

SÀNG LỌC VÀ ĐỊNH DANH CÁC CHỦNG VI NẤM CÓ HOẠT TÍNH KHÁNG VI SINH VẬT KIỂM ĐỊNH TỪ CÁC MẪU SINH VẬT VÀ TRẦM TÍCH BIỂN THU THẬP TẠI VỊNH BÁI TỬ LONG, VIỆT NAM

Cao Đức Tuấn¹, Vũ Thị Quyên², Nguyễn Mai Anh², Đoàn Thị Mai Hương², Phạm Văn Cường², Đỗ Anh Duy⁴, Young-Ho Kim⁵, Hoàng Thị Hồng Liên^{3,✉}, Lê Thị Hồng Minh^{2,✉}, Nguyễn Văn Hùng¹

¹Trường Đại học Y Dược Hải Phòng, 72A Nguyễn Bình Khiêm, Hải Phòng, Việt Nam

²Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Trường Đại học Buôn Ma Thuột, 298 Hà Huy Tập, Buôn Ma Thuột, Đắk Lắk, Việt Nam

⁴Viện Nghiên cứu hải sản, 224 Lê Lai, Hải Phòng, Việt Nam

⁵Trường Đại học Dược, Đại học Quốc gia Chung Nam, Hàn Quốc

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: lhminhbk@gmail.com; hthlien@bmtu.edu.vn

Ngày nhận bài: 18.10.2020

Ngày nhận đăng: 21.01.2021

TÓM TẮT

Hệ sinh thái biển bao phủ khoảng 70% bề mặt của trái đất, là nguồn tiềm năng cung cấp các chất chuyển hóa hữu ích chưa được khai thác nhiều. Trong số các vi sinh vật biển, vi nấm là một trong những nguồn nguyên liệu để sản xuất các chất chuyển hóa thứ cấp ứng dụng trong nhiều lĩnh vực như y dược, thực phẩm... Nghiên cứu này tập trung vào việc thu thập, phân lập và sàng lọc các chủng nấm có hoạt tính kháng khuẩn từ môi trường biển. Hai mươi lăm chủng vi nấm biển được phân lập bằng phương pháp pha loãng nồng độ từ 16 loại mẫu sinh vật và trầm tích biển được thu thập ở vùng biển Bái Tử Long, Việt Nam. Các chủng phân lập được nuôi trong môi trường PDA, dịch nuôi 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* ATCC14579), và nấm men *Candida albicans* ATCC10231. Từ kết quả sàng lọc hoạt tính, đã chọn được 4 chủng vi nấm (M403, M583, M584 và M612) có phổ hoạt tính kháng vi sinh vật tốt nhất, ức chế 4/7 chủng VSVKĐ với các giá trị nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) từ 32 đến 256 µg/ml tùy thuộc vào từng chủng kiểm định. Cụ thể, M403, M583, M584 và M612 đều ức chế *C. albicans* ATCC10231 với giá trị MIC bằng 32-32-64-128 µg/ml tương ứng. Ngoài ra, cả bốn chủng này còn thể hiện hoạt tính ức chế cả ba chủng Gram dương kiểm định với MIC từ 64 µg/mL đến 256 µg/mL. Nghiên cứu đặc điểm hình thái và phân tích trình tự gen 18S rRNA, kết quả cho thấy bốn chủng đều có độ tương đồng hơn 99% so với các trình tự gen 18S rRNA trên ngân hàng gen quốc tế. Chủng M403 thuộc loài *Aspergillus versicolor* và M584 thuộc *Aspergillus unguis*; Trong khi đó M583 tương đồng với loài *Talaromyces purpureogenus* và M612 được xác định là thành viên của loài *Penicillium chrysogenum*. Trình tự gen 18S rRNA của bốn chủng đã được đăng ký lên dữ liệu của ngân hàng gen quốc tế với mã số: M403 (MW479130), M583 (MW479131), M584 (MW015805) và M612 (MW015801). Kết quả nghiên cứu bước đầu cho thấy môi trường biển là tiềm năng lớn để phân lập các chủng vi nấm cho mục đích tìm kiếm các chất kháng khuẩn cũng như các hoạt chất sinh học khác.

Từ khoá: Hoạt tính kháng vi sinh vật, sinh vật biển, MIC, trình tự 18S rRNA, vi nấm

MỞ ĐẦU

Vi nấm có mặt ở khắp nơi trong tự nhiên do khả năng tồn tại và thích nghi với môi trường sống của chúng. Nhiều nghiên cứu hiện nay đã báo cáo về khả năng tạo ra các chất chuyển hóa thứ cấp mới đáng kể của nấm, thông qua việc sản xuất các chất hữu ích

khác nhau như thuốc kháng sinh, chất ức chế miễn dịch, thuốc chống ung thư, hormone thực vật, enzyme, acid và cả sắc tố tự nhiên (Fouillaud *et al.*, 2017).

Tuy nhiên, sự phân bố của các loài nấm có nguồn gốc từ biển và sự đóng góp của chúng vẫn còn

trong giai đoạn sơ khai và nhiều điều cần được khám phá thêm (Panno *et al.*, 2013). Sự đa dạng cao nhất của nấm biển dường như xuất hiện ở các vùng nhiệt đới, chủ yếu ở rừng ngập mặn nhiệt đới, được nghiên cứu rộng rãi vì chúng giàu chất hữu cơ, thuận lợi cho sự phát triển của nhiều loại vi sinh vật dị dưỡng (Jones *et al.*, 2000). Ngoài ra, nhiều khu vực sinh thái biển vẫn chưa được khám phá, với các đặc điểm độc đáo của môi trường biển có thể là nguyên nhân tạo ra các chất mới lạ được sinh tổng hợp bởi các vi sinh vật biển. Nhiều loại nấm thuộc các chi như *Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Eurotium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Halorosellinia*, *Monodictys*... cũng đã được xác định từ các môi trường biển (Caro *et al.*, 2016). Môi trường biển không chỉ quan trọng dưới góc độ tìm kiếm các loại thuốc mới mà còn là nguồn cung cấp các chất nền (khung hóa học) mới, từ đó có thể sửa đổi hoặc tổng hợp nên các chất có các hoạt tính mong muốn.

Trong nghiên cứu này chúng tôi trình bày kết quả về phân lập, nuôi cấy, sàng lọc hoạt tính kháng sinh và định danh các chủng vi nấm biển từ các mẫu sinh vật biển và trầm tích biển thu thập được từ vùng biển Bái Tử Long, Việt Nam.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Hóa chất

Các hóa chất sử dụng cho môi trường được cung cấp từ các hãng Sigma-Aldrich (Mỹ), Hidia (Ấn Độ), Đức Giang (Việt Nam), Kit tách DNA tổng số của hãng Promega (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 18SrRNA NS3F (5'-GCAAGTCTGGTGCAGCAGCC-3') và NS8R (5'-TCCGCAGGTTACCTACGGA-3') (tham khảo bởi White *et al.*, 1990 và Tim *et al.*, 2004).

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* ATCC14579), 1 chủng nấm men *C. albicans* ATCC10231 (Microbiologics, Mỹ).

Môi trường

Các môi trường sử dụng trong nghiên cứu được tham

khảo bởi Kossuga *et al.*, 2012 (có cải tiến):

Môi trường **A1 (g/L)**: tinh bột tan10, cao nấm men 4, pepton 2, muối biển nhân tạo 30, agar 15; môi trường **Czapek (g/L)**: saccharose 30, NaNO₃ 30, K₂HPO₄ 4, MgSO₄ 6,5, muối biển nhân tạo 30, agar 15; môi trường **SWA (g/L)**: muối biển nhân tạo 30, agar 15; môi trường **MEA (g/L)**: cao mạch nha 5, pepton 1, muối biển nhân tạo 30, agar 15; môi trường **NZSG (g/L)**: tinh bột tan 20, cao nấm men 5, glucose 10, NZ Amine A 5, muối biển nhân tạo 30, agar 15; môi trường **PDA (g/L)**: tinh bột khoai tây 30, glucose 10, muối biển nhân tạo 30, agar 15; môi trường **PMDA(g/L)**: tinh bột khoai tây 30, cao mạch nha10, dextrose 10, muối biển nhân tạo 30, agar 15; môi trường **ISP2 (g/L)**: tinh bột tan 5, cao nấm men 2, cao nấm men 10, glucose 10, muối biển nhân tạo 30, agar 15. Các môi trường có bổ sung 1% dung dịch streptomycin có nồng độ 10 mg/mL nhằm ức chế các vi khuẩn trong quá trình phân lập vi nấm.

Các mẫu sinh vật và trầm tích biển đã thu thập

Mười sáu mẫu sinh vật và trầm tích biển được thu thập tại các tọa độ và độ sâu khác nhau (từ 3 – 8 m) thuộc vùng biển Bái Tử Long. Mẫu được lưu giữ trong các ống Eppendorf và ống Falcol 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 vi nấm biển

Cân 0,5 g mẫu vào ống Falcol, 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 8 loại môi trường đã chuẩn bị (A1, CZ, SWA, NZSG, MEA, PDA, PMDA, 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 PDA.

Tạo cặn chiết thô từ dịch nuôi cấy

Các chủng vi nấm phân lập được nuôi trong các bình tam giác 1000 mL có chứa 500 mL môi trường PDA, 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,

bề gia nhiệt ở 45°C) để loại dung môi thu chất chiết xuất thô.

Phương pháp xác định hoạt tính kháng khuẩn

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 (nồng độ ức chế tối thiểu) 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 vi nấm

Các chủng vi nấm sau khi sàng lọc hoạt tính kháng khuẩn sẽ được nuôi cấy trên môi trường thạch CZ (Czapek) ở 28°C từ 5 – 10 ngày và quan sát bào tử bằng kính hiển quang học ECLIPSE 80i NiKon, Nhật Bản.

DNA tổng số của 4 chủng tiềm năng được tách chiết bởi Kit Wizard® Genomic DNA của hãng Promega. Phản ứng khuếch đại gen 18S 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 NS3Fv và NS8R, 0,5 µLDNA tổng số. Chu trình nhiệt của PCR là: 94°C/2 phút (94°C/1 phút, 60°C/1 phút, 72°C/1 phút 20 giây) x 35 chu kỳ, 72°C/ 8 phút và giữ mẫu ở 4°C. Kích thước sản phẩm theo lý thuyết khoảng 1300 bp, sản phẩm được tinh sạch và giải trình tự gen 18S rRNA bằng máy giải trình 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 4.1.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả phân lập các chủng vi nấm

Từ 16 mẫu sinh vật và trầm tích biển thu thập ở vùng biển Bái Tử Long (gồm: 5 mẫu hải miên, 2 mẫu trầm tích, 3 mẫu rong, 3 mẫu hải sâm, 01 mẫu hải quỳ và 02 mẫu ốc nón) tiến hành phân lập theo phương pháp đã trình bày, đã phân lập làm sạch và lưu giữ được 25 chủng vi nấm.

Kết quả phân lập ở Bảng 1 cho thấy, các chủng vi nấm có hình thái và màu sắc khuẩn lạc khá đa


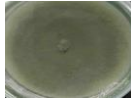
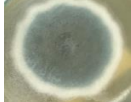







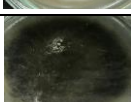




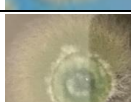



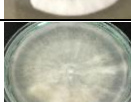
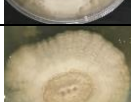
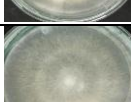
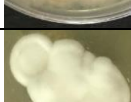

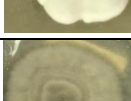
dạng như: trên bề mặt khuẩn lạc có xè thùỳ (M041, M508, M581, M612), bề mặt bông xốp (M404, M425, M501), tạo tia (M428, M520, M584, M598, M601) màu sắc khuẩn lạc khá phong phú như màu trắng, màu xám nhạt, màu xám đậm có viền trắng bao quanh, màu đen... Các chủng nấm phân lập có hình thái và màu sắc đa dạng tùy thuộc vào số lượng mẫu và từng vùng thu thập mẫu, chưa tìm thấy một quy luật chung cho sự phân bố của các vi nấm. Nghiên cứu tương tự của Alwakeel *et al.* (2017) đã phân lập được 125 chủng vi nấm từ 43 mẫu sinh vật biển. trong đó, hầu hết các chủng đều thuộc hai chi *Aspergillus* với 75/125 chủng và chi *Penicillium* với 48/125 chủng.

Sàng lọc hoạt tính kháng khuẩn của các chủng vi nấm

Kết quả thử hoạt tính kháng VSVKĐ của cận chiết thô dịch nuôi cấy các chủng vi nấm được trình bày ở Bảng 2 cho thấy: 25/25 chủng đã phân lập đều thể hiện hoạt tính kháng từ 1 đến 4 chủng VSVKĐ. Trong đó có 4/25 chủng (M403, M583, M584, M612) có hoạt tính kháng từ 4 chủng VSVKĐ (chiếm 16 %) với giá trị MIC từ 32 – 256 µg/mL. Ngoài ra 14/25 chủng thể hiện hoạt tính kháng *C. Albicans* với giá trị MIC từ 32 – 128 µg/mL, hoạt tính này rất đáng quan tâm vì việc sử dụng nhiều thuốc kháng sinh khiến những chủng nấm gây bệnh ngày càng trở nên khó kiểm soát (Forastiero *et al.*, 2013). Một nghiên cứu lớn trên hơn 1800 chủng nấm lâm sàng từ 31 quốc gia cho thấy 82% trường hợp nhiễm nấm trong năm 2013 là do *Candida* (Castanheira *et al.*, 2013). Hiện nay, việc điều trị hiệu quả bệnh nấm *Candida* bị hạn chế bởi hai yếu tố chính, đó là khó chẩn đoán nhanh và chính xác tác nhân xâm lấn và số lượng phương pháp điều trị hạn chế. Sự xuất hiện của các chủng kháng thuốc, bao gồm cả những chủng trở nên kháng nhiều loại thuốc, ngày càng được báo cáo nhiều hơn trong những năm gần đây (Lockhart *et al.*, 2017).

Một điểm đặc biệt là các chủng nấm phân lập được từ các mẫu sinh vật biển thu thập ở vùng Bái Tử Long hầu hết không thể hiện hoạt tính kháng vi khuẩn kiểm định Gram âm đây có thể chỉ là kết quả ngẫu nhiên trong nghiên cứu này. Bên cạnh đó, nguyên nhân cho sự nhạy cảm về kháng sinh giữa các vi khuẩn Gram âm và Gram dương có thể là do sự khác biệt về cấu trúc của thành tế bào, vi khuẩn Gram âm có màng là một lớp kép của phospholipid và lipopolysaccharide (LPS), cấu trúc này giúp cho thành của tế bào khó bị tác động bởi các kháng sinh (Delcour *et al.*, 2009).

Bảng 1. Thông tin tọa độ, độ sâu lấy mẫu, tên mẫu, môi trường phân lập và hình thái khuẩn lạc các chủng vi nấm phân lập.

TT	Tên chủng	Tọa độ, độ sâu, tên mẫu, môi trường	Hình thái khuẩn lạc	TT	Tên chủng	Tọa độ, độ sâu, tên mẫu, môi trường	Hình thái khuẩn lạc
1	M401	21° 05' 56,5" - 107° 36' 37,0", 4m, Hải miên quả cam, 176K, A1		14	M516	20° 59' 13,1" - 107° 34' 43,1", 6,5-7 m, Rong biển, 174B, A1	
2	M402	20° 59' 13,1" - 107° 34' 43,1", 7m, Rong biển, 174D, PMDA		15	M520	21° 06' 02,4" - 107° 36' 31,1", 6-7 m, Ốc nón, 176M, PMDA	
3	M403	20° 59' 13,1" - 107° 34' 43,1", 7m, Rong biển, 176S, PMDA		16	M561	20° 58' 37,0" - 107° 33' 45,3", 8 m, Hải miên xanh, 174T, PDA	
4	M404	20° 58' 37,0" - 107° 33' 45,3", 8m, Hải miên trắng, 174V, MEA		17	M571	20°58'606-107°33'782" 6,4m, hải sâm, 174J, MEA	
5	M406	21° 05' 56,5" - 107° 36' 37,0", 4m, Hải miên quả cam, 176K, Czapek		18	M574	21° 02' 42,5" - 107° 34' 58,5", 5,5-6 m, Hải sâm đá, 175J, A1	
6	M425	20°59'219-107°34'719", 8m, Trâm tích, 176Z, ISP2		19	M581	20° 58' 36,6" - 107° 33' 46,2", 6-7 m, Ốc nón, 174N, A1	
7	M428	20°59'219-107°34'719", 8m, Trâm tích, 176Z, Czapek		20	M583	20° 59' 11,2" - 107° 34' 51,9", 8 m, Hải miên xanh, 176Q, MEA	
8	M431	20°59'219-107°34'719", 8m, Trâm tích, 176Z, ISP2		21	M584	20° 58' 37,0" - 107° 33' 45,3", 8 m, Hải miên xanh, 174T, ISP2	
9	M432	20°59'219-107°34'719", 8m, Trâm tích, 176Z, PMDA		22	M586	20°58'606-107°33'782" 7m, hải quỳ, 174A, PDA	
10	M447	20°58'606-107°33'782", 7m, trâm tích, 174E, ISP2		23	M598	20° 59' 09,9" - 107° 34' 58,8", 9-9,5 m, Hải miên xanh, 174W, ISP2	
11	M448	20°58'606-107°33'782", 7m, trâm tích, 174E, MEA		24	M601	20° 58' 36,6" - 107° 33' 46,2", 6-7 m, Ốc nón, 174N, PDA	
12	M501	20°58'606-107°33'782", 7m, hải quỳ, 174A, ISP2		25	M612	21° 02' 43,9" - 107° 34' 54,5", 7-8 m, Hải miên đá, 175K, MEA	
13	M508	20°59'876-107°33'912", 5m, hải sâm, 175D, A1					

Bảng 2. Giá trị MIC($\mu\text{g/mL}$) cặn chiết ethyl acetate của các chủng vi nấm phân lập

TT	Chủng	Vi khuẩn Gram dương			Vi khuẩn Gram âm			Nấm men
		<i>E. faecalis</i> ATCC29212	<i>S. aureus</i> ATCC25923	<i>B. cereus</i> ATCC14579	<i>E. coli</i> ATCC25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	<i>S. enterica</i> ATCC13076	<i>C. albicans</i> ATCC10231
1	M401	128	-	128	-	-	-	-
2	M402	128	-	-	-	-	-	-
3	M403	128	256	256	-	-	-	32
4	M404	128	-	-	-	-	-	-
5	M406	32	-	256	-	-	-	128
6	M425	32	-	128	-	-	-	-
7	M428	8	-	16	-	-	-	-
8	M431	64	32	-	-	-	-	128
9	M432	16	-	64	-	-	-	-
10	M447	32	128	256	-	-	-	-
11	M448	64	128	64	-	-	-	-
12	M501	128	-	-	-	-	-	8
13	M508	64	-	-	-	-	-	16
14	M516	16	-	256	-	-	-	128
15	M520	32	-	-	-	-	-	128
16	M561	128	-	256	-	-	-	-
17	M571	128	64	-	-	-	-	128
18	M574	128	128	-	-	-	-	128
19	M581	128	-	128	-	-	-	128
20	M583	64	128	256	-	-	-	32
21	M584	128	256	128	-	-	-	64
22	M586	256	256	-	-	-	-	-
23	M598	64	-	-	-	-	-	-
24	M601	128	-	256	-	-	-	64
25	M612	256	256	256	-	-	-	128
	Streptomycin	256	256	128	32	256	128	-
	Cycloheximide	-	-	-	-	-	-	32

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

Từ kết quả sàng lọc, chúng tôi đã lựa chọn được 4 chủng (chủng M403 được phân lập từ mẫu rong biển, M583 và M584 được phân lập từ mẫu trầm tích và M612 được phân lập từ mẫu hải miên) có hoạt tính kháng khuẩn cao nhất để định danh tên khoa học. Cụ thể, bốn chủng này đều có khả năng ức chế cả 3 chủng VSVKĐ Gram dương (*E. faecalis* ATCC29212, *S. aureus* ATCC25923, *B. cereus* ATCC14579) với các giá trị MIC từ 64 đến 256 $\mu\text{g/mL}$ và ức chế rất tốt nấm *C. albicans* ATCC10231 với MIC từ 32 – 128 $\mu\text{g/mL}$ (bảng 2).

Định danh 4 chủng đã sàng lọc

Bốn chủng vi nấm M403, M583, M584 và M612 được nuôi cấy trên môi trường Czapek ở 28°C, hình thái bào tử nấm được quan sát dưới kính hiển vi quang học Nikon ECLIPSE 80i và đối chiếu với các mô tả của Raper, Fennell (1965) và Raper, Thom (1968). Kết quả

cho thấy: 2 chủng M403 và M584 có hình thái khuẩn lạc, đặc điểm thể quả, cuống sinh bào tử và bào tử tương đồng với chi *Aspergillus*; 2 chủng M583 và M612 có các đặc điểm tương đồng với chi *Penicillium*. Chi tiết cụ thể được mô tả như sau:

Khuẩn lạc của chủng M403 trên môi trường Czapek phát triển đạt 3 cm/10 ngày ở 28°C. Bề mặt khuẩn lạc dạng nhung, trung tâm có màu xanh lục lơ đến lục xám, mép có màu trắng (Hình 1A). Cuống sinh bào tử có kích thước 110 – 730 x 4,5 – 8,0 μm , không màu đến nâu nhạt, thành dày, nhẵn. Bọng hình gần cầu đến quả lê hoặc elip, kích thước 8,0–19 μm . Cuống thể bình 3,5 – 8,0 x 2,5 – 5,0 μm ; thể bình 3,5 – 8,5 x 2,5 – 3,2 μm . Bào tử hình gần cầu hoặc cầu, kích thước 3,0 – 3,8 μm (Hình 1E).

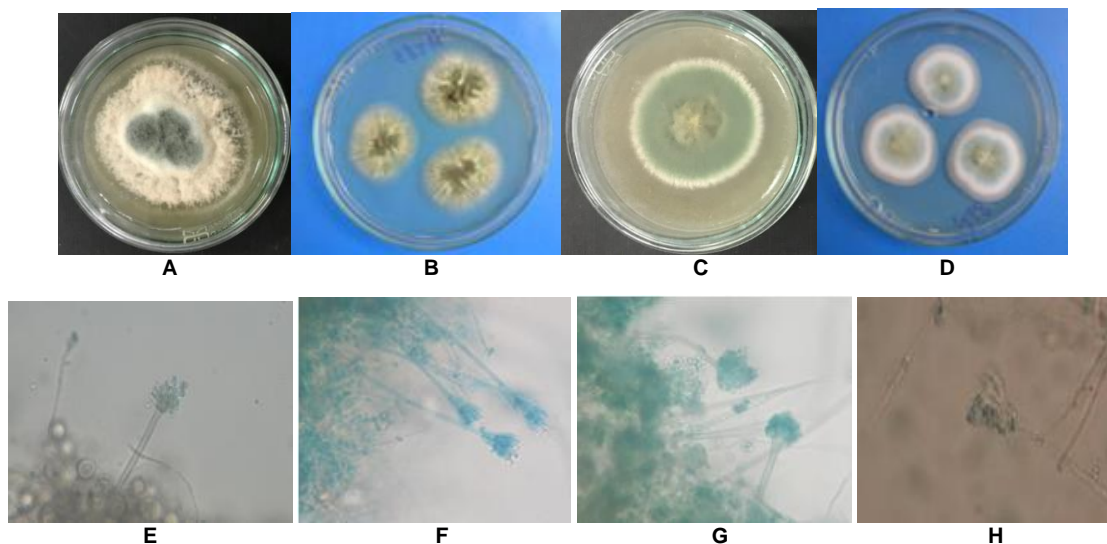
Khuẩn lạc chủng M583 trên môi trường Czapek

đạt 2 cm/5 ngày ở nhiệt độ 28°C, mép mỏng dị thường, màu lục vàng sáng xen kẽ (Hình 1B). Cuống sinh bào tử có kích thước 70 – 300 x 2,5 – 3,5 µm, thành nhẵn, tận cùng là chồi 2 vòng thể bình; cuống thể bình tạo thành vòng 3 – 8 cái, kích thước 10 – 14 x 2,0 – 3,0 µm; thể bình thuôn nhọn ở đỉnh, kích thước 10 – 14 x 2,2 – 2,5 µm; bào tử hình elip hoặc hình gần cầu, kích thước 3,0 – 4,0 x 2,5 – 3,0 µm (Hình 1F).

Khuẩn lạc M584 trên môi trường Czapek phát triển đạt 3 cm/10 ngày ở 28°C, bằng phẳng, mép dị thường, màu xanh lục đến lục nâu đậm, khi già có màu nâu (Hình 1C). Đầu sinh bào tử hình cột, kích thước 75 – 150 x 40 – 50 µm; Cuống sinh bào tử 50 – 70 µm x 4 – 6 µm; Bọng hình cầu đến gần cầu, thể bình 2 tầng; cuống thể bình 5,5 – 7,0 x 2,5 – 3,0 µm.

Bào tử hình cầu đến gần cầu, nhẵn đến ráp, 2,5 – 3,5 µm đường kính (Hình 1G).

Khuẩn lạc M612 trên môi trường Czapek phát triển đạt 2 cm/5 ngày nhiệt độ 28°C. Khuẩn lạc thường phân vùng nhẹ, tạo thành các khía đồng tâm, mỏng, dạng nhung hoặc xốp nhẹ. Hệ sợi nấm lúc đầu có màu trắng, sau chuyển sang màu lục vàng nhạt hoặc lục xám (Hình 1D). Các sợi khí sinh thành mỏng, nhẵn hoặc ráp nhẹ, kích thước 200 – 300 x 3,0 – 4,0 µm, tận cùng là chồi gồm 1 – 2 nhánh nhưng thỉnh thoảng mang chồi dị thường 2 hoặc 3 tầng, với các nhánh tẽ hoặc cuống ngắn mang một tầng thể bình, kích thước 15 – 20 µm x 2,5 – 4,0 µm; thể bình 7,0 – 10 x 2,5 – 3,0 µm; bào tử trần lúc đầu hình elip, sau gần cầu đến cầu, 2, 5– 4,0 µm x 2,2 – 3,5 µm (Hình 1H).



Hình 1. Hình thái khuẩn lạc của chủng M403 (A) M583 (B) và M584 (C) và M612 (D) được nuôi trên môi trường Czapek (CZ) và hình ảnh bào tử dưới kính hiển vi quang học với x 1000 của M403(E) M583(F) M584 (G) và M612(H) ở độ phóng đại 1000x.

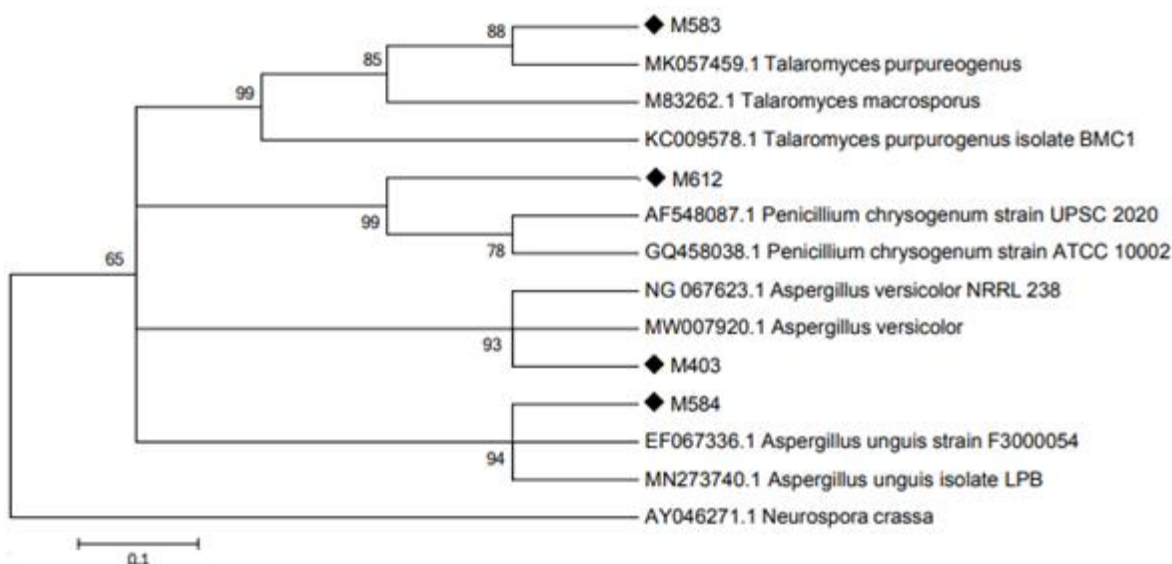
Ngoài ra, bốn chủng có hoạt tính kháng VSVKĐ tốt cũng đã được định danh dựa trên so sánh trình tự gen 18S rRNA bằng chương trình Blast. Các gen 18S rRNA được khuếch đại bằng PCR với cặp mồi NS3F và NS8R đã nêu, các sản phẩm PCR được tinh sạch, giải trình tự và phân tích bằng phần mềm Bioedit. So sánh các trình tự 18S rRNA của bốn 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 18S rRNA so với các chủng đã công bố trên GenBank. Nghiên cứu quan hệ của các chủng trên cây phát sinh loài

(Hình 2) cho thấy, chủng M403 có mối quan hệ gần gũi với các chủng thuộc chi *Aspergillus* và có độ tương đồng 99,31 % so với chủng *Aspergillus versicolor* NRRL 238 thuộc ngân hàng chủng chuẩn có mã số trên GenBank là NG067623 và chủng *Aspergillus versicolor* có mã số trên GenBank MW007920 được Trung Quốc công bố; Chủng M583 có mối quan hệ gần gũi với các chủng thuộc chi *Talaromyces* và có độ tương đồng 99,73 % so với chủng *Talaromyces purpureogenus* có mã số trên GenBank MK057459 và tương đồng 99,47 % so với chủng *Talaromyces purpureogenus* BMC1 có mã số

trên GenBank là KC009578 được Trung Quốc công bố năm 2020; Chủng M584 có mối quan hệ gần gũi với các chủng thuộc chi *Aspergillus* và có độ tương đồng 99,83 % so với chủng *Aspergillus unguis* F3000054 có mã số trên GenBank EF067336 và tương đồng 99,82 % so với chủng *Aspergillus unguis* LPB có mã số trên GenBank là MN273740 được Indonesia công bố năm 2019; Chủng M612 có mối quan hệ gần gũi với các chủng thuộc chi *Penicillium* và có độ tương đồng 99,83 % so với chủng *Penicillium chrysogenum* UPSC 2020 có mã số trên GenBank là AF548087 và tương đồng 99,57 % so với chủng *Penicillium chrysogenum* ATCC 10002 thuộc ngân hàng chủng chuẩn có mã số trên GenBank là GQ458083.

Trình tự 18S rRNA của 4 chủng có hoạt tính cao đã được đăng ký Ngân hàng gen Quốc tế với mã số tương ứng là: M403 (MW479130), M583 (MW479131), M584 (MW015805) và M612 (MW015801).

Nhiều nghiên cứu cho thấy nấm biển cũng thuộc về các chi nổi tiếng như nấm ở môi trường trên cạn, như *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Phoma* và *Fusarium*. Trong đó chi *Aspergillus* là một trong những chi chính đóng góp vào các chất chuyển hóa thứ cấp có nguồn gốc từ nấm biển. Một số lượng lớn các hợp chất mới bao gồm, alkaloid, peptide, polyketide, terpene, sterol... đã được phân lập từ chi này và nhiều chất trong số này thể hiện hoạt tính sinh học rất tốt (Lee *et al.*, 2013).



Hình 2. Cây phát sinh chủng loại thể hiện mối liên quan giữa bốn chủng nghiên cứu với các thành viên đại diện của các chi *Aspergillus* và *Penicillium* dựa trên trình tự gen 18S 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).

Gliotoxin là hợp chất kháng khuẩn đầu tiên được phân lập từ chủng *Aspergillus* sp. có nguồn gốc từ trầm tích biển sâu thuộc biển Seto ở Nhật Bản. Gliotoxin có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn Gram dương *Staphylococcus aureus* và *Bacillus subtilis* (Okutani *et al.*, 1977). Từ chủng *Aspergillus versicolor* XS-20090066 được phân lập từ loài *Dichotella gemmacea* thu thập từ vùng biển Trung Quốc. Wu *et al.* (2020) đã phân lập được 7 hợp chất, trong đó có 2 hợp chất Kipukasin K và Aspergillusene E thể hiện hoạt tính ức chế *Staphylococcus epidermidis* và *Staphylococcus*

aureus với MIC tương ứng là 8 và 16 µg/mL. Ngoài ra, hợp chất Aspergillusene E còn thể hiện các hoạt tính chống nấm *Candida albicans* và *C. tropicalis* với giá trị MIC tương ứng là 64 và 32 µg/mL.

Từ chủng *Aspergillus unguis* PSU-RSPG204, Phainuphong *et al.* (2017) đã phân lập được hợp chất aspergillusphenol A và aspergillusethers D. Hợp chất aspergillusphenol A cho thấy hoạt tính kháng khuẩn ức chế *Staphylococcus aureus* và *S. aureus* kháng methicillin với giá trị MIC tương ứng là 16 và 8 µg / mL, trong khi hợp chất aspergillusethers D thể hiện hoạt tính kháng nấm đối với *C. albicans*

(NCPF3153), *Cryptococcus neoformans* (ATCC90113) kháng flucytosine với giá trị MIC lần lượt là 16 và 8 µg/mL.

Từ chủng nấm *Talaromyces purpureogenus* PP-414, Wang *et al.* (2018) đã phân lập được hai chất chuyển hóa thứ cấp mới, 9,10-diolhinokiic axit và roussoellol C. Trong đó hợp chất roussoellol C cho thấy tính chọn lọc đáng kể kháng tế bào ung thư vú MCF-7 với giá trị IC50 là 6,5 µM.

Một nghiên cứu khác của Phan Thị Hoài Trinh và cộng sự (2017) đã phân lập được 2 hợp chất andrastin A và citreohybridonol từ chủng vi nấm *Penicillium chrysogenum* 045-357-2 có nguồn gốc từ san hô mềm thu thập ở vịnh Cà Ná, Ninh Thuận, Việt Nam. Hợp chất andrastin A thể hiện hoạt tính kháng khuẩn đối với *B. cereus* ATCC11778 và *S. faecalis* ATCC19433 với các giá trị MIC tương ứng là 32 và 64 µg/mL.

Việc nghiên cứu về hóa học các hợp chất có nguồn gốc từ biển trên thế giới đến nay đã có những bước tiến vượt bậc và đạt được nhiều kết quả rất khả quan. Tuy nhiên, việc điều tra nghiên cứu các hợp chất thứ cấp từ nguồn vi sinh vật biển ở Việt Nam mới chỉ được bắt đầu. Vì vậy hướng nghiên cứu về vi sinh vật biển cũng như vi nấm biển Việt Nam là một hướng đi mới rất thú vị và tiềm năng.

KẾT LUẬN

Từ 16 mẫu sinh vật và trầm tích biển thu thập được ở vùng biển Bái Tử Long, đã phân lập được 25 chủng vi nấm, lựa chọn được 4 chủng (M403, M583, M584 và M612) có hoạt tính tốt nhất ức chế 4/7 chủng VSVKD. 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* ATCC13245) và *C. albicans* ATCC10231 với các giá trị MIC từ 32 µg/mL đến 256 µg/mL, tùy thuộc vào từng chủng. Các chủng đã được xác định đặc điểm hình thái và định danh bằng so sánh trình tự gen 18S rRNA. Chủng M403 có mối quan hệ gần gũi với các chủng thuộc chi *Aspergillus* và có độ tương đồng 99,31 % so với chủng *Aspergillus versicolor* NRRL 238 (mã số GenBank: NG067623); chủng M584 có mối quan hệ gần gũi với các chủng thuộc chi *Aspergillus* và có độ tương đồng 99,82 % so với chủng *Aspergillus unguis* LPB (MN273740); chủng M583 có mối quan hệ gần gũi với các chủng thuộc chi *Talaromyces* và có độ tương đồng 99,73 % so với *Talaromyces purpureogenus* (MK057459);

chủng M612 có mối quan hệ gần gũi với các chủng thuộc chi *Penicillium* và có độ tương đồng 99,57 % so với chủng *Penicillium chrysogenum* ATCC 10002 (GQ458083). Các trình tự gen 18S rRNA của M403, M583, M584 và M612 đã được đăng ký ở dữ liệu Ngân hàng gen quốc tế với các mã số tương ứng: MW479130, MW479131, MW015805 và MW015801.

Lời cảm ơn: Công trình này được hoàn thành bởi sự tài trợ kinh phí từ đề tài hợp tác giữa Bộ Khoa học và Công nghệ Việt Nam (mã số đề tài: HNQT / SPDP / 11.19) và Viện Nghiên cứu và Phát triển Thuốc, Trường Đại học Dược, Đại học Quốc gia Chung Nam, Hàn Quốc trong khuôn khổ Hợp tác song phương / đa phương Chương trình Nghiên cứu Quốc tế về Khoa học và Công nghệ đến năm 2020.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alwakeel SS (2016) Molecular identification of fungi isolated from coastal regions of Red Sea, Jeddah, Saudi Arabia. *J Assoc Arab Univ Basic Appl Sci* 24(1): 115–119.
- Caro Y, Venkatachalam M, Lebeau J, Fouillaud M, Dufossé L (2016) Pigments and colorants from filamentous fungi. *Fungal Metabolites* 1–70.
- Castanheira M, Messer SA, Rhomberg PR, Pfaller MA (2013) Antifungal susceptibility patterns of a global collection of fungal isolates: Results of the SENTRY Antifungal Surveillance Program. *Diagn Microbiol Infect Dis* 85: 200–204.
- Delcour AH (2009) Review: Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochim Biophys Acta* 1794 (5): 808–816.
- Forastiero A, Mesa-Arango AC, Alastruey-Izquierdo A (2013) *Candida tropicalis* antifungal cross-resistance is related to different azole target (Erg11p) modifications. *Antimicrob Agents Chemother* 57 (10): 4769–4781.
- Fouillaud M, Venkatachalam M, Llorente M, Magalon H, Cuet P, Dufossé L (2017) Biodiversity of pigmented Fungi Isolated from Marine Environment in La Réunion Island, Indian Ocean: New Resources for Colored Metabolites. *J. Fungi* 3: 36.
- Kossuga MH, Romminger S, Xavier C, Milanetto MC, do Valle MZ, Pimenta EF, Moraes RP, Carvalho E, Mizuno CM, Coradello LFC, Barroso VM, Vacondio B, Javaroti DCD, Selegim MHR, Cavalcanti BC, Pessoa C, Moraes MO, Lima BA, Gonçalves R, Bonugli-Santos R C, Sette LD, Berlinck RGS (2012) Evaluating methods for the isolation of marine-derived fungal strains and production of bioactive secondary

- metabolites. *Rev Bras Farmacogn Braz J. Pharmacogn* 22(2):
- Lee YM, Kim MJ, Li H, Zhang P, Bao B, Lee KJ, Jung JH (2013) Marine-Derived *Aspergillus* Species as a Source of Bioactive Secondary Metabolites. *Mar Biotechnol* 15: 499–519.
- Lockhart SR, Etienne KA, Vallabhaneni S, Farooqi J, Chowdhary A, Govender NP, Colombo AL, Calvo B, Cuomo CA, Desjardins CA (2017) Simultaneous emergence of multidrug-resistant *Candida auris* on 3 continents confirmed by whole-genome sequencing and epidemiological analyses. *Clin Infect Dis* 64: 134–140.
- Okutani K (1977) Gliotoxin produced by a strain of *Aspergillus* isolated from marine mud. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 43(8): 995–1000.
- Panno L, Bruno M, Voyron S, Anastasi A, Gnani G, Miserere L, Varese GC (2013) Diversity ecological role and potential biotechnological applications of marine fungi associated to the seagrass *Posidonia oceanica*. *New Biotechnol* 30: 685–694.
- Phainuphong P, Rukachaisirikul V, Phongpaichit S, Preedanon S, Sakayaroj J (2017) Diphenyl ethers and indanones from the soil-derived fungus *Aspergillus unguis* PSU-RSPG204. *Tetrahedron* 73(40): 5920–5925. Phan THT, Nguyen TKC, Ngo TDN, Phi QT, Bui ML, Tran TTV (2017) Secondary metabolites from a marine – derived fungus *Penicillium chrysogenum* 045-357-2, *Vietnam J Sci Technol* 55(1A): 65–72.
- Raper B, Fennell D (1965) The genus *Aspergillus*, *William & Wilkin*, USA, 442–490.
- Raper B, Thom C (1968) A manual of *Penicillia*. *Hafner Publishing company*, New York & London 359–362.
- Tim SB, Chris M (2004) Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. *Nat Prod Rep* 21: 143–163.
- Wang W, Wan X, Liu ID, Wang J, Zhu H, Chen C, Zhang Y (2018) Two New Terpenoids from *Talaromyces purpurogenus* *Mar Drugs* 16: 150.
- White TJ, Bruns TD, Lee SB, Taylor JW (1990) Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. *Academic Press*, New York, 315–322.
- Wu JS, Yao GS, Shi XH, Rehman SU, Xu Y, Fu XM, Zhang XL, Liu Y, Wang CY (2020) Epigenetic Agents Trigger the Production of Bioactive Nucleoside Derivatives and Bisabolane Sesquiterpenes From the Marine-Derived Fungus *Aspergillus versicolor*, *Front Microbiol* 11: 1–9.

SCREENING AND IDENTIFICATION OF FUNGI HAVING ANTIMICROBIAL ACTIVITY ISOLATED FROM MARINE ORGANISMS AND SEDIMENT SAMPLES TAKEN IN THE BAI TU LONG, VIETNAM

Cao Duc Tuan¹, Nguyen Mai Anh², Vu Thi Quyen², Doan Thi Mai Huong², Pham Van Cuong², Do Anh Duy⁴, Young-Ho Kim⁵, Hoang Thi Hong Lien³, Le Thi Hong Minh², Nguyen Van Hung¹

¹Haiphong University of Medicine and Pharmacy, 72A Nguyen Binh Khiem, Haiphong, Vietnam

²Institute of Marine Biochemistry, Vietnam Academy of Science and Technology

³Buon Ma Thuot University, 298 Ha Huy Tap, Buon Ma Thuot, Daklak, Vietnam

⁴Research Institute for Marine Fisheries, 224 Le Lai, Haiphong, Vietnam

⁵College of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon, Republic of Korea

SUMMARY

Marine ecosystems cover about 70% of the planet surface and are still an underexploited source of useful metabolites. Among microbes, filamentous fungi are captivating organisms used for the production of many chemical classes of secondary metabolites used in various fields such as medicine, food ...The present study was focused on the collection, isolation and screening of fungi with antibacterial activity from 25 marine fungi strains isolated by concentration dilution method from 16 samples including marine organisms and sediments collected in Bai Tu Long, Vietnam. The strains were cultured in PDA medium and the culture broths were extracted by ethyl acetate and vacuum rotary evaporation to produce crude extracts. Antimicrobial activity of the extracts was carried out on 7 tested microorganisms, including three Gram-negative bacterial strains (*Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Salmonella enterica* ATCC13076), three Gram-positive strains (*Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC14579), and yeast *Candida albicans* ATCC10231. The screening results showed that four strains with the highest antibacterial activity (M403, M583, M584 and M612) were capable of inhibiting 4 of the 7 tested microorganisms with minimum inhibitory concentration (MIC) from 32 to 256 µg/mL depending on each tested strain. Specifically, all M403, M583, M584 and M612 inhibited *C.*

albicans ATCC10231 with MIC values of 32-32-64-128 µg/mL, respectively. In addition, all four strains showed inhibitory activity against all three Gram-positive strains tested with MICs from 64 to 256 µg/mL. The strains were identified by morphology and 18S rRNA gene sequences. The results showed that 18S rRNA gene sequences of strains had over 99% similarity with the 18S rRNA gene sequences available on the GenBank database. Strain M403 was most closely related *Aspergillus versicolor* and M584 was most closely related *Aspergillus unguis*, whereas M583 was most closely related *Talaromyces purpureogenus* and M612 identified as a member *Penicillium chrysogenum*. The sequences of 18S rRNA gene of four strains were registered on GenBank database with accession numbers: M403 (MW479130), M583 (MW479131), M584 (MW015805) và M612 (MW015801). Preliminary results showed that the marine environment has great potential for isolating fungal strains which contain antibacterial and other bioactive substances.

Keywords: Antimicrobial activity, fungus, marine organisms, MIC, 18S rRNA gene sequences