NGHIÊN CỨU SÀNG LỌC HOẠT TÍNH KHÁNG VI SINH VẬT KIỂM ĐỊNH VÀ SINH ENZYME PHÂN GIẢI CHẤT HỮU CƠ CỦA CÁC CHỦNG VI NẤM PHÂN LẬP TỪ TRẦM TÍCH VÙNG BIỂN QUẢNG BÌNH

Vũ Thị Thu Huyền*, Nguyễn Mai Anh, Lê Thị Hồng Minh

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

TÓM TẮT

Trầm tích biển là bề mặt giàu dinh dưỡng, tốt cho vi sinh vật nói chung, vi nấm nói riêng, sinh trưởng và phát triển. Các chất chuyển hóa thứ cấp được phân lập từ vi nấm biển được báo cáo có hoạt tính sinh học đáng kể về mặt sinh dược phẩm, bao gồm kháng sinh, kháng virus, chống oxy hóa và chống viêm.

Trong nghiên cứu này, từ 3 mẫu trầm tích thu được ở vùng biển Quảng Bình, 13 chủng vi nấm đã được phân lập và thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định bằng phương pháp đục lỗ thạch. Kết quả cho thấy, 3 chủng có khả năng kháng vi sinh vật kiểm định tốt nhất là chủng M6, M7 và M16 với đường kính kháng *Candida albicans* ATCC1023 tương ứng là 26 mm, 14 mm, 6 mm; kháng *Staphylococcus aureus* ATCC25923 tương ứng là 25 mm, 13 mm, 6 mm; chủng M6 kháng *Bacillus cereus* ATCC13245 với đường kính kháng khuẩn 12 mm.

Ngoài ra, cả 3 chủng này đều biểu hiện khả năng sinh enzyme phân giải cơ chất với mức độ khác nhau. Từ một số đặc điểm hình thái và kết quả xác định trình tự gene 18S rRNA, cho thấy chủng M6 thuộc chi *Penicillium*, M7 và M16 đều thuộc chi *Aspergillus*. Cây phát sinh chủng loại của M6, M7, M16 được xây dựng bằng phần mềm MegaX. Trình tự 18S rRNA của các chủng đã được đăng kí trên GENBANK với các mã số: PP425224 (*Aspergillus* sp. strain M7), PP425226 (*Aspergillus* sp. strain M16), PP425221 *(Penicillium* sp. strain M6). Kết quả của nghiên cứu sẽ là tiền đề cho việc nghiên cứu các hợp chất thứ cấp từ sinh khối lên men lượng lớn của các chủng tiềm năng này, nhằm phát hiện các chất sạch có hoạt tính kháng sinh, gây độc tế bào cao có giá trị ứng dụng trong thực tiễn và là hướng nghiên cứu cần thiết, hứa hẹn nhiều triển vọng.

Từ khóa: Aspergillus, enzyme phân giải cơ chất, vi nấm biển, hoạt tính kháng khuẩn, *Penicillium*, trầm tích.

MỞ ĐẦU

Vi nấm có nguồn gốc từ môi trường biển rất cần thiết trong quá trình tuần hoàn các chất hữu cơ hòa tan. Chúng đã được tìm thấy ở mọi ngóc ngách của đại dương, từ vùng nước nông đến sâu, từ vùng nước mặt, đầm lầy đến trầm tích hoặc cộng sinh cùng tảo, động vật giáp xác, động vật thân mềm, san hô, bọt biển, động, thực vật biển…

Trước đây, vi nấm biển chưa được quan tâm nhiều. Gần đây, việc sử dụng các phương pháp nuôi cấy độc lập để nghiên cứu và các phương pháp giải trình tự thế hệ mới đã cho thấy sự đa dạng của vi nấm (Amend *et al*., 2019). Theo báo cáo mới nhất trên www.marinefungi.org đến ngày 05/03/2024, có 2041 loài vi nấm biển phân bố ở 814 chi, 278 họ, 107 bộ, 34 lớp và 10 ngành thuộc *Aphelidiomycota, Ascomycota, Basidiomycota, Blastocladiomycota, Chytridiomycota, Mortierellomycota* và *Mucoromycota*. Các số liệu trên được ghi nhận từ vật liệu sinh bào tử trong vật liệu ngập trong nước biển (gỗ trôi dạt và bám vào, lá mục, quả mục…), các loại vi nấm phân lập từ nước biển, bùn, đất, trầm tích biển sâu và rừng ngập mặn, vi nấm nội sinh phân lập từ các loại mẫu biển như tảo, san hô, hải miên và các bộ phận ngập nước của thực vật ngập mặn và ký sinh trên sinh vật phù du ở thảm cỏ biển.

Mặc dù sự tiến bộ của công nghệ sinh học phân tử với kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới và metagenomic chắc chắn đã cải thiện sự hiểu biết của chúng ta về vi nấm biển, nhưng việc phân lập, nuôi cấy vi nấm biển sống rất quan trọng để nghiên cứu sinh học tế bào, vai trò sinh thái, sự tiến hóa cũng như tách chiết các chất chuyển hóa thứ cấp từ vi nấm.

Năm 1945, vi nấm biển bắt đầu thu hút sự chú ý khi một nhóm kháng sinh β-lactam được phân lập từ loài *Cephalosporium chrysogenum* (Carroll *et al*., 2019). Các chất chuyển hóa thứ cấp được phân lập từ vi nấm biển có hoạt tính sinh học đáng kể về mặt dược phẩm, bao gồm ức chế tế bào ung thư, kháng sinh, kháng virus, chống oxy hóa và chống viêm. Những chất chuyển hóa này có thể được sử dụng trong y tế, dược phẩm, nông nghiệp và mỹ phẩm. Mặt khác, vi nấm biển có thể biểu hiện sản xuất một số enzyme có hoạt tính xúc tác (ví dụ: catalase, laccase, protease, cellulase và peroxidase) nên chúng còn hỗ trợ xử lý sinh học trong quá trình phân giải các hợp chất hữu cơ (Zeghal *et al*., 2021).

Mặc dù những nỗ lực lớn đã được thực hiện để nuôi trồng vi nấm biển từ giữa thế kỷ 19, nhiều hợp chất thứ cấp phức tạp và có hoạt tính sinh học đã được chiết xuất từ vi nấm biển và số lượng các chất chuyển hóa thứ cấp

mới từ vi nấm biển được phát hiện ngày càng gia tăng. Tuy nhiên, các nhà khoa học cho rằng, các loài vi nấm được ghi nhận từ môi trường biển vẫn còn rất thấp so với tổng số lượng vi nấm được mô tả và ước tính, vai trò chức năng của các loại vi nấm trong hệ sinh thái biển vẫn chưa được nghiên cứu rõ ràng và hầu hết tiềm năng của vi nấm biển còn chưa được khám phá (https://marinefungi.org) .

Vi nấm là sinh vật đầu tiên phân giải lignin và chuyển nó thành carbon dioxide và nước, dẫn đến sự tái phân phối carbon toàn cầu (Amend *et al*., 2019). Nghiên cứu sinh học về vi nấm biển đã cho phép xác định một số chất chuyển hóa có hoạt tính kháng khuẩn, có tác dụng chống lại các chủng đa kháng thuốc. Nhiều hợp chất hoạt tính sinh học khác đã tiếp tục được phân lập từ vi nấm biển: Hơn 3.500 chất chuyển hóa thứ cấp của vi nấm biển đã được báo cáo (Carroll *et al*., 2019). Cephalosporin C là kháng sinh phổ rộng được coi là thuốc có nguồn gốc phân lập từ vi nấm biển *Acremonium chrysogenum* thu được trong mẫu nước thải từ bờ biển Sardinia vào năm 1940 và hợp chất Plinabulin (lớp diketopiperazine) được phân lập từ một loại vi nấm biển (*Aspergillus* sp.) đang trong giai đoạn thử nghiệm lâm sàng của Beyond Spring Pharmaceuticals (Papon *et al*., 2019). Việc chiết xuất các hợp chất hóa sinh dược phẩm từ thực vật hoặc các nguồn sinh vật vĩ mô, cần phải khai thác lượng lớn nguyên liệu, có thể gây đến việc mất cân bằng sinh thái và đe dọa đến việc bảo tồn sinh vật quý hiếm. Trong khi đó, ở quy mô công nghiệp vi sinh vật có thể đạt được sinh khối mong muốn để tổng hợp sản phẩm bằng cách tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy. Vì vậy, công việc nghiên cứu vi sinh vật nói chung và vi vi nấm nói riêng rất có ý nghĩa trong việc bảo vệ nền kinh tế đại dương bền vững nhằm tìm kiếm, phát triển các loại thuốc thay thế theo hướng thân thiện với môi trường.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu nghiên cứu: Ba mẫu trầm tích được lấy tại các tọa độ khác nhau bằng phương pháp dùng cuốc và SCUBA từ đáy vùng biển Quảng Bình, được lưu giữ lạnh trong glycerol 30% tại phòng Công nghệ Sinh học, viện Hóa sinh biển. Các mẫu trầm tích được thừa kế từ đề tài "Nghiên cứu phát hiện các hợp chất kháng lao và kháng sinh từ nguồn vi sinh vật đáy biển vùng biển trung bộ (Vùng biển Bắc trung bộ đến Trung trung bộ, Việt Nam).

Các chủng vi sinh vật kiểm định: Vi khuẩn Gram - (*Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Salmonella enterica* ATCC13076), vi khuẩn Gram + (*Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC 14579) và chủng vi nấm men *Candida albicans* ATCC1023, trong bộ sưu tập các chủng vi khuẩn kiểm định phòng Công nghệ sinh học, Viện Hóa sinh biển, VAST.

Hóa chất, sinh phẩm và môi trường: Hóa chất và sinh phẩm được sử dụng trong nghiên cứu được mua từ các hãng Sigma, Merck, Invitrogen, Himedia.

- Trình tự cặp mồi khuếch đại gen 18S rRNA (Tham khảo Daniel *et al*., 2022):

NS3F (5'-GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC-3')

NS8R (5'-TCCGCAGGTTCACCTACGGA-3').

- Môi trường phân lập vi nấm:

A1 (g/L): Tinh bột hòa tan: 10, chiết xuất vi nấm men: 4, peptone: 2, muối biển nhân tạo: 30; M1 (g/L): Tinh bột hòa tan: 1, chiết xuất vi nấm men: 0.4, peptone: 0.2, muối biển nhân tạo: 30; SWA (g/L): Muối biển nhân tạo: 30; SCA: Muối biển nhân tạo: 30 g/L, $CaCO_3$: 2 mg/L, $FeSO_4.7H_2O$: 10 mg/L, $MgSO_4.7H_2O$: 50 mg/L, casitone: 300 mg/L, K_2HPO_4: 2 g/L, KNO_3: 2 g/L; NZSG (g/L): Tinh bột hòa tan: 20, chiết xuất vi nấm men: 5, glucose: 10, NZ amin A: 5, muối biển nhân tạo: 30; PMDA (g/L): Chiết xuất khoai tây: 30, dextrose: 20, mạch nha: 10; muối biển nhân tạo: 30; PDA (g/L): Chiết xuất khoai tây: 30, dextrose: 20; muối biển nhân tạo: 30; ISP1 (g/L): casiton: 5, chiết xuất men: 3, đại dương hòa tan: 30; ISP2 (g/L): Tinh bột hòa tan: 5, chiết xuất vi nấm men: 2, glucose: 10, chiết xuất mạch nha: 10, muối biển nhân tạo: 30.

Môi trường LB nuôi cấy vi sinh vật kiểm định (g/L): Cao vi nấm men: 10; Peptone: 20; NaCl: 10.

Môi trường xác định hoạt tính enzyme ngoại bào (g/L): Muối biển nhân tạo: 30; cơ chất tương ứng: 2.

Các môi trường được điều chỉnh đến pH 7.0 ± 0.2. Môi trường đặc bổ sung agar 16 g/L.

Phương pháp nghiên cứu (Nguyễn Lân Dũng *et al*., 2001; Honghua *et al*., 2023, Ole *et al.,* 2019).

Phân lập vi nấm: Cân 1 g mẫu trầm tích, bổ sung 9 mL nước muối sinh lý, votex đều và lắc trên máy lắc trong 30'. Dùng pipette vô trùng hút 0.5 mL dịch sang ống nghiệm có chứa 4,5 mL nước muối sinh lý và tiếp tục pha loãng đến 10^{-2}, 10^{-3}. Từ mỗi nồng độ pha loãng, nhỏ 0,1 mL dịch sang đĩa peptri chứa môi trường phân lập có bổ sung kháng sinh polymyxin B sulfate với nồng độ 25 mg/L, ủ đĩa ở nhiệt độ 28^oC trong 14 - 28 ngày.

Khảo sát hoạt tính kháng vi sinh vật gây bệnh bằng khuếch tán trên đĩa thạch: Khuẩn lạc vi nấm sạch, cấy chuyển vào môi trường PDA lỏng, nuôi lắc qua đêm trên máy lắc 170 rpm trong 14 ngày, li tâm thu dịch trong, nhỏ 0.15 mL vào lỗ thạch đã đục sẵn trong đĩa peptri đã cấy trải 10^8 CFU vi sinh vật kiểm định (đã được nuôi lắc trong môi trường LB 170 rpm/ 16 h). Đĩa khi hoàn thành, giữ yên 30 phút tại nhiệt độ phòng, sau đó được đem đi nuôi ấm ở 37^oC. Quan sát kết quả vòng phân giải cơ chất sau 16 h.

Xác định khả năng sinh enzyme của các chủng vi nấm: Vi nấm tiết ra enzyme amylase, protease, cellulase, các enzyme này khuếch tán ra xung quanh khuẩn lạc, phân giải cơ chất tinh bột, protein, CMC tương ứng có trong môi trường. Khi nhỏ dung dịch thuốc thử lugol, khu vực xung quanh khuẩn lạc vi nấm không còn cơ chất (đã bị enzyme tiết ra từ vi nấm phân giải) sẽ có màu trong.

Định danh vi nấm: Phương pháp tách chiết DNA tổng số gồm 3 giai đoạn cơ bản: phá vỡ màng tế bào và màng nhân, loại protein, tủa DNA. DNA tổng số sẽ được sử dụng để làm khuôn khuếch đại lượng lớn đoạn gen 18S rRNA của vi nấm có kích thước khoảng 1300 bp. Thành phần PCR (µL): Temp: 1; 18sFP: 1; 18sRP: 1; H_2O: 9.5; Master Mix 2X: 12.5. Chu kì nhiệt của phản ứng: 94^oC - 2', (94^oC - 1', 62^oC - 1', 72^oC - 1'20'') × 30 chu kỳ, 72^oC - 8', kết thúc ở 4^oC. Sản phẩm khuếch đại được kiểm tra bằng cách chạy điện di trên gel agarose để phát hiện đoạn DNA đặc hiệu. Trình tự của gen được xác định theo phương pháp của Sanger. Trình tự thô được ráp và hiệu chỉnh với phần mềm Bioedit 7.2. Trình tự DNA được so sánh trong BLAST để tìm ra độ tương đồng của chủng nghiên cứu với các dữ liệu đã được công bố trên GenBank. Cây phát sinh loài được xây dựng dựa vào phần mềm MegaX.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập vi nấm biển: Các mẫu trầm tích được lấy tại các tọa độ và độ sâu khác nhau tại vùng đáy biển Quảng Bình, Việt Nam. Mẫu được xử lý, cấy trải trên các môi trường phù hợp, đĩa phân lập được nuôi trong tủ ổn nhiệt 28^oC, từ 14-28 ngày, hàng ngày quan sát sự phát triển các khuẩn lạc, đánh dấu, ghi chép thông số. Tiến hành lựa chọn các khuẩn lạc riêng rẽ và quan sát bằng mắt thường thấy có sự khác nhau của các mẫu. Tổng số 13 chủng có hình thái tế bào giống vi nấm đã thu nhận được và có màu sắc hệ khuẩn ty rất đa dạng. Trong đó nhóm khuẩn lạc thuộc nhóm màu xám, xanh rêu và trắng vẫn chiếm ưu thế. Sự khác biệt về màu sắc của hệ khuẩn ty có thể do nhiều nguyên nhân như: điều kiện tự nhiên, độ mặn, pH,… Các chủng này được nuôi trong môi trường PDA và thử hoạt tính kháng khuẩn và hoạt tính sinh enzyme.

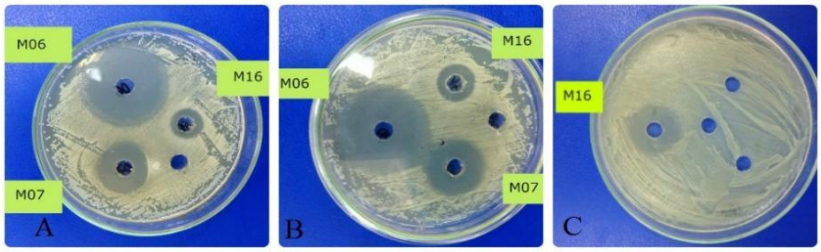
Khảo sát hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định: Kết quả thử hoạt tính kháng một số vi sinh vật kiểm định của các chủng chọn lựa được trình bày ở Bảng 1 và Hình 1.

Bảng 1. Kết quả thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định

STT	Tên chủng	Đường kính kháng các vi sinh vật kiểm định (D-d=mm)						
		Escherichia coli	***Pseudomonas aeruginosa***	***Salmonella enterica***	***Enterococcus faecalis***	***Staphylococcus aureus***	***Bacillus cereus***	***Candida albicans***
1	M1	-	-	-	-	10	-	-
2	M2	-	-	-	-	-	-	-
3	M3	-	-	-	-	-	11	-
4	M4	-	-	-	-	-	-	-
5	M5	-	12	-	-	-	-	-
6	M6	-	-	-	-	25	-	26
7	M7	-	-	-	-	13	-	14
8	M8	13	-	-	-	-	6	-
9	M9	-	-	-	-	-	-	-
10	M13	-	-	-	-	-	-	-
11	M16	-	-	-	-	6	12	6
12	M19	-	-	-	-	-	-	-
13	M21		-	-	-	5	-	6

(-): không thể hiện hoạt tính

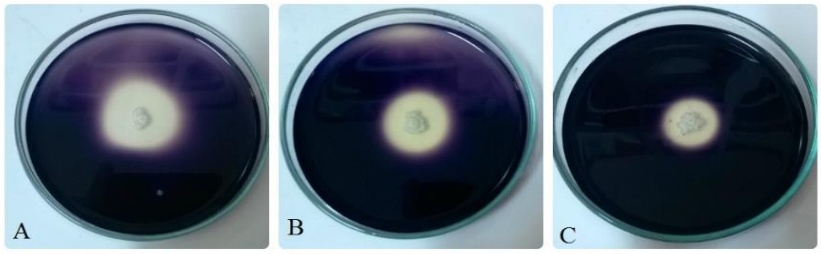
Kết quả thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của các chủng nghiên cứu cho thấy, 9/13 chủng phân lập đều có hoạt tính kháng chủng gây bệnh, nhưng khả năng kháng của các chủng là rất khác nhau. Trong đó, 3 chủng M6, M7 và M16 có khả năng kháng các tác nhân gây bệnh mạnh nhất. Các chủng này được lựa chọn cho nghiên cứu tiếp theo.



Hình 1. Hình ảnh thử hoạt tính kháng VSVKĐ

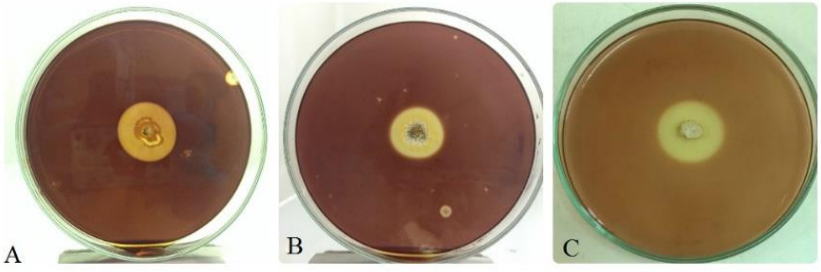
A: Kết quả thử hoạt tính kháng Stapphylococcus aureus của 3 chủng M6, M7 và M16; B: Kết quả thử hoạt tính kháng Candida albicans của 3 chủng M6, M7 và M16. C: Kết quả thử hoạt tính kháng Bacillus cereus của chủng M16.

Thử hoạt tính phân giải cơ chất (Casein, CMC, Tinh bột): Kết quả thử hoạt tính sinh enzyme phân giải cơ chất của 3 chủng tiềm năng được thể hiện qua Hình 2, 3, 4.



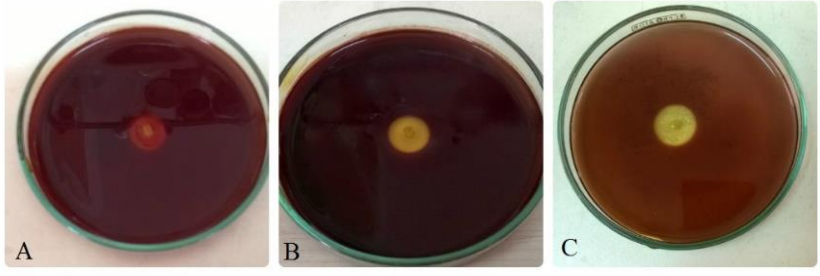
Hình 2. Hình ảnh thử khả năng phân giải tinh bột

A: Khả năng phân giải tinh bột tan của chủng M6 (16 mm); B: Khả năng thủy phân tinh bột tan của chủng M7 (12 mm); C: Khả năng thủy phân tinh bột tan của chủng M16 (7 mm)



Hình 3. Hình ảnh thử khả năng phân giải casein

A: Khả năng phân giải casein của chủng M6 (13 mm); B: Khả năng phân giải casein của chủng M7 (11 mm); C: Khả năng phân giải casein của chủng M16 (13 mm)

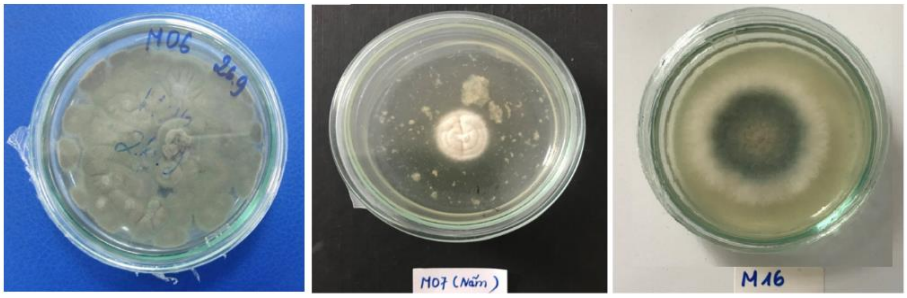


Hình 4. Hình ảnh thử khả năng phân giải cellulose

A: Chủng M6 (9 mm); B: Chủng M7 (10 mm); C: Chủng M16 (11 mm)

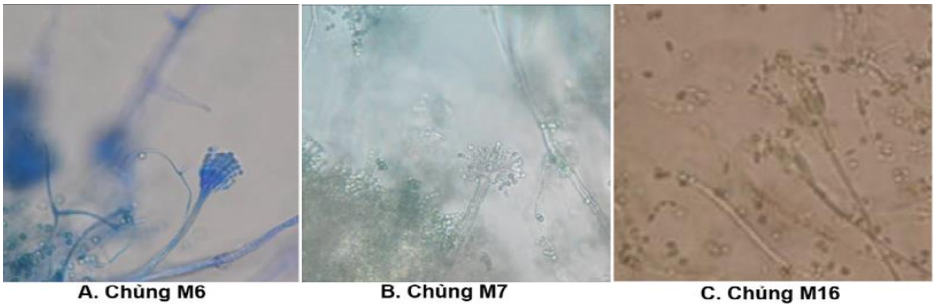
Kết quả thử nghiệm cho thấy cả 3 chủng nghiên cứu đều có khả năng sinh enzyme amylase, cellulase, protease khá tốt với các mức độ hoạt tính khác nhau.

Hình thái các chủng được lựa chọn: Một số hình ảnh hình thái 3 chủng tiềm năng được thể hiện qua Hình 5 và 6.



A. Chủng M6 B. Chủng M7 C. Chủng M16

Hình 5. Hình ảnh khuẩn lạc 3 chủng tiềm năng



A. Chủng M6 B. Chủng M7 C. Chủng M16

Hình 6. Một số hình ảnh ở độ phóng đại 1000 lần, quan sát các chủng tiềm năng qua soi kính hiển vi điện tử Japan's Nikon ECLIPSE 80i optical microscope

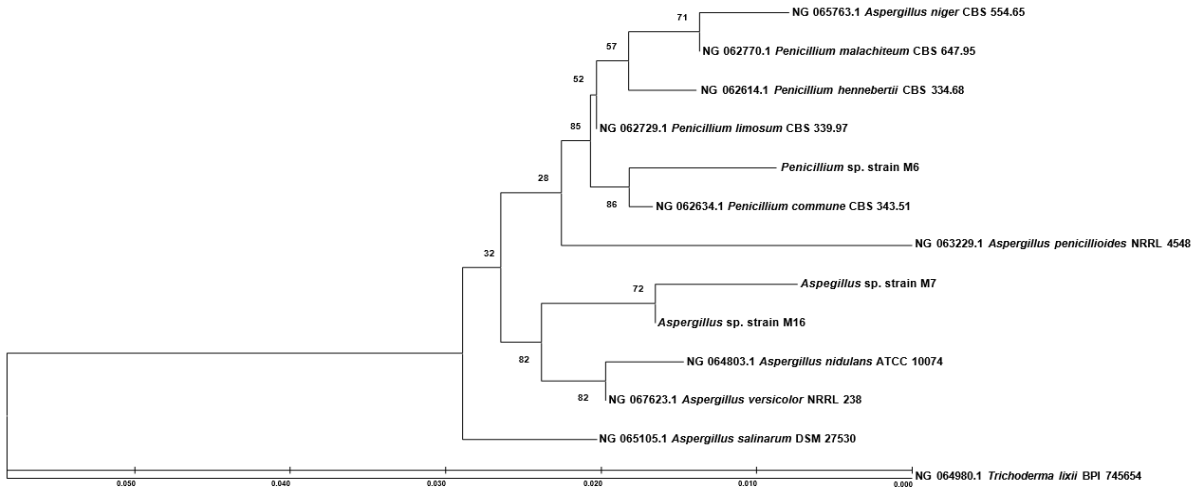
Chủng M6: Khuẩn lạc mọc tương đối nhanh trên môi trường Czapek đạt 4-5 cm/10 ngày ở nhiệt độ 28^{o}C, bề mặt mịn nhung, phân vùng, mép trắng mỏng, màu xanh rêu nhạt sáng xen kẽ các sợi màu nâu trắng; không xuất hiện giọt tiết; mặt trái màu nâu xanh đen. Cuống sinh bào tử được sinh ra từ hệ sợi nền hoặc từ hệ sợi khí sinh, kích thước 50-110 µm x 2.5-3.5 µm, thành nhẵn, tận cùng là chổi gồm 2 vòng thể bình, nhưng thỉnh thoảng có các chổi lớn hơn gồm 2-3 vòng thể bình, đối xứng hoặc không đối xứng; cuống thể bình tạo thành vòng 2-5 cái, kích thước 10-15 µm x 2.5-3.0 µm; thể bình thuôn nhọn ở đỉnh, kích thước thay đổi 10-15 x 2.2-2.5 µm; bào tử hình elip hoặc hạt chanh, 2.5-4.5 x 2.5-3.5 µm, thành dày, nhẵn đến ráp nhẹ, tạo thành cột dài. Các cấu trúc đầu nhỏ sinh bào tử thường được sinh ra có dạng thể bình đơn độc hoặc cấu trúc chổi của chi *Penicillium*.

Chủng M7: Khuẩn lạc trên môi trường Czapek phát triển bình thường, đạt 2,5-3 cm/10 ngày ở 28 ^{o}C. Bề mặt khuẩn lạc phẳng, dạng nhung trắng mịn; giọt tiết không màu đến nâu trắng; mặt trái màu vàng sạm. Cuống sinh bào tử kích thước 140-550 µm x 3,5-8,0 µm, không màu đến nâu nhạt, thành dày, nhẵn. Bọng hình clavat đến gần cầu, kích thước 5.0-16 µm. Thể bình 2 tầng, bao phủ 1/2 đến 3/4 bề mặt bọng. Cuống thể bình 3,2-7.1 µm x 2.5-4.5 µm; thể bình 3.5-6.5 x 2.5-3.0 µm. Bào tử hình gần cầu hoặc cầu, kích thước 3.0-4.0 µm, gai ráp. Tế bào Hüll thỉnh thoảng được sinh ra, hình gần cầu đến cầu, kích thước 8-13 µm.

Chủng M16: Khuẩn lạc trên môi trường Czapek phát triển chậm vừa, đường kính đạt 3.0-4.0 cm/10 ngày ở 28^{o}C, bề mặt bông xốp, giữa màu rêu đậm, viền rộng trắng bông, mặt trái xanh đen. Đầu sinh bào tử hình cột, kích thước 90-280 µm x 4.0-5.5 µm; Các sợi vi nấm bất thụ thường ráp, có các mụn rộp. Cuống sinh bào tử 45-75 µm x 4-6 µm, thành dày, nhẵn; Bọng hình cầu đến gần cầu, đường kính 7-12 µm; thể bình 2 tầng; cuống thể bình 5.5-7.0 µm x 2.5-3.0 µm; thể bình 5-7 x 2-2.5 µm. Bào tử trần hình cầu đến gần cầu, nhẵn đến ráp, 2.5-3.5 µm.

Định danh các chủng lựa chọn: Sau khi kiểm tra định tính kích thước sản phẩm khuếch đại đoạn gen bảo thủ 18S rRNA, bằng điện di trên gel agarose 1%. Sản phẩm khuếch đại gen được tinh sạch để tiến hành đọc trình tự bằng máy ABI PRISM 3100, Applied Bioscience. Trình tự thô được khi xử lý, lắp ráp 2 chiều qua chương trình Bioedit, kết quả nhận được trình tự của đoạn gen 18S rRNA của chủng M6 có độ dài 1185 bp, có tương đồng 99.04% so với trình tự *Penicillium malachiteum* CBS 647.95. Trình tự của đoạn gen 18S rRNA của chủng M7 có độ dài 1183 bp, tương đồng 99.32% với NG_067623.1 *Aspergillus versicolor* NRRL 238. Trình tự của đoạn gen 18S rRNA của chủng M16 có độ dài 1185 bp, tương đồng 99.39% với NG_067623.1 *Aspergillus versicolor* NRRL 238.

Từ kết quả so sánh trình tự gene 18S rRNA của 3 chủng phân lập, cho thấy chủng M7 và chủng M16 thuộc chi *Aspegillus*, chủng M6 thuộc chi *Penicillium*. Bằng phần mềm MegaX, trình tự 18S rRNA của ba chủng tiềm năng được sử dụng để xây dựng cây phát sinh chủng loại. Lịch sử tiến hóa xây dựng cây được suy ra bằng phương pháp Neighbor-Joining với giá trị bootstrap 1000, kết quả được thể hiện trên Hình 7.



Hình 7. Cây phát sinh chủng loại của 3 chủng vi nấm tiềm năng

Từ một số đặc điểm hình thái, kết quả so sánh trình tự gen 18S rRNA và cây phát sinh chủng loại của 3 chủng phân lập, chúng tôi có thể kết luận chủng M6 thuộc chi *Penicillium*, M7 và M16 thuộc chi *Aspergillus*, hai chi này đều là những chi vi nấm lớn, có tầm quan trọng trong môi trường tự nhiên cũng như ứng dụng sản xuất thực phẩm và dược phẩm.

THẢO LUẬN

Vi nấm biển phát triển tốt trên hoặc bên trong các sinh vật sống khác như tảo, động vật giáp xác, động vật thân mềm, san hô và bọt biển, ngay cả ở hố sâu của đại dương. Kết quả nghiên cứu tích cực về vi nấm biển trong những năm gần đây hứa hẹn vi nấm biển sẽ là nguồn cung cấp phong phú để sản xuất các chất chống khối u, kháng virus, kháng vi nấm, và chống viêm, kháng sinh (Zhou *et al.,* 2022). *Aspergillus* biển là nguồn cung cấp các sản phẩm tự nhiên có hoạt tính sinh học quan trọng. Li và đồng nghiệp đã có một nghiên cứu cấu trúc và hoạt động kháng khuẩn của các hợp chất phân lập từ các loài thuộc *Aspergillus* biển khác nhau trong hai năm (tháng 1 năm 2021 - tháng 3 năm 2023), nghiên cứu cho thấy 98 hợp chất có nguồn gốc từ *Aspergillus* đã được mô tả. Sự đa dạng về cấu trúc hóa học và hoạt động kháng khuẩn của các chất chuyển hóa này thế hiện hoạt tính kháng vi sinh vật gây bệnh rất tốt, hứa hẹn cho một nguồn cung cấp dồi dào nguồn hóa dược thiên nhiên chống vi trùng gây bệnh (Honghua *et al.,* 2023). Một sesterterpenoid mới, terretonin G, được tách chiết từ vi nấm biển *Aspergillus* sp. OPMF00272 cho thấy hoạt động kháng khuẩn tốt chống lại *Staphylococcus aureus* FDA209P, *Bacillus subtillis* PCI219 và *Micrococcus luteus* ATCC9341 (Fukuda *et al.,* 2014). Hợp chất 5-Methoxy dihydro sterigmatocystin thu được từ *Aspergillus versicolor* MF359 phân lập từ hải miên *Hymeniaccidon*; hợp chất này ức chế sự phát triển của *Staphylococcus aureus* và *Bacillus subtillis* với giá trị MIC tương đối thấp (Song *et al.,* 2014). Dịch lên men của *Aspergillus niger* chứa dẫn xuất axid itaconic nipyrones A - C, hợp chất này có hoạt tính kháng khuẩn chống lại *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtillis* và *Mycobacterium tuberculosis* có giá trị MIC trong khoảng 8 - 64 μg/mL (Ding *et al.,* 2018). Cottoquinazoline D được phân lập từ môi trường lên men của *Aspergillus versicolor* LCJ-5-4, cho thấy hoạt tính ức chế *Candida albicans* với giá trị MIC là 22.6 μM (Zhuang *et al.,* 2011). Trong nghiên cứu mới năm 2024 về vi vi nấm biển, thu nhận từ vùng biển PhangNga, Thái Lan, nhóm nghiên cứu của Wingfield đã phân lập được 23 chi vi nấm, trong đó số lượng vi vi nấm phần lớn thuộc chi *Aspergillus* và *Penicillium*, kết quả nghiên cứu chỉ ra có 32 chủng thể hiện hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định với đường kính kháng khuẩn của chủng *Aspergillus unguis* B22M1 đạt 24.7 mm và trong đó có 16 chủng có hoạt tính sinh enzyme protease và amylase phân giải cơ chất.

KẾT LUẬN

Từ 3 mẫu trầm tích biển thu được ở vùng biển Quảng Bình Việt Nam, 13 chủng vi vi nấm đã tuyển chọn được và thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định bằng phương pháp đục lỗ thạch, với 3 chủng có khả năng kháng vi sinh vật kiểm định tốt nhất. Chủng M6, M7 và M16 có đường kính kháng *Candida albicans* ATCC1023 tương ứng là 26 mm, 14 mm, 6 mm; kháng *Staphylococcus aureus* tương ứng là 25 mm, 13 mm, 6 mm. Chủng M16 kháng *Bacillus cereus* với đường kính phân giải 12 mm.

Ngoài ra, cả 3 chủng đều có khả năng sinh enzyme amylase, protease và cellulase với mức độ khác nhau: Chủng M6 có khả năng sinh enzyme cao nhất với đường kính vòng phân giải với các enzyme tương ứng là 16 mm, 13 mm, 9 mm; Chủng M7 có khả năng sinh enzyme với vòng phân giải tương ứng là 12 mm, 11 mm, 10 mm; Chủng M16 có khả năng sinh enzyme với vòng phân giải tương ứng là 7 mm, 13 mm, 11 mm.

Từ một số đặc điểm hình thái và so sánh trình tự gene 18S rRNA của 3 chủng tiềm năng. Chúng tôi có thể xác định chủng M6 thuộc chi *Penicillium*, M7 và M16 thuộc chi *Aspergillus*.

Lời cảm ơn: *Nghiên cứu này được thực hiện từ nguồn kinh phí của Đề tài cấp cơ sở, Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Mã số đề tài HSB 24-CS02.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Amend A, Burgaud G, Cunliffe M, Edgcomb V P, Ettinger CL, Gutiérrez MH, Heitman J, Hom EFY, Ianiri G, Jones AC, Kagami M, Picard KT, Quandt CA, Raghukumar S, Riquelme M, Stajich J, Vargas-Muñiz J, Walker AK, Yarden O, and Gladfelter AS (2019). Fungi in the marine environment: Open questions and unsolved problems. *MBio*, *10*(2): 01189–18.

Carroll AR, Copp BR, Davis RA, Keyzers RA, and Prinsep MR (2019). Marine natural products. *Natural Product Reports*, 36(1): 122–173.

Daniel V, Stefan G, Frédéric M, David B (2022). pr2-primers: an 18S rRNA primer database for protists. *Molecular Ecology Resources*, 22 (1): 168-179.

Ding L, Li T, Liao X, He S, and Xu S (2018). Asperitaconic acids A–C, antibacterial itaconic acid derivatives produced by a marine-derived fungus of the genus *Aspergillus*. *The Journal of Antibiotics*, *71*(10): 902-904.

Nguyễn Lân Dũng, Nguyễn Đình Quyến, Phạm Văn Ty (2001). *Vi sinh vật học*, NXB Giáo dục, Hà Nội.

Fukuda T, Kurihara Y, Kanamoto A, and Tomoda H (2014). Terretonin G, a new sesterterpenoid antibiotic from marine-derived *Aspergillus* sp. OPMF00272. *The Journal of Antibiotics*, *67*(8): 593–595.

Honghua L, Yanqi F, and Fuhang S. Marine *Aspergillus*: A Treasure Trove of Antimicrobial Compounds (2023). *Mar Drugs*, May; 21(5): 277.

Ole CH, Jeanette HA, Bjørn A, Espen H & Teppo R (2020). Cultivable marine fungi from the Arctic Archipelago of Svalbard and their antibacterial activity. *Mycology,* 11(3): 230-242.

Papon N, Copp BR, and Courdavault V (2022). Biology, pipelines, current and future prospects for production. *Biotechnology Advances*, *54:* 107871.

Song F, Ren B, Chen C, Yu K, Liu X, Zhang Y, Yang N, He H, Liu X, Dai H, and Zhang L (2014). Three new sterigmatocystin analogues from marine-derived fungus *Aspergillus versicolor* MF359. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *98:* 3753–3758.

Zeghal E, Vaksmaa A, Vielfaure H, Boekhout T, and Niemann H (2021). The potential role of marine fungi in plastic degradation–a review. *Frontiers in Marine Science*, *8:* 738877.

Zhou J, Feng Z, Zhang W, and Xu J (2022). Evaluation of the antimicrobial and cytotoxic potential of endophytic fungi extracts from mangrove plants *Rhizophora stylosa* and *R. mucronata*. *Scientific Reports*, *12*(1): 2733.

Zhuang Y, Teng X, Wang Y, Liu P, Wang H, Li J, Li G, and Zhu W (2011). Cyclopeptides and polyketides from coral-associated fungus, *Aspergillus versicolor* LCJ-5-4. *Tetrahedron*, *67*(37): 7085–7089.

RESEARCH ON SOME MARINE FUNGI ISOLATED FROM SEDIMENT SAMPLES IN VIETNAM CENTRAL COASTAL REGION WITH ANTIMICROBIAL AND SUBSTANCES DEGRADING ENZYME ACTIVITIES

Vu Thi Thu Huyen*, Nguyen Mai Anh, Le Thi Hong Minh

Institute of Marine Biochemistry, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Marine sediment is a nutrient-rich surface that becomes an good environment for microorganisms in general, fungi in particular to grow and develop. In addition, the ability of marine fungi to support extremes of temperature, salinity and pressure demonstrates their potential for medical, pharmaceutical, biotechnological processes. The secondary metabolites isolated from marine fungi displayed biopharmaceutically significant bioactivities, including antibiotic, antiviral, antioxidant, and anti-inflammatory. In this study, from 3 sediment samples collected in the central sea of Vietnam, 13 fungal strains were isolated and tested for their antibacterial activity. The results found that the 3 strains with the best antibacterial ability against tested microorganisms are strains M6, M7 and M16 with anti-*Candida albicans* ATCC1023 diameters of 26 mm, 14 mm, 6 mm, respectively; resistance to *Staphylococcus aureus* ATCC25923 is 25 mm, 13 mm, 6 mm, respectively. Additionally, M16 showed effect antimicrobrial activity against pathogenic strain *Bacillus cereus* ATCC13245 with a diameter of 12 mm. These three strains have the ability to produce enzymes that degrade substrates at different levels. From some morphological characteristics and 18S rRNA gene sequencing results of 3 selected strains, it shows that strain M6 belongs to the genus *Penicillium*, M7 and M16 both belong to the genus *Aspergillus*. Phylogenetic trees M6, M7, M16 were built using MegaX software. The 18S rRNAs of 3 strains were registered on genbank with code numbers: PP425224 (*Aspergillus* sp. strain M7), PP425226 (*Aspergillus* sp. strain M16), PP425221 (*Penicillium* sp. strain M6).

Keywords: Antibacterial activity, *Aspergillus*, marine fungi, *Penicillium* sediment, substrate-degrading enzyme.

* Author for Corresponding: Tel: 978057679; *E-mail: huyenvuibt@gmail.com*