DOI: 10.31276/VJST.64(11).16-21

Đặc điểm sinh học và hoạt tính kháng vi khuẩn gram dương của *Microbacterium* sp. C21 phân lập từ đất

Nguyễn Mạnh Tuấn[1*], Trương Phúc Hưng[2], Trần Minh Hằng[2], Trần Văn Tiến[3]

[1]*Viện Khoa học Sự sống, Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên, xã Quyết Thắng, TP Thái Nguyên, tỉnh Thái Nguyên, Việt Nam*
[2]*Trường Đại học Khoa học, Đại học Thái Nguyên, phường Tân Thịnh, TP Thái Nguyên, tỉnh Thái Nguyên, Việt Nam*
[3]*Học viện Hành chính Quốc gia, 77 Nguyễn Chí Thanh, phường Láng Hạ, quận Đống Đa, Hà Nội, Việt Nam*

Ngày nhận bài 2/3/2022; ngày chuyển phản biện 7/3/2022; ngày nhận phản biện 31/3/2022; ngày chấp nhận đăng 6/4/2022

Tóm tắt:

Phần lớn kháng sinh thương mại có nguồn gốc từ *Streptomyces*. Việc tìm kiếm các nguồn gen tiềm năng mới (không thuộc *Streptomyces*) sản sinh hoạt chất kháng khuẩn được đặt ra nhằm ngăn chặn sự kháng thuốc bởi các vi khuẩn gây bệnh hiện nay. Chủng C21 được phân lập từ đất, khuẩn lạc nhỏ (kích thước 0,8-1,2 mm) trên môi trường Intensive soil extract medium (ISEM). Phân tích trình tự gen 16S rRNA cho thấy, chủng C21 thuộc vi khuẩn khó nuôi cấy và được coi là ứng viên loài mới thuộc chi *Microbacterium*. Ngoại trừ môi trường R2A, chủng C21 chỉ có khả năng sinh trưởng trong môi trường nghèo dinh dưỡng như NB/3, TSB/10 và R4/10. N-acetylglucosamine, maltose, D-glucose, L-proline, L-rhamnose, inositol, sodium acetate và axit 3-hydroxybutyric là những nguồn cacbon phù hợp cho chủng C21 sinh trưởng. Hoạt chất kháng khuẩn tách chiết từ dịch lên men của chủng C21 có khả năng ức chế ở nồng độ 16 µg/ml đối với *Enterococcus faecalis* CCARM 5168, 8 µg/ml đối với *E. faecalis* CCARM 5171, 32 µg/ml đối với *E. faecalis* CCARM 5024, 64 µg/ml đối với *E. faecium* CCARM 5025, 32 µg/ml đối với *Streptococcus agalactiae* CCARM 4504 và 8 µg/ml đối với *S. pyogenes* CCARM 4520. Kết quả của nghiên cứu là cơ sở cho những nghiên cứu tiếp theo về tìm kiếm các hoạt chất kháng khuẩn tiềm năng từ vi khuẩn khó nuôi cấy.

Từ khóa: **hoạt tính kháng khuẩn, *Microbacterium*, nồng độ ức chế tối thiểu.**

Chỉ số phân loại: **1.6**

1. Đặt vấn đề

Penicillin là kháng sinh đầu tiên được phát hiện từ nấm mốc *Penicillium rubrum* bởi Fleming năm 1929 [1] và mở ra thời kỳ vàng cho phát hiện kháng sinh mới từ tự nhiên vào giữa những năm 1950 [2], trong đó có hơn 80% các loại kháng sinh có nguồn gốc từ *Streptomyces* [2, 3]. Tuy nhiên, sau những năm 1965 số lượng kháng sinh mới được phát hiện có xu hướng giảm mạnh [2, 4]. Trong khi các loài vi khuẩn gây bệnh đa kháng kháng sinh xuất hiện ngày càng nhiều, trong đó có *Enterococci* kháng thuốc vancomycin (VRE - Vancomycin resistant *Enterococcus*) và *Streptococci* được biết đến là một trong những nguồn bệnh truyền nhiễm nguy hiểm cho người [5, 6].

Theo báo cáo của M.E. De Kraker và cs (2016) [7] hậu quả của vi khuẩn gây bệnh đa kháng kháng thuốc thường rất nghiêm trọng, gây tử vong khoảng 8,6 triệu người hàng năm trên toàn thế giới và dự đoán đến năm 2050 có khoảng hơn 10 triệu người chết mỗi năm nếu không có giải pháp kịp thời nhằm ngăn chặn tình trạng đa kháng thuốc như hiện nay.

Các nghiên cứu gần đây cho thấy, vấn đề đa kháng thuốc của vi khuẩn gây bệnh ở nước ta xuất hiện ở tất cả các bệnh viện lớn trên cả nước [8-10]. Có tới 48% các loài *E. faecalis* được phân lập từ bệnh nhân tại các bệnh viện kháng lại gentamicin [8]; 22-57% các loài *E. faecium* kháng lại vancomycin và gentamicin; 25-85% các loài *S. pneumoniae* kháng ceftriaxone và erythromycin [9].

Cho đến nay, có khoảng 1% cộng đồng vi khuẩn đất có thể được phân lập và xác định đặc điểm kiểu hình trong điều kiện phòng thí nghiệm [11, 12]. Trong khi hơn 99% vi khuẩn đất là chưa được nuôi cấy (hay còn gọi là vi khuẩn khó nuôi cấy) và đây được coi là nguồn gen tiềm năng cho phát hiện các hoạt chất kháng khuẩn mới nhằm ngăn chặn vấn đề kháng thuốc [13, 14]. Nghiên cứu về các vi khuẩn khó nuôi cấy sản sinh hoạt chất kháng khuẩn gần như chưa được triển khai ở nước ta. Do vậy, nghiên cứu sẽ bổ sung thêm phương pháp tiếp cận vi khuẩn khó nuôi cấy trong phòng thí nghiệm nhằm tuyển chọn nguồn gen vi khuẩn mới phục vụ cho phát hiện các hoạt chất kháng khuẩn.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Đất bề mặt (3 mẫu) thu thập tại Mỏ sắt Trại Cau, Đồng Hỷ, Thái Nguyên. Đất được loại bỏ đất đá, sinh khối thực vật bằng rây với đường kính lỗ 0,2 mm và làm khô ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ.

Các chủng vi khuẩn kiểm định gồm *E. faecalis* CCARM 5168 (kháng tetracycline và gentamicin), *E. faecalis* CCARM 5171, *E. faecalis* CCARM 5025 (kháng oxacillin

*Tác giả liên hệ: Email: nguyenmanhtuan@tuaf.edu.vn

Biological characteristics and antibacterial activity against gram-positive bacteria of *Microbacterium* sp. C21 isolated from soil

Manh Tuan Nguyen[1*], Phuc Hung Truong[2], Minh HangTran[2], Van Tien Tran[3]

[1]*Institute of Life Science, Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry, Quyet Thang Commune, Thai Nguyen City, Thai Nguyen Province, Vietnam*
[2]*Thai Nguyen University of Sciences, Thai Nguyen University, Tan Thinh Ward, Thai Nguyen City, Thai Nguyen Province, Vietnam*
[3]*National Academy of Public Administration, 77 Nguyen Chi Thanh Street, Lang Ha Ward. Dong Da District, Hanoi, Vietnam*

Received 2 March 2022; revised 31 March 2022; accepted 6 April 2022

Abstract:

Most commercial antibiotics are derived from *Streptomyces*. The search for new potential microbial sources (non-*Streptomyces*) for antibacterial activity is proposed to prevent drug resistance by current pathogenic microbes. Strain C21 was isolated from soil, with small colonies (0.8-1.2 mm in size) on an intensive soil extract medium (ISEM). Sequence analysis of the 16S rRNA gene revealed strain C21 belongs to the group of bacteria that are difficult to cultivate, and is considered a candidate for novel species of genus *Microbacterium*. Except for R2A medium, strain C21 was only able to grow in nutrient-poor media such as NB/3, TSB/10, and R4/10. N-acetylglucosamine, maltose, D-glucose, L-proline, L-rhamnose, inositol, sodium acetate and 3-hydroxybutyric acid were suitable carbon sources for the growth of strain C21. Crude extract from fermentation liquid of strain C21 can inhibit *Enterococcus faecalis* CCARM 5168 at a concentration of 16 µg/ml, 8 µg/ml for *E. faecalis* CCARM 5171, 32 µg/ml for *E. faecalis* CCARM 5024, 64 µg/ml for *E. faecium* CCARM 5025, 32 µg/ml for *Streptococcus agalactiae* CCARM 4504, and 8 µg/ml for *S. pyogenes* CCARM 4520. Results of this study established a basis for future studies on finding potential antibacterial compounds from difficult-to-culture bacteria.

Keywords: **antibacterial activity, *Microbacterium*, minimum inhibitory concentration.**

Classification number: **1.6**

và quinupristin/dalfopristin), *E. faecium* CCARM 5024 (kháng ampicillin, oxacillin, teicoplanin và tetracycline), *S. agalactiae* CCARM 4504 (kháng clindamycin, clarithromycin và tetracycline) và *S. pyogenes* CCARM 4520. Các chủng vi khuẩn kiểm định được cung cấp bởi CCARM (Culture collection of antimirobial resistant microorganisms), Hàn Quốc.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Môi trường và phân lập vi khuẩn khó nuôi cấy: Môi trường ISEM gồm dịch chiết đất (200 ml), muối khoáng (thành phần cơ sở), axít amin (2 ml), vitamin B (1 ml), muối vi lượng (2 ml), agar (15 g), pH 6,8±0,2. Thành phần cơ sở (g/795 ml nước cất) gồm: KH_2PO_4 (0,23), K_2HPO_4 (0,23), $MgSO_4.7H_2O$ (0,23), NH_4NO_3 (0,33) và $NaHCO_3$ (0,25). Phương pháp chuẩn bị môi trường ISEM được thực hiện theo mô tả của T.M. Nguyen và cs (2018) [15]. Hòa 25 g đất trong 250 ml nước muối sinh lý, pha loãng đến nồng độ 10^{-7} và cấy trải 100 µl mỗi nồng độ pha loãng đất lên môi trường ISEM và Nutrient (HiMedia, Ấn Độ, đối chứng) nuôi ở 25°C trong 2 tuần. Chỉ thu nhận, tinh sạch các khuẩn lạc xuất hiện sau 7 ngày nuôi cấy trên môi trường ISEM và lưu giữ ở -86°C trong 10% glycerol [16].

Tuyển chọn vi khuẩn khó nuôi cấy sản sinh hoạt chất kháng khuẩn: Các chủng phân lập được nuôi lắc trong bình tam giác chứa đựng 30 ml môi trường dịch thể ISEM có bổ sung 0,1% (w/v) cao nấm men ở 28°C trong 10 ngày. Hoạt chất sinh học tổng số trong dịch nuôi cấy được tách chiết với ethyl acetate theo tỷ lệ 1:1 (v/v). Hòa cặn sau khi bay hơi ethyl acetate trong 300 µl dung môi dimethyl sulfoxide (DMSO). 10 µl hoạt chất tách chiết được nhỏ vào khoanh giấy đường kính 6 mm (Whatman, Merck) và đặt lên môi trường Mueller Hinton Agar (BD DIFCO) chứa *E. faecium* CCARM 5024 và *S. agalactiae* CCARM 4504. Kiểm tra vòng kháng khuẩn sau 24 giờ ở 37°C [17].

Định danh phân tử và xây dựng sơ đồ phả hệ: DNA tổng số của chủng phân lập được tách chiết theo mô tả bởi J. Sambrook và D.W. Russell (2001) [18]. Cặp mồi 27F-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG và 1492R-TACGGYTACCTTGTTACGACTT [19] được sử dụng cho khuếch đại trình tự gen 16S rRNA bằng PCR. Phản ứng PCR được tiến hành trong 25 chu kỳ, biến tính DNA mẫu ở 95°C trong 5 phút, 25 chu kỳ ở 95°C trong 40 giây, gắn mồi 55°C và kéo dài 72°C trong 1 phút; chu kỳ cuối được kéo dài ở 72°C trong 7 phút. Sản phẩm PCR được đọc trình tự thông qua hệ thống Applied Biosystems 3730 xl DNA analyzer sử dụng Big Dye terminator cycle sequencing kit v.3.1 (Macrogen, Hàn Quốc). Nhận diện trình tự gen 16S rRNA thông qua dữ liệu NCBI Blast và Eztaxon Server. Quan hệ di truyền của chủng phân lập được thiết lập bằng phần mềm MEGA 7 sử dụng phương pháp Neighbor-Joining [20].

Xác định đặc điểm nuôi cấy: Chủng phân lập được hoạt hóa trong môi trường ISEM lỏng, 3% (v/v) dịch huyền phù được cấy chuyển đến các môi trường gồm R2A (HiMedia, Ấn Độ), Nutrient Broth - NB (HiMedia, Ấn Độ), TSB (ATCC medium 18: Trypticase Soy) và R4 (g/l): glucose (10), cao nấm men (1), axít casamino (0,1), proline (3), $MgCl_2.6H_2O$ (10), K_2SO_4 (0,2), $CaCl_2.2H_2O$ (4) và axit N-[Tris(hydroxymethyl)methyl]-2-aminoethanesulfonic (5,6). Đồng thời, các chủng phân lập cũng được cấy chuyển đến môi trường nghèo dinh dưỡng hơn, tương ứng R2A/3 (hàm lượng dinh dưỡng giảm đi 3 lần so với môi trường đầy đủ), NB/3, TSB/10 và R4/10. Khả năng sinh trưởng của chủng phân lập trên các loại môi trường được xác định ở 5 ngày, 28°C, 130 vòng/phút thông qua xác định mật độ vi khuẩn ở OD_{600}. Ảnh hưởng của các nguồn cacbon đến sinh trưởng của chủng phân lập được xác định bởi API ID 32 GN Kit (BioMerieux, Pháp). Sử dụng kính hiển vi điện tử quét SEM (Scanning Electron Microscope, Hitachi S-4800, Nhật Bản) để xác định hình thái tế bào của chủng phân lập.

Lên men và tách chiết hoạt chất kháng khuẩn tổng số: Chủng phân lập được hoạt hóa trong môi trường R2A/3 nuôi lắc ở 28°C, 150 vòng/phút trong 3 ngày. Cấy chuyển 3% dịch nuôi cấy đến môi trường R4/10, nuôi lắc 10 ngày. Hoạt chất kháng khuẩn tổng số có trong dịch lên men được tách chiết 2 lần với ethyl acetate (1:1, v/v). Bay hơi dung môi ở 40°C, cặn hoạt chất tổng số được hòa trong 10 ml nước cất và lọc qua màng lọc 0,22 µm (Millipore, Mỹ) trước khi đông khô ở -54°C [21].

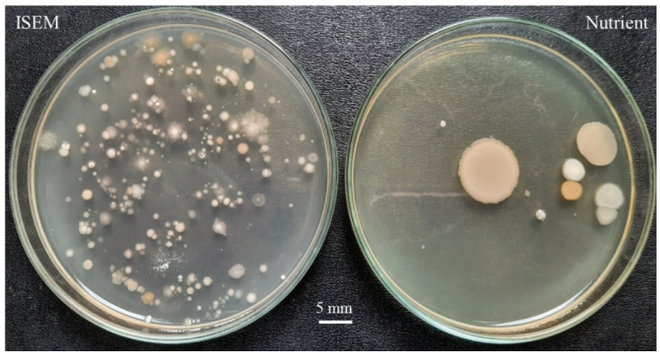
Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của hoạt chất sinh học tổng số tách chiết từ dịch lên men: Quy trình xác định MIC được tiến hành theo phương pháp pha loãng của CLSI (2012) [17]. Các chủng vi khuẩn kiểm định được chuẩn bị ở mật độ 10^5 CFU/ml. Kháng sinh cephalothin và norfloxacin được sử dụng là đối chứng dương. Bột hoạt chất tách chiết tổng số của chủng phân lập và kháng sinh thương mại được chuẩn bị ở nồng độ 128, 64, 32, 16, 8 và 4 µg/ml.

Xử lý số liệu: Kết quả của các thí nghiệm được xử lý bằng Student's t-test để xác định ý nghĩa thống kê. Giá trị $p \leq 0,05$ là giới hạn sai khác có ý nghĩa thống kê.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn khó nuôi cấy tổng hợp hoạt chất kháng khuẩn

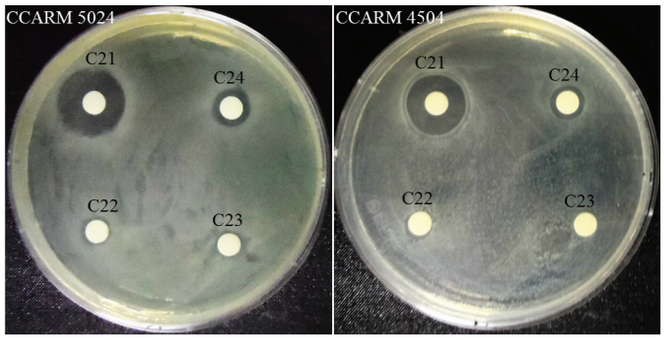
Thành phần dinh dưỡng có trong môi trường phân lập có ảnh lớn đến sự sinh trưởng (khuẩn lạc) của vi sinh vật. Sau 2 tuần nuôi cấy số lượng khuẩn lạc xuất hiện ở nồng độ pha loãng mẫu đất 10^{-5} trên môi trường ISEM và Nutrient lần lượt là 132±18 và 10±3 (hình 1). Ở cùng nồng độ pha loãng mẫu đất, khuẩn lạc xuất hiện trên môi trường ISEM nhiều hơn gần 14 lần so với Nutrient (p=0,009).



Hình 1. Khuẩn lạc xuất hiện trên môi trường thạch đĩa sau 2 tuần.

Sự thiếu các yếu tố từ môi trường sống tự nhiên (nơi mà các vi sinh vật sinh sống) trong các môi trường thương mại (như Nutrient) là một trong những nguyên nhân dẫn tới phần lớn các loài vi sinh vật không thể sinh trưởng trong phòng thí nghiệm [11, 15, 22]. Bên cạch đó, nồng độ dinh dưỡng cao trong môi trường nuôi cấy cũng là nguyên nhân gây ức chế sinh trưởng của các loài [11, 23]. Việc bổ sung thành phần tách chiết từ đất và vitamin vào môi trường ISEM sau khi khử trùng ở 121°C có tác động hỗ trợ cho các loài sinh trưởng tốt hơn trong điều kiện phòng thí nghiệm.

Nghiên cứu này tuyển chọn được 7 chủng vi khuẩn sản sinh hoạt chất kháng khuẩn từ 145 chủng phân lập, trong đó chủng C21 có khả năng ức chế cả 2 vi khuẩn kiểm định *E. faecium* CCARM 5024 và *S. agalactiae* CCARM 4504 với đường kính vòng kháng khuẩn lần lượt là 12,5 và 12 mm (hình 2).

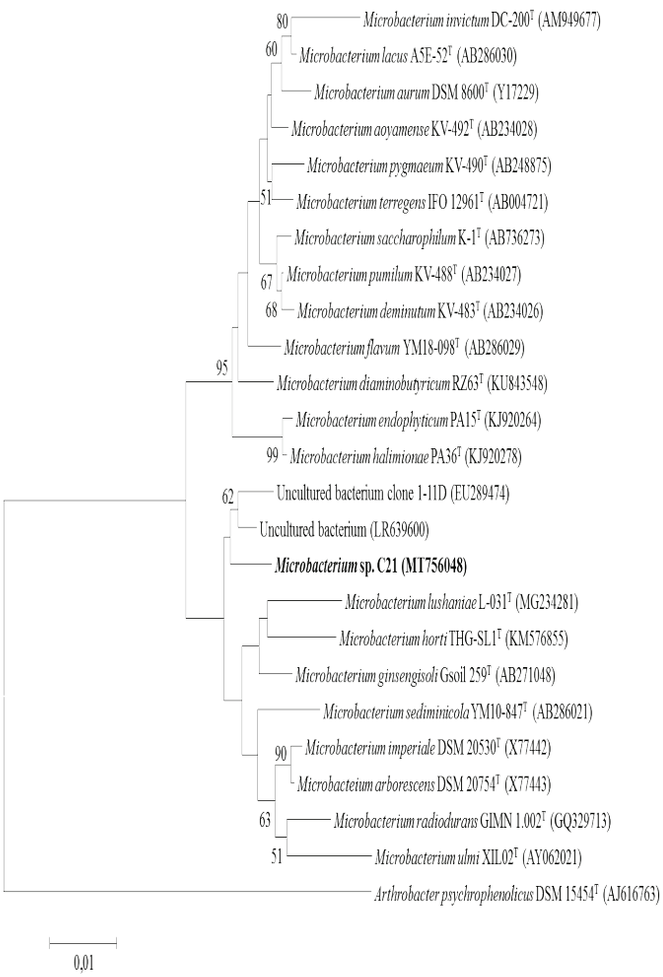


Hình 2. Hoạt tính kháng khuẩn của chủng vi khuẩn khó nuôi cấy.

3.2. Định danh và sơ đồ phả hệ của chủng C21

Kích thước chiều dài gen 16S rRNA của chủng C21 là 1454 bp, với mã số truy nhập MT756048. Kết quả so sánh trình tự gen của chủng C21 cho thấy gần nhất với hai trình tự gen được xác định trực tiếp từ DNA tách chiết trong môi trường mà không thông qua con đường nuôi cấy thuần khiết, bao gồm uncultured bacterium (LR639600) và uncultured bacterium clone 1-11D (EU289474) với độ tương đồng lần lượt là 98,96 và 98,90%. Trong khi so sánh với dữ liệu chủng chuẩn công bố trên dữ liệu Eztaxon Server, trình tự gen 16S rRNA của chủng C21 thể hiện mức tương đồng

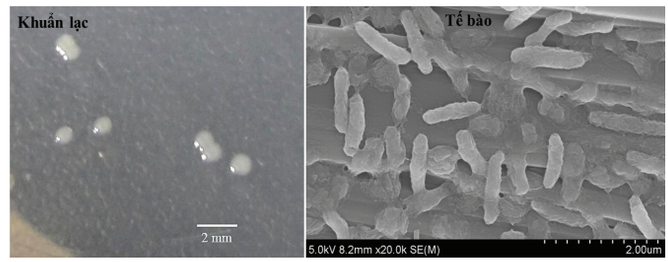
cao nhất (98,54%) với chủng chuẩn *Microbacterium ginsengisoli* DSM 18659^T (JYIY01000074). Bên cạnh đó, sơ đồ phả hệ cũng cho thấy chủng C21 được sắp xếp thuộc chi *Microbacterium*, nhưng ở một vị trí độc lập với các thành viên khác của chi *Microbacterium* đã công bố (hình 3). Nghiên cứu của H.P. Browne và cs (2016) [23] chỉ ra rằng, dựa vào kết quả so sánh trình gen 16S rRNA giữa các loài có giá trị tương đồng dưới 98,7% thì có thể được coi là loài mới. Do vậy, chủng C21 có thể là loài mới thuộc chi *Microbacterium*.



Hình 3. Cây phả hệ chỉ ra mối quan hệ di truyền của chủng C21 với các loài gần nhất của *Microbacterium* dựa trên trình tự gen 16S rRNA. Các giá trị ở các vị trí phân nhánh với tần số xuất hiện (bootstrap) 1000 phép so sánh (chỉ giữ lại giá trị ≥50%); *Arthrobacter psychrophenolicus* DSM 15454^T (AJ616763) là ngoài chi *Microbacterium*.

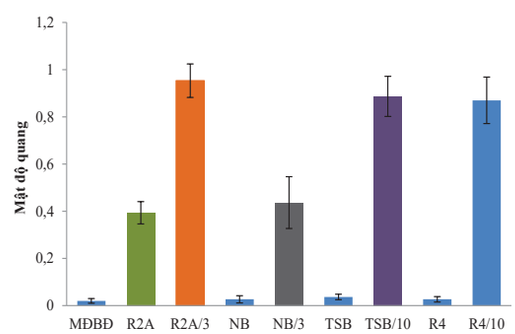
3.3. Đặc điểm nuôi cấy của chủng C21

Khuẩn lạc của chủng C21 trên môi trường ISEM ở 28°C, 6 ngày có màu trắng sữa, tròn lồi, bóng, đường kính khoảng 0,8-1,2 mm. Tế bào có dạng que dài, kích thước 0,20-0,22×1,0-1,2 µm (hình 4).



Hình 4. Hình thái khuẩn lạc và tế bào của chủng C21.

Ngoại trừ môi trường R2A, chủng C21 không sinh trưởng trong môi trường dinh dưỡng hoàn chỉnh như NB, TSB và R4 (p>0,05). Ngược lại, khi sử dụng môi trường nghèo dinh dưỡng hơn thông thường cho thấy chủng C21 sinh trưởng tốt trong tất cả các môi trường sử dụng (hình 5). Mật độ vi khuẩn của chủng C21 trong môi trường hoàn chỉnh (R2A) và nghèo dinh dưỡng (R2A/3) lần lượt là 0,39 và 0,95 (p=0,008). Khi giảm hàm lượng dinh dưỡng đi 3 lần (NB/3), mật độ tế bào chủng C21 đạt 0,44 so với 0,03 đối với môi trường hoàn chỉnh NB (p=0,02). Chủng C21 sinh trưởng tốt trong môi trường nghèo dinh dưỡng (TSB/10 và R4/10), nhưng không sinh trưởng trong môi trường TSB và R4 hoàn chỉnh (p>0,05). Như vậy, vi khuẩn khó nuôi cấy C21 sinh trưởng tốt trong môi trường nghèo dinh dưỡng. Báo cáo của V.H.T. Pham và J. Kim (2012) [11], A.A. Pulschen và cs (2017) [24] cho thấy, sử dụng môi trường có hàm lượng dinh dưỡng thấp hơn so với thông thường được coi là giải pháp hiệu quả cho tuyển chọn các vi sinh sinh vật khó nuôi cấy.



Hình 5. Ảnh hưởng của môi trường đến sinh trưởng chủng C21. MĐBĐ: mật độ tế bào của chủng C21 ban đầu; môi trường hoàn chỉnh: R2A, NB, TSB và R4; môi trường nghèo dinh dưỡng: R2A/3, NB/3, TSB/10 và R4/10.

Kết quả nghiên cứu khả năng sử dụng các nguồn cacbon cho thấy, chủng C21 sinh trưởng tốt ở các nguồn cacbon gồm N-acetylglucosamine, maltose, D-glucose, L-proline, L-rhamnose, inositol, sodium acetate và axit 3-hydroxybutyric; không phát hiện sinh trưởng của chủng C21 đối với các nguồn D-ribose, sucrose, axit itaconic, axit suberic, sodium malonate, axit lactic, L-alanine, potassium 2-ketogluconate, potassium 5-ketogluconate glycogen, L-serine, D-mannitol, salicin, D-melibiose, L-fucose, D-sorbitol, L-arabinose, axit propionic, axit capric, axit

valeric, trisodium citrate, L-histidine, axit 3-hydroxybenzoic và axit 4-hydroxybenzoic. Như vậy, chủng C21 có khả năng sử dụng 8/32 (25%) nguồn cacbon của API ID 32 GN Kit.

3.4. MIC của chủng C21

Kết quả xác định MIC của hoạt chất sinh học tổng số tách chiết từ dịch lên men của chủng C21 được thể hiện ở bảng 1. Hoạt chất sinh học tổng số của chủng C21 có khả năng ức chế sinh trưởng của các vi khuẩn kiểm định từ 8 đến 64 µg/ml, cụ thể *E. faecalis* CCARM 5171 và *S. Pyogenes* CCARM4520 ở nồng độ 8 µg/ml; *E. faecalis* CCARM 5168 ở 16 µg/ml; 32 µg/ml đối với *E. faecalis* CCARM 5024 và *S. agalactiae* CCARM 4504; *E. faecium* CCARM 5025 ở 64 µg/ml. Hoạt tính của kháng sinh có thể được tăng cường dựa trên phương pháp chỉnh sửa bán tổng hợp, kháng sinh mới iboxamycin được tạo ra theo phương pháp trên từ clindamycin là một trong số bằng chứng tiêu biểu (clindamycin là một trong những kháng sinh bị các vi khuẩn gây bệnh gram âm và dương kháng lại). Trong khi kháng sinh iboxamycin nhạy cảm ức chế phổ rộng cả vi khuẩn gây bệnh gram âm và dương [25].

Bảng 1. Giá trị MIC của hoạt chất kháng khuẩn tách chiết từ chủng C21.

Chủng vi khuẩn	MIC (µg/ml)		
	C21	*Cep*	*Nor*
E. faecalis CCARM 5168	16	16	4
E. faecalis CCARM 5171	8	8	8
E. faecalis CCARM 5024	32	32	4
E. faecium CCARM 5025	64	8	8
S. agalactiae CCARM 4504	32	0,25	4
S. pyogenes CCARM 4520	8	0,25	1

Ghi chú: Cep: cephalothin; Nor: norfloxacin.

Những năm gần đây, tìm kiếm các nguồn gen mới (không thuộc *Streptomyces*) tổng hợp hoạt chất kháng khuẩn được các nhà khoa học quan tâm. Chi *Microbacterium* được coi là nguồn gen tiềm năng cho phát hiện hoạt chất kháng khuẩn [26-30]. Báo cáo của D.W. Kim và cs (2011) [26] phát hiện 4 loại kháng sinh thuộc nhóm norfloxacin do *M.* sp. strain 4N2-2 tổng hợp, bao gồm 8-hydroxynorfloxacin, 6-defluoro-6-hydroxynorfloxacin, desethylene norfloxacin và N-acetylnorfloxacin. P. Ghulster và cs (2018) [28] công bố dịch chiết tổng số từ loài mới *M. arborescens* CIP 55.81^T ức chế *S. aureus* ATCC 13709 và S. *aureus* MRSA ATCC 1683 ở hàm lượng 12,5 và 22,5 µg/ml theo thứ tự. Chủng *M. arborescens* 5913 tổng hợp microvionin (kháng sinh thuộc nhóm lipopeptide), nhạy cảm ức chế vi khuẩn gram dương gồm *S. aureus* ATCC 13709, *S. aureus* ATCC 1683 và *S. pneumoniae* ATCC 33400 ở hàm lượng lần lượt là 0,1, 0,46 và 0,15 µg/ml [27]. Gần đây, N.E. Suzina và cs (2022) [30] công bố *M. lacticum* Str. F2E có khả năng ứng chế sinh trưởng phổ rộng các chủng gram dương gồm *B. megaterium* VKM B-512, *B. cereus* GA5, *B. subtilis* ATCC 6633, *B. thuringiensis* ATCC 35646, *B. wehnestephanensis* KBAB4, *L. sphaericus* VKM B-509, *M. liquefaciens* Ash10-2, *M. luteus* VKM Ac-2230, *M. roseus* VKM B-1236, *R. erythropolis* Sh5, *S. aureus* 209-P và *S. salivarius* M15.

4. Kết luận

Chủng C21 thuộc chủng vi khuẩn khó nuôi cấy, có thể là một loài mới thuộc chi *Microbacterium*. Khuẩn lạc có màu trắng sữa, tròn lồi, kích thước 0,8-1,2 mm trên môi trường ISEM, tế bào hình que dài (0,20-0,22×1,0-1,2 µm). Chủng C21 không sinh trưởng trong môi trường dinh dưỡng đầy đủ (ngoại trừ R2A), nhưng sinh trưởng tốt trong môi trường nghèo dinh dưỡng. N-acetylglucosamine, maltose, D-glucose, L-proline, L-rhamnose, inositol, sodium acetate và axit 3-hydroxybutyric là các nguồn cacbon cho chủng C21 sinh trưởng. Hoạt chất kháng khuẩn tổng số tách chiết từ dịch lên men chủng C21 có khả năng ức chế *E. faecalis* CCARM 5168, *E. faecalis* CCARM 5171, *E. faecalis* CCARM 5024, *E. faecium* CCARM 5025, *S. agalactiae* CCARM 4504 và *S. pyogenes* CCARM 4520 ở nồng độ tương ứng là 16, 8, 32, 64, 32 và 8 µg/ml. Đây là nguồn gen mới cho tìm kiếm hoạt chất kháng khuẩn tự nhiên. Chính vì vậy, cần có những nghiên cứu tiếp theo về xác định cấu trúc và tăng hoạt tính kháng khuẩn bằng cách biến đổi cấu trúc hóa học của hoạt chất kháng khuẩn sinh ra bởi chủng C21.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 108.06-2019.03. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Fleming (1929), "On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*", *Br. J. Exp. Pathol.*, **10(3)**, pp.226-236.

[2] L.J. Stephens, M.V. Werrett, A.C. Sedgwick, et al. (2020), "Antimicrobial innovation: A current update and perspective on the antibiotic drug development pipeline", *Future Med. Chem.*, **12(22)**, pp.2035-2065, DOI: 10.4155/fmc-2020-0225.

[3] J. Bérdy (2005), "Bioactive microbial metabolites", *J. Antibiot.*, **58**, pp.1-26, DOI: 10.1038/ja.2005.1.

[4] K. Lewis (2020), "The science of antibiotic discovery", *Cell*, **181(1)**, pp.29-45, DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.056.

[5] J.H. Ch'ng, K.K.L. Chong, L.N. Lam, et al. (2019), "Biofilm-associated infection by enterococci", *Nat. Rev. Microbiol.*, **17**, pp.82-94, DOI: 10.1038/s41579-018-0107-z.

[6] Y. Liu, Z. Tong, J. Shi, et al. (2021), "Reversion of antibiotic resistance in multidrug-resistant pathogens using non-antibiotic pharmaceutical benzydamine", *Commun. Biol.*, **4**, DOI: 10.1038/s42003-021-02854-z.

[7] M.E.A. de Kraker, A.J. Stewardson, S. Harbarth (2016), "Will 10 million people die a year due to antimicrobial resistance by 2050?", *PLOS Med.*, **13(11)**, DOI: 10.1371/journal.pmed.1002184.

[8] L.L. Poulsen, M. Bisgaard, N.T. Son, et al. (2012), "*Enterococcus* and *Streptococcus* spp. associated with chronic and self-medicated urinary tract infections in Vietnam", *BMC Infect. Dis.*, **12**, DOI: 10.1186/1471-2334- 12-320.

[9] V.T.V. Dung, D.T.T. Nga, U. Rydell, et al. (2019), "Antimicrobial susceptibility testing and antibiotic consumption results from 16 hospitals in Viet Nam: The VINARES project 2012-2013", *J. Glob.*, **18**, pp.269-278, DOI: 10.1016/j.jgar.2019.06.002.

[10] T.V.D. Vu, M. Choisy, T.T.N. Do, et al. (2021), "Antimicrobial susceptibility testingresults from 13 hospitals in Viet Nam: VINARES 2016-2017", *Antimicrob. Resist. Infect. Control.*, **10(1)**, DOI: 10.1186/s13756-021-00937-4.

[11] V.H.T. Pham, J. Kim (2012), "Cultivation of unculturable soil bacteria", *Trends. Biotechnol.*, **30(9)**, pp.475-484, DOI: 10.1016/j.tibtech.2012.05.007.

[12] L.A. Hug, B.J. Baker, K. Anantharaman, et al. (2016), "A new view of the tree of life", *Nat. Microbiol.*, **1**, DOI: 10.1038/nmicrobiol.2016.48.

[13] L.L. Ling, T. Schneider, A.J. Peoples, et al. (2015), "A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance", *Nature*, **517**, pp.455-459, DOI: 10.1038/nature14098.

[14] K. Lewis (2017), "New approaches to antimicrobial discovery", *Biochem. Pharmacol.*, **134**, pp.87-98, DOI: 10.1016/j.bcp.2016.11.002.

[15] T.M. Nguyen, C. Seo, M. Ji, et al. (2018), "Effective soil extraction method for cultivating previously uncultured soil bacteria", *Appl. Environ. Microbiol.*, **84(24)**, DOI: 10.1128/AEM.01145-18.

[16] B.C. Ferrari, S.J. Binnerup, M. Gillings (2005), "Microcolony cultivation on a soil substrate membrane system selects for previously uncultured soil bacteria", *Appl. Environ. Microbiol.*, **71(12)**, pp.8714-8720, DOI: 10.1128/AEM.71.12.8714-8720.2005.

[17] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2012), *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically*, pp.1-68.

[18] J. Sambrook, D.W. Russell (2001), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3rd ed., 2344pp.

[19] D.J. Lane (1991), "16S/23S rRNA sequencing", *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, John Wiley and Sons, pp.115-175.

[20] S. Kumar, G. Stecher, K. Tamura (2016), "MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets", *Mol. Biol. Evol.*, **33(7)**, pp.1870-1874, DOI: 10.1093/molbev/msw054.

[21] S. Ahmadi, S. Soleimanian-Zad, D. Zaeim (2020), "Antibacterial and antifungal activity of the aqueous and methanolic extracts and essential oils of Red Beets *Beta vulgaris* leaves", *Zahedan J. Res. Med. Sci.*, **22(3),** DOI: 10.5812/zjrms.83725.

[22] D. Nichols, N. Cahoon, E.M. Trakhtenberg, et al. (2010), "Use of ichip for high-throughput *in situ* cultivation of "uncultivable" microbial species", *Appl. Environ. Microbiol.*, **76(8)**, pp.2445-2450, DOI: 10.1128/aem.01754-09.

[23] H.P. Browne, S.C. Forster, B.O. Anonye, et al. (2016), "Culturing of "unculturable" human microbiota reveals novel taxa and extensive sporulation", *Nature*, **533**, pp.543-546, DOI: 10.1038/nature17645.

[24] A.A. Pulschen, A.G. Bendia, A.D. Fricker, et al. (2017), "Isolation of uncultured bacteria from antarctica using long incubation periods and low nutritional media", *Front. Microbiol.*, **8**, DOI: 10.3389/fmicb.2017.01346.

[25] M.J. Mitcheltree, A. Pisipati, E.A. Syroegin, et al. (2021), "A synthetic antibiotic class overcoming bacterial multidrug resistance", *Nature*, **599**, pp.507-512, DOI: 10.1038/s41586-021-04045-6.

[26] D.W. Kim, T.M. Heinze, B.S. Kim, et al. (2011), "Modification of norfloxacin by a *Microbacterium* sp. strain isolated from a wastewater treatment plant", *Appl. Environ. Microbiol.*, **77(17)**, pp.6100-6108, DOI: 10.1128/AEM.00545-11.

[27] V. Wiebach, A. Mainz, M.A.J. Siegert, et al. (2018), "The anti-staphylococcal lipolanthines are ribosomally synthesized lipopeptides", *Nat. Chem. Biol.*, **14(7)**, pp.652-654, DOI: 10.1038/s41589-018-0068-6.

[28] P. Ghulster, D.L. Beller, J.P. Leonetti, et al. (2018), *Use of Microbacterium Strains for the Production of Antibacterial Agents*, US Patent Application Publication (US 2018/0187216 A1).

[29] T. Wang, F. Li, Q. Lu, et al. (2021), "Diversity, novelty, antimicrobial activity, and new antibiotics of cultivable endophytic actinobacteria isolated from psammophytes collected from Taklamakan desert", *J. Pharm. Anal.*, **11(2)**, pp.241-250, DOI: 10.1016/j.jpha.2020.06.004.

[30] N.E. Suzina, A.V. Machulin, V.V. Sorokin, et al. (2022), "Capture of essential trace elements and phosphate accumulation as a basis for the antimicrobial activity of a new ultramicrobacterium-*Microbacterium* lacticum Str. F2E", *Microorganisms*, **10(1)**, DOI: 10.3390/microorganisms10010128.