

HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN CỦA MỘT SỐ CHỦNG VI KHUẨN PHÂN LẬP TỪ BỌT BIỂN Ở VÙNG ĐẢO PHÚ QUỐC, VIỆT NAM

Phan Thị Hoài Trinh*, Ngô Thị Duy Ngọc, Bùi Minh Lý, Lê Đình Hùng,
Cao Thị Thuý Hằng, Võ Thị Diệu Trang, Huỳnh Hoàng Như Khánh

Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công nghệ Nha Trang, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam,
*phanhoaitrinh84@gmail.com

TÓM TẮT: Nghiên cứu đã sàng lọc hoạt tính kháng khuẩn của 50 chủng vi khuẩn phân lập từ 23 loài bọt biển thu thập từ vùng đảo Phú Quốc. Trong đó, 21 chủng (42%) có khả năng ức chế hiệu quả đối với ít nhất 2 trong số 10 vi khuẩn gây bệnh được thử nghiệm. Đặc biệt, chủng vi khuẩn 045-203-4 thể hiện hoạt tính kháng khuẩn mạnh với 6 chủng vi khuẩn gây bệnh cho người và sinh vật biển, đó là *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Vibrio harveyi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus* và *Streptococcus faecalis*. Chủng vi khuẩn 045-203-4 sinh tổng hợp chất kháng khuẩn với hoạt tính cao trong môi trường lên men chứa dịch chiết nấm men (0,8%), glucose (0,5%), ở pH 7,0 trong 30 giờ. Trình tự 16S rRNA của chủng vi khuẩn 045-203-4 trong đồng đến 99% với trình tự 16S rRNA của *Bacillus subtilis*. Nghiên cứu cho thấy, vi khuẩn phân lập từ bọt biển tại vùng đảo Phú Quốc có triển vọng là nguồn tiềm năng để nghiên cứu và ứng dụng các hợp chất có hoạt tính sinh học.

Từ khóa: *Bacillus subtilis*, bọt biển, hoạt tính kháng khuẩn, vi khuẩn biển, vi khuẩn gây bệnh.

MỞ ĐẦU

Trong những năm gần đây, việc sàng lọc và tìm kiếm các hợp chất có hoạt tính sinh học như kháng sinh, kháng virus, chống lại quá trình lão hóa và một số bệnh nhiệt đới đang được các nhà khoa học trong và ngoài nước tập trung nghiên cứu. Sự đa dạng của hệ sinh thái biển cùng sự phức tạp và khắc nghiệt của môi trường sống, vì vậy, các hợp chất tự nhiên có nguồn gốc từ sinh vật biển cũng hết sức đa dạng về cấu trúc và hoạt tính sinh học. Cho đến nay, hơn 12.000 hợp chất đã được phát hiện và mỗi năm hàng trăm hợp chất mới được công bố có nguồn gốc từ sinh vật biển.

Hợp chất lipopeptides, gageopeptides và macrolactin được phát hiện từ chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis*. Trong đó, hợp chất lipopeptides thể hiện hoạt tính kháng các chủng nấm gây bệnh *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea* và *Colletotrichum acutatum* với nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) là 0,02-0,06 μM . Hợp chất gageopeptides và macrolactin có hoạt tính kháng lại một số chủng vi khuẩn Gram(-) và Gram(+) với giá trị MIC lần lượt là 0,04-0,08 μM và 0,02-0,05 μM [7, 8].

Prem et al. (2006) [5] đã phân lập được 75 chủng vi khuẩn từ 4 loài bọt biển

(*Echinodietyum* sp., *Spongia* sp., *Sigmatocia fibulatus* và *Mycale mannarensis*) ở bờ biển Tuticorin, vịnh Mannar. Trong đó, 24% chủng vi khuẩn được tìm thấy là có khả năng sản xuất kháng sinh. Hiện nay, trên thế giới đã công bố một số dược phẩm chống viêm được sản xuất từ các chất chuyển hóa tổng hợp bởi các vi khuẩn bao gồm pseudopterosin, topsentin, scytonemin và manoalide.

Một vài nghiên cứu cho thấy, nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học tìm thấy ở bọt biển được sinh tổng hợp thông qua các vi sinh vật cộng sinh với bọt biển hoặc là được tạo ra bởi chính các vi sinh vật này. Trong những năm gần đây, nhiều hợp chất mới có hoạt tính đã được tìm ra thông qua việc nuôi cấy các vi sinh vật cộng sinh với bọt biển [4, 6]. Các loài vi sinh vật biển này như một nguồn tiềm năng trong việc sinh tổng hợp các chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính sinh học mới. Với mục tiêu tìm kiếm các hợp chất có hoạt tính kháng sinh từ vi sinh vật biển, nhóm nghiên cứu đã phân lập một số chủng vi khuẩn từ một số loài bọt biển được thu ở vùng đảo Phú Quốc, Việt Nam.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Mẫu bọt biển

Các mẫu bọt biển được thu ở vùng đảo Phú Quốc thuộc tỉnh Kiên Giang và được sử dụng làm nguồn phân lập vi khuẩn.

Vi khuẩn kiểm định

10 chủng vi khuẩn gây bệnh cho người và sinh vật biển được thử nghiệm bao gồm *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Vibrio harveyi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus faecalis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus mirabilis* và *Klebsiella pneumoniae* được cung cấp từ Viện Hóa sinh Hữu cơ Thái Bình Dương, Phân Viện Viễn Đông, Liên bang Nga.

Phương pháp phân lập vi khuẩn từ bọt biển

Mẫu bọt biển được rửa sạch 3 lần với nước biển vô trùng để loại bỏ vi sinh vật ngoại nhiễm. Đồng nhất 1 g mẫu bọt biển với 1 ml dung dịch NaCl 0,85% vô trùng và cấy trong 0,1 ml lên môi trường thạch Marine Agar (5g pepton, 1g dịch chiết nấm men, 0,1g KH₂PO₄, 0,1g MgSO₄ và 18 g agar, 500 ml nước biển và 500 ml nước cất, pH 7,0-7,2). Sau khi ủ 24 giờ ở 28°C, tiến hành cấy chuyển dựa trên đặc điểm hình thái đặc trưng của các khuẩn lạc, bao gồm màu sắc và hình thái khác nhau để tạo các chủng vi khuẩn thuần. Các chủng vi khuẩn thuần được giữ trong môi trường chứa 40% glycerol ở -80°C để phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo.

Phương pháp lên men và tách chiết dịch kháng khuẩn

Chủng vi khuẩn tuyển chọn được lên men trong môi trường Marine Broth (5 g

peptone, 1 g dịch chiết nấm men, 0,1 g MgSO₄, 0,1 g KH₂PO₄, 500 ml nước cất và 500 ml nước biển, pH 7,0-7,2) với tốc độ lắc 150 rpm. Sau 24 giờ nuôi cấy, dịch lên men được ly tâm với tốc độ 8.000 rpm trong 20 phút để thu nhận dịch lên men và loại bỏ sinh khối vi khuẩn. Tiến hành chiết với etyl acetate theo tỷ lệ 1:1 (v/v) trong 30 phút, lặp lại 2 lần. Phần dung môi được thu nhận và cô quay chân không để thu nhận hợp chất kháng khuẩn thô.

Phương pháp xác định hoạt tính kháng khuẩn

Xác định hoạt tính kháng khuẩn theo phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch [1]. Dịch chiết thô được cho lên đĩa giấy (Whatman, đường kính 6 mm) với nồng độ khoảng 200 µg/dĩa. Các đĩa giấy được đặt lên đĩa môi trường Muller Hinton Agar đã cấy vi khuẩn thử nghiệm. Đường kính vòng vô khuẩn được xác định sau khi ủ các đĩa ở 37°C trong 24 giờ.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Sàng lọc hoạt tính kháng khuẩn của các chủng vi khuẩn biển phân lập

Kết quả nghiên cứu cho thấy, trong số 50 loài vi khuẩn biển phân lập từ các loài bọt biển khác nhau có 24% chủng vi khuẩn biển có khả năng kháng *S. aureus*, 26% chủng vi khuẩn kháng lại *P. aeruginosa* và đến 66% chủng vi khuẩn kháng lại *P. mirabilis*. Trong khi đó, chỉ có 4% vi khuẩn biển có hoạt tính kháng khuẩn đối với *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* và *S. faecalis* (bảng 1).

Bảng 1. Sàng lọc hoạt tính kháng khuẩn của các chủng vi khuẩn biển

Vi khuẩn biển	Chủng vi khuẩn kiểm định									
	SA	PA	EC	VP	PM	VH	KP	BC	SF	LM
045-169-1	-	-	-	-	11	-	-	-	-	10
045-170-1	-	-	-	-	12	-	-	-	-	-
045-171-1	10	13	-	-	12	-	-	-	-	-
045-231-1	-	-	-	-	10	-	-	-	-	-
045-251-1	11	-	12	18	10	-	-	-	-	-
045-251-2	14	-	10	-	13	-	-	-	-	9
045-271-1	11	-	12	-	19	10	-	-	-	-
045-275-1	-	14	-	-	22	-	-	-	-	-
045-290-1	11	-	-	-	20	-	-	-	-	-
045-305-1	10	-	-	-	11	-	-	-	-	-

045-306-1	-	-	-	-	10	-	-	-	-	-
045-313-1	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
045-320-1	15	-	-	-	13	-	-	-	-	-
045-326-1	11	17	-	-	21	-	-	-	-	-
045-336-2	09	-	-	-	16	-	-	-	-	-
045-336-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
045-390-1	10	12	-	-	15	-	-	-	-	-
045-412-1	09	-	-	-	18	-	-	-	-	-
045-203-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
045-203-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
045-203-4	-	32	21	-	-	11	11	09	09	-
045-203-5	-	10	-	-	15	-	-	-	-	-
045-206-1	-	12	20	-	10	-	-	-	-	-
045-206-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
045-206-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
045-230-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
045-230-2	-	-	-	-	15	-	-	-	-	-
045-230-3	-	-	-	-	18	-	-	-	-	-
045-236-1	-	-	-	-	-	-	-	11	-	-
045-236-2	-	12	-	-	-	-	-	11	-	-
045-236-3	-	11	-	-	15	-	-	-	-	-
045-236-4	-	11	-	-	12	-	-	-	-	-
045-236-5	-	-	-	-	12	-	-	-	-	-
045-236-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23
045-255-1	-	-	22	-	12	-	-	-	-	-
045-255-2	-	-	-	-	12	-	-	-	-	-
045-255-3	-	-	-	-	12	-	-	-	-	-
045-255-4	-	-	-	-	20	-	-	-	-	-
045-255-5	-	-	-	-	15	-	-	-	-	-
045-255-6	-	-	-	-	15	-	-	-	-	-
045-273-1	-	20	-	12	18	-	-	-	-	12
045-273-2	-	-	-	-	25	-	-	-	-	-
045-273-3	-	-	-	-	18	-	-	-	-	-
045-273-4	-	-	-	-	15	-	-	-	-	-
045-273-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
045-274-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
045-274-3	-	-	-	-	-	-	12	-	-	-
045-274-4	-	11	-	-	-	-	-	-	-	-
045-274-5	-	11	-	-	-	-	-	-	-	-

(-): không có hoạt tính kháng khuẩn; các chủng vi khuẩn gây bệnh: *Escherichia coli*: EC; *Pseudomonas aeruginosa*: PA; *Staphylococcus aureus*: SA; *Vibrio parahaemolyticus*: VP; *Vibrio harveyi*: VH; *Bacillus cereus*: BC; *Streptococcus faecalis*: SF; *Listeria monocytogenes*: LM; *Proteus mirabilis*: PM; *Klebsiella pneumoniae*: KP.

Chủng 045-203-4 thể hiện hoạt tính kháng khuẩn với nhiều chủng vi khuẩn thử nghiệm nhất, đến 6 chủng vi khuẩn thử nghiệm bao gồm *P. aeruginosa*, *E. coli*, *V. harveyi*, *K. pneumoniae*, *B. cereus* và *S. faecalis*. Chủng

045-203-4 và 045-273-1 thể hiện khả năng kháng *P. aeruginosa* khá mạnh, với đường kính vòng vô khuẩn lần lượt là 32 mm và 20 mm.

Nghiên cứu bước đầu cho thấy, các chủng vi khuẩn phân lập từ bọt biển ở Việt Nam cũng

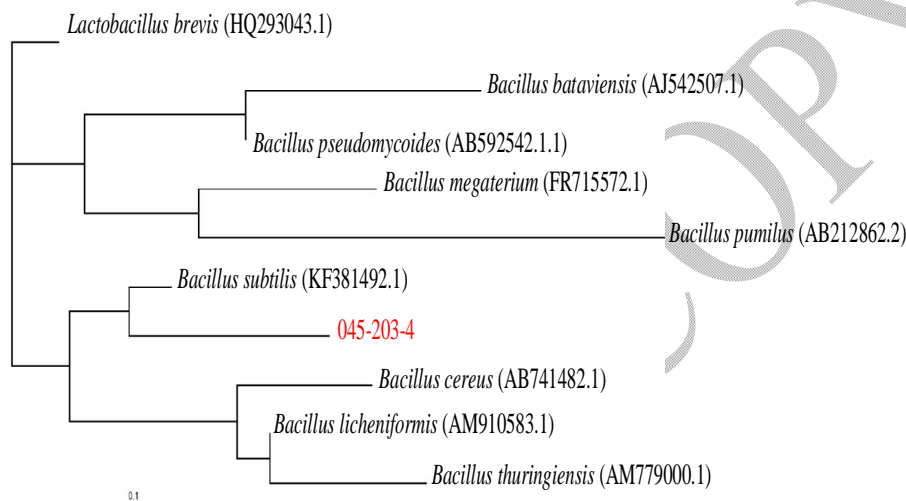
có khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh như thông báo của một số công trình nghiên cứu về vi khuẩn phân lập từ bọt biển của tác giả Rosa et al. (2003) [2] hay nghiên cứu gần đây của nhóm tác giả Jafarzade et al. (2013) [3] khi so sánh vi khuẩn phân lập từ các nguồn sinh vật biển khác nhau bao gồm bọt biển, hải sâm, trầm tích rừng ngập mặn và nước biển.

Kết quả nghiên cứu đồng thời cho thấy, chủng vi khuẩn 045-203-4 có hoạt tính kháng

khuyến tốt nhất nên được tuyển chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

Định danh chủng vi khuẩn 045-203-4

Tiến hành định danh loài dựa trên so sánh trình tự 16S rRNA với trình tự công bố trên ngân hàng gen cho thấy chủng này tương đồng 99% với trình tự 16S rRNA của *Bacillus subtilis* (NCBI accession no. 381492.1) (hình 1).



Hình 1. Cây phân loại chủng vi khuẩn biển 045-203-4.

Bảng 2. Ảnh hưởng của các nguồn nitơ hữu cơ và vô cơ khác nhau lên khả năng sinh hợp chất kháng khuẩn của chủng *B. subtilis* 045-203-4

Vi khuẩn kiểm định	Kết quả kháng khuẩn (mm)					
	Peptone	Casein	Peptone thịt	Dịch chiết nấm men	(NH ₄) ₂ SO ₄	Na NO ₃
SA	30	15	25	33	12	20
PA	20	-	13	22	-	-
EC	19	19	22	32	19	21
VP	18	11	19	15	-	-
PM	13	17	14	25	22	14
KP	24	13	13	14	-	17
VH	11	10	13	12	12	18
BC	16	19	15	22	13	18
SF	15	19	14	14	13	14
LM	27	25	24	45	30	27

Khảo sát điều kiện lên men

Chủng vi khuẩn *B. subtilis* 045-203-4 được nuôi cấy trong môi trường Marine Broth bổ

sung các nguồn nitơ hữu cơ (dịch chiết nấm men, peptone thịt, casein và pepton) và nguồn nitơ vô cơ (natri nitrat và ammonium sulphat) với nồng độ 1% (w/v).

Kết quả nghiên cứu cho thấy, khả năng sinh hợp chất kháng khuẩn của chủng *B. subtilis* 045-203-4 khi nuôi trong môi trường có chứa các nguồn nitơ khác nhau có sự khác nhau đáng kể (bảng 2). Trong số các nguồn nitơ khảo sát, nguồn nitơ hữu cơ thích hợp hơn cho sự sinh tổng hợp các chất kháng khuẩn so với nguồn nitơ vô cơ và dịch chiết nấm men được xem là nguồn nitơ thích hợp nhất cho chủng *B. subtilis*

045-203-4 sinh tổng hợp chất kháng khuẩn.

Tiến hành khảo sát ảnh hưởng của nồng độ dịch chiết nấm men, kết quả cho thấy hoạt tính kháng khuẩn của chủng nghiên cứu có sự thay đổi rõ rệt khi thay đổi lượng dịch chiết nấm men trong thành phần môi trường (bảng 3). Hoạt tính kháng khuẩn tăng nhẹ trong dải nồng độ 0,4-0,8%, sau đó tăng mạnh và đạt cực đại tại nồng độ 0,8% dịch chiết nấm men.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ dịch chiết nấm men lên khả năng sinh chất kháng khuẩn của chủng *B. subtilis* 045-203-4

Vi khuẩn kiểm định	Kết quả kháng khuẩn (mm)						
	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6
<i>S. aureus</i>	-	-	20	22	24	28	22
<i>P. aeruginosa</i>	-	10	14	12	-	-	-
<i>E. coli</i>	23	25	28	22	-	-	-
<i>P. mirabilis</i>	12	20	34	24	13	13	12
<i>K. pneumoniae</i>	12	13	16	14	13	10	10
<i>B. cereus</i>	13	15	20	18	13	13	13
<i>S. faecalis</i>	14	14	14	15	14	13	13
<i>L. monocytogenes</i>	36	38	42	40	39	38	32

Đồng thời, kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của các nguồn carbon khác nhau lên khả năng sinh chất kháng khuẩn của chủng *B. subtilis* 045-203-4 bao gồm tinh bột, maltose, manitol, glucose, sucrose ở nồng độ 0,4% (w/v) cho thấy, glucose là nguồn carbon thích hợp nhất cho việc sinh tổng hợp chất kháng khuẩn của chủng vi khuẩn này và nồng độ glucose tối ưu là 0,5% (w/v).

KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy, vi khuẩn phân lập từ bọt biển là nguồn tiềm năng sinh các chất kháng sinh mới với hoạt tính cao. Nghiên cứu cũng cho thấy môi trường biển ở vùng đảo Phú Quốc là nơi thích hợp cho các nghiên cứu về hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học nhằm phát hiện các hợp chất mới để sử dụng trong y sinh đồng thời thúc đẩy khai thác và sử dụng nguồn vi sinh vật biển ở Việt Nam.

Lời cảm ơn: Kết quả nghiên cứu này được thực hiện bởi sự tài trợ kinh phí từ dự án thuộc đề án 47 với mã số VAST.ĐA47.12/16-19 và nhiệm vụ VAST.HTQT.NGA.13/16-17.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bauer A. W., Kirby W. M. M., Sherris J. C., Turck M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 36(3): 493-496.
2. De Rosa S., Mitova M., Tommonero G., 2003. Marine bacteria associated with sponge as a source of cyclic peptides. *Biomol. Eng.*, 20(4): 311-316.
3. Jafarzade M., Yahya N. A., Mohamad S., Usup G., Ahmad A., 2013. Isolation and characterization of pigmented bacteria showing antimicrobial activity from Malaysian marine environment. *Malays. J. Microbiol.*, 9(2): 152-160.
4. Mitova M., Tommonero G., Rosa D. S., 2003. A novel cyclopeptide from a bacterium associated with the marine sponge *Ircinia muscarum*. *Zeitschrift für Naturforschung*, 58(9): 740-745.
5. Prem A. T., Abdul W. B., Yogesh S. S., Upal R., Jay S., Siddhartha P. S., 2006. Antimicrobial activity of marine bacteria

- associated with sponges from the waters off the coast of South East India. *Microbiol. Res.*, 161(3): 252-262.
- Suzumura K., Yoko T., Funatsu M., Nagai K., Tanaka K., Zhang H., Suzuki K., 2003. YM-266183 and YM-266184, novel thiopeptide antibiotics produced by *Bacillus cereus* isolated from a marine sponge II. Structure elucidation. *J. Antibiot. (Tokyo)*, 56(2): 129-134.
 - Tareq F. S., Kim J. H., Lee M. A., Lee Hyi-Seung, Lee Yeon-Ju, Lee J. S., Shin H. J., 2013. Antimicrobial Gageomacrolactins characterized from the fermentation of the marine-derived bacterium *Bacillus subtilis* under optimum growth conditions. *J. Agric. Food Chem.*, 61(14): 3428-3434.
 - Tareq F. S., Lee M. A., Lee Hyi-Seung, Lee Yeon-Ju, Lee J. S., Hasan C. M., Islam M. T., Shin H. J., 2014. Non-cytotoxic antifungal agents: Isolation and structure of Gageopeptides A-D from a *Bacillus* strain 109GGC020. *J. Agric. Food Chem.*, 62(24): 5565-5572.

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF MARINE BACTERIA ISOLATED FROM MARINE SPONGES AT PHU QUOC ISLAND, VIETNAM

Phan Thi Hoai Trinh, Ngo Thi Duy Ngoc, Bui Minh Ly,
Le Dinh Hung, Cao Thi Thuy Hang, Vo Thi Dieu Trang, Huynh Hoang Nhu Khanh

Nha Trang Institute of Technology Research and Application, VAST

SUMMARY

Screening antibacterial activity of fifty marine bacterial strains isolated from twenty-three species of marine sponges from Phu Quoc island. Among them, twenty-one strains (42%) have the ability to inhibit effectively at least two of the ten strains of the tested bacteria. Especially, the strain 045-203-4 showed strong antibacterial activity against six strains of pathogenic bacteria for humans and marine organisms, viz. *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Vibrio harveyi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus* and *Streptococcus faecalis*. The strain 045-203-4 produced antibacterial with high activity in the medium contained yeast extract (0.8% w/v), glucose (0.5%), pH 7.0 for 30 hours. Analysis of the nucleotide sequence of 16S rRNA gene of strain 045-203-4 showed a strong similarity (99%) with the 16S rRNA gen of *Bacillus subtilis*. The present investigation reveals that the marine bacteria isolated from marine sponges from Phu Quoc island can be served as a potential source for the study and application of compounds with biological activity.

Keywords: *Bacillus subtilis*, antibacterial activity, marine bacteria, marine sponges, pathogenic bacteria.

Ngày nhận bài: 21-9-2015