

# Phân lập, tuyển chọn và định danh xạ khuẩn (Actinobacteria) cộng sinh với hải miên ở vùng biển Kiên Giang có khả năng kháng *Staphylococcus aureus*

Trần Vũ Phương\*, Cao Ngọc Diệp

Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ, đường 3/2, phường Xuân Khánh, quận Ninh Kiều, TP Cần Thơ, Việt Nam

Ngày nhận bài 29/11/2023; ngày chuyển phân biện 3/12/2023; ngày nhận phân biện 26/12/2023; ngày chấp nhận đăng 28/12/2023

## **Tóm tắt:**

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân lập, tuyển chọn và định danh một số chủng xạ khuẩn (vi khuẩn sợi - Actinobacteria) cộng sinh với hải miên ở vùng biển Kiên Giang có khả năng kháng *Staphylococcus aureus*. Xạ khuẩn được phân lập trên môi trường Starch Casein Agar và được đánh giá khả năng kháng khuẩn bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch. Tổng cộng có 198 chủng xạ khuẩn được phân lập từ 63 mẫu hải miên ở vùng biển Kiên Giang, Việt Nam. Kết quả khảo sát khả năng kháng khuẩn cho thấy, có 22 chủng có tính kháng *S. aureus*. Dựa theo thang đánh giá mức độ kháng khuẩn, có 01 chủng kháng mạnh, chiếm tỷ lệ 4,5%; 12 chủng kháng mức độ trung bình, chiếm 54,5% và 09 chủng kháng mức độ yếu, chiếm 40,9%. Bằng kỹ thuật PCR và giải trình tự đoạn gen 16S rRNA với cặp môi SC-Act-0235-aS-20 và SC-Act-0878-aA-19, đã định danh được 06 chủng xạ khuẩn có khả năng kháng *S. aureus* tốt nhất là *Streptomyces variabilis* (N10b), *Streptomyces ambofaciens* (N1a), *Streptomyces recifensis* (N5c), *Streptomyces griseoaurantiacus* (H6b), *Gordonia bronchialis* (H6a) và *Microbacterium binotii* (HD2.3e).

**Từ khóa:** hải miên vùng biển Kiên Giang, hoạt tính kháng *Staphylococcus aureus*, xạ khuẩn.

**Chỉ số phân loại:** 1.6, 2.8, 3.5

## Isolation, selection, and characterisation of sponge-associated actinobacteria against *Staphylococcus aureus* in the Kien Giang sea area

Vu Phuong Tran\*, Ngoc Diep Cao

Institute of Food and Biotechnology, Can Tho University, 3/2 Street, Xuan Khanh Ward, Ninh Kieu District, Can Tho City, Vietnam

Received 29 November 2023; revised 26 December 2023; accepted 28 December 2023

## **Abstract:**

The aim of this study is to isolate, select, and characterise some strains of sponge-associated actinobacteria against *Staphylococcus aureus* in the Kien Giang sea area. Actinobacteria were isolated on the starch casein agar medium and were evaluated for antibacterial activity by the agar well diffusion method. A total of 198 actinobacterial strains were isolated from 63 sponge samples in the area of Kien Giang sea, Vietnam. The results of the antibacterial activity found that 22 isolates had the ability to resist *S. aureus*. Based on the level of the resistance, 1 isolate was found at strong level (4.5%), 12 isolates at medium level (54.5%), and 9 isolates at weak level (40.9%). Six actinobacterial strains having the highest resistance ability to *S. aureus* were characterised as follows *Streptomyces variabilis* (N10b), *Streptomyces ambofaciens* (N1a), *Streptomyces recifensis* (N5c), *Streptomyces griseoaurantiacus* (H6b), *Gordonia bronchialis* (H6a), and *Microbacterium binotii* (HD2.3e) by polymerase chain reaction (PCR) method and 16S rRNA gene sequencing with SC-Act-0235-aS-20 and SC-Act-0878-aA-19 primers.

**Keywords:** actinobacteria, activity against *Staphylococcus aureus*, sponge from Kien Giang sea.

**Classification numbers:** 1.6, 2.8, 3.5

\*Tác giả liên hệ: Email: tvuphuong@ctu.edu.vn

## 1. Đặt vấn đề

Trong những năm gần đây, việc sàng lọc và tìm kiếm các hợp chất có hoạt tính sinh học như kháng khuẩn, kháng virus, chống lại quá trình lão hóa và một số bệnh nhiệt đới đang được các nhà khoa học trong và ngoài nước tập trung nghiên cứu. Hệ sinh thái biển vô cùng đa dạng, phức tạp và cũng là môi trường sống khắc nghiệt mà các hợp chất tự nhiên của hệ sinh thái biển có nguồn gốc từ sinh vật biển cũng hết sức đa dạng về cấu trúc và hoạt tính sinh học. Cho đến nay, hơn 12.000 hợp chất đã được phát hiện và mỗi năm hàng trăm hợp chất mới được công bố có nguồn gốc từ sinh vật biển [1]. Hải miên là một nguồn phong phú về cấu trúc các hợp chất tự nhiên độc đáo, một số trong đó có thể hiện nhiều hoạt tính sinh học khác nhau [2]. Hải miên có giàu sự đa dạng của vi sinh vật trong mô và một số trường hợp chiếm 40% sinh khối, ví dụ như loài *Aplysina aerophoba* [3].

Một vài nghiên cứu cho thấy, nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học tìm thấy ở hải miên được tổng hợp thông qua các vi sinh vật cộng sinh với hải miên hoặc được tạo ra bởi chính các vi sinh vật này. Nhiều hợp chất mới có hoạt tính đã được tìm ra thông qua việc nuôi cấy các vi sinh vật cộng sinh với hải miên [4]. Các loài vi sinh vật biển này như là một nguồn tiềm năng trong việc tổng hợp chất chuyên hóa thứ cấp có hoạt tính sinh học mới. Vi sinh vật liên kết với hải miên có cả nội bào và ngoại bào [5, 6], cộng đồng vi sinh vật này đặc hiệu cho hải miên. Về cơ bản hơn 40% thể tích của cơ thể hải miên có chứa các vi sinh vật, có tác dụng sinh học trên chính hải miên đó. Cho đến nay, nhiều chất có hoạt tính sinh học có nguồn gốc từ hải miên đã được mô tả [7].

*S. aureus* là một loài tụ cầu khuẩn, gram dương là nguyên nhân gây ra nhiều bệnh nhiễm trùng, tạo mủ và gây độc ở người, thường xảy ra ở những chỗ trầy xước trên bề mặt da như nốt, gây ra nhiều bệnh nhiễm trùng nghiêm trọng như viêm phổi, viêm vú, viêm tĩnh mạch, viêm màng não, nhiễm trùng tiểu và những bệnh nguy hiểm khác như viêm xương tủy, viêm màng trong tim. *S. aureus* còn gây ngộ độc thực phẩm do tạo độc tố ruột enterotoxin trong thực phẩm và gây hội chứng sốc độc tố do tạo ra siêu kháng nguyên trong máu [8]. Đa số các chủng *S. aureus* có thể tổng hợp một hay nhiều enterotoxin trong môi trường có nhiệt độ trên 15°C, nhiều nhất khi tăng trưởng ở nhiệt độ 35-37°C. Tuy nhiên, chỉ với một lượng nhỏ *S. aureus* tạo độc tố cũng có thể gây ngộ độc [9]. Cùng với *Salmonella* và *Clostridium perfringens*, *S. aureus* được xem là một trong ba tác nhân chính của các vụ ngộ độc thực phẩm ở nhiều nước [10-13].

Mục tiêu của nghiên cứu này là tuyển chọn và định danh xạ khuẩn phân lập từ hải miên có khả năng đối kháng với vi khuẩn gây bệnh trên người như *S. aureus* nhằm khai thác các chủng xạ khuẩn có khả năng sản xuất ra hợp chất kháng khuẩn tốt và có tiềm năng ứng dụng vào y dược học.

## 2. Nội dung và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Phân lập xạ khuẩn

Mẫu hải miên thu ở vùng biển Kiên Giang được nghiền và pha loãng 10 lần, cho vào các đĩa môi trường SCA (Starch Casein Agar), dùng que thủy tinh trải đều giọt mẫu trong đĩa, ủ trong tủ ủ ở nhiệt độ 30°C trong 10-15 ngày để các xạ khuẩn phát triển, tiếp tục cấy phân lập nhiều lần cho đến khi quan sát thấy các khuẩn lạc tách rời nhau và đồng nhất, quan sát dưới kính hiển vi để kiểm tra độ rỗng của xạ khuẩn. Tiến hành đo kích thước và quan sát hình thái khuẩn lạc gồm các chỉ tiêu như màu sắc, hình dạng, kích thước, độ nổi và dạng bìa.

### 2.2. Đánh giá khả năng kháng *S. aureus*

Ứng dụng phương pháp khuếch tán qua giếng thạch và tiêu chí đánh giá mức độ kháng khuẩn của A.B. Galindo (2004) [14] theo các bước như sau: (1) Vi khuẩn *S. aureus* được pha loãng với nồng độ 10<sup>6</sup> CFU/ml và được trải lên môi trường thạch rắn; giếng thạch được khoan lỗ trên các đĩa đã trải vi khuẩn *S. aureus* (ATCC 25923) (giếng thạch có đường kính 6 mm, sâu khoảng 2,5 mm; mỗi đĩa 5 giếng thạch); (2) Các chủng xạ khuẩn được nuôi trong môi trường lỏng, trên máy lắc sau 3 ngày, dịch nuôi cấy được ly tâm 12.000 vòng/phút trong 15 phút; phần dịch trong sau ly tâm được thu hoạch cho vào ống nghiệm mới; cho 50 µl phần dịch trong vào giếng đã khoan lỗ sẵn trên môi trường đã trải vi khuẩn *S. aureus*; thực hiện với 3 lần lặp lại, đối chứng dương là 50 µl kháng sinh với nồng độ 15 µg/ml (sử dụng là ampicilin đối với vi khuẩn gram dương, tetracyclin đối với vi khuẩn gram âm và fluconazole đối với nấm men), đối chứng âm là nước cất; các đĩa được ủ ở 37°C trong 24 giờ; (3) Khả năng kháng khuẩn được đánh giá và xác định thông qua sự hiện diện vòng vô khuẩn xung quanh các giếng thạch. Đường kính vòng vô khuẩn được tính theo công thức sau:

$$D = d_1 - d_2$$

trong đó, D là đường kính vòng vô khuẩn; d<sub>1</sub> là đường kính tổng vòng vô khuẩn; d<sub>2</sub> là đường kính giếng thạch.

Đánh giá mức độ kháng khuẩn theo quy ước của A.B. Galindo (2004) [14]: Kháng mạnh >20 mm (+++), kháng trung bình 6-20 mm (++) , kháng yếu 1-5 mm (+), không kháng <1 mm (-). Các chủng xạ khuẩn có khả năng kháng *S. aureus* tốt sẽ được thử nghiệm với vi khuẩn *Bacillus cereus* (ATCC 11778) và nấm men *Candida albicans* (ATCC 10231) phương pháp thực hiện giống như thử nghiệm với *S. aureus*.

### 2.3. Nhận diện xạ khuẩn

Ly trích DNA của xạ khuẩn theo phương pháp của J. Sambrook và cs (1989) [15]. Sử dụng cặp mồi chuyên biệt cho xạ khuẩn: SC-Act-0235-aS-20 (5'-CGCGGCCTATCAGCTTGTTG-3') và SC-Act-0878-aA-19 (5'- CCGTACTCCCCAGGCGGGG- 3') [16] để nhân bản đoạn gen khoảng 640 bp, thực hiện phản ứng PCR theo chu kỳ sau: 95°C trong 4 phút, 30 chu kỳ gồm 95°C trong 45 giây, ở 68°C trong 45 giây, 72°C trong 1 phút và hoàn tất cuối cùng trong 5 phút ở 72°C.

Kết quả trình tự các chủng xạ khuẩn được so sánh độ tương đồng với các trình tự trên ngân hàng dữ liệu NCBI bằng chương trình BLASTN. Để phân tích cây phả hệ di truyền, các trình tự gen được xử lý với phần mềm CLUSTALX, version 1.81 và phần mềm Mega 7.0 với hệ số bootstrapping 1000 lần cho phân tích Neighbor joining.

## 3. Kết quả và bàn luận

### 3.1. Phân lập xạ khuẩn từ hải miên

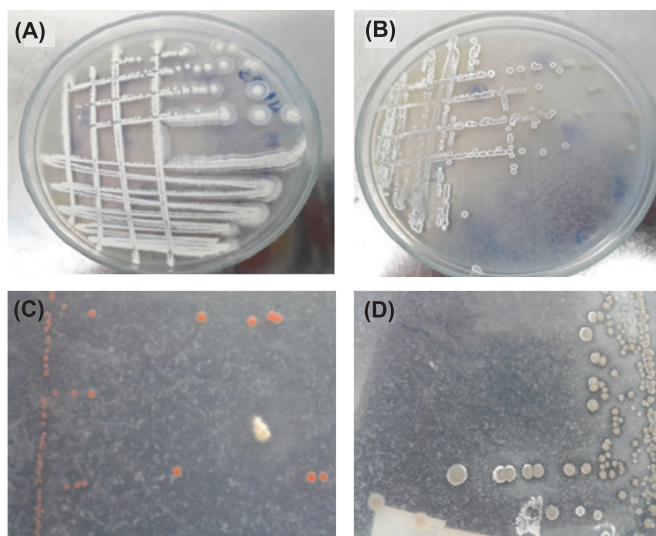
Từ các mẫu hải miên thu được ở 7 địa điểm thuộc vùng biển Kiên Giang: (1) Núi Đền, phường Pháo Đài, TP Hà Tiên; (2) Hòn Kiến Vàng, (3) Hòn Rễ Lớn, (4) Hòn Rễ Nhỏ, xã Bình An, huyện Kiên Lương; (5) Ba Hòn Đầm, (6) Hòn Heo và (7) Hòn Nghệ, xã đảo Sơn Hải, huyện Kiên Lương đã phân lập được 198 chủng xạ khuẩn trên môi trường thạch SCA (bảng 1).

**Bảng 1. Số lượng mẫu hải miên và số lượng các chủng xạ khuẩn phân lập.**

Thứ tự	Nơi thu mẫu	Số mẫu hải miên	Số chủng xạ khuẩn
1	Núi Đền	15	35
2	Hòn Kiến Vàng	3	5
3	Hòn Rễ Lớn	3	12
4	Hòn Rễ Nhỏ	6	20
5	Ba Hòn Đầm	15	73
6	Hòn Heo	10	20
7	Hòn Nghệ	11	33
Tổng số		63	198

Các chủng xạ khuẩn được cấy trên đĩa môi trường thạch SCA, ủ ở nhiệt độ 30°C trong khoảng thời gian 10-15 ngày để phát triển và hình thành khuẩn lạc. Tiến hành quan sát hình thái khuẩn lạc (hình 1) và đặc điểm tế bào của các chủng xạ khuẩn bằng phương pháp giọt ép, dưới kính hiển vi quang học với độ phóng đại 400 lần.

Đặc điểm về hình thái khuẩn lạc của các chủng xạ khuẩn: Về hình dạng khuẩn lạc, có 117 chủng xạ khuẩn có hình dạng tròn, chiếm 59,1%, 68 chủng xạ khuẩn có dạng



**Hình 1. Khuẩn lạc một số chủng xạ khuẩn đặc trưng trên môi trường SCA. (A) Khuẩn lạc chủng N10a; (B) Khuẩn lạc chủng H4b; (C) Khuẩn lạc chủng HD1-6c; (D) Khuẩn lạc chủng N3b.**

tròn, có sợi 34,3%, 8 chủng xạ khuẩn có xuất hiện giọt tiết ở giữa khuẩn lạc của xạ khuẩn, chiếm 4% và 5 chủng xạ khuẩn có vòng đồng tâm xung quanh khuẩn lạc và có sợi ăn sâu vào bề mặt môi trường, chiếm 2,5%. Về màu sắc khuẩn lạc, có 76 chủng có màu trắng, chiếm 38,4%, 62 chủng có màu vàng và vàng nhạt, chiếm 31,3%, 34 chủng có màu cam, chiếm 17,2%, 13 chủng có màu đỏ, chiếm 6,6% và 13 chủng có màu xám, chiếm 6,6%. Dạng bia của khuẩn lạc có 110 chủng có dạng bia nguyên, chiếm 55,6%, 88 chủng có dạng bia răng cưa, chiếm 44,4%. Độ nổi của khuẩn lạc, có 124 chủng có độ nổi khuẩn lạc dạng mô, chiếm 62,6% và 74 chủng xạ khuẩn có độ nổi dạng lồi, chiếm 37,4%.

Đặc điểm hình thái tế bào của các chủng xạ khuẩn: Tất cả 198 chủng xạ khuẩn phân lập được là gram dương. Về hình thái tế bào, có 115 chủng xạ khuẩn có hình thái tế bào dạng que ngắn, chiếm 58,1%, 35 chủng xạ khuẩn có tế bào dạng que dài, chiếm 17,7%, 23 chủng xạ khuẩn có dạng que ngắn kết chuỗi, chiếm 11,6%, 20 chủng có dạng hình cầu, chiếm 10,1% và 5 chủng có dạng hình cầu kết chuỗi, chiếm 2,5%. Về khả năng chuyển động của tế bào, có 40 chủng xạ khuẩn có tế bào chuyển động, chiếm 20,2% và 159 chủng có tế bào không chuyển động, chiếm 79,8%. Xạ khuẩn phân lập từ hải miên từ các vùng biển khác nhau được nhiều tác giả công bố trước đây: từ các mẫu trầm tích, hải miên, san hô mềm, da gai, sao biển thu thập từ ba vùng biển Hạ Long - Cát Bà, Cô Tô - Thanh Lân và Bái Tử Long đã phân lập được 143 chủng xạ khuẩn [17], từ hải miên ở vùng biển Vàng, Trung Quốc phân lập được 106 chủng xạ khuẩn [18], từ hải miên sưu tập tại Ras Mohamed (Ai cập) và Rovinj (Croatia) phân lập được 90 chủng xạ khuẩn [19], từ hải miên sưu tập tại vùng biển Indonesia phân lập được 62 chủng xạ khuẩn [20].

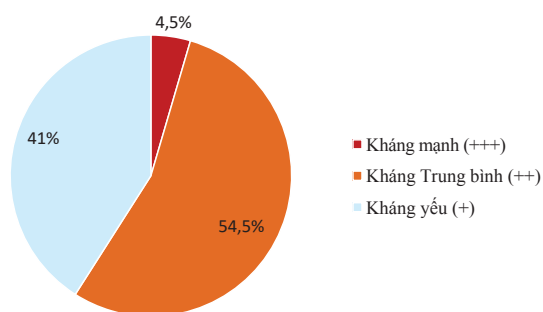
### 3.2. Tuyển chọn xạ khuẩn đối kháng với *S. aureus*

Kết quả khảo sát khả năng kháng khuẩn của 198 chủng xạ khuẩn phân lập được cho thấy, có 22 chủng có khả năng kháng được vi khuẩn *S. aureus*. Trong đó có một chủng kháng mạnh, chiếm tỷ lệ 4,5%, 12 chủng kháng mức độ trung bình, chiếm 54,5% và 9 chủng kháng mức độ yếu, chiếm 41% theo thang đánh giá mức độ kháng khuẩn quy ước của A.B. Galindo (2004) [14] (bảng 2, hình 2).

**Bảng 2.** Mức độ kháng *S. aureus* của 22 chủng xạ khuẩn.

Thứ tự	Ký hiệu chủng xạ khuẩn	Đường kính vòng kháng khuẩn (*)	Mức độ kháng khuẩn theo quy ước của A.B. Galindo (2004) [14] (**)
1	ND1.4 <sup>c</sup>	7,0 <sup>i</sup>	++
2	ND1.6 <sup>b</sup>	7,7 <sup>hi</sup>	++
3	ND1.7 <sup>c</sup>	5,0 <sup>kl</sup>	+
4	RL1 <sup>d</sup>	5,3 <sup>jk</sup>	+
5	RL2 <sup>a</sup>	6,0 <sup>j</sup>	++
6	RN1 <sup>a</sup>	7,0 <sup>i</sup>	++
7	RN1 <sup>c</sup>	7,7 <sup>hi</sup>	++
8	RN1 <sup>d</sup>	5,0 <sup>kl</sup>	+
9	RN1 <sup>f</sup>	8,0 <sup>e</sup>	++
10	RN2 <sup>b</sup>	3,3 <sup>m</sup>	+
11	RN3 <sup>b</sup>	2,3 <sup>o</sup>	+
12	RN6 <sup>a</sup>	5,0 <sup>kl</sup>	+
13	RN6 <sup>b</sup>	3,0 <sup>no</sup>	+
14	HD2.3 <sup>c</sup>	10,3 <sup>f</sup>	++
15	H6 <sup>a</sup>	15,0 <sup>e</sup>	++
16	H6 <sup>b</sup>	18,0 <sup>b</sup>	++
17	N1 <sup>a</sup>	24,0 <sup>a</sup>	+++
18	N5 <sup>c</sup>	14,0 <sup>d</sup>	++
19	N5 <sup>d</sup>	8,0 <sup>b</sup>	++
20	N9 <sup>a</sup>	4,3 <sup>l</sup>	+
21	N10 <sup>b</sup>	12,0 <sup>c</sup>	++
22	N11 <sup>c</sup>	5,0 <sup>kl</sup>	+
Đối chứng (tetracyclin)		12,0 <sup>c</sup>	

\*: đường kính vòng vô khuẩn [D = d<sub>1</sub> - d<sub>2</sub>] (mm): số liệu là trung bình của 3 lần lặp lại. Các chữ cái khác nhau theo sau bên phải số liệu trong cùng một cột khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 99%; \*\*: mức độ kháng: +++: kháng mạnh, ++: kháng trung bình, +: kháng yếu, -: không kháng.



**Hình 2.** Tỷ lệ mức độ kháng *S. aureus* của các chủng xạ khuẩn.

### 3.3. Định danh các chủng xạ khuẩn tuyển chọn

Sáu chủng xạ khuẩn đã được tuyển chọn do có khả năng kháng *S. aureus* tốt nhất, tương đương hoặc cao hơn so với nghiệm thức đối chứng ampicilin là các chủng: N1a, H6b, H6a, N5c, N10b và HD2.3e, với đường kính vòng vô khuẩn >10 mm khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các chủng còn lại (bảng 2). Sáu chủng xạ khuẩn này được đánh giá khả năng kháng vi khuẩn *B. cereus* và nấm men *C. albicans*, kết quả được trình bày ở bảng 3.

**Bảng 3.** Mức độ kháng *B. cereus* và *C. albicans* của 6 chủng xạ khuẩn tuyển chọn.

Thứ tự	Chủng xạ khuẩn	Vi sinh vật thử nghiệm			
		<i>B. cereus</i>		<i>C. albicans</i>	
		Vòng kháng khuẩn (*)	Mức độ kháng (**)	Vòng kháng khuẩn (*)	Mức độ kháng (**)
1	HD2.3e	6,0 <sup>e</sup>	++	11,7 <sup>c</sup>	++
2	H6a	18,0 <sup>b</sup>	++	-	-
3	H6b	20,0 <sup>a</sup>	+++	-	-
4	N1a	10,0 <sup>c</sup>	++	21,0 <sup>a</sup>	+++
5	N5c	-	-	13,7 <sup>b</sup>	++
6	N10b	7,0 <sup>d</sup>	++	8,0 <sup>d</sup>	++

\*: đường kính vòng vô khuẩn [D = d<sub>1</sub> - d<sub>2</sub>] (mm): số liệu là trung bình của 3 lần lặp lại. Các chữ cái khác nhau theo sau bên phải số liệu trong cùng một cột khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 99%; \*\*: mức độ kháng: +++: kháng mạnh, ++: kháng trung bình, +: kháng yếu, -: không kháng.

Đối với khả năng kháng *B. cereus*, có 1 chủng đạt mức kháng mạnh, 4 chủng đạt mức kháng trung bình và 1 chủng không kháng. Đối với khả năng kháng *C. albicans*, có 1 chủng đạt mức kháng mạnh, 3 chủng đạt mức kháng trung bình và 2 chủng không kháng. Hai chủng xạ khuẩn HD2.3e và N10b đều có khả năng kháng với 3 loại vi sinh vật thử nghiệm là *B. cereus*, *S. aureus* và *C. albicans*.

Sáu chủng xạ khuẩn tuyển chọn được khảo sát các đặc điểm khuẩn lạc và đặc điểm tế bào của 6 chủng xạ khuẩn tuyển chọn được trình bày ở bảng 4.

**Bảng 4.** Đặc điểm khuẩn lạc và đặc điểm tế bào của 6 chủng xạ khuẩn tuyển chọn.

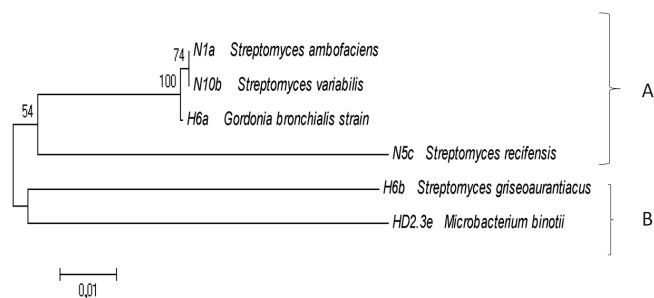
Thứ tự	Chủng xạ khuẩn	Đặc điểm khuẩn lạc					Đặc điểm tế bào		
		Màu sắc	Hình dạng	Dạng bề mặt	Độ nổi	Đường kính (mm)	Hình dạng	Di động	Gram
1	HD2.3e	Vàng	Tròn	Răng cưa	Mô	1,5	Que ngắn, kết chuỗi	+	+
2	H6a	Vàng	Tròn, có sợi	Răng cưa	Lài	3	Que ngắn	-	+
3	H6b	Trắng	Tròn	Nguyên	Lài	2	Que dài	-	+
4	N1a	Trắng	Tròn, có sợi	Răng cưa	Lài	3	Que dài	-	+
5	N5c	Trắng	Tròn	Răng cưa	Lài	3	Que ngắn	-	+
6	N10b	Cam	Tròn	Răng cưa	Mô	1,5	Que dài	+	+

Sáu chủng xạ khuẩn tuyển chọn được nhân bản đoạn gen 16S rRNA với cặp mồi SC-Act-0235-aS-20 và SC-Act-0878-aA-19 chuyên biệt cho xạ khuẩn (actinobacteria), có kích thước khoảng 640 bp [16]. Kết quả giải trình tự được so sánh độ tương đồng với các trình tự trên ngân hàng dữ liệu NCBI, so sánh với các đặc điểm hình thái khuẩn lạc, các đặc điểm về hình thái, đặc điểm sinh học của tế bào (bảng 4), xác định được tên loài của 6 chủng xạ khuẩn tuyển chọn được trình bày ở bảng 5.

**Bảng 5. Kết quả định danh của 6 chủng xạ khuẩn tuyển chọn.**

Thứ tự	Chủng xạ khuẩn	Loài xác nhận	Độ đồng hình (%)
Họ Actinomycetaceae			
1	N1a	<i>Streptomyces ambofaciens</i> strain 1 (MK929479)	99,80
2	N5c	<i>Streptomyces recifensis</i> strain WZS121 (MH497607)	99,12
3	H6b	<i>Streptomyces griseoaurantiacus</i> strain XY173 (MH432690)	100
4	N10b	<i>Streptomyces variabilis</i> strain AC31 (KX845578)	100
Họ Microbacteriaceae			
5	HD2.3e	<i>Microbacterium binotii</i> Rup 1 (LC389374)	99,22
Họ Gordoniaceae			
6	H6a	<i>Gordonia bronchialis</i> strain G7C (KT907150)	99,70

Trình tự đoạn gen của 6 chủng xạ khuẩn tuyển chọn được phân tích mối liên hệ di truyền với phần mềm CLUSTALX, version 1.81 và phần mềm Mega 7.0 với hệ số bootstrapping 1000 lần kết quả được trình bày ở hình 3.



**Hình 3. Cây phả hệ dựa trên trình tự gen 16S rRNA (640 bp) của 6 chủng xạ khuẩn nghiên cứu. 0,01 chỉ khoảng cách di truyền 1 thay đổi/100 bases.**

Cây phả hệ của 6 chủng xạ khuẩn chia làm 2 nhánh rõ rệt, nhánh A với 4 chủng: liên kết di truyền giữa 2 chủng *S. variabilis* N10b với *S. ambofaciens* N1a, cả 2 chủng này có mối quan hệ di truyền với *Gordonia bronchialis* H6a; cả 3 chủng có liên hệ di truyền chặt chẽ với *S. recifensis* N5c. Trong khi đó, nhánh B chỉ có 2 chủng *Microbacterium binotii* HD2.3e và *S. griseoaurantiacus* H6b có quan hệ di truyền chặt chẽ dù chúng khác chi.

Các vi sinh vật liên kết với hải miên vô cùng đa dạng, không chỉ có vi khuẩn và nấm mà còn có cả nhóm xạ khuẩn [21]. Kết quả phân lập này phù hợp với nghiên cứu của H. Zhang và cs (2006) [18] đã phân lập được 106 chủng xạ khuẩn từ loài hải miên *Hymeniacidon perleve* ở vùng biển Vàng, Trung Quốc. Năm 2010, U.R. Abdelmohsen (2010) [19] đã phân lập được 90 chủng xạ khuẩn từ 11 loài hải miên sưu tập tại Ras Mohamed (Ai Cập) và Rovinj (Croatia). Từ 2 loài hải miên *Xestospongia testudinaria* và *Xestospongia muta*, N.F. Montalvo và cs (2014) [22] cũng đã phân lập được 126 chủng xạ khuẩn thuộc 18 chi chủ yếu là các chi *Brevibacterium*, *Micromonospora*, *Micrococcus* và *Streptomyces*. M.C.D.L.H. Romo và cs (2022) [23] tổng kết có nhiều chi xạ khuẩn được phân lập từ hải miên như *Streptomyces* sp., *Nocardiosis* sp., *Micromonospora* sp., *Verrucospora* sp., *Salinispora* sp..., có khả năng sinh ra các hợp chất có hoạt tính kháng nhiều chủng vi khuẩn gây bệnh trong đó có *S. aureus*.

H. Maleki và cs (2013) [24] phân lập và xác định 2 chủng G614C1 và K36C5 có hoạt tính kháng vi khuẩn *S. aureus* và có độ tương đồng với 2 loài *S. coelicolor* và *S. albogriseolus*. P.S. Kumar và cs (2014) [25] phân lập các chủng xạ khuẩn ở trong đất trồng trọt vùng Tamil Nadu, Ấn Độ có 1 chủng *Streptomyces* sp. SCA7 có khả năng kháng lại vi khuẩn *Staphylococcus epidermis* và *Massezia pichidermatis*. B.F.A. Maria và cs (2018) [26] xác định từ dịch nuôi cấy chủng *S. lincolnesis* AA1 tiết ra chất kháng khuẩn rất mạnh kháng *S. aureus*. M.C. Kim và cs (2022) [27] phát hiện chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. EG32 phân lập từ vùng biển Ai Cập có khả năng sản xuất chlororesistoflavins A và B kháng mạnh đối với *S. aureus* kháng methicillin. Kết quả nghiên cứu này tìm ra 6 chủng xạ khuẩn đối kháng mạnh với vi khuẩn gây bệnh trên người là *S. aureus* trong đó chủng tốt nhất là *Streptomyces coelicolor* N1a, trùng khớp với kết quả của H. Maleki và cs (2013) [24].

#### 4. Kết luận

Nghiên cứu đã thực hiện được bộ sưu tập gồm 198 chủng xạ khuẩn phân lập từ 63 mẫu hải miên được thu thập ở 7 địa điểm khác nhau của vùng biển Kiên Giang, trong đó có 22 chủng có khả năng kháng *S. aureus*. Sáu chủng có khả năng kháng *S. aureus* tốt nhất đã được định danh là *S. variabilis* (N10b), *S. ambofaciens* (N1a), *S. recifensis* (N5c), *S. griseoaurantiacus* (H6b), *Gordonia bronchialis* (H6a) và *Microbacterium binotii* (HD2.3e). Các chủng xạ khuẩn này có hoạt tính kháng khuẩn cao được phân lập từ hải miên là nguồn vật liệu quý và là cơ sở khoa học cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm phục vụ cho nghiên cứu tinh sạch, sản xuất các hợp chất có hoạt tính sinh học cao, góp phần ứng dụng trong việc điều trị bệnh và bảo vệ sức khỏe cho con người.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] P.T.H. Trinh, N.D.Ngoc, B.M. Ly, et al. (2016), “Antibacterial activity of marine bacteria isolated from marine sponges at Phu Quoc island, Vietnam”, *Academia Journal of Biology*, **38(1)**, pp.109-114, DOI: 10.15625/0866-7160/v38n1.7074.
- [2] S.D. Rosa, M. Mitova, G. Tommonaro (2003), “Marine bacteria associated with sponge as source of cyclic peptides”, *Biomolecular Engineering*, **20(4-6)**, pp.311-316, DOI: 10.1016/S1389-0344(03)00038-8.
- [3] A.B. Friedrich, H. Merkert, T. Fendert, et al. (1999), “Microbial diversity in the marine sponge *Aplysina cavernicola* (formerly *Verongia cavernicola*) analyzed by fluorescence in situ hybridization (FISH)”, *Marine Biology*, **134**, pp.461-470, DOI: 10.1007/s002270050562.
- [4] K. Suzumura, T. Yokoi, M. Funatsu, et al. (2003), “YM-266183 and YM-266184, novel thiopeptide antibiotics produced by *Bacillus cereus* isolated from a marine sponge II. Structure elucidation”, *The Journal of Antibiotics*, **56(2)**, pp.129-134, DOI: 10.7164/antibiotics.56.123.
- [5] B. Calcinai, F. Azzini, G. Bavestrell, et al. (2006), “Boring sponges from Ha Long bay, Tonkin Gulf, Vietnam”, *Zoological Studies*, **45(2)**, pp.201-212.
- [6] H.H. Cho, E.J. Shim, J.S. Park (2010), “Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponges, *Spirastrella abata* and *Cinachyrella* sp.”, *The Korean Journal Microbiol.*, **46(2)**, pp.177-182.
- [7] D. Handayani, H. Rivai, R. Mulyana, et al. (2018), “Antimicrobial and cytotoxic activities of endophytic fungi isolated from mangrove plant *Sonneratia alba* Sm”, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **8(2)**, pp.49-53, DOI: 10.7324/JAPS.2018.8207.
- [8] K. Todar (2006), *Staphylococcus Aureus and Staphylococcal Disease*, <https://textbookofbacteriology.net/staph.html>, accessed 29 November 2022.
- [9] C.A. Batt, M.L. Tortorello (2014), *Encyclopedia of Food Microbiology*, 2<sup>nd</sup> Ed., Academic Press, pp.659-680.
- [10] J.P. Rosec, O. Gigaud (2002), “Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France”, *International Journal of Food Microbiology*, **35(1-2)**, pp.61-70, DOI: 10.1016/s0168-1605(02)00044-2.
- [11] J.M. Fueyo, M.C. Martín, M.A.G. Hevia, et al. (2001), “Enterotoxin production and DNA fingerprinting in *Staphylococcus aureus* isolated from human and food samples. Relations between genetic types and enterotoxins”, *International Journal of Food Microbiology*, **67(1-2)**, pp.139-145, DOI: 10.1016/s0168-1605(01)00441-x.
- [12] V. Atanmassova, A. Meindl, C. Ring (2001), “Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococci enterotoxin in raw pork and uncooked smoked ham - A comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR”, *International Journal of Food Microbiology*, **67(1-2)**, pp.105-113, DOI: 10.1016/s0168-1605(01)00479-2.
- [13] G. Normanno, A. Firinu, S. Virgilio, et al. (2005), “Coagulase-positive Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy”, *International Journal of Food Microbiology*, **98(1)**, pp.73-79, DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.008.
- [14] A.B. Galindo (2004), *Lactobacillus Plantarum 44A as A Live Feed Supplement for Freshwater Fish*, PhD Thesis, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.
- [15] J. Sambrook, E.R. Fritsch, T. Maniatis (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1546pp.
- [16] J.E.M. Stach, L.A. Maldonado, A.C. Ward, et al. (2003), “New primers for the class Actinobacteria: Application to marine and terrestrial environments”, *Environ. Microbiol.*, **5(10)**, pp.828-841, DOI: 10.1046/j.1462-2920.2003.00483.x.
- [17] L.T.H. Minh, V.T. Quyen, N.M. Anh, et al. (2016), “Isolation, screening and identification of microorganisms having antimicrobial activity isolated from samples collected on seabed of Northeast Vietnam”, *Vietnam Journal of Biotechnology*, **14(3)**, pp.539-547, DOI: 10.15625/1811-4989/14/3/9871 (in Vietnamese).
- [18] H. Zhang, Y.K. Lee, W. Zhang, et al. (2006), “Culturable actinobacteria from the marine sponge *Hymeniacidon* perleve: Isolation and phylogenetic diversity by 16S rRNA gene-RFLP analysis”, *Antonie Van Leeuwenhoek*, **90**, pp.159-169, DOI: 10.1007/s10482-006-9070-1.
- [19] U.R. Abdelmohsen, S.M.P. Elardo, A. Hanora, et al. (2010), “Isolation, phylogenetic analysis and anti-infective activity screening of marine sponge-associated actinomycetes”, *Marine Drugs*, **8(3)**, pp.399-412, DOI: 10.3390/md8030399.
- [20] S.F. Dita, S. Budiarti, Y. Lestari (2017), “Sponge-associated actinobacteria: Morphological character and antibacterial activity against pathogenic bacteria”, *Jurnal Sumberdaya HAYATI*, **3(1)**, pp.21-26, DOI: 10.29244/jsdh.3.1.21-26.
- [21] U. Hentschel, K.M. Usher, M.W. Taylor (2003), “Marine sponges as microbial fermenters”, *FEMS Microbiology Ecology*, **55(2)**, pp.167-177, DOI: 10.1111/j.1574-6941.2005.00046.x.
- [22] N.F. Montalvo, J. Davis, V. Jan, et al. (2014), “Integration of culture-based and molecular analysis of a complex sponge-associated bacterial community”, *PLOS ONE*, **9(3)**, DOI: 10.1371/journal.pone.0090517.
- [23] M.C.D.L.H. Romo, L. Díaz, L. Villamil (2022), “Marine actinobacteria a new source of antibacterial metabolites to treat acne vulgaris disease - A systematic literature review”, *Antibiotics*, **11**, pp.965-967, DOI: 10.3390/antibiotics11070965.
- [24] H. Maleki, A. Dehnad, S. Hanifan, et al. (2013), “Isolation and molecular identification of *Streptomyces* spp. with antibacterial activity from northwest of Iran”, *BioImpacts*, **3(3)**, pp.129-134, DOI: 10.5681/bi.2013.017.
- [25] P.S. Kumar, V. Duraipandiyani, S. Ignacimuthu (2014), “Isolation, screening and partial purification of antimicrobial antibiotics from soil *Streptomyces* sp. SCA 7”, *Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, **30**, pp.435-446, DOI: 10.1016/j.kjms.2014.05.006.
- [26] B.F.A. Maria, S.A. Sharmili, J. Anbumalarmathi (2018), “Isolation and characterization of actinomycetes from marine soil”, *MOJ Biology and Medicine*, **3(6)**, pp.221-225, DOI: 10.15406/mojbm.2018.03.00103.
- [27] M.C. Kim, Z. Li, R. Cullum, et al. (2022), “Chlororesistoflavins A and B, chlorinated benzopyrene antibiotics produced by the marine-derived actinomycete *Streptomyces* sp. strain EG32”, *J. Nat. Prod.*, **85**, pp.270-275, DOI: 10.1021/acs.jnatprod.1c01084.