

**KHẢO SÁT HOẠT TÍNH KHÁNG VI KHUẨN GRAM ÂM
CỦA CAO CHIẾT TỪ XẠ KHUẨN *STREPTOMYCES ALBUS* 4VH4**

*Nguyễn Huỳnh Kim¹, Nguyễn Minh Thái¹, Hồ Lê Trúc Linh¹
Nguyễn Thị Thúy Hằng², Nguyễn Tú Anh^{1*}*

Tóm tắt

Mục tiêu: Khảo sát hoạt tính kháng vi khuẩn Gram âm của cao toàn phần và cao phân đoạn từ môi trường lên men xạ khuẩn *Streptomyces albus* (*S. Albus*) 4VH4. **Phương pháp nghiên cứu:** *S. albus* 4VH4 được tăng sinh trong môi trường ISP cải tiến. Cao toàn phần và cao phân đoạn thu được từ dịch lên men xạ khuẩn được khảo sát hoạt tính kháng khuẩn bằng phương pháp khuếch tán và vi pha loãng, thành phần hóa học của cao chiết được phân tích bằng sắc ký lỏng ghép khối phổ (Liquid chromatography-mass spectrometry - LC-MS). **Kết quả:** Chất kháng khuẩn trong phân đoạn F6 của cao chiết dichloromethan từ dịch lên men *S. albus* 4VH4 có khối lượng phân tử 506,15 Da. Chất này ức chế các vi khuẩn *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* đặc biệt *K. pneumoniae* có MIC = 0,25 µg/mL, tương đương gentamicin. **Kết luận:** Cao phân đoạn từ dịch lên men *S. albus* 4VH4 chứa hợp chất khối lượng phân tử 506,15 Da có hoạt tính kháng vi khuẩn Gram âm.

Từ khóa: Xạ khuẩn *Streptomyces albus*; Cao phân đoạn; Vi khuẩn Gram âm; *Klebsiella pneumoniae*.

**INVESTIGATION OF THE ANTI-GRAM-NEGATIVE BACTERIA
ACTIVITY OF EXTRACTS FROM ACTINOBACTERIA
STREPTOMYCES ALBUS 4VH4 CULTIVATION**

Abstract

Objectives: To investigate the anti-gram-negative bacteria activity of fractionated extracts derived from the cultivation of actinomycete strain *Streptomyces albus* (*S. albus*) 4VH4. **Methods:** The *S. albus* 4VH4 strain was cultivated in a modified ISP medium. Fractions obtained from the crude extract of the fermentation broths

¹Khoa Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

²Khoa Kiểm soát nhiễm khuẩn, Bệnh viện Nhân dân Gia Định

*Tác giả liên hệ: Nguyễn Tú Anh (nguyentuanh@ump.edu.vn)

Ngày nhận bài: 29/7/2024

Ngày được chấp nhận đăng: 30/8/2024

<http://doi.org/10.56535/jmpm.v49i7.942>

were evaluated for antibacterial activity using diffusion and microdilution techniques, and the chemical composition of these extracts was analyzed using LC-MS. **Results:** The antibacterial agent identified in fraction F6 of the dichloromethane extract from *S. albus* 4VH4 fermentation broths had a molecular weight of 506.15 Da. This compound showed antibacterial activity against Gram-negative bacteria *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, particularly *K. pneumoniae*, with a MIC of 0.25 µg/mL, equivalent to gentamicin. **Conclusion:** The fractionated extracts from the fermentation broths of *S. albus* 4VH4 containing a compound having a molecular weight of 506.15 Da exhibited activity against Gram-negative bacteria.

Keywords: Actinomycete *Streptomyces albus* 4VH4; Fraction extract; Gram-negative bacteria; *Klebsiella pneumoniae*.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Đề kháng kháng sinh trên thế giới nói chung và ở Việt Nam nói riêng đang trở thành vấn đề đáng quan ngại trong điều trị các bệnh lý nhiễm khuẩn [1, 2]. Trong công cuộc tìm kiếm kháng sinh mới, phân lập các chất tiềm năng từ xạ khuẩn tại các vùng sinh thái khác nhau là chiến lược được nhiều nhóm nghiên cứu thực hiện [3]. Hệ xạ khuẩn cộng sinh địa y là một trong những nguồn thu nhận mẫu được quan tâm trong những năm gần đây [4]. Khoảng 80% kháng sinh đang sử dụng trong lâm sàng có nguồn gốc từ xạ khuẩn, chủ yếu từ *Streptomyces* spp. và *Micromonospora* spp. Đặc biệt, các *Streptomyces* spp. sản xuất khoảng

7.600 hợp chất có hoạt tính kháng sinh mạnh. Năm 2022, nhóm nghiên cứu của chúng tôi đã phân lập được một số xạ khuẩn từ địa y *Dirinaria applanata* trên thân cây dứa tại huyện Giồng Trôm, Bến Tre [5]. Khi thử bằng phương pháp đường vạch đôi kháng, các chất chuyển hoá của xạ khuẩn - đặc biệt từ chủng *S. albus* 4VH4 cho thấy khả năng kháng vi khuẩn Gram âm. Do đó, chúng tôi tiến hành nghiên cứu nhằm: *Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của cao toàn phần và cao phân đoạn từ dịch chiết môi trường lên men xạ khuẩn S. albus 4VH4. Sau đó, phân đoạn có hoạt tính cao nhất được phân tích thành phần hoá học bằng LC-MS.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu

Chủng xạ khuẩn *S. albus* 4VH4 phân lập từ địa y *Dirinaria applanata* trên thân cây dừa tại huyện Giồng Trôm, Bến Tre, vào tháng 02/2021 [5]. *S. albus* 4VH4 được lưu trữ trong glycerol 25% (tt/tt), ở -70°C tại Bộ môn Vi sinh Ký sinh, Khoa Dược, Đại Học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh. Các chủng vi khuẩn Gram âm gây bệnh *Klebsiella pneumoniae* ATCC 15308, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 được lưu trữ tại Bộ môn Vi sinh Ký sinh, Khoa Dược, Đại Học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh.

2. Phương pháp nghiên cứu

* *Tăng sinh xạ khuẩn*: *S. albus* 4VH4 được tăng sinh cấp 1 trong môi trường Tryptone Soybean Broth (TSB) với tốc độ lắc 180 vòng/phút ở 30°C trong 48 giờ. Ở giai đoạn tăng sinh cấp 2, xạ khuẩn 4VH4 được nuôi cấy trên 15L môi trường International Streptomyces Project (ISP) cải tiến (3 g/L glucose, 4 g/L chiết xuất mạch nha và 3 g/L chiết xuất nấm men) với tỷ lệ cấy 5% (tt/tt), tốc độ lắc 180 vòng/phút ở 30°C trong 7 ngày.

* *Chiết cao toàn phần*: Dịch nuôi cấy được lọc qua bông. Dịch lọc lắ phân bố với 1L dichloromethan (DCM). DCM được bay hơi ở nhiệt độ phòng, thu cắ.

* *Chiết cao phân đoạn*: Triển khai sắc ký cột pha thuận để tách các phân đoạn. Mẫu thử: Cao toàn phần DCM. Cột sắc ký: Chiều dài 45cm, đường kính 2,5cm có khóa. Chuẩn bị mẫu: Trộn cao phân đoạn đều với đồng lượng silicagel (cỡ hạt 40 - 63 μm) được hỗn hợp bột khô, toi, xỏp, đều màu. Chuẩn bị cột: Lót 1 miếng bông thấm vào dưới đáy cột, cho silicagel (cỡ hạt 40 - 63 μm) vào cốc có mỏ, sấy 100 - 120 $^{\circ}\text{C}$ trong 2 giờ, để nguội, thêm n-hexan và khuấy đều trong 15 phút và đổ hỗn hợp vào trong cột sắc ký, ổn định cột trong 6 giờ. Pha động: Dung môi từ kém phân cực đến phân cực: n-hexan:dichloromethan:ethyl acetat:methanol, thể tích thu nhận ở mỗi phân đoạn: 10mL, xác định hoạt tính kháng khuẩn của các phân đoạn.

* *Xác định hoạt tính kháng khuẩn của các cao phân đoạn bằng phương pháp khuếch tán và vi pha loãng*: Chuẩn bị vi khuẩn thử nghiệm: Sau khi cấy trên đĩa thạch Brain-Heart Agar (BHA), ủ ở 37°C trong 24 giờ, vi khuẩn được phân tán trong NaCl 0,85%.

Huyền dịch vi khuẩn được điều chỉnh độ hấp thu ở bước sóng 600nm trong khoảng 0,08 - 0,12 tương đương với mật độ vi khuẩn 1 - $1,5 \times 10^8$ đơn vị hình thành khuẩn lạc/mL (Colony forming units, CFU/mL). Chất thử nghiệm: Cân chính xác cao toàn phần, cao phân đoạn để pha dung dịch gốc có nồng độ 10,24 mg/mL trong Dimethyl sulfoxide (DMSO) 10% (tt/tt). Đối với phương pháp khuếch tán: Cho 60 μ L/L cao phân đoạn vào đĩa giấy có đường kính 6mm. Đối với phương pháp vi pha loãng: Chuẩn bị dãy chất thử gồm 15 nồng độ được pha loãng theo cấp số 2. Kháng sinh đối chứng là gentamicin.

* *Phân tích thành phần cao toàn phần và cao phân đoạn bằng LC-MS*: Cao toàn phần DCM từ dịch lên men *S. albus* 4VH4 và cao phân đoạn được phân tích bằng hệ thống khối phổ MS 6545 series Q-TOF (Agilent, Mỹ) và hệ thống sắc ký lỏng siêu cao áp Agilent 1900 (Mỹ) với cột Xterra C₁₈, 4,6 x 50mm, pha động: (A) acid formic trong nước (0,1% tt/tt) và (B) acetonitril. Dự đoán công thức chất có hoạt tính kháng khuẩn bằng phân tích HR-LC-MS, LC-MS với nguồn ion hóa phun điện tử (ESI) của

các phân tử có thời gian lưu trùng nhau giữa cao toàn phần và phân đoạn. Đọc kết quả phổ và dự đoán hợp chất sinh tổng hợp được từ chủng xạ khuẩn 4VH4. Để nhận dạng thành phần giả định, thời gian lưu và khối lượng chính xác của các thành phần được so sánh với cơ sở dữ liệu khối phổ có độ phân giải cao. Đối với các thành phần không trùng khớp trong cơ sở dữ liệu, công thức phân tử dự đoán và khối lượng chính xác đã được tìm kiếm trong cơ sở dữ liệu của Chapman and Hall Dictionary of Natural Products (DNP) [7]. Nếu tìm thấy sự trùng khớp hợp lý, xem xét khối lượng/công thức phân tử chính xác, vi sinh vật sản sinh và xét nghiệm mục tiêu, phân tử được báo cáo là thành phần gợi ý của phân đoạn.

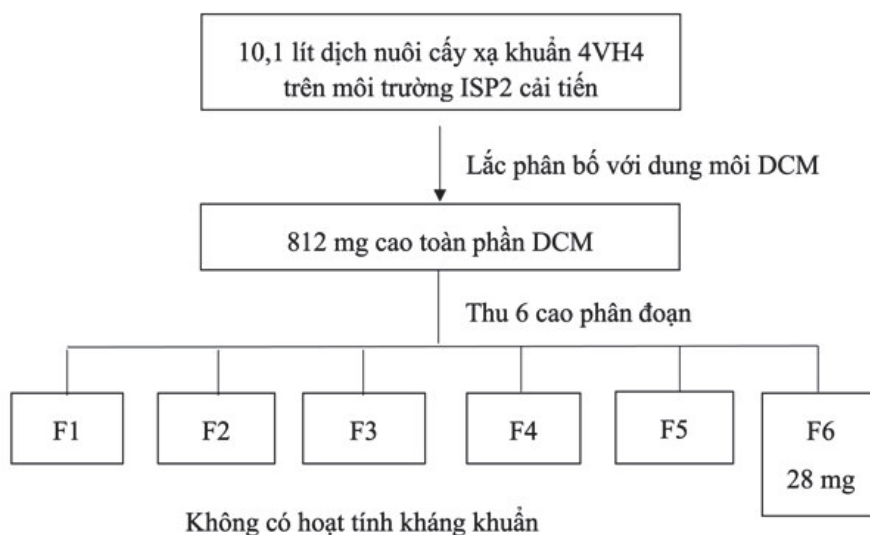
KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Chiết cao toàn phần từ dịch lên men xạ khuẩn *S. albus* 4VH4

Nuôi cấy 4VH4 trên 15L môi trường ISP cải tiến, lọc bỏ sinh khối thu được 10,1L dịch nuôi cấy. Chiết dịch nuôi cấy với DCM và cô dịch chiết đến cạn thu được 812mg cao DCM. Cao chiết được dùng cho sắc ký cột thu cao phân đoạn.

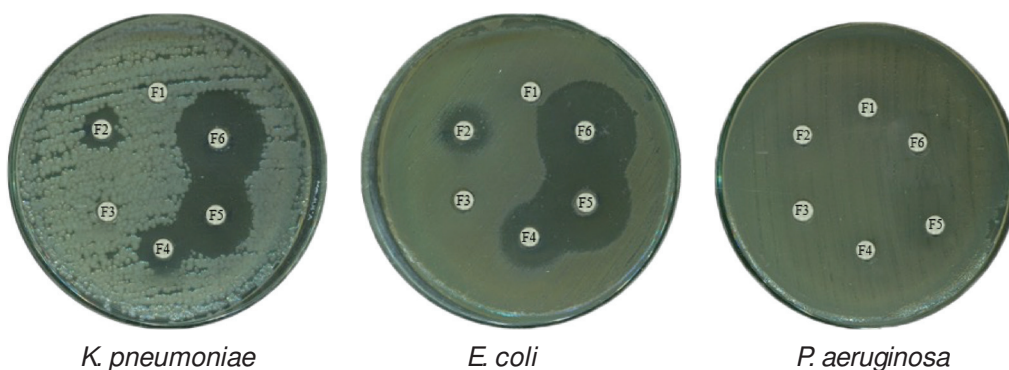
2. Thu cao phân đoạn bằng sắc ký cột

Triển khai sắc ký cột pha thuận để tách các phân đoạn cao DCM sử dụng pha động từ kém phân cực đến phân cực: n-hexan:dichloromethan:ethyl acetat:methanol (Hình 1).



Hình 1. Sơ đồ thu nhận các phân đoạn F1 - F6 từ cao chiết toàn phần cao DCM.

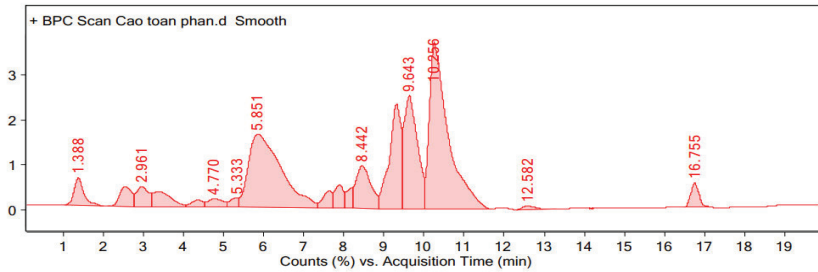
Thử hoạt tính kháng khuẩn 6 phân đoạn bằng phương pháp đĩa giấy khuếch tán, xác định phân đoạn 6 có hoạt tính kháng khuẩn cao nhất trên vi khuẩn *K. pneumoniae* và *E. coli*, tất cả các phân đoạn đều không thể hiện hoạt tính kháng vi khuẩn *P. aeruginosa* (Hình 2). Hiệu suất chiết phân đoạn F6 so với cao toàn phần là 3,4%.



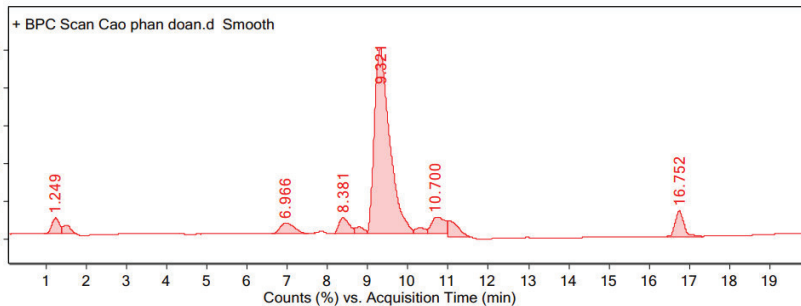
Hình 2. Khả năng ức chế *K. pneumoniae*, *E.coli* và *P. aeruginosa* của 6 phân đoạn thu từ cao toàn phần DCM.

3. Phân tích LC-MS cao toàn phần DCM và phân đoạn F6

Sắc ký đồ LC của cao toàn phần DCM và cao phân đoạn F6 có các thành phần trùng thời gian lưu (RT) với khoảng RT 9,2 - 9,8 chiếm tỷ lệ cao nhất (Hình 3, 4).

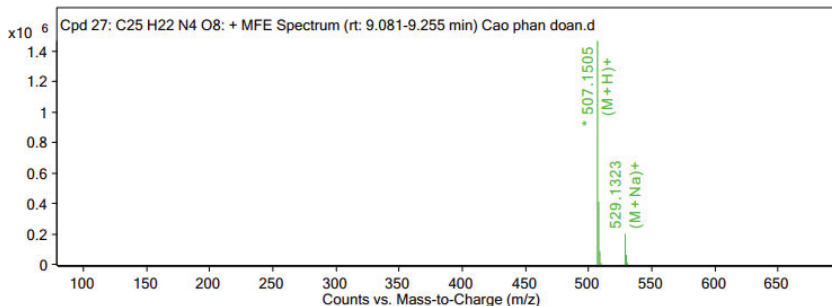


Hình 3. Sắc ký đồ LC của cao toàn phần DCM.



Hình 4. Sắc ký đồ LC phân đoạn F6 của cao toàn phần DCM.

Kết quả phổ HR-ESI-MS cho mảnh ion dương ở m/z $[M+H]^+$ 507,1505, với khối lượng phân tử được xác định là 506,15 Da, công thức phân tử dự đoán là $C_{25}H_{22}N_4O_8$ và $C_{22}H_{14}N_{14}O_2$ (Hình 5).



Hình 5. Kết quả phổ HR-ESI-MS.

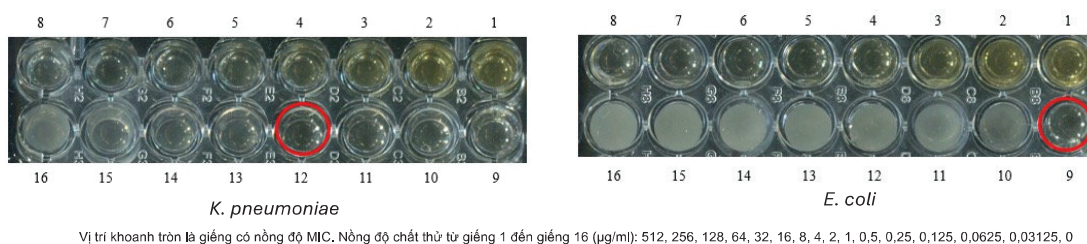
Các phân tử có RT trùng nhau (khoảng RT 8,3 - 10,7) giữa cao toàn phần và phân đoạn F6 được phân tích bằng HR-ESI-MS và chương trình Masshunter Qualitative Agilent, có 6 công thức được dự đoán (Bảng 1).

Bảng 1. Một số chất được dự đoán có trong cao toàn phần DCM.

STT	Hợp chất dự đoán	Công thức phân tử dự đoán	Khối lượng chính xác	Thời gian lưu (phút)
S1	Cyclo(4-hydroxy-S-Pro-S-Trp)	$C_{16}H_{17}N_3O_3$	299,12	8,056
S2	5H-Indolo[3,2-B]Quinolin-11 (10H)-One	$C_{15}H_{10}N_2O$	234,07	8,499
S3	Mianserin	$C_{18}H_{20}N_2$	264,16	8,527
S4	N-[2-(5-methyl-1H-indol-3-yl)ethyl]acetamide	$C_{13}H_{16}N_2O$	216,12	8,639
S5	Streptonigrin	$C_{25}H_{22}N_4O_8$	506,5	9,214
S6	Atenolol	$C_{14}H_{22}N_2O_3$	266,16	10,19

4. MIC của cao toàn phần DCM và phân đoạn F6

Cao toàn phần DCM và phân đoạn F6 được xác định nồng độ ức chế tối thiểu bằng phương pháp vi pha loãng trên phiến nhựa 96 giếng. MIC của cao toàn phần DCM trên *K. pneumoniae*, *E. coli*, lần lượt là 2 µg/mL, 8 µg/mL. MIC của cao phân đoạn F6 trên *K. pneumoniae*, *E. coli*, lần lượt là 0,25 µg/mL, 2 µg/mL.



Hình 6. Kết quả MIC của phân đoạn F6 trên vi khuẩn thử nghiệm.

BÀN LUẬN

MIC của gentamicin trên *K. pneumoniae* < 0,5 µg/mL. Như vậy, các vi khuẩn thử nghiệm đều nhạy với kháng sinh đối chứng theo CLSI M100 - S29 [6]. MIC của phân đoạn F6 trên *K. pneumoniae* là 0,25 µg/mL (tương đương với gentamicin). Số liệu này

cho thấy chất kháng khuẩn trong phân đoạn F6 của cao chiết DCM từ dịch lên men *S. albus* 4VH4 ức chế tốt trên vi khuẩn Gram âm, đặc biệt là với *K. pneumoniae*. Bằng phương pháp LC-MS, phân đoạn F6 chứa hợp chất kháng khuẩn được dự đoán có công thức phân tử là $C_{25}H_{22}N_4O_8$ hoặc

$C_{22}H_{14}N_{14}O_2$ với khối lượng phân tử là 506,15 Da, trùng với khối lượng phân tử của streptonigrin - chất kháng khối u và kháng vi sinh vật được chiết xuất từ xạ khuẩn *Streptomyces flocculus* [8].

KẾT LUẬN

Cao toàn phần DCM từ dịch lên men *S. albus* 4VH4 và phân đoạn F6 có hoạt tính kháng vi khuẩn *K. pneumoniae* và *E.coli*. Các nghiên cứu tiếp theo cần khảo sát đồng nuôi cấy *S. albus* 4VH4 với xạ khuẩn khác phân lập từ địa y hoặc vi khuẩn gây bệnh khác để đánh giá tiềm năng sản xuất kháng sinh mới và khảo sát các hoạt tính sinh học khác của các phân đoạn. Ngoài ra, kỹ thuật giải trình tự gen có thể được sử dụng để tìm kiếm nhóm gen chịu trách nhiệm sinh tổng hợp hợp chất polyketid và nonribosomal peptid - là các hợp chất có nhiều hoạt tính sinh học và thường tìm thấy ở chi *Streptomyces*.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ kinh phí bởi Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh theo hợp đồng số 180/2023/HĐ-ĐHYD, ngày 15 tháng 9 năm 2023. Nhóm tác giả cam kết không có xung đột về lợi ích trong nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Engström A. Antimicrobial resistance as a creeping crisis, in Understanding

the creeping crisis. *Springer International Publishing Cham*. 2021:19-36.

2. Nguyễn Xuân Thiêm, tổng Thị Thảo, Nguyễn Hữu Thắng. Thực trạng nhiễm khuẩn bệnh viện và một số yếu tố liên quan tại Bệnh viện Đa khoa Hà Đông, năm 2020. 2022; 152(4):179-185.

3. Anandan R, D Dharumadurai, and GP Manogaran. An introduction to actinobacteria, in *Actinobacteria-basics and biotechnological applications*. *IntechOpen*. 2016.

4. Jiang Y, et al. Diversity and antimicrobial activities of actinomycetes associated with three species of lichens. 2015; 3(5):171-177.

5. Nguyễn Hồng Trang, Phân lập xạ khuẩn liên kết một số địa y tại Việt Nam có tiềm năng tổng hợp kháng sinh, in *Vi sinh Ký sinh*. Đại học Y Dược Thành Phố Hồ Chí Minh: TP. Hồ Chí Minh. 2019:90.

6. Clinical & Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, in M100. 2020: USA.

7. Chapman J. Chapman and Hall dictionary of natural products. 2008.

8. Donohoe TJ, Jones CR, and Barbosa LC. Total synthesis of (\pm)-streptonigrin: De Novo construction of a Pentasubstituted pyridine using ring-closing metathesis. *Journal of the American Chemical Society*. 2011; 133(41):16418-16421.