

PHÂN LẬP, ĐỊNH DANH VI NẤM BIỂN CÓ HOẠT TÍNH KHÁNG VI SINH VẬT TỪ ĐẢO BẠCH LONG VĨ, HẢI PHÒNG

Đặng Thị Thu Hà¹, Hoàng Thị Hồng Liên², Lê Thị Hồng Minh³, Vũ Thùy Dung¹
Trịnh Văn Khương¹, Đinh Thị Thanh Mai¹, Nguyễn Văn Hùng¹ và Cao Đức Tuấn^{1,✉}

¹Trường Đại học Y Dược Hải Phòng

²Trường Đại học Y Dược Buôn Ma Thuột

³Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Việt Nam là một trong những nước có tỷ lệ kháng kháng sinh cao trên thế giới. Vì vậy, nhu cầu phát triển sản phẩm kháng sinh mới từ nguồn nguyên liệu trong nước là rất cấp thiết. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân lập, định danh các chủng vi nấm biển có hoạt tính kháng vi sinh vật (VSV) từ đảo Bạch Long Vĩ, Hải Phòng. Từ 105 mẫu biển, đã phân lập được 31 chủng vi nấm biển. Tất cả 31 chủng vi nấm đều thể hiện hoạt tính kháng VSV, trong đó, 8/31 chủng kháng ít nhất 4/7 chủng VSV thử nghiệm, 4/31 chủng kháng vi khuẩn Gram âm và 26/31 chủng kháng nấm. Các chủng vi nấm biển đã được định danh dựa trên hình thái hoặc trình tự gen 18S rRNA. Trình tự gen 18S rRNA 3 chủng vi nấm biển có hoạt tính kháng VSV tốt nhất đã được đăng ký trên ngân hàng gen quốc tế (GenBank-NCBI) với mã số là MW015803; MW015806 và MW015807. Kết quả cho thấy, vi nấm biển Bạch Long Vĩ rất có tiềm năng trong sản xuất các hợp chất có hoạt tính kháng VSV.

Từ khóa: Bạch Long Vĩ, kháng vi sinh vật, vi nấm biển.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Việc phát hiện kháng sinh Penicillin từ nấm *Penicillium* đánh dấu một thành tựu lớn trong y học.¹ Kể từ đó, có rất nhiều thuốc kháng sinh đã được đưa vào sử dụng trên lâm sàng, trong đó, trên 50 % thuốc kháng sinh có nguồn gốc từ vi sinh vật (VSV), bao gồm vi nấm và xạ khuẩn.² Mặc dù vậy, Việt Nam là một trong những nước có tỷ lệ kháng kháng sinh cao trên thế giới, một số vi khuẩn gây ra những bệnh truyền nhiễm có khả năng lây lan cao trong cộng đồng để lại những hệ quả nặng nề về sức khỏe và kinh tế, vì thế, nhu cầu phát triển sản phẩm mới có hoạt tính kháng sinh từ nguồn nguyên liệu trong nước là rất cấp thiết.³

Gần đây, các nhóm nghiên cứu trên thế giới

có xu hướng tập trung tìm kiếm các hợp chất có hoạt tính kháng sinh từ biển, đặc biệt là vi nấm biển. Trong giai đoạn 5 năm, từ 2015 đến 2015, số lượng các hợp chất mới từ vi nấm biển chiếm trên 50 % tổng số lượng các hợp chất từ biển.⁴ Với bờ biển dài trên 3000km, diện tích mặt biển trên 1 triệu km², Việt Nam là một trong những trung tâm đa dạng sinh học biển cao của thế giới.⁵

Đảo Bạch Long Vĩ, thuộc thành phố Hải Phòng, cách đất liền khoảng 135km, là đảo trong vịnh xa bờ nhất của Việt Nam, có số lượng và thành phần các loài sinh vật biển đa dạng (342 loài), do đó, dự đoán vi nấm biển Bạch Long Vĩ rất có tiềm năng trong nghiên cứu phát triển sản phẩm có hoạt tính sinh học.⁶ Bên cạnh đó, Khu bảo tồn biển Bạch Long Vĩ là nơi đầu tiên ở Việt Nam được Thủ tướng Chính phủ ký quyết định thành lập (năm 2013).⁷ Với đặc thù của một huyện đảo xa bờ, việc phát huy các giá trị của khu bảo tồn có ý nghĩa đặc biệt

Tác giả liên hệ: Cao Đức Tuấn

Trường Đại học Y Dược Hải Phòng

Email: cdtuan@hpmu.edu.vn

Ngày nhận: 19/09/2022

Ngày được chấp nhận: 17/01/2023

quan trọng đối với sự phát triển kinh tế - xã hội cũng như góp phần bảo đảm chủ quyền quốc gia trên biển của Việt Nam.

Từ những lý do trên, nghiên cứu đã được thực hiện với mục tiêu: phân lập, thử nghiệm hoạt tính kháng VSV và định danh các chủng vi nấm biển từ các mẫu biển (mẫu nước, trầm tích và sinh vật biển) thu nhận ở đảo Bạch Long Vĩ, thành phố Hải Phòng.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng

Đối tượng nghiên cứu là các chủng vi nấm biển có nguồn gốc từ vùng biển đảo Bạch Long Vĩ, Hải Phòng.

Vật liệu nghiên cứu

Là các mẫu biển (mẫu nước, trầm tích và sinh vật biển) thu nhận ở vùng biển Bạch Long Vĩ. Đối với mẫu sinh vật biển, đề tài thực hiện thu mẫu thuận tiện, tức là thu thập tất cả mẫu bắt gặp trong quá trình thu mẫu.

Thời gian thu mẫu

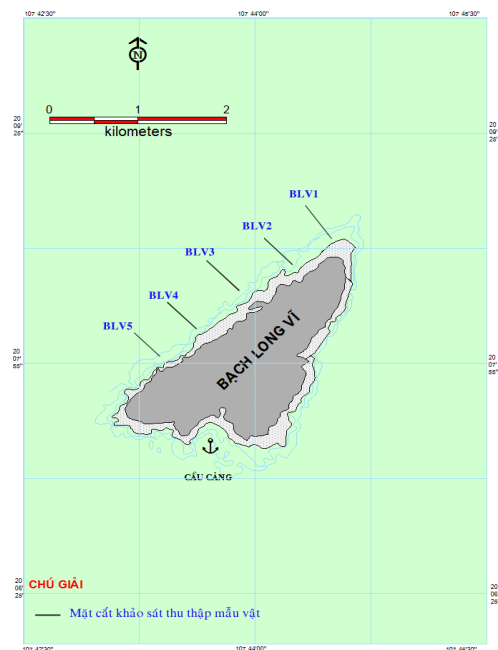
Từ ngày 04/7/2019 đến ngày 10/7/2019.

2. Phương pháp

Phương pháp thu mẫu

Vị trí thu mẫu chính xác được lựa chọn dựa trên điều kiện thời tiết và con nước thực tế. Mẫu sinh vật biển được thu thập bằng phương pháp lặn sâu có khí tài SCUBA theo quy trình hướng dẫn của English et al. (1997).⁸ Sau khi xác định được vị trí thu mẫu, tại mỗi điểm thu sẽ tiến hành rải dây mặt cắt dài 100m vuông góc với đường bờ. Mẫu sinh vật biển được thu theo dây mặt cắt, thu trên nền đáy và trong lớp trầm tích bằng dụng cụ thu mẫu chuyên dụng. Trước khi thu mẫu, tiến hành chụp ảnh phân bố của mẫu vật. Mỗi mẫu vật ngay sau khi thu dưới nước được cho riêng biệt vào từng túi zip và ghi thông tin sơ bộ về mẫu (địa điểm thu, thời gian thu, kí hiệu mẫu, loại mẫu). Mỗi mẫu sẽ

được thu thành 2 bộ, 1 bộ sẽ được xử lý, dùng cho phân lập vi nấm tại thực địa, 1 bộ được bảo quản theo phương pháp thường quy để tiến hành định danh. Tại khu vực vùng biển ven đảo Bạch Long Vĩ, số mặt cắt được thiết kế để thu thập mẫu vật là 5 mặt cắt. Các mặt cắt được đặt vuông góc với đường bờ, trên mỗi mặt cắt mẫu vật được thu thập tại 3 điểm đại diện từ bờ trở ra. Vị trí các mặt cắt thu thập mẫu vật được thể hiện ở hình 1.



Hình 1. Sơ đồ vị trí các mặt cắt thu thập mẫu vật tại đảo Bạch Long Vĩ

Phương pháp phân lập và nuôi cấy vi nấm biển

Quá trình phân lập và nuôi cấy được thực hiện theo các phương pháp đã công bố, trong đó có áp dụng một số kỹ thuật được chuyển giao từ trường Đại học Illinois, Chicago, Mỹ.⁹⁻¹¹ Môi trường phân lập và nuôi cấy bao gồm A1, CZ, ISP1, ISP2, MEA, NZSG, PDA, PMDA, SCA và SWA.

Tại thực địa, mẫu biển đã thu nhận được bảo quản vô trùng ở 0 °C và được sử dụng trong vòng 24 giờ kể từ khi thu mẫu. Đầu tiên, 0,5g

mẫu biển được đưa vào ống Fancol, bổ sung 4,5ml nước cất vô trùng, đảo đều mẫu bằng thanh inox đã khử trùng. Tiến hành sốc nhiệt ở nhiệt độ 60°C trong 8 phút, hút 50µl dịch đã được sốc nhiệt vào một ống Eppendorf khác có chứa 450µl nước cất đã khử trùng, tiếp tục trộn đều mẫu và hút 50µl dịch cấy trải vào các đĩa có chứa các loại môi trường đã chuẩn bị. Các đĩa phân lập được bảo quản vô trùng ở nhiệt độ phòng và vận chuyển về phòng thí nghiệm. Tại phòng thí nghiệm, các đĩa được nuôi trong tủ ấm ở 28 - 30°C từ 4 - 20 ngày, lựa chọn các khuẩn lạc cấy chuyển làm sạch sang môi trường tương ứng. Các chủng vi nấm thuần chủng sau đó được bảo quản vô trùng ở -80°C.

Đối với nuôi cấy, các chủng vi nấm được lấy ra từ tủ lạnh - 80 °C, tiến hành hoạt hóa cấy chấ trên đĩa thạch để kiểm tra độ sạch của các chủng nghiên cứu, nhặt một khuẩn lạc cấy chuyển vào bình tam giác 125ml khác có chứa 25ml môi trường LB đã khử trùng 121°C trong 30 phút, nuôi qua đêm, chuyển toàn bộ phần tế bào đã phát triển vào bình tam giác 1000ml có chứa 500ml môi trường tương ứng với môi trường phân lập để nuôi lắc 100 vòng/phút ở 28°C trong 7 - 12 ngày tùy thuộc vào sự phát triển của từng chủng.

Phương pháp tạo cặn chiết và thử nghiệm hoạt tính sinh học

Dịch nuôi cấy vi nấm (500mL) được chiết với dung môi ethyl acetat với thể tích dung môi tương ứng là 300mL x 5 lần. Dịch chiết sau đó được loại dung môi dưới áp suất giảm để thu cặn chiết thô.

Hoạt tính kháng VSV của các mẫu được thử nghiệm đối với 7 chủng VSV kiểm định, gồm ba chủng vi khuẩn Gram âm (*Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Salmonella enterica* ATCC13076), ba chủng vi khuẩn Gram dương (*Enterococcus*

faecalis ATCC29212, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC14579), và nấm men *Candida albicans* ATCC10231. Mẫu thử nghiệm được pha loãng trong DMSO và thử nghiệm được thực hiện trên đĩa 96 giếng chứa sẵn các chủng VSV thử nghiệm (5×10^5 CFU/mL) theo phương pháp mô tả bởi Hadacek và Greger (2000).¹² Đĩa được ủ ở 37°C, sau 24h, mật độ quang (OD) của các giếng được đo ở 650nm. Đối chứng dương là kháng sinh streptomycin cho các chủng vi khuẩn và cyclohexamide cho nấm men.

Phương pháp định danh vi nấm

- *Phương pháp định danh dựa trên đặc điểm hình thái của vi nấm:*

Chủng vi nấm được nuôi cấy trên môi trường Czapek trong thời gian 5 - 10 ngày (tùy thuộc vào từng chủng) ở 28°C. Tiến hành quan sát, ghi nhận các đặc điểm hình thái khuẩn lạc vi nấm trên đĩa thạch và kiểm tra hình thái bào tử nấm bằng kính hiển vi quang học Nikon ECLIPSE 80i, Nhật Bản. Đặc điểm hình thái và tên chủng vi nấm được xác định theo khóa phân loại của Domsch và Gams (1980); Raper và Thom (1968), Robert và cộng sự (1984).¹³⁻¹⁵

- *Phương pháp định danh dựa trên trình tự gen 18S rRNA của vi nấm:*

Sử dụng các phương pháp tách ADN tổng số, PCR, điện di trên gel agarose, Giải trình tự 18S rRNA (Sambrook &cs., 1989).¹⁶ Trình tự gen 18S rRNA sau đó được so sánh trong BLAST để tìm ra độ tương đồng của chủng nghiên cứu với các dữ liệu đã được công bố trên ngân hàng gen tại www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST.

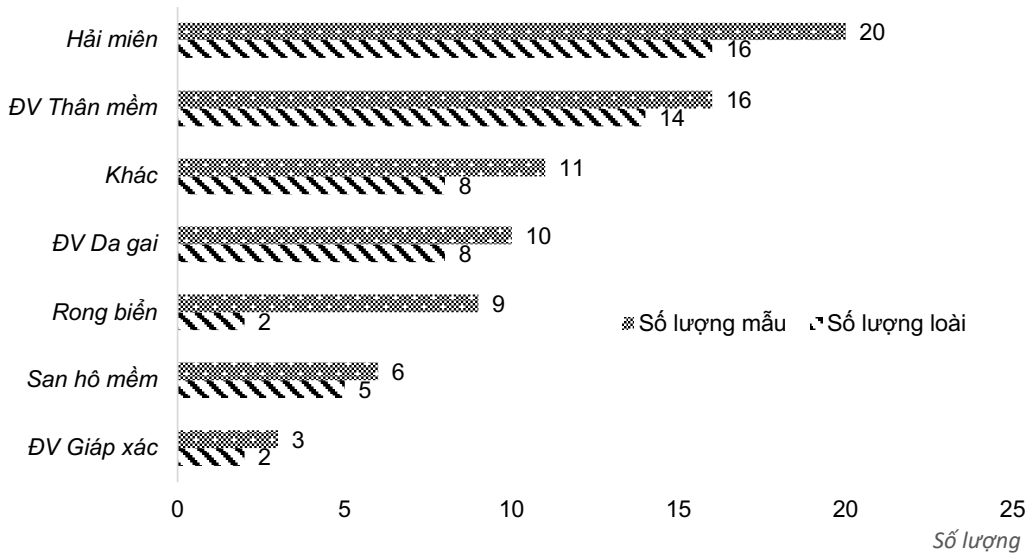
Cặp mồi để khuếch đại gen 18S rRNA: NS3F (5'-GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC-3') và NS8R (5'-TCCGCAGGTTACCTACGGA-3') được đặt tổng hợp tại hãng Invitrogen.

III. KẾT QUẢ

1. Kết quả thu nhận mẫu biển

Trong thời gian khảo sát, thu thập mẫu sinh vật tại vùng biển ven đảo Bạch Long Vĩ, từ ngày 04/7/2019 đến ngày 10/7/2019, đã thu thập được tổng số 105 mẫu biển, bao gồm 15 mẫu

nước, 15 mẫu trầm tích và 75 mẫu sinh vật biển các loại, được định danh thuộc 55 loài, trong đó, nhóm hải miên chiếm ưu thế với 20 mẫu, 16 loài, cụ thể được thể hiện ở hình 2.

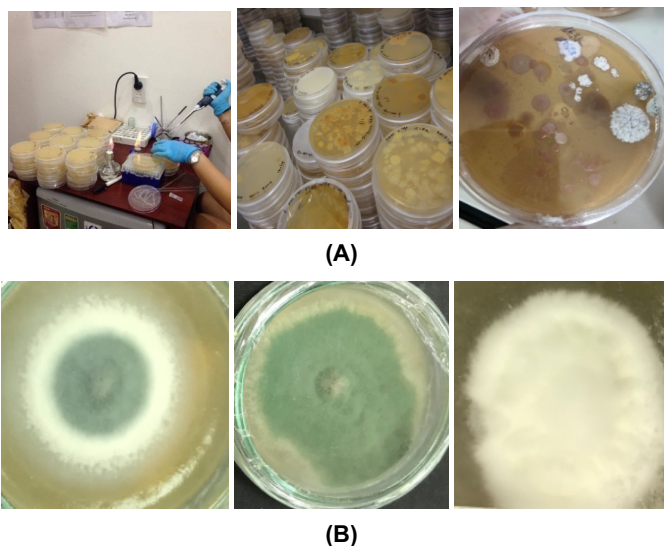


Hình 2. Số lượng mẫu, loài sinh vật biển thu thập được ở vùng biển Bạch Long Vĩ

2. Kết quả phân lập vi nấm biển

Từ 105 mẫu đã thu thập được, tiến hành xử lý mẫu và cấy chủng lên các môi trường phân lập với các nồng độ khác nhau sau đó nuôi ở 28°C, chúng tôi nhận được các khuẩn lạc riêng rẽ (Hình 3A). Tiến hành lựa chọn các khuẩn lạc riêng rẽ đặc trưng cho các mẫu sau đó cấy chấm điểm các khuẩn lạc đó ra đĩa môi trường

để làm thuần khiết các chủng nghiên cứu. Sau khi tiến hành lựa chọn các khuẩn lạc riêng rẽ đặc trưng cho các mẫu, cấy chấm điểm các khuẩn lạc đó ra đĩa môi trường để làm thuần khiết các chủng nghiên cứu. Chúng tôi đã chọn được 31 chủng vi nấm biển có hình thái và màu sắc khuẩn lạc khác nhau từ vùng biển Bạch Long Vĩ (Hình 3B)



Hình 3. Hình ảnh minh họa kết quả phân lập vi nấm biển Bài Từ Long

(A) Một số hình ảnh các khuẩn lạc mọc sau 5-30 ngày nuôi cấy

(B) Một số hình thái khuẩn lạc khác nhau khi làm sạch chủng

3. Kết quả nuôi cấy, tạo cặn chiết và thử hoạt tính kháng vi sinh vật các chủng vi nấm biển đã phân lập

Các chủng vi nấm biển được nuôi cấy quy mô 500mL, dịch nuôi cấy được thu nhận, tạo cặn chiết và thử hoạt tính kháng VSV kiểm định theo các phương pháp đã mô tả. Kết quả cho thấy 31 cặn chiết đều thể hiện hoạt tính ức chế từ 1 chủng VSV thử nghiệm (Bảng 1). 26/31 chủng ức chế khá tốt chủng nấm men *C.albicans* ATCC10231 với nồng độ ức chế tối

thiểu (MIC) từ 16 - 256 $\mu\text{g/ml}$; chỉ có 4 chủng (M469, M485, M488 và M504) thể hiện ức chế 1 chủng kiểm định Gram âm. Đặc biệt 3 chủng có hoạt tính kháng ở phổ khá rộng là M416, M440 và M485 ức chế cả 3 chủng Gram dương và chủng nấm *C.albicans* với giá trị MIC tương ứng khá thấp là 32 - 128 - 64 - 16 $\mu\text{g/ml}$; 32 - 64 - 16 - 16 $\mu\text{g/ml}$; 64 - 128 - 256 - 256 $\mu\text{g/ml}$; ngoài ra M485 còn ức chế 1 chủng kiểm định Gram âm *E.coli* ATCC25922 với giá trị MIC = 64 $\mu\text{g/ml}$;

Bảng 1. Kết quả thử hoạt tính kháng VSV kiểm định 31 chủng vi nấm biến

TT	Chủng	Kết quả thử hoạt tính - MIC(μ g/ml)								
		Vi khuẩn Gram dương			Vi khuẩn Gram âm			Nấm		
		<i>E. faecalis</i> ATCC29212	<i>S. aureus</i> ATCC25923	<i>Bacillus cereus</i> ATCC14579	<i>E. coli</i> ATCC25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	<i>S. enterica</i> ATCC13076	<i>C. albicans</i> ATCC10231		
1	M405	64	256	256	-	-	-	-	128	
2	M411	32	128	128	-	-	-	-	64	
3	M413	128	-	256	-	-	-	-	64	
4	M414	32	-	-	-	-	-	-	32	
5	M415	128	256	256	-	-	-	-	64	
6	M416	32	128	64	-	-	-	-	16	
7	M417	64	64	-	-	-	-	-	256	
8	M424	32	128	128	-	-	-	-	-	
9	M426	128	128	64	-	-	-	-	-	
10	M430	128	-	-	-	-	-	-	128	
11	M433	64	-	-	-	-	-	-	64	
12	M434	32	-	-	-	-	-	-	16	
13	M440	32	64	16	-	-	-	-	16	
14	M454	256	-	-	-	-	-	-	64	
15	M464	256	-	256	-	-	-	-	-	
16	M469	256	-	-	-	64	-	-	128	
17	M470	-	-	-	-	-	-	-	128	

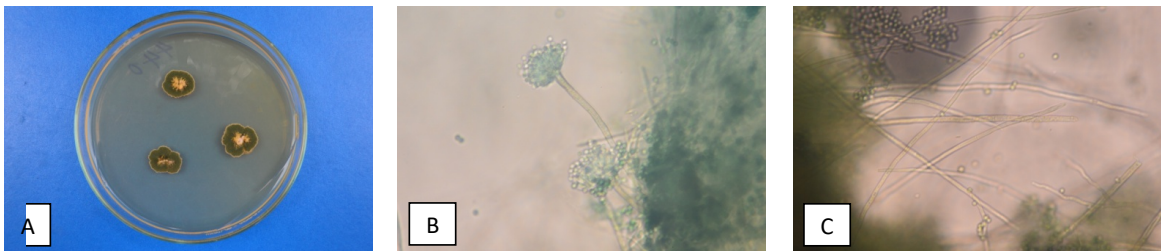
		Kết quả thử hoạt tính - MIC(μ g/ml)										
TT	Chủng	Vi khuẩn Gram dương					Vi khuẩn Gram âm					Năm
		<i>E. faecalis</i> ATCC29212	<i>S. aureus</i> ATCC25923	<i>Bacillus cereus</i> ATCC14579	<i>E. coli</i> ATCC25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	<i>S. enterica</i> ATCC13076	<i>C. albicans</i> ATCC10231				
18	M472	64	128	128	-	-	-	-	-	-	32	
19	M476	256	128	128	-	-	-	-	-	-	256	
20	M485	64	128	256	64	-	-	-	-	-	256	
21	M486	128	-	256	-	-	-	-	-	-	256	
22	M488	128	-	256	-	128	-	-	-	-	128	
23	M500	256	-	256	-	-	-	-	-	-	64	
24	M504	128	-	-	-	128	-	-	-	-	-	
25	M507	128	128	64	-	-	-	-	-	-	-	
26	M515	64	64	-	-	-	-	-	-	-	64	
27	M528	128	32	-	-	-	-	-	-	-	128	
28	M529	64	128	-	-	-	-	-	-	-	64	
29	M549	128	256	256	-	-	-	-	-	-	64	
30	M556	64	64	-	-	-	-	-	-	-	128	
31	M587	128	-	256	-	-	-	-	-	-	128	
KS	Strep	256	256	128	32	256	128	256	128	-	-	
	Cyc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	32	

KS: Kháng sinh; **Strep:** Streptomycin; **Cyc:** Cycloheximide; -: MIC > 256 μ g/ml

4. Kết quả định danh vi nấm biển

Các chủng vi nấm biển được định danh dựa trên đặc điểm hình thái hoặc sinh học phân tử theo phương pháp đã mô tả. Kết quả cho thấy, 31 chủng vi nấm đã phân lập thuộc 11 chi, trong đó *Aspergillus* chiếm đa số với 15 chủng, tiếp theo là *Penicillium*: 5 chủng, *Verticillium* và *Tritirachium*: 2 chủng và các chi *Phanerochaete*, *Parengyodontium*, *Hortaea*, *Chrysosporium*, *Ophiosphaerella*, *Beauveria*, *Zasmidium*: 1 chủng.

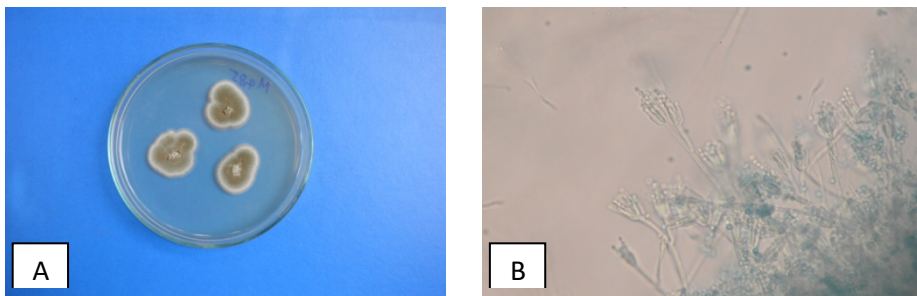
Đối với 3 chủng có hoạt tính tiềm năng nhất (M416, M440 và M485), đã thực hiện định danh bằng cả 2 phương pháp (Hình 4-6), trong đó, không xác định được tên khoa học chủng M416 bằng phương pháp hình thái. Dải trình tự gen của các chủng này đã được đăng ký trên ngân hàng gen quốc tế (GenBank-NCBI) với mã số tương ứng là **MW015803**, **MW015806** và **MW015807**.



Hình 4. Kết quả định danh hình thái chủng M440

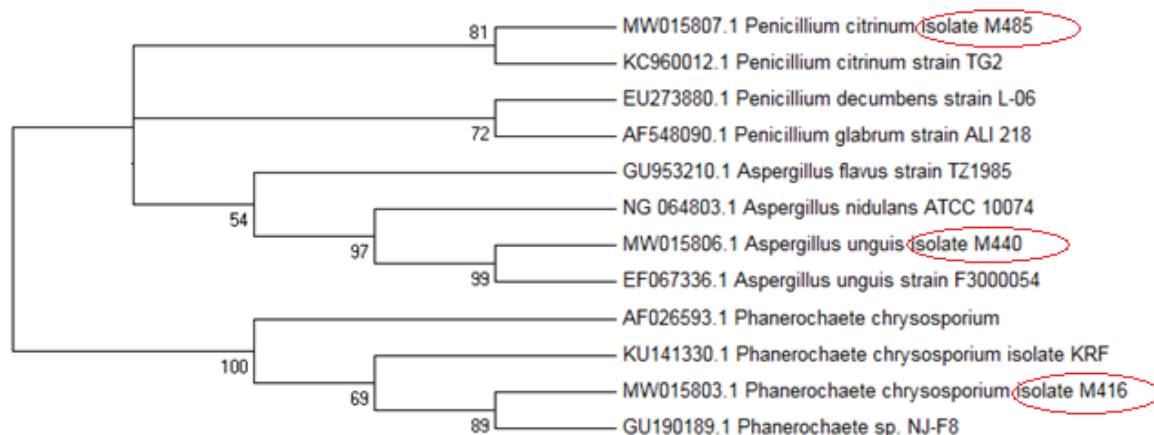
Aspergillus unguis (E.-W. and Guadin) Thom and Raper

- (A) khuẩn lạc trên môi trường Czapek ở 28°C/7 ngày;
- (B) Cơ quan sinh bào tử trần và bào tử trần x 1000;
- (C) Các sợi nấm bắt thụ x 1000



Hình 5. Kết quả định danh hình thái chủng M485: *Penicillium corylophilum* Dierckx

- (A) khuẩn lạc trên môi trường Czapek ở 25°C/7 ngày;
- (B) Cơ quan sinh bào tử trần và bào tử trần x 1000



Hình 6. Kết quả định danh bằng sinh học phân tử 3 chủng vi nấm tiềm năng

IV. BÀN LUẬN

Đối với điều tra đa dạng sinh học, việc lựa chọn số lượng mặt cắt khảo sát, thu mẫu phải đảm bảo các tiêu chí:

1) Đảm bảo cho đánh giá được đầy đủ tính đa dạng sinh học và nguồn lợi khu vực nghiên cứu;

2) Đại diện cho các hệ sinh thái biển ven đảo;

3) Đảm bảo đủ số liệu thống kê để phân tích đánh giá;

4) Phù hợp với diện tích vùng nghiên cứu, tính đa dạng sinh học, hệ sinh thái và

5) kinh phí. Tức là, để nghiên cứu đa dạng sinh học biển, cần bố trí thu mẫu ở ít nhất 10 mặt cắt, tương ứng với 30 trạm mới đảm bảo tính thống kê.^{8,17}

Tuy nhiên, nghiên cứu này nhằm mục đích tìm kiếm, phân lập vi nấm từ biển, không phải để đánh giá đa dạng sinh học vùng biển Bạch Long Vĩ. Hơn nữa, do diện tích đảo Bạch Long Vĩ không lớn (~2,5 km²), đặc tính nhiệm vụ chỉ là thu thập mẫu vật để phân tích, nên số mặt cắt khảo sát được bố trí tối thiểu bằng ½ số mặt cắt nghiên cứu đa dạng sinh học nhưng vẫn đảm

bảo đại diện cho hệ sinh thái rạn san hô, rạn đá quanh đảo, đại diện cho các địa hình đáy các mặt biển đảo Bạch Long Vĩ.⁶ Do đó, nhóm nghiên cứu đã lựa chọn thực hiện thu mẫu ở 5 mặt cắt, tương ứng với tổng số 15 trạm. Điểm tồn tại của cách bố trí các mặt cắt trong nghiên cứu này là các mặt cắt chỉ tập trung phía Tây Bắc đảo, không thu được mẫu biển ở phía Đông Nam đảo. Nguyên nhân của việc này là do ảnh hưởng của thời tiết, vào thời điểm thu mẫu (04/7/2019 - 10/7/2019), thời tiết không thuận lợi, biển động, tàu thu mẫu và thợ lặn không hoạt động được ở phía Đông Nam đảo.

Phương pháp thu mẫu biển thuận tiện đã được lựa chọn cũng do đặc thù của nghiên cứu là tìm kiếm vi nấm từ biển. Trong môi trường biển ven bờ, ước tính số lượng VSV trong nước và trầm tích tương ứng là 7×10^6 tế bào/ml và 3×10^7 tế bào/g, tức là môi trường biển có rất nhiều VSV, bao gồm vi nấm biển.¹⁸ Mặc dù VSV biển rất đa dạng, song, mới chỉ có khoảng 1% số VSV từ các mẫu thu thập ở môi trường biển nuôi cấy được trên môi trường nhân tạo.¹⁹ Yếu tố quyết định đến hiệu quả phân lập là phương pháp phân lập chứ không phải số

lượng mẫu biển thu nhận, do đó, phương pháp thu nhận mẫu biển thuận tiện phù hợp với mục tiêu nghiên cứu đề ra.

So sánh với các nghiên cứu khác ở vùng biển phía Bắc, hiệu quả phân lập vi nấm biển Bạch Long Vĩ tương tự kết quả đã công bố của tác giả Đỗ Anh Duy và cộng sự (2020, 2021). Ở vùng biển Cô Tô – Thanh Lân, Quảng Ninh, từ 154 mẫu biển, có 28 chủng vi nấm biển đã được phân lập.²⁰ Từ 128 mẫu biển ở vùng Bái Tử Long, Quảng Ninh, nhóm tác giả đã phân lập được 25 chủng vi nấm biển.²¹ Tác giả Đỗ Anh Duy cũng sử dụng phương pháp phân lập tại thực địa, sự tương đồng của các kết quả cho thấy phương pháp phân lập tại thực địa bước đầu chứng minh được tính ổn định và hiệu quả. Trong một nghiên cứu khác về vi nấm biển Bái Tử Long, có 4/25 chủng vi nấm biển ức chế tối thiểu 4/7 chủng vi sinh vật thử nghiệm.²² So sánh về hoạt tính kháng VSV của các chủng vi nấm biển đã phân lập với vi nấm biển phân lập ở Bái Tử Long cho thấy kết quả thu được có tính tương đồng.

Tại các vùng biển miền Trung, tác giả Phan Thị Hoài Trinh (2017, 2018) đã nghiên cứu hoạt tính kháng VSV của vi nấm biển phân lập từ hai vùng biển Bán Đảo Sơn Trà, Đà Nẵng và Vịnh Nha Trang, Nha Trang. Kết quả, nhóm tác giả đã phân lập được tương ứng 73 và 100 chủng vi nấm biển từ mỗi vùng. Mặc dù số lượng vi nấm phân lập được nhiều hơn so với chúng tôi nhưng tỷ lệ số chủng có hoạt tính kháng VSV lại thấp hơn (29/73 và 59/100 so với 31/31).^{23,24} Do số lượng mẫu biển đã thu nhận ở từng vùng biển nghiên cứu không được công bố, khó có thể so sánh về hiệu quả phân lập vi nấm biển ở các vùng. Sự khác biệt về hoạt tính kháng VSV có thể lý giải dựa trên phương pháp nuôi cấy. Tác giả Phan Thị Hoài Trinh đã nuôi cấy tất cả các chủng vi nấm trên môi trường đĩa thạch (Sabouraud), điều này có thể ảnh hưởng đến

sự phát triển của vi nấm do không phải chủng vi nấm nào cũng phát triển tối ưu trên môi trường Sabouraud. Trong nghiên cứu của chúng tôi, để tăng hiệu quả phân lập cũng như tạo điều kiện tốt nhất cho vi nấm biển phát triển, 10 môi trường nuôi cấy thường dùng đã được lựa chọn để phân lập. Sau đó, các chủng vi nấm sẽ được nuôi cấy ở môi trường phân lập ương ửng. Tuy nhiên, một trong những nhược điểm của phương pháp này là tốn kém về nguyên vật liệu, hóa chất, cũng như thời gian nghiên cứu dài. Một cách khác có thể dùng để lý giải cho sự khác biệt về hoạt tính kháng VSV của vi nấm biển giữa các vùng biển phía Bắc và miền Trung là sự khác biệt về điều kiện tự nhiên (khí hậu, môi trường...), tuy nhiên cách lý giải này chưa đủ căn cứ kết luận do các phương pháp sử dụng trong nghiên cứu giữa 2 vùng có sự khác biệt đáng kể.

V. KẾT LUẬN

Từ 105 mẫu biển thu nhận ở đảo Bạch Long Vĩ, đã phân lập được 31 chủng vi nấm biển có màu sắc và hình thái khuẩn lạc khác nhau. Thử nghiệm hoạt tính kháng VSV cho thấy cả 31 chủng đều có hoạt tính, từ đó, đã lựa chọn được 3 chủng vi nấm biển tiềm năng (M416, M440 và M485), có hoạt tính tốt nhất, ức chế 4/7 chủng VSV thử nghiệm với giá trị MIC: 16 - 256 µg/ml. Kết quả định danh các chủng vi nấm biển đã phân lập cho thấy đa số các chủng vi nấm thuộc hai chi *Aspergillus* và *Penicillium*. So sánh với các kết quả nghiên cứu khác đã công bố cho thấy khả năng kháng VSV tốt của các chủng vi nấm Bạch Long Vĩ, là nguồn nguyên liệu tiềm năng để nghiên cứu phát triển sản phẩm kháng sinh mới.

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 Trường Đại học Dược, Đại học Quốc gia Chung Nam, Hàn Quốc, trong khuôn khổ Chương trình Hợp tác nghiên cứu song phương và đa phương về Khoa học và Công nghệ đến năm 2020. Nhóm tác giả cam kết không có xung đột lợi ích từ kết quả nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Gaynes R. The Discovery of Penicillin-New Insights After More Than 75 Years of Clinical Use. *Emerg Infect Dis* 2017; 23(5): 849-853.
2. Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA. *General Introduction to Actinomycete Biology. In: Practical streptomycetes Genetics*. Norwich, UK: The John Innes Foundation; 2000.
3. World Health O. *Antimicrobial resistance: global report on surveillance*. World Health Organization; 2014.
4. Carroll AR, Copp BR, Davis RA, Keyzers RA, Prinsep MR. Marine natural products. *Nat Prod Rep*. Mar 4 2021; 38(2): 362-413.
5. Vu Thi Quyen, Tran Van Hieu, Doan Thi Mai Huong, et al. Secondary Metabolites from an Actinomycete from Vietnam's East Sea. *Nat Prod Commun*. Mar 2016; 11(3): 401-4.
6. Trần Đức Thạnh. *Thiên nhiên và môi trường vùng biển đảo Bạch Long Vĩ*. Hà Nội: Nhà xuất bản Khoa học Tự nhiên và Công nghệ; 2013.
7. Quyết định số 2630/QĐ-TTg ngày 31/12/2013 của Thủ tướng chính phủ về việc thành lập khu bảo tồn biển Bạch Long Vĩ.
8. English S, Wilkinson C and Baker V. *Survey Manual for Tropical Marine Resources*. 2nd ed. Townsville, QLD, Australia: Australian Institute of Marine Science; 1997.
9. Vũ Thị Minh Đức. Thực tập Vi sinh Vật học. *Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội, Hà Nội*. 2001;
10. Williams S, Davies F. Use of antibiotics for selective isolation and enumeration of actinomycetes in soil. *Microbiology*. 1965; 38(2): 251-261.
11. Williams S, Cross T. Chapter XI actinomycetes. Booth C, eds. *Methods in microbiology*. Academic Press; 1971: 295-334.
12. Hadacek F, Greger H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochem Anal* 2000; 11(3): 137-147.
13. Raper B, Thom C. *A manual of the Penicillia*. New York, NY: Hafner Publishing company; 1968.
14. Domsch KH, Gams W, Anderson TH. *Compendium of Soil Fungi*. London, UK: Academic Press; 1980.
15. Samson RAR. *Introduction to food-borne fungi*. Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures; 1988.
16. Wood EJ. Molecular cloning. Maniatis T, Fritsch EF and Sambrook J, eds. *A laboratory manual*. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory; 1982:545.
17. WWF. *Sổ tay hướng dẫn giám sát và điều tra đa dạng sinh học*. Hà Nội: Nxb. Giao thông Vận tải; 2003.
18. Bech PK, Lysdal KL, Gram L, Bentzon-Tilia M, Strube ML. Marine Sediments Hold an Untapped Potential for Novel Taxonomic and Bioactive Bacterial Diversity. *mSystems*. Sep 15 2020; 5(5)doi:10.1128/mSystems.00782-20.
19. Ward DM, Weller R, Bateson MM. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nat*. 1990; 345(6270): 63-5.
20. Đỗ Anh Duy, Trần Văn Hương, Phùng Văn Giới và cộng sự. Kết quả nghiên cứu ban đầu về tiềm năng sinh vật biển khu vực Cô Tô - Thanh Lân phục vụ nghiên cứu phân lập vi nấm

biển. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*. 2020; 2020: 112-121.

21. Đỗ Anh Duy, Trần Văn Hương, Hoàng Thị Hồng Liên và cộng sự. Nghiên cứu phân lập một số chủng vi nấm biển có hoạt tính kháng viêm từ vùng biển Bái Tử Long. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*. 2021; Tháng 12/2021: 342-351.

22. Cao Đức Tuấn, Vũ Thị Quyên, Nguyễn Mai Anh và cộng sự. 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. *Tạp*

chí Công nghệ Sinh học. 2021; 19(4): 755-764.

23. Phan Thi Hoai Trinh, Do Thi Duy Ngoc, Vo Thi Dieu Trang, et al. Antimicrobial activity of marine fungi isolated from the Son Tra peninsula, Da Nang, Vietnam. *Tạp Chí Sinh học*. 2017; 39(4): 457-462.

24. Phan Thi Hoai Trinh, Phi Quyet Tien, Ngo Thi Duy Ngoc, Bui Minh Ly, Tran Thi Thanh Van. Isolation and screening marine fungi with antimicrobial activity from samples collected in Nha Trang bay, Vietnam. *Vietnam Journal of Biotechnology*. 2018; 16(1): 181-187.

Summary

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF ANTIMICROBIAL MARINE-DERIVED FUNGI FROM BACH LONG VI ISLAND, HAI PHONG

Vietnam is one of the countries in the world with high antibiotic resistance, thus, there is an urgent need to develop new antibiotic products from domestic raw materials. This study was conducted to isolate and identify marine fungal strains with antimicrobial activity from Bach Long Vi island, Hai Phong. From 105 marine samples, 31 strains of marine fungi were isolated. All 31 isolated strains showed antimicrobial activity, of which, 8/31 strains were active against at least 4/7 tested microorganisms, 4/31 strains were active against Gram-negative bacteria and 26/31 strains were resistant to fungus. Isolated marine fungal strains were identified based on their morphology or 18S rRNA gene sequence. Particularly, the three most potential marine fungal strains were identified by both methods and their 18S rRNA gene sequence was registered on GenBank with access code: MW015803; MW015806 and MW015807. The obtained results revealed that Bach Long Vi marine fungi have great potential in the production of antimicrobial compounds.

Keywords: Antimicrobial, Bach Long Vi, marine fungi.