

SÀNG LỌC VÀ ĐỊNH DANH CÁC CHỦNG XẠ KHUẨN CÓ HOẠT TÍNH KHÁNG SINH TỪ CÁC MẪU SINH VẬT BIỂN VÀ TRẦM TÍCH BIỂN THUỘC VÙNG BIỂN ĐẢO LÝ SƠN, QUẢNG NGÃI

Trần Thị Thanh Hoa^{1,2,3}, Lê Thị Hồng Minh^{1,✉}, Vũ Thị Quyên¹, Nguyễn Mai Anh¹, Đoàn Thị Mai Hương¹, Châu Văn Minh¹, Phạm Văn Cường¹

¹Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương

³Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: lhminhbk@gmail.com

Ngày nhận bài: 09.7.2019

Ngày nhận đăng: 31.12.2019

TÓM TẮT

Hiện nay, xạ khuẩn biển được đánh giá là nguồn tiềm năng trong việc tìm kiếm các chất kháng sinh cũng như các chất có hoạt tính sinh học. Mục tiêu của nghiên cứu này là phân lập và sàng lọc các chủng xạ khuẩn có hoạt tính kháng khuẩn từ môi trường biển. 61 chủng xạ khuẩn đã được phân lập từ 80 mẫu sinh vật biển và trầm tích biển được thu thập từ đảo Lý Sơn, Quảng Ngãi. Các chủng được lên men trong môi trường A1, dịch lên men được chiết với ethyl acetate và làm bay hơi dung môi bằng cô quay chân không để tạo ra cặn chiết thô. Hoạt tính kháng sinh của các cặn chiết được thực hiện trên 7 chủng vi sinh vật kiểm định (VSVKĐ), gồm ba chủng vi khuẩn Gram âm (*Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Salmonella enterica* ATCC13076), ba chủng Gram dương (*Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC 13245), và nấm men *Candida albicans* ATCC10231. Từ kết quả sàng lọc hoạt tính, đã chọn được 3 chủng xạ khuẩn (G330, G336 và G361) có hoạt tính kháng khuẩn cao nhất, ức chế 5/7 chủng VSVKĐ với các giá trị nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) từ 4 đến 256 µg/ml tùy thuộc vào từng chủng kiểm định. Cụ thể, cả ba chủng này đều ức chế *C. albicans* ATCC10231 và ba chủng Gram dương. Ngoài ra, G330 và G336 còn thể hiện hoạt tính ức chế chủng Gram âm *S. enterica* ATCC13076 với giá trị MIC = 256 µg/ml và G361 có khả năng ức chế khá tốt đối với *E. coli* ATCC25922 với giá trị MIC là 8 µg/ml. Nghiên cứu đặc điểm hình thái và phân tích trình tự gen 16S rRNA, kết quả cho thấy chủng G330 thuộc chi *Streptomyces*, các chủng G336 và G361 được xác định là thành viên của chi *Salinispora*, với độ tương đồng hơn 99% so với các trình tự gen 16S rRNA trên ngân hàng gen quốc tế. Kết quả nghiên cứu cho thấy môi trường biển có tiềm năng lớn để phân lập các chủng xạ khuẩn cho mục đích tìm kiếm các chất kháng khuẩn cũng như các hoạt chất sinh học khác.

Từ khóa: hoạt tính kháng vi sinh vật, MIC, trình tự 16S rRNA, xạ khuẩn

MỞ ĐẦU

Ngày nay, một trong những vấn đề quan trọng nhất liên quan đến sức khỏe của con người đó là sự gia tăng, xuất hiện và lây lan các vi sinh vật kháng kháng sinh (như vi khuẩn, nấm, virus và ký sinh trùng). Đặc biệt với vi

khuẩn, tình trạng kháng kháng sinh đang gia tăng ở cả trong cộng đồng và trong bệnh viện cùng với đó là sự gia tăng tỷ lệ tử vong và bệnh tật (Powerset *al.*, 2004).

Tháng 8 năm 2016, Tại Trung tâm sức khỏe Washoe quận Reno thuộc bang Nevada (Mỹ), từ

một bệnh nhân bị nhiễm khuẩn cấp đã phát hiện loài *Klebsiella pneumonia* thuộc họ *Enterobacteriaceae* kháng lại kháng sinh carbapenem (CRE) và kháng tất cả các loại thuốc kháng khuẩn trên thị trường (Chen *et al.*, 2017). Với sự gia tăng của các mầm bệnh đa kháng thuốc này, số lượng kháng sinh hiệu quả đã giảm đáng kể. Bệnh truyền nhiễm đang là mối đe dọa sức khỏe cộng đồng và được coi là một trong những thách thức lớn trong thế kỷ này (WHO, 2014).

Trong số các hợp chất tự nhiên có nguồn gốc vi sinh vật 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 *et al.*, 2009). Trong đó, chi *Streptomyces* được biết đến nhiều nhất về khả năng tổng hợp các chất kháng sinh. Các chất kháng sinh khác nhau có nguồn gốc từ xạ khuẩn đã được nghiên cứu bao gồm aminoglycoside, anthracyclin, lycopetide, β -lactam, macrolides, nucleoside, peptide, polyene, polyeste, polyketide, actinomycin và tetracycline (Goodfellow *et al.*, 1996).

Từ lâu vi sinh vật được biết đến như là nguồn cung cấp chính cho những khám phá về các chất có hoạt tính sinh học, hầu hết các vi sinh vật này đến từ môi trường trên cạn. Tuy nhiên việc phát hiện lặp lại với tần suất cao các hợp chất đã biết đã cản trở việc nghiên cứu phát triển thuốc. Trong khi đó hệ sinh thái biển đang ít được khám phá, mặc dù các vi sinh vật biển có khả năng tạo ra các hợp chất có hoạt tính sinh học và độc đáo về cấu trúc mà không thể tìm thấy trong các hệ sinh thái trên cạn (Imhoff *et al.*, 2016).

Việt Nam với đường bờ biển dài hơn 3000 km, có hệ sinh thái rất đặc thù và được đánh giá là một trong những khu vực đa dạng sinh học cao của thế giới. Tuy nhiên, việc điều tra nghiên cứu về các hợp chất thứ cấp từ nguồn vi sinh vật biển ở Việt Nam vẫn còn hạn chế. Để khai thác tiềm năng của vi sinh vật biển cho các mục đích phát triển dược phẩm trong tương lai, trong nghiên cứu này chúng tôi trình bày kết quả về nuôi cấy, sàng lọc hoạt tính kháng sinh và định danh các chủng xạ khuẩn từ các mẫu sinh vật

biển và trầm tích biển thu thập được từ vùng biển đảo Lý Sơn, Quảng Ngãi.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Hóa chất

Các hóa chất sử dụng cho môi trường được cung cấp từ các hãng Hidia (Ấn Độ), Sigma-Aldrich (Mỹ), Đức Giang (Việt Nam), Kit tách DNA tổng số của hãng Madison (Mỹ), Dream Taq PCR Master mix của hãng Thermo Scientific, Hàn Quốc, chỉ thị DNA chuẩn (Fisher Scientific), các cặp mồi để khuếch đại gen 16S rRNA (16sF: 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG3'; 16sR: 5'-AAGGAGGTGATCCAACC3').

Các chủng vi sinh vật kiểm định

Gồm các chủng sau: 3 chủng vi khuẩn Gram âm (*E. coli* ATCC25922, *P. aeruginosa* ATCC27853, *S. enterica* ATCC13076), 3 chủng vi khuẩn Gram dương (*E. faecalis* ATCC29212, *S. aureus* ATCC25923, *B. cereus* ATCC 14579), 1 chủng Nấm men *C. albicans* ATCC10231 (Microbiologics, Mỹ).

Môi trường

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. Môi trường A1: tinh bột tan 10 g/L, cao nấm men 4 g/L, pepton 2 g/L, muối biển nhân tạo 30 g/L, thạch agar 15 g/L); môi trường M1: tinh bột tan 5 g/L, cao nấm men 2 g/L, pepton 1 g/L, muối biển nhân tạo 30 g/L, thạch agar 15 g/L; môi trường SWA: muối biển nhân tạo 30 g/L, thạch agar 15 g/L; môi trường SCA: muối biển nhân tạo 10 g/L, K_2HPO_4 2 g/L, KNO_3 2 g/L, casitone 0,3 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 50 mg/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 10 mg/L, $CaCO_3$ 2 mg/L, thạch agar 15 g/L, muối biển nhân tạo 30 g/L; môi trường NZSG: tinh bột tan 20 g/L, cao nấm men 5 g/L, glucose 10 g/L, NZ Amine A 5 g/L, muối biển nhân tạo 30 g/L, thạch agar 15 g/L; môi trường ISP1: muối biển nhân tạo 5 g/L, cao nấm

men 2 g/L, casitone 5 g/L, muối biển nhân tạo 30 g/L, thạch agar 15 g/L; môi trường ISP2: tinh bột tan 5 g/L, cao nấm men 2 g/L, cao mạch nha 10 g/L, glucose 10 g/L, muối biển nhân tạo 30 g/L, thạch agar 15 g/L.

Các mẫu sinh vật và trầm tích biển đã thu thập

80 mẫu sinh vật và trầm tích biển được thu thập tại các tọa độ và độ sâu khác nhau (từ 3 – 16 m) thuộc vùng biển Lý Sơn, Quảng Ngãi. Mẫu được lưu giữ trong các ống Eppendorf và facol vô trùng, được bảo quản lạnh trong thời gian vận chuyển và được tiến hành phân lập trong 24 h.

Phương pháp nghiên cứu

Phân lập các chủng xạ khuẩn

Cân 0,5 g mẫu vào ống fancol, sau đó bổ sung 4,5 mL nước cất vô trùng (dùng thanh inox vô trùng để nghiền mẫu nếu là mẫu sinh vật biển), đảo đều mẫu và 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 7 loại môi trường đã chuẩn bị (A1, M1, SWA, NZSG, SCA, ISP1, 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.

Tạo cặn chiết thô từ dịch nuôi cấy

Các chủng xạ khuẩn được nuôi trong các bình tam giác 1000 mL có chứa 500 mL môi trường A1, ở điều kiện 28°C lắc 170 vòng/phút. Sau 7 ngày nuôi cấy, dịch nuôi được chiết với 300 mL ethyl acetate (5 lần × 15 phút). Chất chiết xuất sau đó được làm bay hơi dưới áp suất giảm (250 mbar, bể gia nhiệt ở 45°C) để loại dung môi thu chất chiết xuất 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 nấm 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 chiết 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, 128, 64, 32, 16, 8, 4 và 2 µg/mL với số thí nghiệm lặp lại N = 3. Bổ sung 50 µL dung dịch vi khuẩn và nấm kiểm định ở nồng độ 2×10^5 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. Đối chứng là kháng sinh streptomycin cho các chủng vi khuẩn và cycloheximide cho nấm men.

Phương pháp định danh các chủng xạ khuẩn

Các chủng xạ khuẩn sau khi sàng lọc hoạt tính kháng khuẩn sẽ được nuôi cấy trên môi trường thạch (ISP2) ở 30°C trong 14 ngày và quan sát bào tử bằng kính hiển vi điện tử quét SEM (scanning electron microscopy) model JSM-5410 LV, JEOL. 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 16S rRNA được thực hiện trong một thể tích hỗn hợp 25 µL chứa: 10 µL H₂O khử ion vô trùng, 12,5 µL PCR Master mix, 1,0 µL mỗi với nồng độ 0,05 mM cho mỗi mỗi 16sF và 16sR, 0,5 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. Kích thước sản phẩm theo lý thuyết khoảng 1500 bp. Sản phẩm PCR sau đó 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.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập và sàng lọc hoạt tính kháng khuẩn các chủng xạ khuẩn

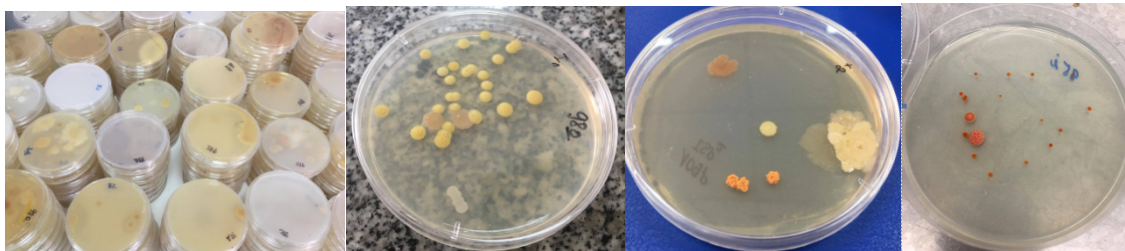
Từ 80 mẫu sinh vật và trầm tích biển thu thập ở đảo Lý Sơn, Quảng Ngãi (gồm 11 mẫu trầm tích, 9 mẫu thân mềm, 11 mẫu san hô mềm, 15 mẫu Rong, 8 mẫu Hải miên, 26 mẫu da gai) được tiến hành phân lập theo phương pháp đã trình bày, đã phân lập làm sạch và lưu giữ được 61 chủng xạ khuẩn.

Các chủng sau đó được tiến hành nuôi cấy trong môi trường A1, dịch nuôi cấy được chiết với dung môi ethyl acetate (5 lần) thu được cặn chiết. Kết quả sàng lọc hoạt tính kháng khuẩn từ cặn chiết của các chủng xạ khuẩn cho thấy: 44/61 chủng phân lập đều có hoạt tính ức chế từ

1 đến 5 chủng VSVKD, trong đó có 18 chủng phân lập có hoạt tính ức chế từ 3 chủng VSVKD trở lên. Ngoài ra, chỉ có 9/61 chủng phân lập có hoạt tính kháng VSVKD 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 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 của kháng sinh cũng như các tác nhân bên ngoài vào thành tế bào (Basilio *et al.*, 2003; Oskay *et al.*, 2004).



Hình 1. Một số hình ảnh trong quá trình thu thập mẫu.



Hình 2. Một số hình ảnh trong quá trình phân lập xạ khuẩn từ các mẫu thu thập.

Từ kết quả sàng lọc, chúng tôi đã lựa chọn 3 chủng (G330 được phân lập từ mẫu thân mềm, G336 được phân lập từ mẫu trầm tích và G361 được phân lập từ mẫu rong biển) có hoạt tính kháng khuẩn cao nhất, ức chế 5/7 chủng VSVKD. Ba chủng này đều có khả năng ức chế cả 3 chủng VSVKD Gram dương (*E. faecalis* ATCC29212, *S. aureus* ATCC25923, *B.*

cereus ATCC 14579) với các giá trị MIC từ 4 đến 256 $\mu\text{g/mL}$. Trong khi đó chủng G330 và G336 chỉ ức chế 1 chủng Gram âm là *S. enterica* ATCC13076; chủng G361 ức chế khá mạnh chủng *E. coli* ATCC25922 với giá trị MIC là 8 $\mu\text{g/mL}$ (so với MIC của kháng sinh đối chứng streptomycin là 32 $\mu\text{g/mL}$). Ngoài ra, 3 chủng G330, G336 và G361 còn ức chế rất tốt

nấm *C. albicans* ATCC10231 với MIC từ 8 - 64 $\mu\text{g/mL}$ (bảng 1). Hoạt tính này rất đáng quan tâm vì *C. albicans* là tác nhân gây ra nhiều bệnh, đặc biệt là niêm mạc miệng, lưỡi, dạ dày, hành tá tràng, đường ruột, niệu đạo và đường

sinh dục. Hiện nay *C. albicans* trở nên khó kiểm soát do đã đề kháng với các kháng sinh chống nấm hiện có như amphotericin B, vaclotrimazole, 5-fluorocytosine... (Nguyễn Vĩnh Hà *et al.*, 2002).

Bảng 1. Giá trị MIC ($\mu\text{g/mL}$) của cặn chiết ethyl acetate của 3 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 14579	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. enterica</i> ATCC 13076	<i>C. albicans</i> ATCC10231
1	G330	256	128	64	-	-	256	64
2	G336	256	4	8	-	-	256	8
3	G361	256	16	256	8	-	-	8
	Streptomycin	256	256	128	32	256	128	-
	Cycloheximide	-	-	-	-	-	-	32

(-): Mẫu cho kết quả âm tính ở nồng độ thử nghiệm

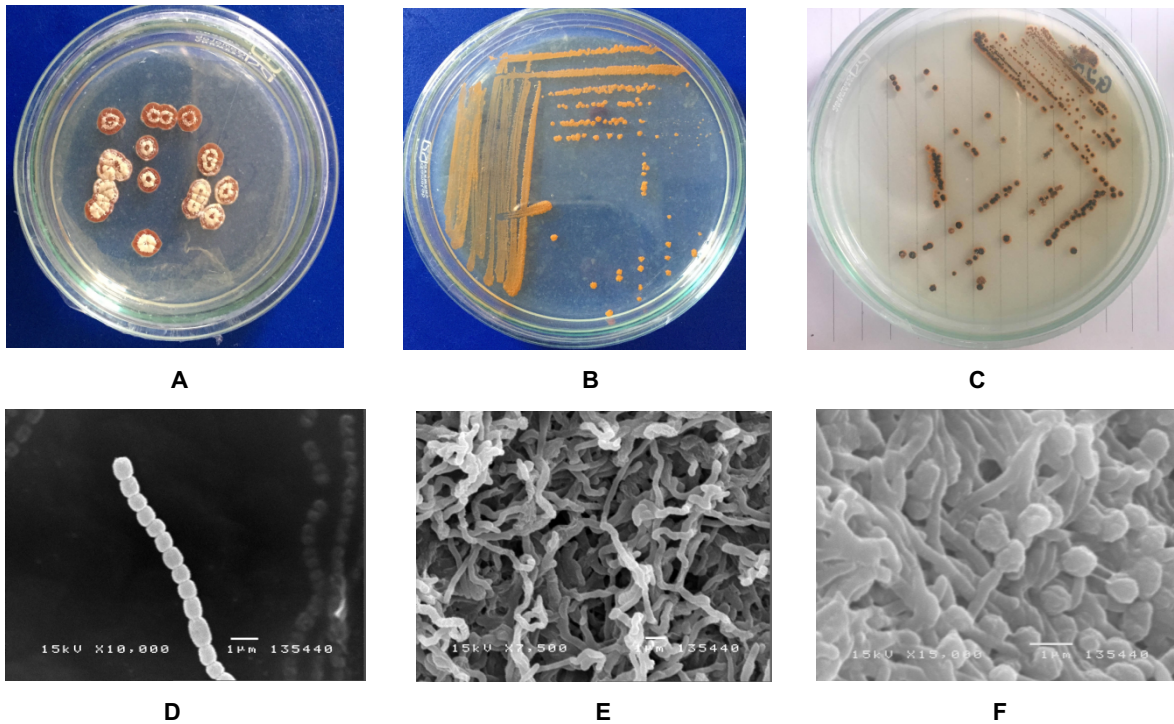
Định danh 3 chủng đã sàng lọc

Ba chủng xạ khuẩn G330, G336 và G361 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 (G336), trắng chuyển dần sang nâu đỏ ở viền khuẩn lạc (G330) và màu cam nâu (G361). Quan sát hình thái bào tử của ba chủng xạ khuẩn dưới kính hiển vi điện tử SEM cho thấy G330 có bào tử được sinh ra đơn lẻ và kết thành chuỗi, có đường kính khoảng 0,5 - 1 μm . Chủng G336 và G361 có các bào tử ở dạng nốt và mịn trên bề mặt và không di chuyển được (Hình 3). Các đặc điểm này được coi là những đặc điểm quan trọng hỗ trợ trong việc định loài vi sinh vật (Mukherjee *et al.*, 2004; Maruyama *et al.*, 1975).

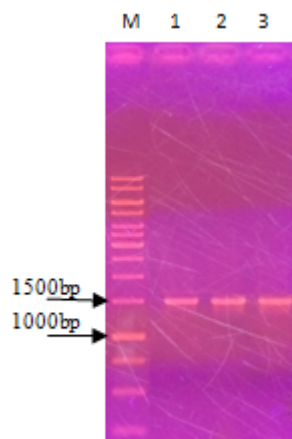
Ba chủng có hoạt tính kháng VSVKD cao và có tiềm năng ứng dụng đã được định danh dựa trên so sánh trình tự gen 16S rRNA bằng chương trình Blast. Các gen 16S rRNA được khuếch đại bằng PCR với cặp mồi 16sF và 16sR đã nêu, tạo ra các sản phẩm tính theo lý thuyết khoảng 1500 bp (Hình 4). Các sản phẩm

PCR được tinh sạch, giải trình tự và phân tích bằng phần mềm Bioedit. So sánh các trình tự 16S rRNA của ba chủng nghiên cứu với các trình tự trong cơ sở dữ liệu của GenBank, 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 cho thấy chủng G330 thể hiện sự tương đồng cao với chi *Streptomyces*, chủng G336 và G361 có độ tương đồng cao với chi *Salinispora* (Hình 5).

Streptomyces là chi thuộc họ *Streptomycetaceae*, là chi lớn nhất của ngành *Actinobacteria*. Mặc dù chi *Streptomyces* là một chi rất phổ biến trong đất, nhưng các nghiên cứu gần đây cũng cho thấy nhóm vi sinh vật này đã thích nghi và phát triển ở môi trường biển. Cho đến ngày nay, các thành viên của chi *Streptomyces* chịu trách nhiệm sản xuất phần lớn các chất chuyển hóa thứ cấp từ nguồn vi sinh vật thu thập được ở đại dương. Nhiều hợp chất thứ cấp có cấu trúc thú vị và độc đáo từ nguồn vi sinh vật biển có thể là hiếm khi xuất hiện hoặc hoàn toàn chưa từng thấy từ các nguồn vi sinh vật trên cạn (Khan *et al.*, 2011).



Hình 3. Hình thái khuẩn lạc của chủng G330 (A) G336 (B) và G361 (C) được nuôi trên môi trường ISP2 và hình ảnh bào tử dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM) của G330 (D) G336 (E) và G361 (F) ở độ phóng đại 1000x



Hình 4. Ảnh Điện di sản phẩm PCR gen 16S rRNA của ba chủng nghiên cứu. M: thang ADN chuẩn 1Kb của Fisher Scientific. 1-3: Sản phẩm PCR của các chủng G330, G336 và G361.

Từ các mẫu trầm tích thu thập được ở bờ biển phía tây Banten, Sunaryanto *et al.*, (2010) đã phân lập được 29 chủng xạ khuẩn, trong đó chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. A11 thể hiện

hoạt tính kháng khuẩn tốt nhất. Bằng các phương pháp hóa học, từ chủng *Streptomyces* sp. A11 đã tách được một hợp chất tinh khiết có hoạt tính kháng khuẩn khá tốt với nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) ở *E. coli* ATCC 25922 là 27 $\mu\text{g/mL}$, *P. aeruginosa* ATCC 27853 là 68,7 $\mu\text{g/mL}$, *S. aureus* ATCC 25923 là 80,2 $\mu\text{g/mL}$ và *B. subtilis* ATCC 66923 là 73,7 $\mu\text{g/mL}$, thấp hơn nhiều so với chất kháng sinh đối chứng là tetracycline.

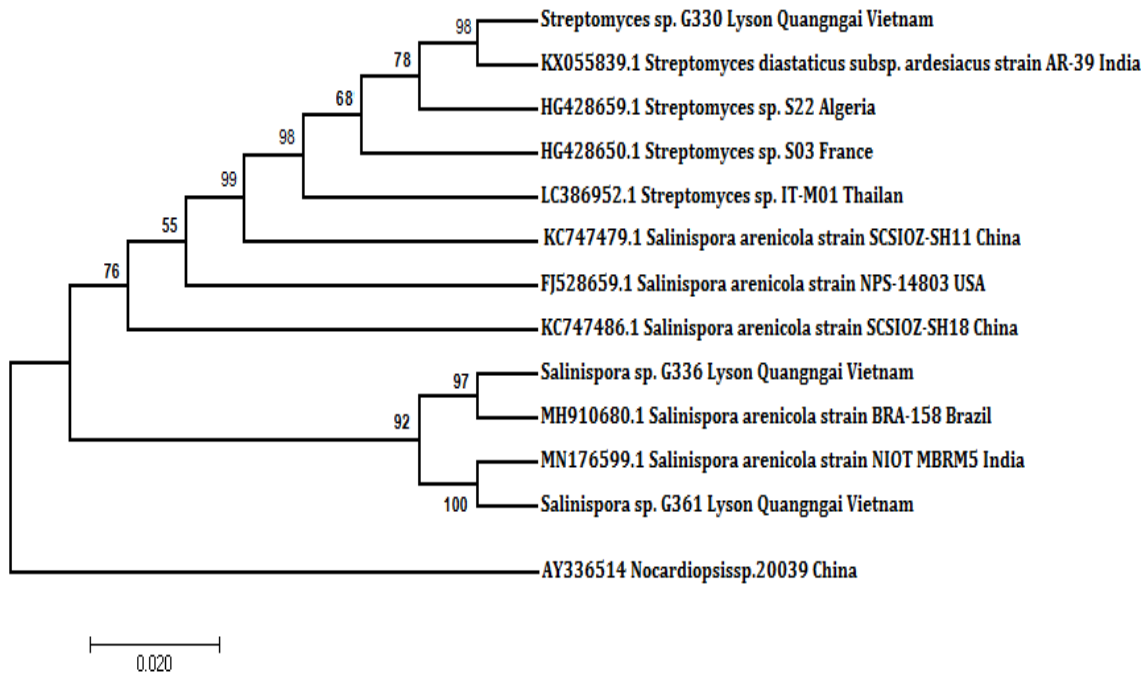
Từ chủng xạ khuẩn *Pseudonocardia* sp. SCSIO-01299 phân lập từ trầm tích được thu thập ở độ sâu 3258 m, thuộc biển Đông. Sumei *et al.*, 2011 đã tách được 4 hợp chất có hoạt tính sinh học tốt đó là deoxyxyboquinone và pseudonocardian A-C. Deoxyxyboquinone và pseudonocardian A và B thể hiện hoạt tính kháng *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212, *B. thuringensis* SCSIO BT01 với các giá trị MIC trong khoảng từ 1 - 4 $\mu\text{g/mL}$, và hoạt tính ức chế tế bào ung thư phổi

SF-268, ung thư vú MCF-7 và ung thư não NCI-H460 với các giá trị IC50 trong khoảng từ 0,01 đến 0,21 μ m.

Một nghiên cứu khác của (Cheng *et al.*, 2017), từ chủng *Streptomyces* sp. SBT348 phân lập được từ hải miên *Petrosia ficiformis* thuộc vùng biển Địa Trung Hải, đã tách được hợp chất petrocin A và 2,3-dihydroxybenzamide. Hai hợp chất này biểu hiện độc tính gây độc tế bào đối với các dòng tế bào ung thư HL-60 và HT-29 với giá trị IC50 là 3,9 và 5,3 μ g/ml tương ứng.

Chi *Salinispora* được phân lập từ trầm tích

biển và được báo cáo lần đầu tiên vào năm 1989. Vào thời điểm đó, các đặc điểm về hình thái và hóa học của chúng cho thấy chúng là họ hàng gần của chi *Micromonospora* và chúng được đề xuất các loài trong chi này. Các nghiên cứu phát sinh gen sau đó đã đặt các xạ khuẩn này vào một nhánh khác với *Micromonosporae*, và chúng được đề xuất là đại diện cho một chi mới là “*Salinispora*”. Đến năm 2005 chi này được mô tả chính thức và chi với tên được sửa đổi thành *Salinispora* và có 3 loài *S. tropica*, *S. arenicola* và *S. pacifica* được mô tả chính thức (Paul *et al.*, 2015).



Hình 5. Cây phát sinh chủng loại thể hiện mối liên quan giữa ba chủng nghiên cứu với các thành viên đại diện của các chi *Streptomyces* và *Salinispora* 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).

Các hợp chất đầu tiên được mô tả từ chi *Salinispora* là lomaiviticins A và B (He *et al.*, 2001). Vào thời điểm đó, chủng đã được báo cáo là một loài mới thuộc chi *Micromonospora* với tên được đề xuất là *Micromonospora lomaivitiensis*. Tuy nhiên, phân tích trình tự gen 16S rRNA sau đó đã xác định chủng này là *S.*

pacifica (Janso *et al.*, 2014). Ở một nghiên cứu khác của Williams *et al.* (2007) từ chủng *S. arenicola* CNR-059 đã phân lập được các hợp chất saliniketals A và B. Hai hợp chất này thể hiện hoạt tính ức chế ornithine decarboxylase, một mục tiêu quan trọng để ngăn ngừa ung thư với các giá trị IC50 tương ứng là 1,95 và 7,83

µg/mL. Một loại kháng sinh mới là salinisporamycin thuộc nhóm rifamycin, cũng đã được báo cáo từ chủng *S. arenicola* có nguồn gốc trầm tích biển (Matsuda *et al.*, 2009). Trong một nỗ lực khám phá kháng sinh mới từ các chủng thuộc chi *Salinispora* sp., nhằm chống lại chủng vi khuẩn kháng thuốc *S. aureus* kháng methicillin (MRSA), Asolkar *et al* (2010) đã phân lập được một kháng sinh mới thuộc nhóm kháng sinh benzo [α] naphthacene là arenimycin A từ chủng *S. arenicola* CNR-647.

KẾT LUẬN

Từ 80 mẫu sinh vật và trầm tích biển thu thập được ở vùng biển đảo Lý Sơn, Quảng Ngãi, đã phân lập được 61 chủng xạ khuẩn, lựa chọn được 3 chủng xạ khuẩn (G330, G336 và G361) có hoạt tính cao nhất, ức chế 5/7 chủng VSVKĐ. Các chủng được chọn đều có khả năng ức chế cả 3 chủng vi khuẩn Gram dương (*E. faecalis* ATCC29212, *S. aureus* ATCC25923, *B. cereus* ATCC 13245) với các giá trị MIC từ 4 µg/mL đến 256 µg/mL. Chủng G330 và G336 chỉ ức chế 1 chủng vi khuẩn Gram âm là *S. enterica* ATCC13076, chủng G361 ức chế khá mạnh chủng *E. coli* ATCC25922 với giá trị MIC là 8 µg/mL. Ngoài ra, 3 chủng G330, G336 và G361 còn ức chế rất tốt nấm *C. albicans* ATCC10231 với MIC từ 8 - 64 µg/ml. Các chủng đã được xác định hình thái và định danh bằng trình tự gen 16S rRNA. Kết quả cho thấy, 16S rRNA của các chủng có độ tương đồng cao hơn 99% so với các trình tự gen 16S rRNA trên ngân hàng gen quốc tế. Chủng G330 thuộc chi *Streptomyces*; hai chủng G336 và G361 được xác định là thành viên của chi *Salinispora*.

Lời cảm ơn: Công trình này được hoàn thành với sự tài trợ kinh phí từ đề tài mã số VAST.TĐ. ĐAB.04/ 16-18 của Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

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.

Asolkar RN, Kirkland TN, Jensen PR, Fenical W (2010) Arenimycin, an antibiotic effective against rifampin- and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from the marine actinomycete *Salinispora arenicola*. *J Antibiot* 63:37-39. DOI:10.1038/ja.2009.114

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.

Chen L, Todd R, Kiehlbauch J, Walters M, Kallen A (2017) Notes from the Field: PanResistant New Delhi metallo-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* - Washoe County, Nevada, 2016. *Morb Mortal Wkly Rep* 66(1): 33.

Cheng C, Eman M (2017) Isolation of Petrocidin A, a new cytotoxic cyclic dipeptide from the marine sponge-derived bacterium *Streptomyces* sp. SBT348. *Mar Drugs* 15(12):383 <https://doi.org/10.3390/md15120383>

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.

Hadacek F, Greger H (2000) Test of antifungal natural products methodologies, comparability of result and assay choice. *Phytochem Anal* 90: 137-147.

He H, Ding WD, Bernan VS, Richardson AD, Ireland CM, Greenstein M, Ellestad GA, Carter GT (2001) Lomaiviticins A and B, potent antitumor antibiotics from *Micromonospora lomaivitiensis*. *J Am Chem Soc* 123:5362-5363.

Imhoff JF (2016) Natural products from marine fungi-Still an underrepresented resource. *Mar Drugs* 14(1): 19 <https://doi.org/10.3390/md14010019>.

Janso JE, Haltli BA, Eustáquio AS, Kulowski K, Waldman AJ, Zha L, Nakamura H, Bernan VS, He

- H, Carter GT, Koehn FE, Balskus EP (2014) Discovery of the lomaiviticin biosynthetic gene cluster in *Salinispora pacifica*. *Tetrahedron* 70:4156-4164. DOI: 10.1016/j.tet.2014.03.009.
- Khan ST, Komaki H, Motohashi K, Kozone I, Mukai A, Takagi M, Shin-ya K (2011) *Streptomyces* associated with a marine sponge *Haliclona* sp. biosynthetic genes for secondary metabolites and products. *Environ Microbiol Black Sci Pub*13: 391-403
- Matsuda S, Adachi K, Matsuo Y, Nukina M, Shizuri Y (2009) Salinisporamycin, a novel metabolite from *Salinispora arenicola*. *J Antibiot* 62:519-526. DOI: 10.1038/ja.2009.75
- 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.
- Mukherjee G, Sen SK (2004) Characterization and identification of chitinase producing *Streptomyces venezulae* P10. *J Exp Biol Indian* 42: 541-544.
- Nguyễn Vĩnh Hà (2002), Khảo sát hoạt tính đối kháng của các chủng nấm sợi phân lập từ rừng ngập mặn khu vực Giao Thủy, Nam Định và Thái Thụy, Thái bình, Luận án Thạc sĩ Sinh học, Trường Đại học Sư Phạm Hà Nội: 5- 30.
- Oskay M, Same A, Azeri C (2004) Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *Afr J Biotechnol* 3: 441-456.
- Paul R J, Bradley SM, William F (2015) The marine actinomycete genus *Salinispora*: A model organism for secondary metabolite discovery. *Nat Prod Rep* 32(5): 738-751.doi: 10.1039/c4np00167b
- Powers JH (2004) Antimicrobial drug development-the past, the present, and the future. *Clin Microbiol Infect* 10(4): 23-31.
- Sunaryanto R, Marwoto B (2010) Marine actinomycetes screening of Banten west coast and their antibiotics purification. *Biodiversitas* 11(4): 176-181
- Sumei L, Tian X, NiuS, Zhang W, ChenY (2011) Pseudonocardians A-C Pseudonocardians A-C, New diazaanthraquinone derivatives from a deep-sea actinomycete *Pseudonocardia* sp. SCSIO 01299. *Marine Drugs*9:1428-1439.
- Trener HD, Buckus EJ (1963) System of color wheels for *Streptomyces* taxonomy. *Appl Microbiol* 11: 335 - 338.
- WHO (2014) Antimicrobial resistance: global report on surveillance. Switzerland: World Health Organization.
- Williams PG, Asolkar RN, Kondratyuk T, Pezzuto JM, Jensen PR, Fenical W (2007) Saliniketals A and B, bicyclic polyketides from the marine actinomycete *Salinispora arenicola*. *J Nat Prod* 70:83-88. DOI:10.1021/np0604580.

SCREENING AND IDENTIFICATION OF ACTINOMYCETES HAVING ANTIMICROBIAL ACTIVITY ISOLATED FROM MARINE ORGANISMS AND SEDIMENT SAMPLES IN LY SON ISLAND, QUANG NGAI

Tran Thi Thanh Hoa^{1,2,3}, Le Thi Hong Minh¹, Vu Thi Quyen¹, Nguyen Mai Anh¹, Doan Thi Mai Huong¹, Chau Van Minh¹, Pham Van Cuong¹

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

²National Institute of Hygiene and Epidemiology

³Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

The discovery of bioactive compounds from marine microorganisms for drug development has been currently widely studied. In which marine actinomycetes are highlighted as a potential source in finding antibiotics as well as substances with biological activity in general. The objective of this study is to isolate and screen the actinomycetes strains with antibacterial activity from the marine environment. Sixty one actinomycetes were isolated from 80 samples of marine

organisms and sediments collected from Ly Son Island, Quang Ngai. The strains were fermented in the A1 medium and the culture broths were extracted by ethyl acetate and vacuum rotary evaporation to produce crude extracts. Antimicrobial activity of the extracts were carried out on 7 strains of tested microorganisms, including three strains of Gram-negative bacteria (*Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Salmonella enterica* ATCC13076), three Gram-positive strains (*Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC 13245), and yeast *Candida albicans* ATCC10231. The screening results showed that three strains with the highest antimicrobial activity (G330, G336 and G361) were capable of inhibiting 5 of the 7 tested microorganisms with Minimum Inhibitory Concentration (MIC) values ranging from 4 to 256 µg/mL, depending on each tested strain. Specifically, all three strains inhibited *C. albicans* ATCC10231 and three Gram-positive strains (*E. faecalis* ATCC29212, *S. aureus* ATCC25923, *B. cereus* ATCC 13245). In addition, G330 and G336 also showed the inhibitory activity to Gram negative strain *S. enterica* ATCC13076 with value of 256 µg/mL, G361 has a good inhibitory ability for *E. coli* ATCC25922 with MIC value of 8 µg/mL. The strains were identified by morphological and the 16S rRNA gene sequences. The results showed that 16S rRNA sequences of the strains had over 99% similarity to the 16S rRNA sequences on the GeneBank database, strains G336 and G361 belonged to the genus *Salinispora*, whereas strain G330 belonged to the genus *Streptomyces*. These results showed that marine environment has a great potential in isolation of actinomycetes strains for the search for antibacterial substances as well as other biologically active compounds.

Keywords: *actinomycetes, antimicrobial activity, MIC, 16S rRNA gene sequences*