

SÀNG LỌC MỘT SỐ CHỦNG VI SINH VẬT CÓ KHẢ NĂNG PHÁ VỠ MÀNG SINH HỌC (BIOFILM) VÀ SINH ENZYME PHÂN GIẢI CHẤT HỮU CƠ

Cung Thị Ngọc Mai^{1*}, Đỗ Thị Liên¹, Hoàng Phương Hà^{1,2}, Lê Thị Nhi Công^{1,2}

¹ Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

² Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Tại các đường ống nước thải sinh hoạt luôn tồn tại các mảng bám từ vi sinh vật và các hợp chất hữu cơ, dầu mỡ, chất rắn khác. Các mảng bám từ vi sinh vật, biofilm, với thành phần chính polysaccharide, protein hay DNA ngoại bào là nguyên nhân gây tắc các đường ống thoát nước và gây ra mùi hôi. Dịch nuôi cấy của nhiều chủng vi sinh vật có khả năng phá vỡ biofilm do các chủng vi sinh vật khác tạo thành bởi chúng có khả năng phân hủy protein, polysaccharide hay DNA ngoại bào - là các thành phần cấu tạo nên biofilm. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sàng lọc được 3/11 chủng vi sinh vật mà dịch nuôi cấy của chúng hoặc có khả năng phá vỡ biofilm giả định hoặc sinh một số enzyme phân giải các hợp chất hữu cơ. Trong 3 chủng lựa chọn, chủng B5 có hoạt tính enzyme như protease, amylase, cellulase cao nhất và có khả năng phá vỡ 62% biofilm; chủng B7 có hoạt tính sinh các loại enzyme chỉ sau chủng B5 và khả năng phá vỡ biofilm đạt 28,3%. Chủng B24 mặc dù hoạt tính enzyme không cao nhưng hiệu suất phá vỡ biofilm đạt 54,7%. Bằng việc quan sát hình thái và so sánh trình tự đoạn gen 16S rRNA với các trình tự đoạn gen khác trên NCBI, chủng B5, chủng B7 có quan hệ gần gũi với các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus*; chủng B24 có quan hệ gần gũi với các chủng vi khuẩn thuộc chi *Pseudomonas*. Do vậy, 3 chủng này được đặt tên lần lượt là *Bacillus* sp. B5, *Bacillus* sp. B7 và *Pseudomonas* sp. B24. Những kết quả từ nghiên cứu này là tiền đề để chúng tôi tiếp tục có những nghiên cứu sâu hơn về vai trò của hợp chất do các chủng vi khuẩn sinh tổng hợp có khả năng loại bỏ biofilm trong tương lai.

Từ khóa: Biofilm, đường ống thoát nước sinh hoạt, enzyme, mảng bám, phá vỡ biofilm.

MỞ ĐẦU

Trong tự nhiên, khoảng 99% vi sinh vật tồn tại ở dạng màng sinh học (biofilm) và chỉ có 1% tồn tại ở dạng tế bào tự do. Màng sinh học (biofilm) được định nghĩa là tập hợp quần xã vi sinh vật bám trên một bề mặt của vật thể rắn hoặc bề mặt chất lỏng, sau khi gắn trên 1 bề mặt, chúng sẽ bắt đầu sản xuất lớp polyme ngoại bào (EPS - extracellular polymeric substance) bao phủ bề mặt đó. Các EPS này được cấu thành bởi các polyme có tính kết dính cao (như: alginate, pel, psl...), sẽ kéo theo việc bám dính của nhiều chất hữu cơ, dầu mỡ hay các chất rắn lơ lửng trong các đường ống thoát nước sinh hoạt (Costerton 1987). Đây là nguyên nhân chính gây ra mùi hôi và gây tắc các đường ống thoát nước.

Tại thị trường hiện nay một số chế phẩm: Microbe-lift (Mỹ), EcoCleanTM (Mỹ), cùng với rất nhiều các sản phẩm bột thông tắc cống khác có nguồn gốc từ Nhật, Hàn Quốc,... được thương mại hóa với mục đích loại bỏ các mảng bám dầu mỡ khi sử dụng các chủng vi sinh vật có khả năng sử dụng dầu mỡ, các chất hữu cơ từ thức ăn dư thừa là nguồn dinh dưỡng để chúng sinh trưởng. Nhưng với những mảng bám tạo thành bởi các chủng vi khuẩn tạo biofilm có cấu trúc bền vững tại bề mặt đường ống thì chưa thấy được đề cập.

Theo công bố của nhiều nhà khoa học trên thế giới cho thấy, dịch nuôi cấy của nhiều chủng vi sinh vật có khả năng phá vỡ biofilm do các chủng vi sinh vật khác tạo thành bởi chúng có khả năng phân hủy các thành phần cấu thành nên lớp EPS bảo vệ tế bào vi sinh vật như: protein, polysaccharide hay DNA ngoại bào. LasB elastase và Esp serine protease được tìm thấy lần lượt trong trong dịch nuôi loài *Pseudomonas aeruginosa* và *Staphylococcus cholerae* (Park *et al.*, 2012). β -N-acetylglucosaminidase được mã hóa bởi gen *dspB* do *Actinobacillus actinomycetemcomitans* tổng hợp có hiệu quả trong việc làm giảm tính bám dính của vi sinh vật từ đó tăng cường sự phá vỡ biofilm (Kaplan *et al.*, 2003). Dịch nuôi của loài nấm *Penicillium funiculosum* có hiệu quả cao trong việc phân hủy chất nền trong biofilm của *Pseudomonas aeruginosa* và phân hủy polysaccharide ngoại bào của *Pseudomonas fluorescens* (Vickery *et al.*, 2004). Nghiên cứu mới nhất của Li và đồng tác giả (2020) cho thấy, khi sử dụng methyl anthranilate có khả năng phá vỡ biofilm do *Aeromonas sobria* tạo thành.

Như vậy, có thể thấy rằng, việc phá vỡ biofilm có thể cho hiệu quả cao từ dịch nuôi cấy của các chủng vi sinh vật. Bên cạnh đó, nguồn vi sinh vật rất phong phú, giá thành không cao lại chưa được tận dụng hết. Do vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành sàng lọc các chủng vi sinh vật có khả năng phá vỡ biofilm và đánh giá hoạt tính một số enzyme phân hủy các chất hữu cơ từ bộ sưu tập chủng giống tại đơn vị. Các kết quả thu được giúp nhóm nghiên cứu có những định hướng để có thể đưa ra sản phẩm loại bỏ mảng bám tại các đường ống thoát nước sinh hoạt bảo vệ môi trường trong tương lai.

NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng vi khuẩn tạo biofilm

Các chủng vi khuẩn ký hiệu là T3, T23 được phân lập từ các mẫu màng bám trên ống thoát nước sinh hoạt có khả năng tạo biofilm tốt được sử dụng để tạo biofilm trong môi trường giả định (Mẫu đối chứng: Control - C).

Chủng vi sinh vật sử dụng đánh giá khả năng phá vỡ biofilm

Mười một chủng vi sinh vật (10 chủng vi khuẩn và 1 chủng xạ khuẩn) từ bộ sưu tập chủng giống của Phòng CNSH Môi trường, Viện Công nghệ sinh học, VAST được sử dụng để hoạt hóa nuôi trên môi trường MPA trong điều kiện hiếu khí trên máy lắc với tốc độ 150 vòng/phút và nhiệt độ $28 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Sau 18 giờ, ly tâm 6.000 vòng trong 10 phút, bỏ cạn. Dịch nổi thu được sau khi ly tâm (dịch thô) sẽ được sử dụng để đánh giá khả năng phá vỡ biofilm.

Môi trường nuôi cấy vi sinh vật:

Môi trường MPA dịch để nuôi cấy vi khuẩn (g/L): 5 g NaCl, 10 g peptone, 3 g cao thịt; nước cất đủ 1 lít; pH 7-7,2. Môi trường Gause để nuôi cấy xạ khuẩn (g/L): 20 g tinh bột tan, 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1 g KNO_3 ; 0,5 g NaCl, 0,01 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 g K_2HPO_4 ; nước cất đủ 1 lít; pH 7. Đối với các môi trường thạch, thành phần như môi trường dịch nhưng có bổ sung thêm 20 g/l agar.

Hóa chất để đánh giá khả năng tạo biofilm và thử nghiệm hoạt tính enzyme

Dung dịch tím tinh thể 0,1%; nước cất vô trùng, acetic acid 33% và thuốc thử lugol.

Tạo biofilm

Hai chủng T3, T23 được hoạt hóa trên môi trường MPA dịch và sử dụng làm các chủng tạo biofilm tốt. Quá trình tạo biofilm được thực hiện theo mô tả của Morikawa và đồng tác giả (2006).

Đánh giá khả năng phá vỡ biofilm

Khả năng phá vỡ biofilm được thực hiện theo mô tả của Pitts và đồng tác giả (2003) với môi trường tạo biofilm là MPA. Sau 48 giờ tạo biofilm, dùng pipet hút nhẹ dịch nuôi (không làm vỡ biofilm), rửa bằng 500 μl nước cất vô trùng (lặp lại 2 lần). Tiếp đó, bổ sung "dịch thô" của các chủng thử nghiệm vào, đặt các eppendorf trong tủ nuôi $30 \text{ }^\circ\text{C}$ với tốc độ lắc là 100 vòng/phút. Sau 3 giờ, lấy các ống eppendorf ra, hút hết dịch, rửa bằng 500 μl nước cất vô trùng (lặp lại 2 lần), nhuộm bằng 300 μl dung dịch tím kết tinh 0,1%, cố định ở nhiệt độ phòng 10 phút và rửa lại 2 lần bằng nước cất vô trùng. Bổ sung 300 μl dung dịch acetic acid 33%, trộn đều rồi pha loãng và đo OD ở bước sóng 570 nm. Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần và có đối chứng là các mẫu không được xử lý bằng dịch nuôi vi sinh vật.

Đánh giá hoạt tính sinh một số enzyme phân giải các hợp chất hữu cơ của các chủng vi sinh vật

Hoạt tính một số loại enzyme có khả năng phân giải các hợp chất hữu cơ như: cellulose, α -amylase, protease được định tính theo phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Cụ thể như sau: Chuẩn bị các đĩa thạch chứa môi trường có bổ sung 1% từng loại cơ chất là CMC, tinh bột, casein tương ứng với các cellulose, α -amylase, protease. Sau khi đục lỗ thạch tiến hành tra mẫu, trong đó, môi trường không chứa vi sinh vật là đối chứng âm, các giếng còn lại là 100 μL dịch các chủng vi khuẩn nghiên cứu. Sau 16 giờ nuôi tĩnh ở nhiệt độ từ $28 - 30^\circ\text{C}$, đổ dung dịch thuốc thử lugol sao cho ngập kín mặt đĩa thạch. Sau 1 giờ, rửa lại mẫu bằng nước cất rồi quan sát đo đường kính các vòng sáng màu trên nền thạch chứa cơ chất so với giếng đối chứng âm là môi trường MPA.

Quan sát hình thái khuẩn lạc, hình thái tế bào

Chủng vi sinh vật có khả năng phá vỡ biofilm tốt nhất được lựa chọn để cấy trải trên môi trường MPA thạch và quan sát hình thái tế bào dưới kính hiển vi điện tử quét S4800 - Hitachi, Nhật Bản. Quá trình được thực hiện với sự phối hợp của Viện Vệ sinh dịch tễ trung ương.

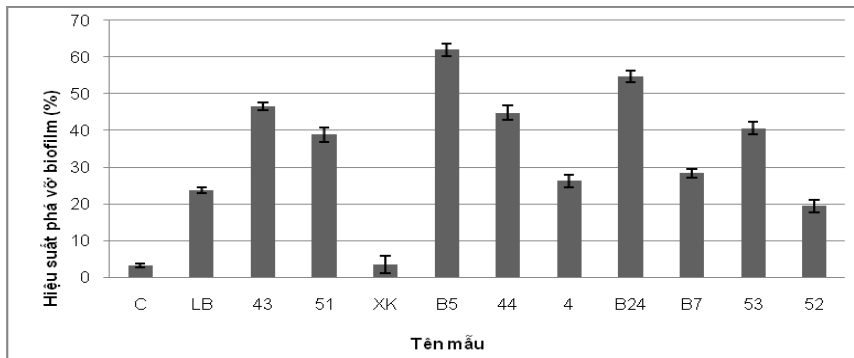
Tách chiết DNA tổng số, PCR và giải trình tự đoạn gen 16S rRNA

DNA tổng số của chủng vi sinh vật lựa chọn được tách chiết, nhân đoạn gen 16S rRNA (có kích thước 1500 bp) với cặp mồi đặc hiệu 27f (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1527r (5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3'), thành phần phản ứng PCR, quy trình tinh sạch sản phẩm PCR và xây dựng cây phát sinh chủng loại được thực hiện theo mô tả của Cung Thị Ngọc Mai và đồng tác giả (2010).

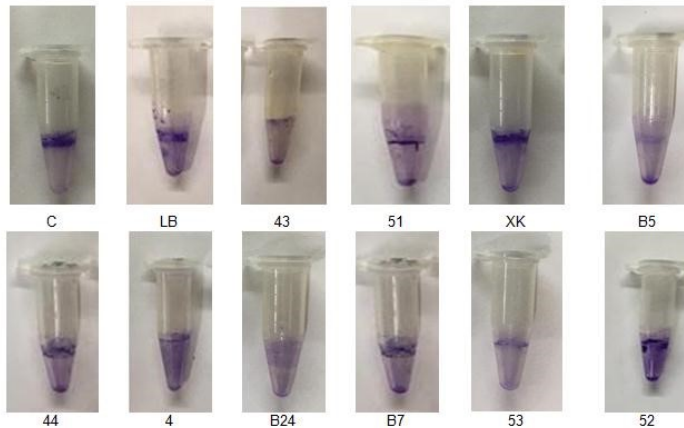
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khả năng phá vỡ biofilm của các chủng vi sinh vật

Để đánh giá khả năng phá vỡ biofilm thì trước tiên, 2 chủng T3 và T23 được tiến hành tạo biofilm trên các ống eppendorf 1,5 mL sau 48 giờ nuôi lắc với tốc độ 100 vòng/phút. Dịch nuôi thô của 11 chủng vi sinh vật thử nghiệm được bổ sung vào biofilm và lắc với tốc độ 100 vòng/phút. Sau 3 giờ các mẫu được lấy ra để thử khả năng phá vỡ biofilm bởi các dịch nuôi thô này. Kết quả được chỉ ra ở Hình 1 và Hình 2.



Hình 1. Hiệu suất phá vỡ biofilm bởi dịch thô vi sinh vật sau 3 giờ xử lý



Hình 2. Khả năng bắt màu tím tinh thể của các mẫu biofilm sau 3 giờ bị phá vỡ

Từ kết quả Hình 1 và Hình 2 có thể thấy rằng, so với mẫu C đối chứng được tạo từ 2 chủng vi khuẩn tạo màng tốt là T3 và T23 khi không được xử lý thì trong 11 chủng thử nghiệm thì các chủng B5, B24, 43, 53 và 51 có khả năng phá vỡ biofilm tốt hơn hẳn các chủng còn lại. Trong đó, chủng B5 có khả năng phá vỡ biofilm 62%, chủng B24 có khả năng phá vỡ biofilm 52,7% sau 3 giờ xử lý. Chủng xạ khuẩn XK có khả năng phá vỡ biofilm thấp nhất, chỉ đạt 3,48% và các chủng còn lại phá vỡ biofilm từ 19,4 - 28,3%.

Hoạt tính sinh một số enzyme phân giải các hợp chất hữu cơ

Trong các đường ống thoát nước sinh hoạt, ngoài biofilm do các chủng vi sinh vật hình thành còn có các hợp chất hữu cơ như protein, α -amylase, cellulose từ các nguồn thực phẩm dư thừa trong quá trình sử dụng. Do vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi cũng tiến hành thử hoạt tính sinh một số enzyme phân giải các hợp chất hữu cơ đó bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch với các cơ chất tương ứng là casein, tinh bột tan và CMC. Kết quả cho thấy, trong các chủng thử nghiệm thì chủng B5 có hoạt tính cả 3 loại enzyme mạnh nhất, tiếp đó là chủng B7. Riêng chủng B24 và XK không có hoạt tính cả 3 loại enzyme thử nghiệm (Bảng 1).

Bảng 1. Đường kính vòng phân giải cơ chất của một số enzyme

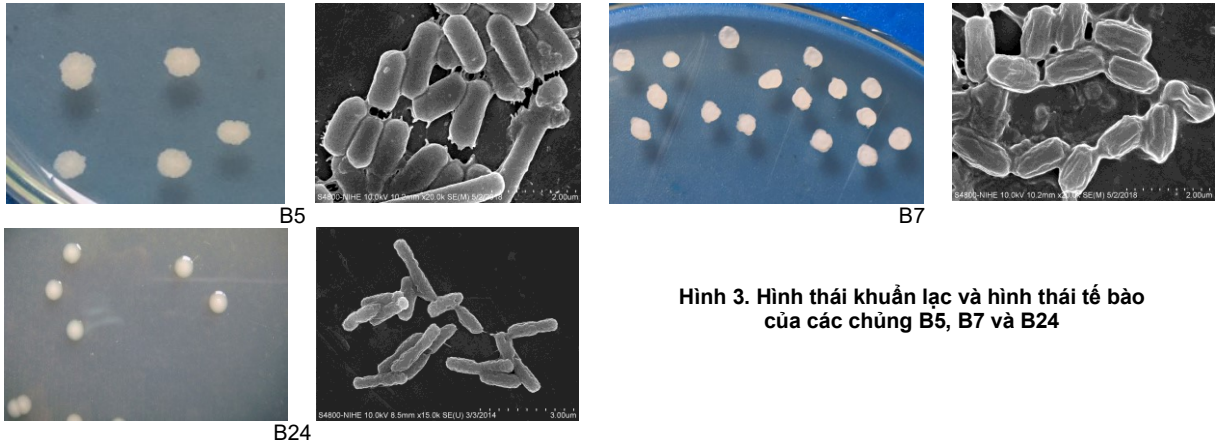
TT	Ký hiệu chủng	Tên enzyme			TT	Ký hiệu chủng	Tên enzyme		
		Protease	Cellulase	α -amylase			Protease	Cellulase	α -amylase
1	C	0,6	0,6	0,6	7	52	1,2	1,1	0,6
2	B24	0,6	0,6	0,6	8	53	1,1	1,2	0,6
3	4	1,1	0,9	0,6	9	B7	1,7	1,8	0,6
4	43	1,3	1,2	0,6	10	B5	2,2	2,2	1,3
5	44	1,1	1,4	0,6	11	LB	0,6	1,4	0,6
6	51	1,1	0,8	0,6	12	XK	0,6	0,6	0,6

Từ các kết quả trên có thể thấy rằng, chủng B5 có khả năng phá vỡ biofilm và hoạt tính sinh cả 3 loại enzyme tốt nhất, chủng B7 mặc dù có hoạt tính sinh enzyme chỉ kém chủng B5 và cao hơn các chủng còn lại, tuy nhiên khả năng phá vỡ biofilm chỉ đạt 28,3%. Chủng B24 không có hoạt tính sinh các loại enzyme nhưng có khả năng phá

vỡ biofilm cao chỉ sau chủng B5. Bên cạnh đó, cả 3 chủng này không đối kháng lẫn nhau nên việc sử dụng kết hợp cả 3 chủng này không chỉ có khả năng phá vỡ biofilm mà còn có khả năng phân giải các hợp chất hữu cơ tại các đường ống thoát nước thải và 3 chủng này đã được chúng tôi lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

Hình thái khuẩn lạc, hình thái tế bào

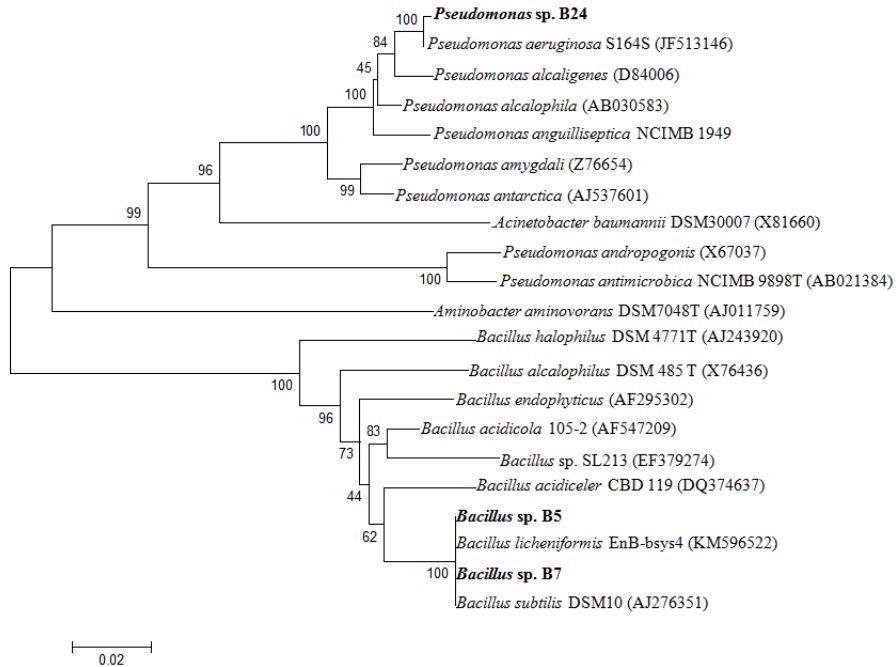
Khuẩn lạc chủng vi khuẩn B5 màu trắng đục, phẳng, mọc lan, kích thước từ 1 - 2 mm; dưới kính hiển vi điện tử quét, tế bào dạng hình que, bề mặt nhẵn, kích thước (1,3 - 1,5) x (0,4 - 0,6) µm. Chủng B7 khuẩn lạc màu trắng đục, khô, mọc lan, bề mặt nhẵn nheo, kích thước từ 3 - 4 mm; dưới kính hiển vi điện tử quét, tế bào dạng hình que ngắn, bề mặt hơi xù xì, kích thước (0,6 - 0,7) x (1,4 - 1,5) µm. Chủng B24 màu trắng đục, lồi, bóng, đường kính từ 1 - 2 mm; dưới kính hiển vi điện tử quét, tế bào dạng hình que ngắn, bề mặt hơi xù xì, kích thước (2,4 - 2,6) x (0,3 - 0,5) µm (Hình 3).



Hình 3. Hình thái khuẩn lạc và hình thái tế bào của các chủng B5, B7 và B24

Tách chiết DNA tổng số, PCR và giải trình tự đoạn gen 16S rRNA

Để phân loại phân tử vi khuẩn thì việc tách chiết DNA là một việc làm cần thiết. DNA của vi khuẩn được tách chiết và nhân đoạn gen 16S rRNA với cặp mồi đặc hiệu. Tiếp đó, trình tự đoạn gen 16S rRNA được xử lý bằng phần mềm Bioedit và so sánh với các trình tự đoạn gen khác trên NCBI. Các trình tự so sánh cũng được xử lý trên phần mềm tin sinh Clustal X và sử dụng phần mềm Mega4 để xây dựng cây phát sinh chủng loại (Hình 4).



Hình 4. Cây phát sinh chủng loại của các chủng B5, B7 và B24

Dựa trên kết quả Hình 4 nhận thấy, trình tự gen 16S rRNA của 2 chủng B5 và B7 có quan hệ gần gũi với các chủng thuộc chi *Bacillus*, đặc biệt có độ tương đồng cao tới 99% với chủng *Bacillus licheniformis* EnB-bsys4 (KM596522)

và *Bacillus subtilis* DSM10 (AJ276351). Chủng B24 có độ tương đồng lên tới 99% với chủng *Pseudomonas aeruginosa* S164S (JF513146). Do vậy, 3 chủng này được đặt tên lần lượt là *Bacillus* sp. B5, *Bacillus* sp. B7 và *Pseudomonas* sp. B24.

Các nghiên cứu trên thế giới đã chỉ ra rằng, dịch nuôi cấy của nhiều chủng vi sinh vật có khả năng phá vỡ biofilm do các chủng vi sinh vật khác tạo thành bởi chúng có khả năng phân hủy các thành phần cấu thành nên lớp EPS bảo vệ tế bào vi sinh vật. Trong các dịch nuôi cấy đó, protease là 1 trong những enzyme phổ biến có khả năng phân hủy protein – là 1 trong những thành phần cấu thành chủ yếu lớp EPS. Monnappa và đồng tác giả (2014) đã sử dụng 10% dịch nuôi (v/v) loài *Bdellovibrio bacteriovorus* chứa 2 loại enzyme là protease và DNase có khả năng ức chế tới 75% biofilm của *Staphylococcus aureus*. Các protease như: aureolysin, proteinase K, protease spl, prothopain A và B khác có vai trò làm phân tán các tế bào trong biofilm (Fleming *et al.*, 2017). LasB elastase và Esp serine protease được tìm thấy lần lượt trong dịch nuôi loài *Pseudomonas aeruginosa* và *Staphylococcus cholerae* đều có khả năng ức chế và phá hủy các biofilm của *S. aureus* khi nó đã được hình thành (Park *et al.*, 2012).

Bên cạnh các loại enzyme có khả năng phá vỡ biofilm kể trên thì các hợp chất khác như: α -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-glycerol-phosphate- 1 loại polysaccharide được tìm thấy trong dịch nuôi cấy loài *Bacillus licheniformis* có khả năng ức chế biofilm đối với nhiều nhóm vi sinh vật đặc biệt là *Escherichia coli* PHL628 and *Pseudomonas fluorescens* (Sayem *et al.*, 2011). Methyl anthranilate - một hợp chất hữu cơ vòng thơm được tổng hợp từ quá trình lên men 2 loài *Escherichia coli* và *Corynebacterium glutamicum* có khả năng ức chế và phá vỡ biofilm trên nhiều loài vi khuẩn khác nhau như: *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio vulnificus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella enterica*,... do nó làm giảm nồng độ c-di-GMP nội bào và tăng khả năng di động của các tế bào vi khuẩn trong biofilm từ đó gây ra sự phá vỡ biofilm (Lee *et al.*, 2019; Luo *et al.*, 2019). Nghiên cứu mới nhất của Li và đồng tác giả (2020) cho thấy, khi sử dụng 0,5 μ l/mL methyl anthranilate thì hợp chất này có khả năng làm giảm 51,44% biofilm do *Aeromonas sobria* tạo thành.

Như vậy, có thể thấy rằng, dịch nuôi cấy của các chủng vi sinh vật mà chúng tôi lựa chọn có vai trò nhất định trong quá trình phá vỡ biofilm. Trong dịch nuôi đó có thể chứa các enzyme phân giải các thành phần cấu thành nên EPS hay các hợp chất hữu cơ khác có khả năng làm giảm khả năng liên kết, tăng khả năng di động của các tế bào vi khuẩn trong biofilm từ đó gây ra sự phá vỡ biofilm. Tuy nhiên để có thể khẳng định được chính xác yếu tố nào phá hủy biofilm của các chủng vi sinh vật thì cần có các nghiên cứu chuyên sâu hơn.

KẾT LUẬN

Từ 11 chủng vi sinh vật trong bộ sưu tập chủng giống, chúng tôi đã tuyển chọn được 3 chủng vi khuẩn, trong đó chủng *Bacillus* sp. B5, *Pseudomonas* sp. B24 và *Bacillus* sp. B7 có khả năng phá vỡ biofilm lần lượt là 62; 52,7 và 28,3%. Trong 3 chủng vi khuẩn này, chủng *Bacillus* sp. B5 và chủng *Bacillus* sp. B7 có hoạt tính enzyme phân giải các hợp chất hữu cơ là protease, cellulose và amylase cao. Do vậy, khi sử dụng kết hợp 3 chủng này không những có thể phá vỡ biofilm mà còn khả năng phân hủy các hợp chất hữu cơ trong các mảng bám tại các đường ống thoát nước sinh hoạt.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ Đề tài cơ sở năm 2020 mã số CS20-18 do Viện Công nghệ Sinh học tài trợ và sử dụng các trang thiết bị tại Phòng Công nghệ sinh học Môi trường, Viện Công nghệ Sinh học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, Marrie TJ (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* 41: 435-464.
- Cung Thị Ngọc Mai, Trần Hải Đăng, Nguyễn Văn Bắc, Nghiêm Ngọc Minh (2010). Khả năng phân hủy hydrocarbon thơm đa nhân và phenol của chủng vi khuẩn BTL11 phân lập từ nước thải khu công nghiệp. *Tạp chí Công nghệ sinh học* 8(3B): 173.
- Fleming D, Chahin L, Rumbaugh K (2017). Glycoside hydrolases degrade polymicrobial bacterial biofilms in wounds. *Antimicrob Agents Chemother* 61.
- Kaplan JB, Ragunath C, Ramasubbu N, Fine DH (2003). Detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm cells by an endogenous β -hexosaminidase activity. *J Microbiol* 185(16): 4693-4698.
- Lee LH, Kim SY, Kim JE, Han YD, Kim BG, Ahn JH (2019). Synthesis of methylated anthranilate derivatives using engineered strains of *Escherichia coli*. *J Microbiol Biotechnol* 29(6): 839-844.
- Li T, Sun X, Chen H, He B, Mei Y, Wang D, Li J (2020). Methyl anthranilate: A novel quorum sensing inhibitor and anti-biofilm agent against *Aeromonas sobria*. *Food Microbiol* 86: 103356.
- Luo WZ, Cho SJ, Lee YS (2019). Microbial production of methyl anthranilate, a grape flavor compound. *Appl Biol Sci* 116(22): 10749-1075.

Morikawa M, Kagihiro S, Haruki M, Takano K, Branda S, Kolter R, Kanaya S (2006). Biofilm formation by a *Bacillus subtilis* strain that produces gamma-polyglutamate. *Microbiol* 152: 2801.

Park JH, Lee JH, Cho MH, Herzberg M, Lee J (2012). Acceleration of protease effect on *Staphylococcus aureus* biofilm dispersal. *FEMS Microbiol Lett* 335: 31-38.

Pitts B, Hamilton MA, Zelter N, Stewart PS (2003). A microtiter plate screening method for biofilms disinfection and removal. *Microbiol Met* 54: 269-276.

Sayem SMA, Manzo E, Ciavatta L, *et al.*, (2011). Anti-biofilm activity of an exopolysaccharide from a sponge-associated strain of *Bacillus licheniformis*. *Microbial cell factories* 10: 74.

Vickery K, Pajkos A, Cossart Y (2004). Removal of biofilms from endoscope: Evaluation of detergent efficacy. *Inf Con* 32: 170-176.

SCREENING BREAKING - BIOFILM AND EXPRESSING ENZYME ABLE TO HYDROLYSE ORGANIC COMPOUND MICROORGANISIMS

Cung Thi Ngoc Mai^{1*}, Do Thi Lien¹, Hoang Phuong Ha^{1,2}, Lê Thi Nhi Cong^{1,2}

¹ Institute of Biotechnology

² Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology,

SUMMARY

At the sewage pipes, there is always plaque from microorganisms and the adhesion of numerous organic compounds, grease and other solids. The adhesion formed by microbe is the biofilm containing mainly polysaccharide, protein and/or extracellular DNA leading to terrible odors and clogging of drainage pipes. The fluid culture of many microorganisms is capable of breaking down biofilm produced by other microorganisms because they can decompose the layer of protein, polysaccharides or extracellular DNA forming biofilm. In this study, we screened three out of eleven strains of microorganisms whose cultures were either capable of breaking the assumed biofilm or producing some enzymes that degrade organic compounds. Among the three selected strains, B5 strain has the highest enzyme activity such as protease, amylase, cellulase and has the ability to break 62% of biofilm; the strain of B7 has the activity of producing enzymes less than B5 strain and the ability to break biofilm reaches 28.3%. Although the enzyme activity of B24 strain is not high but the biofilm breaking performance also reached 54.7%. By observing morphology and comparing the sequences of 16S rRNA gene with other gene sequences on National Center for Biotechnology Information (NCBI), B5 and B7 strains were closed with *Bacillus* genus; B24 strain was closed with the bacterial strains of genus *Pseudomonas*. Therefore, these three strains were named *Bacillus* sp. B5, *Bacillus* sp. B7 and *Pseudomonas* sp. B24, respectively. The results from this study provide us with a new perspective on the role of the compound due to the biosynthetic bacteria being able to eliminate biofilm in the future.

Keywords: Biofilm, breaking biofilm, enzyme, plaque, sewage pipes.

* Author for correspondence: Tel: + 84-936321112; Email: cungngocmai@gmail.com/cnmai@ibt.ac.vn