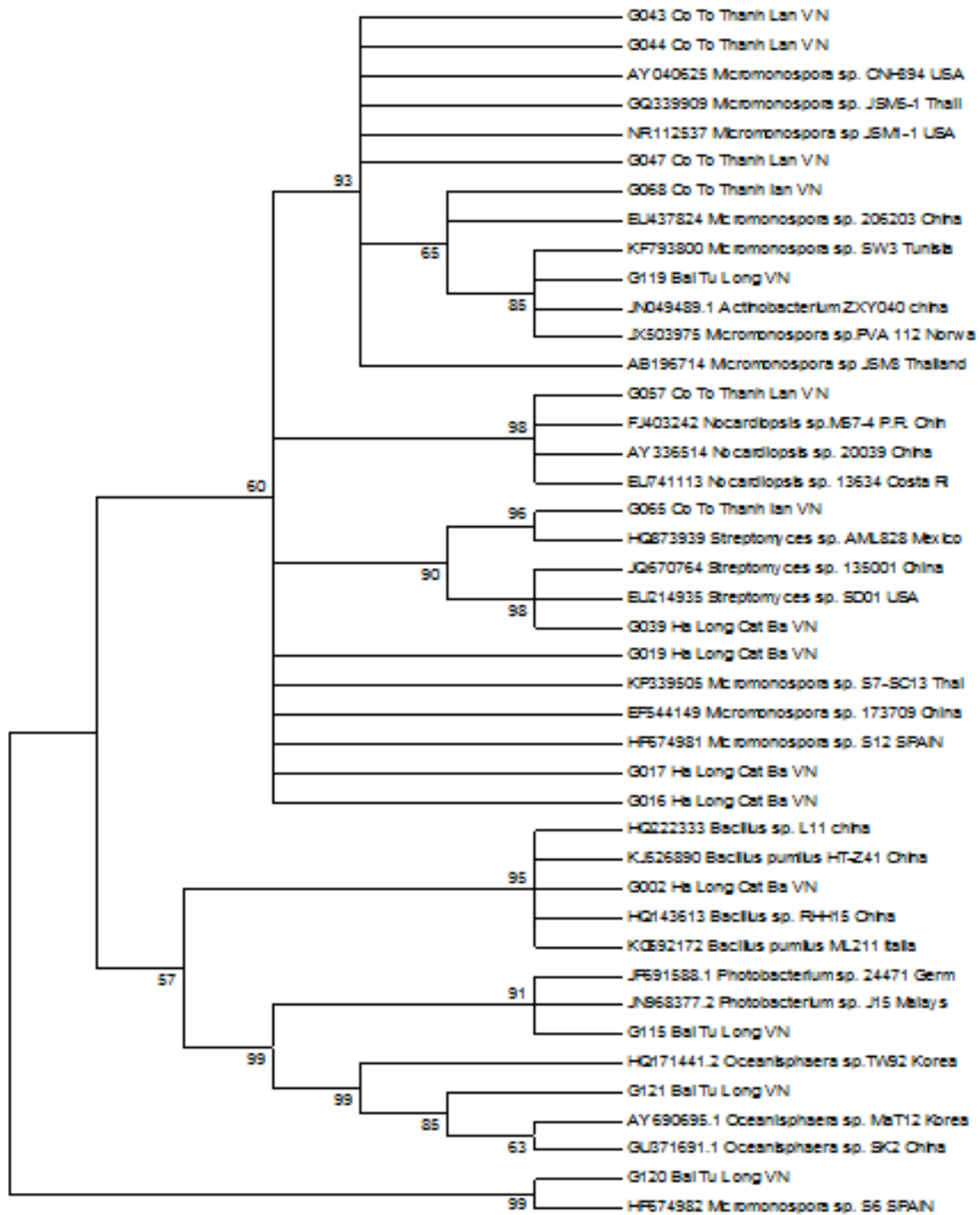
trong việc định loài vi sinh vật (Mukherjee *et al.*, 2004; Maruyama *et al.*, 1975).



Hình 1. Hình thái khuẩn lạc của các chủng nghiên cứu trên môi trường A1 và ISP2: Chủng G002 (A); Chủng G115 (B); Chủng G121 (C); Chủng G016 (D); Chủng G017 (E); Chủng G039 (F); Chủng G043 (G); Chủng G044 (H); Chủng G047 (I); Chủng G057 (J); Chủng G065 (K); Chủng G068 (L); Chủng G119 (M); Chủng G120 (N); Chủng G019 (O).



Hình 2. Hình ảnh bào tử dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM) của một số chủng nghiên cứu: G016(A); G017(B); G113(C); G039 (D); G065 (E) và G57 (F).



Hình 3. Cây phân loại thể hiện mối liên quan giữa 15 chủng nghiên cứu với các loài gần gũi dựa trên trình tự gen 16S rRNA. Cây được dựng theo phương pháp neighbor – joining, các chỉ số hiển thị ở các vị trí phân nhánh là kết quả phân tích bootstrap đối với 1000 phép so sánh (chỉ có các giá trị trên 50% được trình bày trên hình). Kết quả cho thấy mối quan hệ giữa các chủng nghiên cứu với các thành viên đại diện của các chi *Micromonospora*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Photobacterium* và *Oceanisphaera*.

Mười lăm chủng có hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định cao và có tiềm năng ứng dụng đã được định danh dựa trên so sánh trình tự gen 16S rRNA bằng chương trình Blast. kết quả cho thấy các chủng này có độ tương đồng cao (hơn 99%) về trình tự gen 16S rRNA so với các chủng đã công bố trên GenBank. Nghiên cứu quan hệ của các chủng trên cây phát sinh loài (Hình 3) cho thấy các chủng G016, G017, G019, G043, G044, G047, G068, G119, G120 có được xếp vào chi *Micromonospora*, các chủng G039 và G065 thuộc chi *Streptomyces*, chủng G002 thuộc chi *Bacillus*, chủng G115 thuộc chi *Photobacterium* và chủng G121 thuộc chi *Oceanisphaera*.

Các chi được phân lập từ môi trường biển dường như có khả năng sản xuất các hợp chất lý thú. Một loài thuộc chi *Streptomyces* chưa được mô tả phân lập từ trầm tích của Biển Địa Trung Hải, đã sản xuất ra các hợp chất lần đầu tiên được tìm thấy trong tự nhiên: triazolopyrimidine, Gutingimycin và một phức chất guanine/ trioxacarcin A (Erba *et al.*, 1999; Fred *et al.*, 2006). Các hợp chất này có hoạt tính gây độc tế bào và kháng khuẩn chống lại nhiều chủng Gram dương và Gram âm.

Một loài thuộc chi *Streptomyces* được phân lập từ trầm tích biển thu thập ở vịnh Ayajin thuộc biển Đông Hàn Quốc, sản xuất một lượng nhỏ streptochlorin, Streptochlorin được tìm thấy có đặc tính ức chế NFκB một yếu tố phiên mã liên quan đến sự phát triển của bệnh ung thư (Hozzein *et al.*, 2004).

Chủng ưa mặn được xác định là thành viên của chi *Micromonospora* là *Micromonospora lomaivitiensis* được phân lập từ loài hải tiêu *Polysyncraton lithostrotum*, xạ khuẩn này tạo ra hai lomaiviticins A và B có cấu trúc gần tương tự với thuốc kháng sinh kinamycin. Một chủng thuộc chi *Micromonospora* phân lập từ mẫu san hô ở Ấn Độ Dương, đã được ứng dụng để sản xuất IB-96212 có hoạt tính gây độc tế bào. Lucentamycin A cũng là một chất gây độc tế bào được phân lập từ *Nocardiosis lucentensis* thuộc quần đảo Bahamas. Kahakamide A là một N-glycosyl hiếm được phân lập từ *N. dassonvillei* từ trầm tích ở đảo Kauai thuộc quần đảo Hawaii có hoạt tính kháng khuẩn *B. subtilis* (Kano *et al.*, 2005).

Nghiên cứu các hợp chất thứ cấp từ nguồn vi sinh vật biển ở Việt Nam mới chỉ được bắt đầu, có rất ít các nghiên cứu đã công bố, mặc dù nguồn đa dạng vi sinh vật biển của nước ta là rất lớn nhờ vị trí địa lý tiếp giáp với biển. Do vậy, việc tiến hành nghiên cứu các hợp chất thứ cấp của nguồn vi sinh

vật biển Việt Nam nhằm phát hiện các chất có hoạt tính sinh học cao có thể nghiên cứu ứng dụng trong lĩnh vực y dược là hướng nghiên cứu cần thiết, hứa hẹn nhiều triển vọng.

KẾT LUẬN

Từ 161 mẫu gồm: Trầm tích, Hải miên, San hô mềm, da gai, sao biển và một số loại khác thu thập ở ba vùng biển Hạ Long- Cát Bà; Cô Tô- Thanh Lân; Bái Tử Long, chúng tôi đã phân lập được 143 chủng vi khuẩn và xạ khuẩn. Từ kết quả sàng lọc hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định, chúng tôi đã lựa chọn được 15 chủng vi sinh vật có hoạt tính sinh học cao nhất (Ký hiệu: G002, G016, G017, G019, G039, G043, G044, G047, G057, G065, G068, G115, G119, G120, G121). Cả 15 chủng lựa chọn đều có khả năng kháng 2 chủng kiểm định Gram dương là *E. faecalis* ATCC29212 và *B. cereus* ATCC13245. Ngoài ra, 14/15 chủng có khả năng ức chế khá mạnh chủng nấm *C. albicans* ATCC10231 (trừ chủng G016) với MIC từ 2 µg/ml đến 64 µg/ml. Đối với các chủng vi sinh vật kiểm định Gram âm, trong 15 chủng chọn lọc chỉ có chủng G057 là có khả năng kháng *S. enterica* ATCC13076 và G002 kháng *E. coli* ATCC25922 với giá trị tương ứng MIC_{G057} = 8 µg/ml, MIC_{G002} = 256 µg/ml; và 3 chủng G115, G119, G120 có khả năng kháng *P. aeruginosa* ATCC27853 với giá trị tương ứng MIC_{G115} = 64 µg/ml, MIC_{G119} = 32 µg/ml và MIC_{G120} = 32 µg/ml. Các chủng đã được xác định hình thái và định danh bằng trình tự gen 16S rRNA. Kết quả cho thấy: Chủng G016, G017, G019, G043, G044, G047, G068, G119, G120 đều thuộc chi *Micromonospora*, Chủng G039 và G065 thuộc chi *Streptomyces*, G002 thuộc chi *Bacillus*, G057 thuộc chi *Nocardiosis*; G115 thuộc chi *Photobacterium*. và chủng G121 thuộc *Oceanisphaera*.

Lời cảm ơn: Công trình này được hoàn thành với sự tài trợ kinh phí của Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, đề tài mã số VAST. TĐ. ĐAB.04/ 13-15.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Arnold LD, Sergio S (2009) Microbial drug discovery: 80 years of progress. *J Antibiotics* 62: 5–16
- Arai T (1975) *Culture Media for Actinomycetes*. The Society for Actinomycetes Japan, Tokyo: 1-31.
- Basilio A, González I, Vicente MF, Gorrochategui J,

- Cabello A, González A, Genilloud O (2003) Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. *J Appl Microbiol* 95: 814-823.
- Cédric O, Skylar C, Bindiya K, Mashal MA, Haipeng L, Anna O, Quan S, Van Cuong Pham, Catherine LS, Brian TM, Alexander SM (2013) Tool for characterizing bacterial protein synthesis inhibitors. *Antimicrob Agent Chemother* 57: 5994- 6002.
- Debnath M, Paul AK, Bisen PS (2007) Natural bioactive compounds and biotechnological potential of marine bacteria. *Curr Pharm Biotechnol* 8: 253-260.
- Erba E, Bergamaschi D, Ronzoni S, Faretta M, Taverna S, Bonfanti M, Catapano CV, Faircloth G, Jimeno J, (1999) Mode of action of thiocoraline, a natural marine compound with anti-tumour activity. *BrJCancer* 80: 971-980.
- Fred C (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria, *AmerJ Med*, 119: 3-10.
- Goodfellow M, Davenport R, Stainsby FM, Curtis TP (1996) Actinomycete diversity associated with foaming in activated sludge plants. *Microbiol Biotechnol J Ind* 17: 268-280.
- Hozzein WN, Li WJ, Ali M I, Hammouda O, Mousa AS, Xu LH, Jiang CL (2004) *Nocardiosis alkiphila* sp. nov., a novel alkaliphilic actinomycete isolated from desert soil in Egypt, *Int J Syst Evol Microbiol*, 54: 247-252,
- Hadacek F, Greger H (2000) Test of antifungal natural products methodologies, comparability of result and assay choice. *Phytochem Anal* 90: 137-147.
- Itoh T, Kudo T, Parenti F, Seino A (1989) Amended description of the genus *Kineosporia*, based on chemotaxonomic and morphological studies. *Int J Sys Bacteriol* 39: 168-173.
- Kanoh K, Matsuo Y, Adachi K, Imagawa H (2005) Mechercharmycins A and B, cytotoxic substances from marine-derived *Thermoactinomyces* sp. YM3-251, *J Antibiot* (Tokyo). 58(4): 89-92.
- Mukherjee G, Sen SK (2004) Characterization and identification of chitinase producing *Streptomyces venezulae* P10, *Indian J Exp Biol*. 42: 541-544.
- Maruyama HB, Suhara Y, Suzuki W, Maeshima Y, Shimizu MA (1975) New antibiotic fumaramidmycin I- Production, biological properties and characterization of producer strain. *J Antibiot* 28: 636-647.
- Oskay M, Same A, Azeri C (2004) Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *Afr J Biotechnol* 3:441-456.
- Rajesh M. M, Subbaiya R, Balasubramanian M (2013) Isolation and Identification of Actinomycetes *isoptericola variabilis* From Cauvery River Soil Sample. *IntJ Curr Microbiol App Sci.*, 2(6): 236-245.
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol* 4: 406-425.
- Trener HD, Buckus EJ (1963) System of color wheels for *Streptomyces* taxonomy. *Appl Microbiol* 11: 335 - 338.
- Williams ST, Davies FL (1965) Use of antibiotics for selective isolation and enumeration of Actinomycetes in soil. *J Gen Microbiol* 38: 251-261.
- Williams ST, Cross T (1971) *Actinomycetes*. In: *Methods in Microbiology*. Academic Press (London) 4: 295-334.

ISOLATION, SCREENING AND IDENTIFICATION OF MICROORGANISMS HAVING ANTIMICROBIAL ACTIVITY ISOLATED FROM SAMPLES COLLECTED ON SEABED OF NORTHEAST VIETNAM

Le Thi Hong Minh^{1,✉}, Vu Thi Quyen¹, Nguyen Mai Anh¹, Doan Thi Mai Huong¹, Brian T Murphy², Chau Van Minh¹, Pham Van Cuong¹

¹Institute of Marine Biochemistry, Vietnam Academy of Science and Technology

²College of Pharmacy, University of Illinois at Chicago, USA

SUMMARY

Microorganisms are especially interested in due to the ability to produce secondary compounds with high-value applications. Plenty of novel and diverse chemical structures have been found in the bioactive substances of microorganisms. In this study, we isolated 143 strains of bacteria and actinomycetes from 161 samples including: sediments, sponges, soft corals, echinoderms and starfish collected from three sea areas of Viet Nam: Ha Long - Cat Ba; Co To - Thanh Lan; Bai Tu Long. The strains were fermented in A1 medium and then fermentation broths were extracted 5 times with ethyl acetate. The extraction residue screening test using 7

✉ Author for correspondence: E-mail: lhminhbk@gmail.com

reference strains isolated 15 target strains with the highest biological activity. Most of these strains have dramatic inhibition on Gram positive bacteria: *Enterococcus faecalis* ATCC29212; *Bacillus cereus* ATCC13245 and *Candida albicans* ATCC10231 with MIC values less than or equal to the MIC value of the reference antibiotic. In particular, strain G057 was active against *S. enterica* ATCC 13076 and G002 inhibited *E. coli* ATCC25922 with respective values $MIC_{G057} = 8 \mu\text{g/ml}$, $MIC_{G002} = 256\mu\text{g/ml}$; and three strains G115, G119, G120 showed the inhibitory effect towards *P. aeruginosa* ATCC27853 with respective values $MIC_{G115} = 64 \mu\text{g/ml}$, $MIC_{G119} = 32 \mu\text{g/ml}$ and $MIC_{G120} = 32 \mu\text{g/ml}$. All 15 strains were then subjected to morphological and phylogenetic investigations based on 16S rRNA gene sequences. The results showed that 9 of 15 strains G016, G017, G019, G043, G044, G047, G068, G119 and G120 belonged to Genus *Micromonospora*; strains G039 and G065 were identified as Genus *Streptomyces*; G002 was identified as *Bacillus*; G057 was identified as *Nocardiosis*; G115 was in *Photobacterium* and G121 belonged *Oceanisphaera*.

Keywords: Actinomycetes, Antimicrobial activity, MIC, 16S rRNA gene sequences