

## Bài báo nghiên cứu

**PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN CÁC CHỦNG XẠ KHUẨN  
CÓ KHẢ NĂNG SINH ENZYME NGOẠI BÀO, ĐỐI KHÁNG *VIBRIO* SPP.****Tô Đình Phúc<sup>1\*</sup>, Nguyễn Thủy Hương<sup>2</sup>, Phạm Thị Thu Đan<sup>3</sup>, Trương Thị Mỹ Phương<sup>1</sup>**<sup>1</sup>Công ty TNHH Khoa học Công nghệ Liên Hiệp Phát, Việt Nam<sup>2</sup>Trường Đại học Bách khoa, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam<sup>3</sup>Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam\*Tác giả liên hệ: Tô Đình Phúc - Email: [todinhphuc00co@yahoo.com](mailto:todinhphuc00co@yahoo.com)

Ngày nhận bài: 23-12-2020; ngày nhận bài sửa: 16-5-2021; ngày duyệt đăng: 08-6-2021

**TÓM TẮT**

Nghiên cứu được tiến hành nhằm phân lập và tuyển chọn các chủng xạ khuẩn từ các ao nuôi tôm thẻ chân trắng ở huyện Thạnh Phú, tỉnh Bến Tre có khả năng sinh enzyme ngoại bào và đối kháng với *Vibrio* spp. Có tất cả 26 chủng xạ khuẩn được phân lập, trong đó 5 chủng TM1, TM2, TM7, TM21 và TM22 được xác định đều là các chủng đa chức năng. Cả 5 chủng này đều có khả năng sản sinh tốt cả 3 loại enzyme protease, amylase và cellulase. Đặc biệt, 3 chủng TM1, TM2 và TM21 còn có khả năng đối kháng với *Vibrio* spp.. Phân tích kết quả giải trình tự gen 16S rRNA cho thấy cả 3 chủng TM1, TM2, TM21 đều thuộc loài *Streptomyces hygrosopicus*. Hai chủng TM7 và TM22 được xác định lần lượt là *Streptomyces diastaticus* và *Streptomyces spiralis*.

**Từ khóa:** xạ khuẩn thủy sản; đối kháng *Vibrio* spp.; enzyme ngoại bào; *Streptomyces*

**1. Giới thiệu**

Ngày nay, biện pháp phòng trị sinh học đã được chú trọng do có nhiều ưu điểm là không ô nhiễm môi trường và quan trọng là tạo ra nguồn lương thực an toàn cho con người. Các vi sinh vật đối kháng được sử dụng như là yếu tố hiệu quả để kiểm soát các bệnh truyền nhiễm thông qua các cơ chế loại trừ cạnh tranh như cạnh tranh chất dinh dưỡng, tạo kháng sinh, tiết enzyme ngoại bào... (Siddiqui, 2006). Trong số các hợp chất tự nhiên có nguồn gốc từ vi sinh vật sinh đã được công bố sử dụng trên thế giới thì 45% được sinh ra từ xạ khuẩn, 38% từ nấm và 17% từ vi khuẩn (Demain, & Sanchez, 2009). Trong quá trình sống, xạ khuẩn tiết ra nhiều chất có hoạt tính sinh học cao có khả năng kháng lại các loài vi sinh vật khác nhau bao gồm cả nấm và vi khuẩn. Chính vì vậy, xạ khuẩn là một trong những nguồn sản xuất các chất có hoạt tính sinh học đầy tiềm năng (Mitra et al., 2008). Ngoài ra, nhóm xạ khuẩn còn có khả năng phân hủy các cơ chất như tinh bột, casein, cellulose... và

---

**Cite this article as:** Tô Đình Phúc, Nguyễn Thủy Hương, Phạm Thị Thu Đan, & Trương Thị Mỹ Phương (2021). Isolation and screening of actinomycetes against *Vibrio* spp. and producing extracellular enzymes. *Ho Chi Minh City University of Education Journal of Science*, 18(6), 1016-1027.

sản xuất các chất chống vi khuẩn như vi khuẩn *Vibrio* sp. (Barcina et al., 1987; Zheng et al., 2000). Một vấn đề còn tồn tại song song với vi khuẩn gây bệnh nguy hiểm trên thủy sản *Vibrio* sp., đó chính là hàm lượng hữu cơ trong ao nuôi tôm thường rất lớn. Nguồn ô nhiễm này thường xuyên phát sinh và xuất phát từ chất thải của tôm, cá và đặc biệt là từ thức ăn dư thừa trong quá trình nuôi. Ngoài *Vibrio* sp., nguồn ô nhiễm này cũng gây ảnh hưởng vô cùng lớn đến tỉ lệ sống và quá trình phát triển của tôm (Jamilah et al., 2009).

Vì vậy, với hai vấn đề còn tồn tại nêu trên, nghiên cứu này được tiến hành thực hiện với mong muốn phát hiện, xác định được những chủng xạ khuẩn có khả năng sinh enzyme ngoại bào và có hoạt tính kháng vi khuẩn *Vibrio* spp. nhằm mục đích xử lý ô nhiễm ao nuôi và phòng ngừa hoặc giảm thiểu khả năng nhiễm bệnh của vật nuôi thủy sản. Từ đó, sử dụng các chủng xạ khuẩn có các chức năng hữu ích này để phục vụ nghề nuôi trồng thủy sản nói chung và nuôi tôm nói riêng.

## 2. Vật liệu và phương pháp

### 2.1. Vật liệu

- Ngoài mẫu bùn đáy ao, mẫu nước cũng sẽ được thu thập để không loại trừ khả năng hiện diện của xạ khuẩn trong các tầng nước hoặc được đưa vào từ môi trường nước lợ cấp từ nguồn tự nhiên nhưng có khả năng sinh trưởng thích nghi trong môi trường ao nuôi. Mẫu bùn đáy ao (cách bề mặt 2-5 cm) và mẫu nước (cách bề mặt 0,2-0,5 m) tại ao nuôi tôm thuộc huyện Thạnh Phú, tỉnh Bến Tre. Mẫu bùn đáy và mẫu nước mỗi ao được lấy ở 3 vị trí ngẫu nhiên ở 3 ao tôm thuộc 3 trại nuôi khác nhau, tổng số có 18 mẫu phân lập. Các ao lấy mẫu đều đang trong tình trạng ổn định và có tôm khỏe mạnh, chưa từng sử dụng chế phẩm sinh học có thành phần xạ khuẩn. Mẫu được bảo quản trong thùng đá trên trường vận chuyển về phòng thí nghiệm và trong tủ lạnh ở 4°C cho đến khi xử lý và phân tích.

- Vi khuẩn *Vibrio* spp. do Công ty TNHH Khoa học Công nghệ Liên Hiệp Phát cung cấp được phân lập từ các ao nuôi bị Hội chứng tôm chết sớm (EMS – Early Mortality Syndrome) ở Long An và Ninh Thuận đã được kiểm chứng trên tôm được kí hiệu là *Vibrio* sp. VPA1 và *Vibrio* sp. VPA2.

### 2.2. Phương pháp

#### 2.2.1. Phân lập xạ khuẩn

Xạ khuẩn được phân lập theo phương pháp Vinogradkii (1952) trích theo Nguyễn Thành Đạt (2000) (Nguyen, 2000). Quan sát màu sắc khuẩn lạc và phân loại màu theo nhóm. Màu sắc của hệ sợi khí sinh được xác định dựa vào bảng màu của Tresner và Buckus (Tresner, & Backus, 1963). Các chủng xạ khuẩn được phân lập sẽ được nuôi trong môi trường lỏng qua 7 ngày và glycerol sẽ được thêm vào sao cho nồng độ cuối đạt 15% rồi bảo quản ở -20°C (Valli et al., 2012).

### 2.2.2. Xác định khả năng sinh enzyme ngoại bào của các chủng xạ khuẩn

Xác định hoạt tính các enzyme ngoại bào bằng phương pháp khuếch tán trên môi trường có bổ sung từng nguồn cơ chất sau: tinh bột (xác định hoạt tính amylase với thuốc thử lugol), sữa gầy (xác định hoạt tính protease thông qua vòng phân giải), và CMC (xác định hoạt tính cellulase với thuốc thử lugol). Chỉ tiêu theo dõi là đường kính vòng thủy phân trên đĩa thạch (mm) (Egorov, 1976).

### 2.2.3. Xác định các chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng với một số chủng *Vibrio* spp.

Xác định đặc tính đối kháng với vi khuẩn *Vibrio* bằng phương pháp khuếch tán qua lỗ thạch (Egorov, 1976). Chủng *Vibrio* sp. được nuôi cấy trên môi trường TCBS lỏng trong 24 giờ. Các chủng xạ khuẩn được nuôi cấy trên môi trường Gause-1 lỏng (lắc ở 220 vòng/phút) trong 5-7 ngày. Tiến hành li tâm ở 5000 vòng/phút trong 15 phút, thu dịch. Nhỏ 100  $\mu$ L dịch qua lọc (lỗ lọc 0,2  $\mu$ m) thu được vào các lỗ tạo ra trên đĩa môi trường TCBS đã cấy vi khuẩn *Vibrio*, ủ 37° trong 24 giờ. Kiểm tra hoạt tính dịch nuôi cấy thông qua kích thước vòng vô khuẩn (mm) trên đĩa thạch.

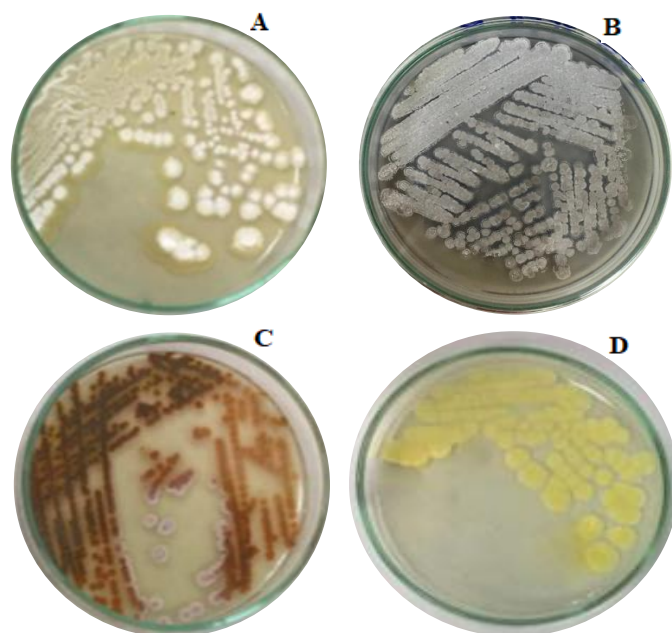
### 2.2.4. Định danh các chủng xạ khuẩn mục tiêu

Các chủng xạ khuẩn được sàng lọc có chức năng phân giải hữu cơ tốt nhất và có khả năng đối kháng *Vibrio* spp. sẽ được định danh thông qua giải trình tự gen 16S rRNA. Gen 16S rRNA được khuếch đại bằng cách sử dụng đoạn mồi được mô tả bởi Takahashi và cộng sự (2002) (Takahashi et al., 2002; Sriprechasak et al., 2014). Các mẫu xạ khuẩn được định danh bởi Phòng Xét nghiệm Công ty TNHH Dịch vụ và Thương mại Nam Khoa.

## 3. Kết quả và thảo luận

### 3.1. Phân lập các chủng xạ khuẩn

Từ các mẫu nước và mẫu bùn ao nuôi được thu nhận tại ao nuôi tôm thuộc huyện Thạnh Phú, tỉnh Bến Tre, 26 chủng xạ khuẩn đã được phân lập và làm thuần. Dựa trên hình thái đại thể, các chủng này có thể chia thành 4 nhóm: nhóm 1 là các xạ khuẩn có khuẩn lạc màu trắng bao gồm các chủng có kí hiệu TM4, TM8, TM9, TM15, TM11, TM12, TM13, TM19, TM21, TM22; nhóm 2 là các xạ khuẩn có khuẩn lạc màu xám bao gồm các chủng có kí hiệu TM1, TM2, TM3, TM5, TM16, TM18, TM23, TM24, TM25, TM26; nhóm 3 là các xạ khuẩn có khuẩn lạc màu đỏ bao gồm các chủng có kí hiệu TM6, TM7, TM10, TM17, TM20; nhóm 4 là các xạ khuẩn có khuẩn lạc màu vàng là chủng có kí hiệu TM14. Trong đó các chủng TM1, TM2, TM3, TM4, TM5, TM8, TM10, TM11, TM12, TM13, TM14, TM18, TM 19, TM20, TM21, TM22, TM23, TM24, TM25, TM26 được phân lập từ các mẫu bùn đáy ao, các chủng còn lại được phân lập từ các mẫu nước.



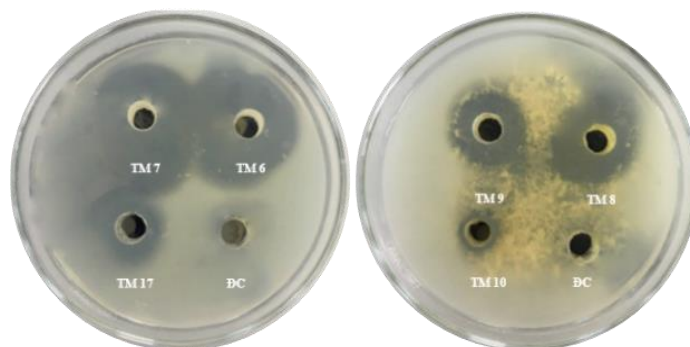
**Hình 1.** Khuẩn lạc xạ khuẩn màu trắng (A), Khuẩn lạc xạ khuẩn màu xám (B),  
Khuẩn lạc xạ khuẩn màu đỏ (C), Khuẩn lạc xạ khuẩn màu vàng (D)

Qua quan sát hình thái khuẩn lạc phát triển trên môi trường Gause-1, nhận thấy các khuẩn lạc này thường bám chắc vào bề mặt thạch, bề mặt sần sùi, có nếp nhăn, dạng nhung tơ, dạng vôi hoặc dạng da và có màu sắc khuẩn lạc khác nhau. Các đặc điểm hình thái này giống với đặc điểm hình thái khuẩn lạc của xạ khuẩn và màu sắc của khuẩn ti khí sinh được xác định theo bảng màu của Tresner và Buckus (Tresner, & Backus, 1963).

### 3.2. Xác định khả năng sinh enzyme ngoại bào của các chủng xạ khuẩn

#### 3.2.1. Xác định khả năng sinh protease

Kết quả cho thấy có 24 chủng xạ khuẩn có khả năng sinh enzyme protease với đường kính vòng phân giải từ 11-37 mm. Trong đó, chủng TM7 có khả năng sinh enzyme protease mạnh nhất với đường kính vòng phân giải là  $36,33 \pm 1,15^m$  mm và có sự khác biệt về mặt thống kê với các chủng còn lại. Các chủng TM4 và TM5 không có khả năng sinh enzyme protease (Biểu đồ 1, Hình 2).



**Hình 2.** Đường kính vòng phân giải cơ chất sữa gầy

### 3.2.2. Xác định khả năng sinh cellulase

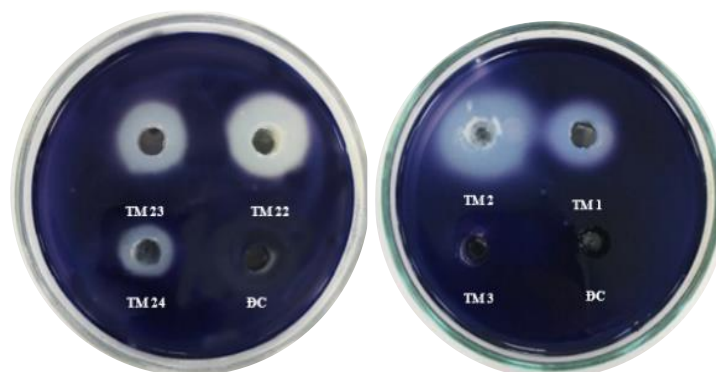
20 chủng xạ khuẩn phân lập được có khả năng sinh enzyme cellulase với đường kính vòng phân giải từ 16-28 mm. Trong đó, chủng TM22 có khả năng sinh enzyme cellulase mạnh nhất với đường kính vòng phân giải là  $27,00 \pm 1,00^g$  mm. Các chủng TM3, TM9, TM10, TM12, TM14 và TM24 không có khả năng sinh enzyme cellulase (Biểu đồ 2, Hình 3). Để khảo sát khả năng sinh enzyme amylase, sau khi tiến hành phương pháp đục lỗ thạch trên môi trường có bổ sung tinh bột, kết quả thu được ở Biểu đồ 3 và Hình 4.



**Hình 3.** Đường kính vòng phân giải cơ chất CMC

### 3.2.3. Xác định khả năng sinh amylase

21 chủng xạ khuẩn phân lập được có khả năng sinh enzyme amylase với đường kính vòng phân giải từ 11-27 mm. Trong đó, chủng TM2 và TM22 có khả năng sinh enzyme amylase mạnh nhất với đường kính vòng phân giải lần lượt là  $25,00 \pm 2,00^k$  mm và  $23,67 \pm 1,15^k$  mm. Các chủng TM3, TM9, TM10, TM12 và TM14 không có khả năng sinh enzyme amylase.

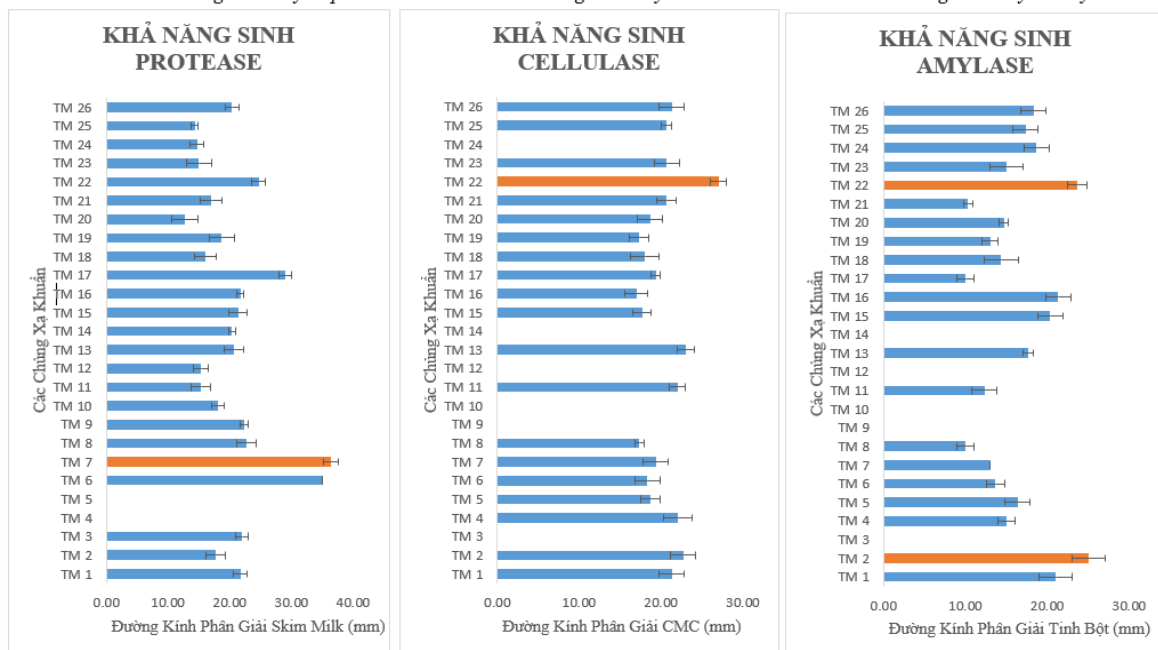


**Hình 4.** Đường kính vòng phân giải cơ chất tinh bột

Kết quả thể hiện ở Biểu đồ 1, 2 và 3 cho thấy hầu hết các chủng xạ khuẩn đều có khả năng sinh enzyme ngoại bào như protease, cellulase và amylase. Trong đó, chủng TM22 đặc biệt có khả năng sinh cùng lúc 3 loại enzyme protease, cellulase và amylase với đường kính phân giải cơ chất tương ứng lần lượt là  $24,67 \pm 1,15^j$  (mm),  $27,00 \pm 1,00^g$  (mm) và  $23,67 \pm 1,15^k$  (mm) và có sự khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê với các chủng còn lại. Trong đó, đường kính phân giải đối với CMC và tinh bột là lớn nhất, đối với sữa gầy thấp hơn chủng

TM7 nhưng cao hơn các nghiệm thức còn lại. Chủng TM7 có khả năng sinh enzyme protease vượt trội nhất với đường kính phân giải sữa gầy là  $36,33 \pm 1,15^m$  (mm), khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê đối với tất cả các chủng còn lại. Ngoài ra, chủng TM7 còn có khả năng sinh enzyme amylase và cellulase với đường kính phân giải cơ chất tương ứng lần lượt là  $13,00 \pm 0,00^{de}$  (mm) và  $19,33 \pm 1,53^{cd}$  (mm). Tương tự như vậy, chủng TM2 đều có khả năng sinh enzyme amylase, protease và cellulase. Trong đó, khả năng sinh amylase cao nhất và khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê so với 26 chủng phân lập với đường kính phân giải tinh bột là  $25,00 \pm 2,00^k$  (mm). Khả năng sinh enzyme cellulase chỉ đứng sau chủng TM22 với đường kính phân giải CMC là  $22,67 \pm 1,53^f$  (mm) và khác biệt với các chủng còn lại. Khả năng sinh enzyme protease của TM2 cũng khá cao, với đường kính phân giải cơ chất là  $17,67 \pm 1,53^{ef}$  (mm). Kết quả này tương tự với kết quả của tác giả Bùi Thị Việt Hà (2006) (Bui, 2006) khi tiến hành kiểm tra khả năng thủy phân casein, tinh bột và CMC của các chủng xạ khuẩn R2 và D1; tác giả Nguyễn Văn Hiếu và cộng sự (2012) (Nguyen et al., 2012) trên chủng xạ khuẩn HLD 3.16. Kết quả nghiên cứu cũng tương ứng với nghiên cứu của tác giả Babu và cộng sự (2018), nhiều chủng xạ khuẩn được phân lập có khả năng phân giải hữu cơ rất tốt (Babu et al., 2018).

**Biểu đồ 1.** Khả năng sinh enzyme protease **Biểu đồ 2.** Khả năng sinh enzyme cellulase **Biểu đồ 3.** Khả năng sinh enzyme amylase



Các chủng xạ khuẩn cơ bản là sinh vật hoại sinh, do đó chúng đóng một vai trò quan trọng trong chu trình chuyển hóa chất hữu cơ trong môi trường bằng cách sinh ra các enzyme như amylase, protease, cellulase... (Mohan et al., 2012; Williams et al., 1984). Khả năng này của xạ khuẩn khiến chúng tăng khuynh hướng trở thành một yếu tố kiểm soát sinh học (Sharma, 2014). Nhìn chung, các phương thức sinh học trong nuôi trồng thủy sản thường

dựa vào quá trình xử lý chất thải sinh học thành các chất đơn giản hơn bằng các vi sinh vật hoại sinh (Babu et al., 2018). Các nghiên cứu tiền đề trước đây về chế phẩm sinh học cho thủy sản thường tập trung mạnh vào việc tạo ra các yếu tố kiểm soát sinh học trong hệ thống ương nuôi ấu trùng tôm (Nogami et al., 1997; Maeda et al., 1997). Trong nuôi trồng thủy sản nói chung và nuôi tôm nói riêng, cặn bã, chất thải hữu cơ thường bao gồm thức ăn dư thừa, rác từ bên ngoài đưa vào, phân thải và các sinh vật gây bệnh (Bergheim et al., 1996). Các nghiên cứu nêu trên và kết quả của nghiên cứu đã thực hiện này càng cho thấy tiềm năng nổi bật trong khả năng phân giải hữu cơ của các chủng xạ khuẩn nước mặn. Với đặc tính quan trọng này, xạ khuẩn hoàn toàn có thể trở thành một liệu pháp sinh học cho hệ thống ao nuôi thủy sản nhằm kiểm soát hữu cơ dư thừa trong quá trình nuôi, giảm thiểu nguy cơ tôm, cá chết hàng loạt hoặc chậm lớn do ô nhiễm ao nuôi.

### 3.3. Xác định các chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng với một số chủng *Vibrio* spp.

Khả năng đối kháng với các vi sinh vật khác của xạ khuẩn được cho là bởi các hợp chất có hoạt tính sinh học, đặc biệt là các loại chất kháng sinh. Các chất này thường được xạ khuẩn tiết ra môi trường trong quá trình nuôi cấy, chính vì vậy chúng tôi đã sử dụng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch để tuyển chọn và đánh giá hoạt tính kháng vi khuẩn của các chủng xạ khuẩn. Môi trường Gause-1 được sử dụng để nuôi xạ khuẩn, hai loại môi trường NA + 1,5% NaCl và TCBS được sử dụng để nuôi cấy vi khuẩn *Vibrio* spp..

Sau khi tiến hành phương pháp đục lỗ thạch, kết quả khả năng đối kháng của các chủng xạ khuẩn đối với chủng *Vibrio* sp. VPA1 và *Vibrio* sp. VPA2 thu được ở Bảng 1 và Hình 5.

**Bảng 1.** Đường kính vòng đối kháng *Vibrio* spp.

Chủng	Đường kính vòng đối kháng (mm)	
	<i>Vibrio</i> sp. VPA1	<i>Vibrio</i> sp. VPA2
TM1	7,33 ± 1,53 <sup>a</sup>	0
TM2	8,33 ± 1,53 <sup>a</sup>	0
TM21	0	7,17 ± 0,29

Qua quá trình sàng lọc, 02 trong số 26 chủng xạ khuẩn nghiên cứu được xác định có khả năng đối kháng với chủng *Vibrio* sp. VPA1 là TM1 và TM2 với đường kính vòng kháng khuẩn là 7,33 mm và 8,33 mm. (Hình 5A). Các chủng còn lại không có khả năng đối kháng với *Vibrio* sp. VPA1.

Trong 26 chủng xạ khuẩn khảo sát thì chọn được 1 chủng có khả năng đối kháng với chủng 2 là TM21 với đường kính vòng kháng khuẩn là 7,17 mm (Hình 5B). Các chủng còn lại không có khả năng đối kháng với *Vibrio* sp. VPA2.



**Hình 5.** Kết quả vòng kháng khuẩn *Vibrio* spp. của các chủng xạ khuẩn khảo sát  
(A. Đối kháng với *Vibrio* sp. VPA1; B. Đối kháng với *Vibrio* sp. VPA2)

Ba chủng trong số 26 chủng xạ khuẩn phân lập được cho thấy hoạt tính kháng khuẩn chống lại vi khuẩn *Vibrio* gây bệnh cho động vật không xương sống (Bảng 1, Hình 5). Trong những năm gần đây, đã có một số công bố trên thế giới về việc tìm ra các chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng với *Vibrio*. Theo kết quả You et al. (2005), các tác giả đã chỉ ra rằng 48 chủng trong 94 chủng (51,1%) chủng xạ khuẩn được phân lập từ ao nuôi tôm có hoạt tính kháng khuẩn chống lại *Vibrio* (You et al., 2005). Theo Bernal et al. (2015), trong 31 chủng xạ khuẩn phân lập được có 5 chủng xạ khuẩn (16,13%) có khả năng đối kháng với vi khuẩn *Vibrio*, đặc biệt ức chế mạnh với *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* và *V. vulnificus* (Bernal et al., 2015).

Như vậy, xạ khuẩn là những chủng vi sinh vật có hoạt tính đối kháng hiệu quả đối với các vi khuẩn gây bệnh trên vật nuôi thủy sản. Hơn nữa, chúng còn có thể dễ dàng sinh trưởng và phát triển trong điều kiện khắc nghiệt ở môi trường ao nuôi thủy sản và tiếp tục sản sinh ra các hợp chất trao đổi có hoạt tính đối kháng với *Vibrio* spp. (You et al., 2005). Tuy nhiên, các chủng xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces* có nguồn gốc từ môi trường nước mặn lại rất ít được chú ý đến (Valli et al., 2012). Gần đây, nhiều nghiên cứu chứng tỏ tiềm năng mạnh mẽ của xạ khuẩn nước mặn, đặc biệt *Streptomyces* được xem như một nguồn sản sinh các hoạt chất sinh học tự nhiên hữu ích. Trong đó, việc chú trọng đến khả năng sản sinh các loại kháng sinh mới từ xạ khuẩn nước mặn đang được tiến hành nghiên cứu ứng dụng trong nuôi trồng thủy sản.

Hơn nữa, 3 chủng TM1, TM2 và TM21, ngoài khả năng kháng *Vibrio*, còn có khả năng sinh enzyme protease, amylase và cellulase. Trong đó, khả năng sinh đa enzyme của TM2 đã được đề cập ở phần trên. Chủng TM1 có khả năng sinh đa enzyme khá tốt và đồng đều với đường kính phân giải cơ chất là  $21,67 \pm 1,15^{hi}$  (mm) (sữa gầy),  $21,33 \pm 1,53^{ef}$  (mm) (CMC) và  $21,00 \pm 2,00^j$  (mm) (tinh bột). Khả năng sinh đa enzyme của chủng TM21 có phần thấp hơn các chủng đa chức năng TM1, TM2, TM7 và TM22. Trong đó, đường kính phân



giải sữa gầy là  $17,00 \pm 1,73^{\text{def}}$  (mm), CMC là  $20,67 \pm 1,15^{\text{de}}$  (mm) và tinh bột là  $10,33 \pm 0,58^{\text{bc}}$  (mm).

### 3.4. Định danh các chủng xạ khuẩn mục tiêu

Các chủng xạ khuẩn đa chức năng có khả năng sinh enzyme ngoại bào nổi bật và khả năng đối kháng *Vibrio* spp. là các chủng TM1, TM2, TM7, TM21 và TM22 sẽ được tiến hành giải trình tự định danh để xác định tính an toàn và làm tiền đề cho các nghiên cứu sau này.

Sau khi giải trình tự 16S rRNA của các chủng xạ khuẩn mục tiêu, các trình tự này được so sánh trên GenBank bằng chương trình BLAST. Kết quả cho thấy, trình tự gen 16S rRNA của chủng TM1, TM2 và TM21 thuộc loài *Streptomyces hygroscopicus* với mức tương đồng lần lượt là 100%; 99,02% và 99,34%. Các trình tự gen 16S rRNA của chủng TM7 và TM22 sau khi so sánh cho thấy chúng lần lượt thuộc loài *Streptomyces diastaticus* với độ tương đồng 100% và *Streptomyces spiralis* với độ tương đồng 99,89%.

*Streptomyces hygroscopicus* được ứng dụng nhiều trong nông nghiệp. Trong đó, tác giả Jovana Grahovac và cộng sự (2014) từng nghiên cứu ứng dụng dịch nuôi cấy của chủng xạ khuẩn này làm nhân tố kiểm soát sinh học vùng rễ cây táo, kết quả mang lại tính an toàn sinh học và giúp cây táo khỏe mạnh. *Streptomyces hygroscopicus* có thể đối kháng mạnh mẽ với 2 chủng nấm mốc gây bệnh là *Collectotrichum gloeosporioides* và *Collectotrichum acutatum* (Grahovac et al., 2014). *Streptomyces hygroscopicus* còn được ứng dụng trong việc tạo ra các cấu tử EB1 và chất elaiophylin có khả năng kháng khuẩn, kháng nấm và có hoạt tính chống ung thư. Trong đó, elaiophylin có tác dụng trên tế bào ung thư HL-60 và HEp-2 với liều  $IC_{50} = 1 \mu\text{g/mL}$  (Lima et al., 2016).

*Streptomyces diastaticus* được phân lập trên Cua Đóm đỏ *Portunus sanguinolentus* với hoạt tính kháng màng biofilm có thể đối kháng mạnh mẽ với nấm *Candida albicans* (Siddharthan et al., 2020). *Streptomyces diastaticus* cũng được phân lập trong hang đá ở Brazil làm chủng xạ khuẩn sinh enzyme endoglucanase ứng dụng trong sản xuất enzyme công nghiệp và sản xuất ethanol của quốc gia này (Bispo et al., 2018).

Ngoài ra, chủng *Streptomyces diastaticus* còn được chứng minh có khả năng đối kháng với nhiều chủng gây bệnh trên người và kể cả chủng có khả năng đề kháng kháng sinh được phân lập trong cây Trinh nữ Hoàng cung (Truong et al., 2017).

Tác giả El-Tarabily và cộng sự (2010) đã ứng dụng *Streptomyces spiralis* đơn chủng hoặc kết hợp với *Actinoplanes campanulatus* và *Micromonospora chalcea* trên cây dưa chuột giống, giúp cây phát triển nhanh hơn và tăng năng suất (Golinska et al., 2015).

Như vậy, các chủng *Streptomyces* sp. được định danh kể trên đều có tính an toàn sinh học rõ ràng và được nghiên cứu ít nhiều về những ứng dụng hữu ích trên thế giới. Tuy nhiên, ứng dụng trong thủy sản vẫn chưa được nghiên cứu nhiều đối với các loài *Streptomyces hygroscopicus*, *Streptomyces diastaticus* và *Streptomyces spiralis*. Vì vậy, đây là các chủng

xạ khuẩn tiềm năng cho các nghiên cứu chuyên sâu kế tiếp để đánh giá đầy đủ hơn các đặc tính sinh học phù hợp theo hướng ứng dụng cho nuôi trồng thủy sản.

#### 4. Kết luận

Trong nghiên cứu này 26 chủng xạ khuẩn đã được phân lập, trong đó, 5 chủng xạ khuẩn thuộc 3 loài gồm *Streptomyces hygroscopicus* (TM1, TM2 và TM21), *Streptomyces diastaticus* (TM7) và *Streptomyces spiralis* (TM22) được xác định là các chủng đa chức năng. Chủng TM7 và TM22 sinh tổng hợp mạnh cả 3 loại enzyme ngoại bào protease, amylase và cellulase. Các chủng TM1, TM2 và TM21 ngoài khả năng sinh tổng hợp được 3 loại enzyme trên, chúng còn có khả năng đối kháng với *Vibrio* spp. gây bệnh ở vật nuôi thủy sản. 5 chủng xạ khuẩn nêu trên rất có tiềm năng trong việc kiểm soát sinh học ao nuôi thủy sản, giúp giảm thiểu các rủi ro về ô nhiễm hữu cơ và các bệnh liên quan đến *Vibrio* spp..

❖ **Tuyên bố về quyền lợi:** Các tác giả xác nhận hoàn toàn không có xung đột về quyền lợi.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Babu, D. T., Archana, K., Kachiprath, B., Solomon, S., Jayanath, G., Singh, I. S. B., & Philip, R. (2018). Marine actinomycetes as bioremediators in *Penaeus monodon* rearing system. *Fish and Shellfish Immunology*, 75, 231-242.
- Barcina, I., Iriberry, J., & Egea, L. (1987). Enumeration, isolation and some physiological properties of actinomycetes from sea water and sediment. *Systematic applied microbiology*, 10(1), 85-91.
- Bernal, M. G., Campa-Córdova, Á. I., Saucedo, P. E., González, M. C., Marrero, R. M., & Mazón-Suástegui, J. M. (2015). Isolation and in vitro selection of actinomycetes strains as potential probiotics for aquaculture. *Veterinary world*, 8(2), 170.
- Bergheim, A., & Asgard, T. (1996). *Waste production from aquaculture*. In: Baird, D.J., Beveridge, M. C. M., Kelly, L. A., Muir, J. F. (Eds.). *Aquaculture and Water Resource Management*. Blackwell, Oxford, 50-80.
- Bispo, A. S. R., Andrade, J. P., Souza, D. T., Teles, Z. N. S., & Nascimento, R. P. (2018). Utilization of Agroindustrial by-products as substrate in endoglucanase production by *Streptomyces diastaticus* PA-01 under submerged fermentation. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 35(2), 429-440.
- Bui, T. V. H. (2006). Nghiên cứu xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces* sinh chất kháng sinh chống nấm gây bệnh thực vật ở Việt Nam [Research on actinomycetes of genus *Streptomyces* in producing antibiotics against fungi causing plant diseases in Vietnam]. Doctoral thesis. Hanoi.
- Demain, A. L., & Sanchez, S., (2009). Microbial drug discovery: 80 years of progress. *The Journal of antibiotics*, 62(1), 5-16.
- Egorov, N. (1976). *Thuc tap vi sinh vat hoc [Practical manual of microbiology]* (translated by Nguyen Lan Dung). Science and Technics Publishing House.

- Grahovac, J., Grahovac, M., Dodic, J., Bajic, B., & Balaz, J. (2014). Optimization of cultivation medium for enhanced production of antifungal metabolites by *Streptomyces hygroscopicus*. *Crop Protection*, 65, 143-152.
- Jamilah, I., Meryandini, A., Rusmana, I., Suwanto, A., & Mubarik, N. R. (2009). Activity of proteolytic and amylolytic enzymes from *Bacillus* spp. isolated from shrimp pond. *Microbiology Indonesia*, 3(2), 67-77.
- Lima, S. M. A., Melo, J. G. S., Militao, G. C. G., Lima, G. M. S., Lima, M. C. A., Aguiar, J. S., Araujo, R. M., Braz - Filho, R., Marchand, P., Araujo, J. M., & Silva, T. J. (2016). *Characterization of the biochemical, physiological, and medicinal properties of Streptomyces hygroscopicus ACTMS-9H isolated from the Amazon (Brazil)*. *Appl Microbiol Biotechnol*.
- Maeda, M., Nogami, K., Kanematsu, M., & Hirayama, K. (1997). The concept of biological control methods in aquaculture. *Hydrobiologia*, 358, 285-290.
- Mitra, A., Santra, S. C., & Mukherjee, J. (2008). Distribution of actinomycetes, their antagonistic behaviour and the physico-chemical characteristics of the world's largest tidal mangrove forest. *Applied microbiology and biotechnology*, 80(4), 685-695.
- Mohan, G. M., & Charya, M. A. S. (2012). Enzymatic activity of fresh water Actinomycetes. *Int. Res. J. Pharma*, 3(11), 193-197.
- Nguyen, T. D. (2000). *Sinh hoc vi sinh vat [Microbiology]*. Hanoi: Vietnam Education Publishing House.
- Nguyen, V. H., Nguyen, P. N., Vu, T. H. Ng., Phan, T. H. Th., Pham, T. H., Phi, Q. T., & Le, G. H. (2012). Nghien cuu chung xa khuan HLD 3.16 co hoat tinh khang khuan phan lap tu vung ven bo bien Viet Nam [Studying on marine actinomycete strain HLD 3.16 from the coast of Vietnam for producing antimicrobial compounds]. *Vietnam Journal of Science and Technology*, 50(5), 579.
- Nogami, K., Hamasaki, K., Maeda, M., & Hirayama, K. (1997). Biocontrol method in aquaculture for rearing the swimming crab larvae *Portunus trituberculatus*. *Hydrobiologia*, 358, 291-295.
- Patrycja Golinska, Magdalena Wypij, Gauravi Agarkar, Dnyaneshar Rathod, Hanna Dahm, & Mahendra Rai (2015). *Endophytic actinobacteria of medicinal plants: diversity and bioactivity*, Antonie van Leeuwenhoek.
- Sharma, M. (2014). Actinomycetes: source, identification and their applications. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.*, 3(2), 801-832.
- Siddharthan, S., Rajamohamed, B. S., & Gopal, V. (2020). *Streptomyces diastaticus isolated from the marine crustacean Portunus sanguinolentus with potential antibiofilm activity against Candida albicans*. *Archives of Microbiology*.
- Siddiqui, Z. A. (2006). *PGPR: biocontrol and biofertilization*. Springer.
- Sripreehasak, P., Suwanborirux, K., & Tanasupawat, S. (2014). Characterization and antimicrobial activity of *Streptomyces* strains from soils in southern Thailand. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 4(10), 24-31.
- Takahashi, Y., Matsumoto, A., Seino, A., Ueno, J., Iwai, Y., & Omura, S. (2002). *Streptomyces avermectinius* sp. nov., an avermectin-producing strain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 2163-2168.

- Tresner, H., & Backus, E. (1963). System of color wheels for streptomycete taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol*, 11(4), 335-338.
- Truong, M. P., Le, T. T. H., Pham, T. H., Nguyen, T. H. M., & Nguyen, H. C. (2017). Nghiên cứu hoạt tính kháng khuẩn của các chủng xạ khuẩn nội sinh trong cây Trinh nữ hoàng cung (*Crinum latifolium*) [Study of the antimicrobial activity of endophytic Streptomyces strains isolated from *Crinum latifolium*]. *Science & Technology Development*, 5(20), 69-77.
- Valli, S., Suvathi, S. S., Aysha, O. S., Nirmala, P., Vinoth, K. P., & Reena, A. (2012). Antimicrobial potential of Actinomycetes species isolated from marine environment. *Asian Pac. J. Trop. Biomed*, 2(6), 469-473.
- Williams, S. T., Lanning, S., & Wellington, E. M. H. (1984) *Ecology of actinomycetes*. In: Goodfellow, M., Mordarski, M., Williams, S. T. (Eds). *The biology of actinomycetes*. Academic. London, 481-528.
- You, J., Cao, L., Liu, G., Zhou, S., Tan, H., & Lin, Y. (2005). Isolation and characterization of actinomycetes antagonistic to pathogenic *Vibrio* spp. from nearshore marine sediments. *Journal of Microbiology Biotechnology*, 21(5), 679-682.
- Zheng, Z., Zeng, W., Huang, Y., Yang, Z., Li, J., Cai, H., & Su, W. J. F. M. I. (2000). Detection of antitumor and antimicrobial activities in marine organism associated actinomycetes isolated from the Taiwan Strait. *China*, 188(1), 87-91.

---

**ISOLATION AND SCREENING OF ACTINOMYCETES AGAINST *VIBRIO* SPP.  
AND PRODUCING EXTRACELLULAR ENZYMES**

**To Dinh Phuc<sup>1\*</sup>, Nguyen Thuy Huong<sup>2</sup>, Pham Thi Thu Dan<sup>3</sup>, Truong Thi My Phuong<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Lien Hiep Phat Science Technology Company Limited, Vietnam

<sup>2</sup> Ho Chi Minh City University of Technology, Vietnam

<sup>3</sup> Ho Chi Minh City University of Food Industry, Vietnam

\*Corresponding author: To Dinh Phuc – Email: todinhphuc00co@yahoo.com

Received: December 23, 2020; Revised: May 16, 2021; Accepted: June 08, 2021

**ABSTRACT**

*In this report, the experiments were implementing for isolation and screening of actinomycetes which have ability to produce extracellular enzymes and against Vibrio spp. from the white leg shrimp ponds of Thanh Phu, Ben Tre province. There are 26 strains of actinomycetes were isolated. Five strains of them TM1, TM2, TM7, TM21 and TM22 were determined to be multifunctional actinomycetes. These strains have ability of extracellular enzymes production which includes protease, cellulase, amylase. Especially, TM1, TM2 and TM21 also have antogonistic activity to Vibrio spp.. According to the phenotypic characteristics and the 16S rRNA gene sequencing results, these isolates were belonged to the genus Streptomyces and were identified as Streptomyces hygrosopicus (TM1, TM2, TM21), Streptomyces diastaticus (TM7) and Streptomyces spiralis (TM22).*

**Keywords:** Actinomycetes in aquaculture; against *Vibrio* spp.; extracellular enzymes; *Streptomyces*