

NGHIÊN CỨU MỘT SỐ ĐẶC TÍNH SINH HOÁ CỦA CÁC CHỦNG XẠ KHUẨN PHÂN LẬP ĐƯỢC TỪ CÁC AO NUÔI TÔM THÂM CANH TẠI THỪA THIÊN HUẾ

Nguyễn Ngọc Phước*, Nguyễn Thị Huệ Linh, Trương Thị Hoa

Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

*Tác giả liên hệ: nguyennhocphuoc@huaf.edu.vn

Nhận bài: 11/02/2020

Hoàn thành phản biện: 14/03/2020

Chấp nhận bài: 29/03/2020

TÓM TẮT

Nghiên cứu này nhằm tìm hiểu đặc tính sinh hoá của các chủng xạ khuẩn phân lập được từ các ao nuôi tôm tại Thừa Thiên Huế, từ đó tìm ra chủng xạ khuẩn có khả năng kháng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh cho tôm nuôi. Xạ khuẩn được phân lập theo phương pháp của Lakshmi (2008) và định danh bằng phương pháp giải trình tự gen 16S rRNA. Nghiên cứu khả năng sinh enzyme và xác định khả năng gây độc trên máu tôm của các chủng xạ khuẩn được thực hiện trên các môi trường thạch chuyên biệt. Kết quả đã phân lập được 5 chủng xạ khuẩn DH A1, DM A1, DM A2, PH A1 và QN A1 có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn *V. parahaemolyticus*. Cả 5 chủng không làm tan tế bào máu tôm trên môi trường Rose-Bengal. Các chủng xạ khuẩn phân lập được có trình tự nucleotide tương đồng từ 94-98% so với chủng *Streptomyces sampsonii* ATCC 25495. Năm chủng xạ khuẩn phân lập được đều có khả năng sản sinh ra cellulase, amylase, lipase (trừ chủng PH A1), riêng 2 chủng PHA1 và QN A1 còn có khả năng tiết ra enzyme gelatinase. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy có thể ứng dụng những chủng này để sản xuất chế phẩm sinh học thay thế cho kháng sinh trong điều trị bệnh nhiễm khuẩn do *Vibrio parahemolyticus* gây ra.

Từ khóa: *Streptomyces sampsonii*, *Vibrio parahaemolyticus*, Xạ khuẩn

ISOLATION AND BIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF ACTINOMYCES FROM INTENSIVE SHRIMP PONDS IN THUA THIEN HUE PROVINCE

Nguyen Ngoc Phuoc, Nguyen Thi Hue Linh, Trương Thị Hoa

Faculty of Fisheries, University of Agriculture and Forestry, Hue University

ABSTRACT

The aims of this study were: (i) to isolate and identify actinomycetes strains that were recovered from intensive shrimp ponds in Tam Giang lagoon in Thua Thien Hue province; (ii) to study on the enzymes and antimicrobial activity on the pathogenic bacteria *Vibrio parahaemolyticus* to cultured shrimp; and (iii) to study on the virulence of recovered actinomycetes strains to shrimp in the *in vitro* condition. The isolates were isolated from the following method of Lakshmi *et al.* (2008) and identified by 16s rRNA gene sequencing. Five actinomycete isolates (DH A1, DM A1, DM A2, PH A1 and QN A1) were isolated from shrimp pond's sediment and the 16S rRNA gene sequences of these five isolates showed the identities from 94 - 98% with those of *Streptomyces sampsonii* strain ATCC 25495 through the BLAST analysis. The isolates were then investigated how their abilities produced antibacterial compounds, enzymes as well as haemolytic activity. Five isolates showed antimicrobial activity against *V. parahaemolyticus*. These isolates were non-haemolytic on the Rose-Bengal medium with hemolymph of shrimp added. In addition, PH A1 and QN A1 were able to increase enzymatic activity by producing cellulase, amylase, and gelatinases while DH A1, DM A1, DM A2, and QN A1 produced cellulase, amylase, and lipase. Results from this study provided the first insight into characteristics of marine actinomycete isolates recovered from shrimp ponds sediments in Thua Thien Hue.

Keywords: Actinomycetes, *Vibrio parahaemolyticus*, *Streptomyces sampsonii*

1. MỞ ĐẦU

Những năm gần đây, ngành thủy sản đối mặt với nhiều khó khăn, thách thức. Sự phát triển tự phát và thiếu quy hoạch các vùng nuôi làm bệnh dịch lây lan và tình trạng ô nhiễm môi trường ngày càng khó kiểm soát. Để giải quyết những vấn đề này, người nuôi thường xuyên sử dụng hóa chất và thuốc kháng sinh gây suy thoái môi trường và xuất hiện nhiều loại vi khuẩn kháng kháng sinh. Xu hướng hiện nay là sử dụng các vi khuẩn đối kháng thay thế cho kháng sinh trong việc nâng cao hiệu quả xử lý môi trường ở các ao nuôi (Nguyễn Hoàng Minh Huy, 2006), xạ khuẩn là nhóm vi khuẩn được nghiên cứu để phân hủy các hợp chất hữu cơ và hạn chế sự gia tăng các mầm bệnh như *Vibrio parahaemolyticus*, *V. harveyi* trong ao (Nguyễn Lâm Dũng và cs., 1978).

Trong số hơn 8.000 chất kháng sinh hiện đã được biết trên thế giới thì có trên 80% có nguồn gốc từ xạ khuẩn, chủ yếu là từ các chi *Streptomyces* và *Micromonospora*. Xạ khuẩn còn được dùng để sản xuất nhiều loại enzyme, một số vitamin và axit hữu cơ, các chất sinh học như vitamin nhóm B (B₂, B₆, B₁₂). Trong nuôi trồng thủy sản, xạ khuẩn có thể được sử dụng như một loại thuốc để xử lý nước thải, trong môi trường nước xạ khuẩn tiết ra các loại kháng sinh làm ức chế sự tăng trưởng của vi khuẩn gây bệnh trong ao nuôi (Nguyễn Lâm Dũng và cs., 1998). Ngoài ra, xạ khuẩn có hàm lượng protein cao (> 60%), vitamin nhóm B và các enzyme tiêu hóa, có thể được sử dụng làm thực phẩm hoặc phụ gia trong sản xuất thức ăn cho tôm, đặc biệt là trong giai đoạn ấu trùng, để cải thiện tỷ lệ sống.

Nuôi trồng thủy sản tại Thừa Thiên Huế cũng đang đối mặt với nhiều thách thức về dịch bệnh và ô nhiễm môi trường. Tôm thẻ chân trắng được nuôi chủ yếu tại

các xã ven biển, và nuôi thâm canh tập trung chủ yếu huyện Phong Điền và Phú Vang. Theo thống kê của Chi cục Thủy sản Thừa Thiên Huế, năm 2018, hơn 10% diện tích nuôi tôm thẻ chân trắng bị dịch bệnh do vi khuẩn *Vibrio* gây ra, đặc biệt là bệnh hoại tử gan tụy cấp do vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây ra trên tôm nuôi dưới 30 ngày tuổi và chưa có giải pháp phòng trị hiệu quả ngay cả việc sử dụng kháng sinh gây ra tổn thất lớn về kinh tế cho người dân và gây ô nhiễm môi trường (Chi cục Thủy sản Thừa Thiên Huế, 2018).

Xuất phát từ những vấn đề nêu trên, nghiên cứu này nhằm tìm hiểu đặc điểm sinh học của các chủng xạ khuẩn phân lập được từ các ao nuôi tôm tại Thừa Thiên Huế, từ đó tìm ra chủng xạ khuẩn có khả năng kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh cho tôm nuôi, giúp hạn chế sử dụng kháng sinh.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Địa điểm thu mẫu

Mẫu bùn đáy được thu tại các ao nuôi tại các xã thuộc 3 huyện: Phú Vang (xã Phú Hải), Quảng Điền (xã Quảng Công, Quảng Ngạn), Phong Điền (xã Phong Hải, Điền Môn, Điền Hương, Phong Lộc), là các xã ở tỉnh Thừa Thiên Huế có vùng nuôi tôm thẻ chân trắng phát triển và đại diện cho 2 vùng sinh thái của đầm phá Tam Giang.

2.2. Phương pháp phân lập và định danh xạ khuẩn

2.2.1. Phương pháp phân lập xạ khuẩn

Các chủng xạ khuẩn được phân lập từ các mẫu bùn đáy thu thập từ các trang trại nuôi tôm ở tỉnh Thừa Thiên Huế. Các mẫu bùn đáy được thu vào bình nhựa 50 mL sau đó được xử lý để phân lập chọn lọc các xạ khuẩn theo phương pháp của Lakshmi và cs. (2008). Mẫu thu được xử lý ở nhiệt độ 50 - 60°C trong 60 phút. Trộn

1 g của các mẫu bùn đáy với 0,1 g CaCO₃ và ủ trong tủ ẩm ở nhiệt độ 28°C trong khoảng thời gian một tuần. Các mẫu sau đó sẽ được pha loãng, trộn đều và cấy lên môi trường xạ khuẩn MT1 (tinh bột 15 g/L, K₂HPO₄ 0.5 g/L, MgSO₄ 0.5 g/L, FeSO₄ 0.01 g/L, agar 6 g/L) có bổ sung bavistin (Biostadt, Ấn độ) để kháng nấm và novobiocin (Công ty Dược Hậu Giang, Việt Nam) để ức chế sự phát triển của vi khuẩn. Khuẩn lạc với các đặc điểm của xạ khuẩn sẽ được nuôi cấy lên môi trường đặc trưng của xạ khuẩn MT2 (tinh bột 10 g/L, nấm men 4 g/L, peptone 20 g/L) cho đến khi thu được khuẩn lạc thuần. Lấy khuẩn lạc thuần cấy lên môi trường thạch nghiêng đặc trưng của xạ khuẩn nước mặn. Sau đó, lấy khuẩn lạc của xạ khuẩn trong ống thạch nghiêng và tiến hành tăng sinh trong 20 mL môi trường đặc trưng lỏng, nuôi cấy trong máy lắc 100 vòng/phút ở nhiệt độ 33°C để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

2.2.2. Định danh xạ khuẩn

Các chủng xạ khuẩn được định danh bằng phương pháp giải trình tự gen 16S rRNA, đoạn gen được khuếch đại bằng phương pháp PCR với cặp mồi được sử dụng là 27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC-3' và 1492R 5'-TACGGTTACCTTGTTACGACT-3' (Weisburgh và cs., 1994). DNA của các chủng xạ khuẩn (DH A1, DM A1, DM A2, PH A1, QN A1) được trích ly tại phòng thí nghiệm Bệnh học thủy sản, khoa Thủy sản, trường Đại học Nông Lâm Huế trước khi gửi đi giải trình tự gen. Chọn 5 - 10 khuẩn lạc rời cho vào ống ly tâm 2,2 mL, sau đó, cho 1 viên bi sắt vào ống và lắc bằng máy lắc. Tiếp tục cho vào 1 mL dung dịch lysis buffer, lắc đều, ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Ly tâm 13000 vòng trong 5 phút, lấy phần dung dịch chuyển sang ống ly tâm mới. Sau đó, cho một lượng tương đương ethanol 95%, ly tâm 13000 vòng/5 phút, bỏ

phần dung dịch phía trên. Rửa phần kết tủa bằng 500 µL ethanol 70%, ly tâm 13000 rpm/5 phút. Sấy khô chân không trong 10 phút (45°C). Hòa tan trong 100 µL dung dịch TE 0,1X. Dung dịch DNA của 5 chủng xạ khuẩn được gửi tới phòng thí nghiệm BIOLAB (Hàn Quốc) để định danh. Kết quả giải trình tự gen được tra cứu bằng phần mềm BLAST và so sánh với dữ liệu gen trên GENBANK. Dùng phần mềm MEGA 6.0 để vẽ cây phả hệ.

2.3. Nghiên cứu khả năng sản xuất enzyme của các chủng xạ khuẩn phân lập được

Khuẩn lạc của xạ khuẩn khác nhau sau khi đã thu được dòng thuần sẽ được cấy trên các môi trường khác nhau để xác định khả năng sản xuất amylase, lipase, gelatinase và cellulase của xạ khuẩn.

2.3.1. Khảo sát khả năng sản xuất amylase của xạ khuẩn

Cấy xạ khuẩn phân lập được vào môi trường thạch tinh bột ủ trong 4 - 5 ngày ở nhiệt độ phòng (28 ± 2°C). Sau đó, nhỏ dung dịch Iodine lên khuẩn lạc của xạ khuẩn phát triển trên đĩa thạch, xạ khuẩn có sự sản xuất amylase khi dung dịch Iodine không chuyển sang màu xanh.

2.3.2. Khảo sát khả năng sản xuất lipase của xạ khuẩn

Cấy xạ khuẩn phân lập được trên môi trường tributyrin agar pH 7, ủ trong 4 - 5 ngày ở trong nhiệt độ phòng. Sự sản xuất lipase sẽ được phát hiện bởi các vòng phân giải xuất hiện xung quanh khuẩn lạc xạ khuẩn.

2.3.3. Khảo sát khả năng sản xuất gelatinase của xạ khuẩn

Môi trường thạch Fraziers gelatin pH 7 được sử dụng để phát hiện hoạt động của enzyme gelatinase của xạ khuẩn. Cây xạ khuẩn phân lập được vào đĩa và ủ trong 4 - 5 ngày ở nhiệt độ phòng. Ngâm các tấm với Fraziers có chlorua thủy ngân đặc vào

trong đĩa có xạ khuẩn phát triển, tiến hành đo vòng phân giải xuất hiện để xác định khả năng sản xuất gelatinase của xạ khuẩn.

2.3.4. Khảo sát khả năng sản xuất cellulase của xạ khuẩn

Cấy xạ khuẩn phân lập được vào môi trường dinh dưỡng cellulose agar pH 6,8 và ủ trong vòng 4 - 5 ngày ở nhiệt độ phòng. Sự sản xuất cellulase sẽ được phát hiện bởi sự xuất hiện của vòng phân giải xung quanh khuẩn lạc của xạ khuẩn.

2.3.5. Phương pháp xác định khả năng gây độc trên máu tôm của các chủng xạ khuẩn phân lập được

Tôm thẻ chân trắng được thu thập tại các trang trại nuôi tôm đem về phòng thí nghiệm và nuôi trong vòng 1 tuần. Sau đó tôm được khử trùng bằng dung dịch sodium hypochlorite, lấy 1 mL máu tôm cho vào ống eppendorf đã được vô trùng có chứa 200 μ L dung dịch chống đông máu Heparin (Vaxcel Heparin Sodium Injection 500 IU/mL, Kotra Pharma (M) Sdn Bhd, Malaysia).

Lấy 1 mL máu tôm thêm vào môi trường Rose-Bengal đã được hấp khử trùng, rồi lắc nhẹ để trộn. Môi trường được đổ vào đĩa petri. Xạ khuẩn được cấy lên đĩa thạch, ủ 48 h ở nhiệt độ phòng. Khi không có sự xuất hiện của các vòng dung huyết chứng tỏ xạ khuẩn không có khả năng dung giải các tế bào máu tôm.

2.4. Thử khả năng kháng khuẩn của các chủng xạ khuẩn phân lập được

Các chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* phân lập được từ tôm thẻ chân trắng nhiễm bệnh được cung cấp từ phòng thí nghiệm Bệnh học thủy sản, khoa Thủy Sản, trường Đại học Nông Lâm Huế được sử dụng để kiểm tra khả năng kháng khuẩn của các chủng xạ khuẩn đã phân lập được từ mẫu bùn đáy bằng phương pháp đục lỗ thạch.

Các chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* được tăng sinh trong 20 mL môi trường TSA (Tryptone Soy Agar) 2% NaCl ủ ở 28°C, sau 24 giờ thu dịch nuôi cấy. Cấy dần 20 μ L chủng vi khuẩn này với mật độ 10^6 cfu/mL lên môi trường nuôi cấy tương ứng. Dùng ống hút thủy tinh vô trùng khoan 3- 5 lỗ trên một đĩa thạch đã cấy vi khuẩn với đường kính mỗi lỗ là 5 mm. Lấy 100 μ L dịch nuôi cấy của các chủng xạ khuẩn phân lập đã qua ly tâm để loại bỏ xạ khuẩn và đặt vào các giếng. Đĩa thạch này được ủ trong tủ ẩm ở nhiệt độ 28°C trong 4 - 5 ngày. Xác định hoạt tính kháng khuẩn của xạ khuẩn bằng cách đo đường kính vòng vô khuẩn D-d (mm) được tạo thành trên đĩa thạch.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

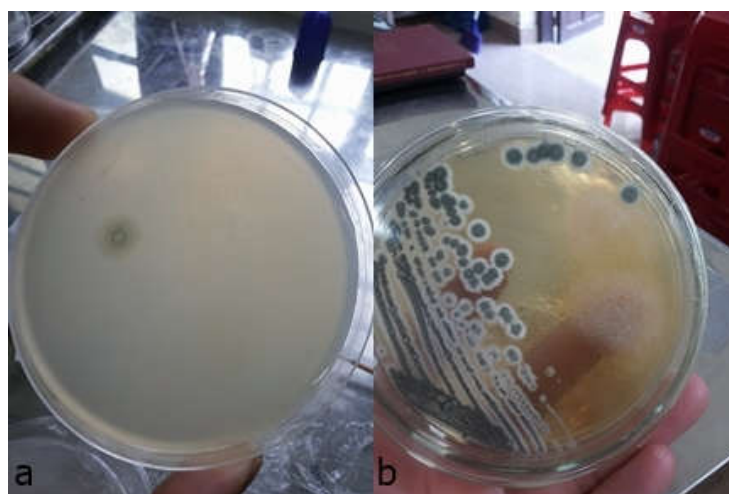
3.1. Phân lập xạ khuẩn từ mẫu bùn đáy

Các mẫu bùn đáy sau khi được xử lý và pha loãng 1000x sẽ được cấy trên môi trường MT1, sau đó ủ trong tủ ẩm ở 28°C trong vòng 7 ngày, lựa chọn những khuẩn lạc có hình dạng được mô tả như đặc điểm hình thái xạ khuẩn, tiến hành nhuộm Gram để quan sát hình dạng dưới kính hiển vi, sau đó tách dòng đến khi nào thu được chủng xạ khuẩn thuần.

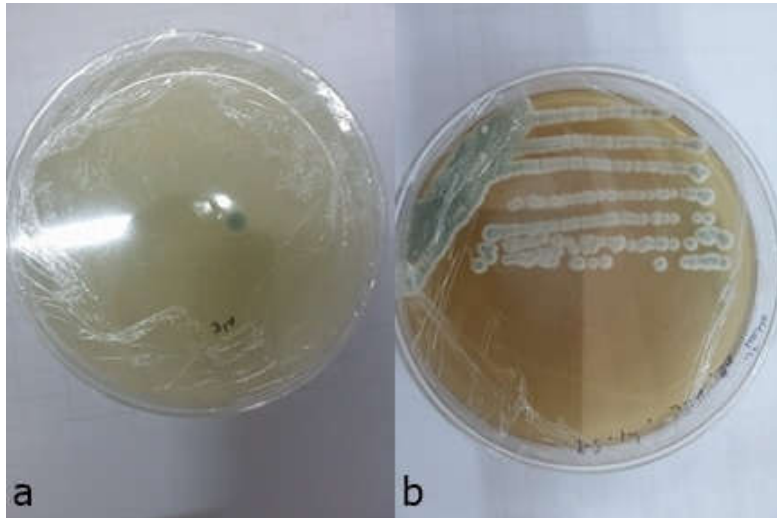
Qua 5 đợt thu mẫu, chúng tôi phân lập được từ mẫu bùn đáy của các ao nuôi tôm và thu được 3 chủng xạ khuẩn DH A1, DM A1, DM A2 tại 2 xã Điền Hương và Điền Môn, huyện Phong Điền; 1 chủng xạ khuẩn PH A1 thu được tại xã Phong Hải, huyện Phong Điền; 1 chủng xạ khuẩn QN A1 thu được tại xã Quảng Ngạn, huyện Quảng Điền. Không phân lập được xạ khuẩn từ các mẫu bùn đáy thu được ở các xã thuộc huyện Phú Lộc và Phú Vang. Đặc điểm hình thái các chủng xạ khuẩn phân lập được tóm tắt ở Bảng 1.

Bảng 1. Đặc điểm hình thái của các chủng xạ khuẩn phân lập được trên môi trường nuôi cấy MT1 và MT2

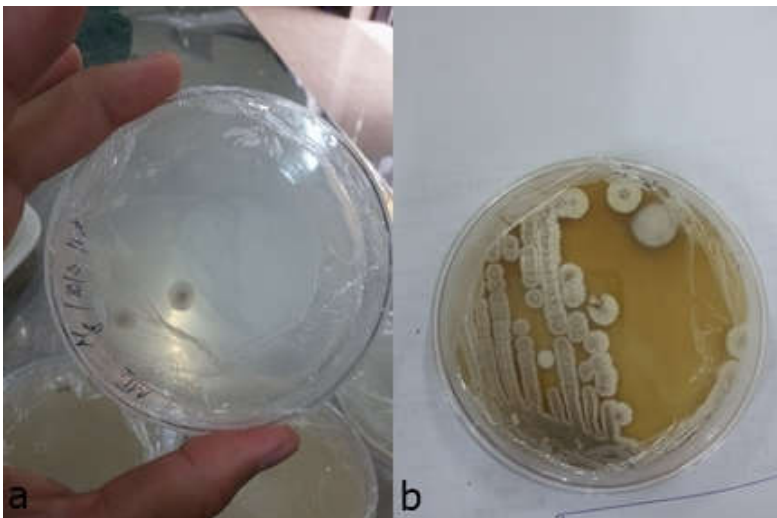
Tên chủng	Màu sắc	Đặc điểm	
DH A1	Màu xanh đậm ở giữa lớn. có viền trắng mỏng bao quanh	Khuẩn lạc	Đều, tròn, khuẩn lạc nhô cao, mặt khô không trơn, thời gian xuất hiện 7 ngày, đường kính 5 mm (Hình 1a, b).
		Nhuộm Gram	Gram (+), dạng sợi dài, không có vách ngăn ngang, không sinh nhánh.
DM A1	Màu xanh nhạt	Khuẩn lạc	Đều, tròn, khuẩn lạc nhô cao, mặt khô không trơn, thời gian xuất hiện 6 ngày, đường kính 10 mm (Hình 2a, b).
		Nhuộm Gram	Gram (+), dạng sợi dài, không có vách ngăn ngang, không phân nhánh.
DM A2	Màu trắng, giữa có màu nâu nhạt	Khuẩn lạc	Đều, tròn, khuẩn lạc nhô cao xòe rộng, mặt khô không trơn, thời gian xuất hiện 6 ngày, đường kính 9 mm (Hình 3a, b).
		Nhuộm Gram	Gram (+), dạng sợi dài, không có vách ngăn ngang, không phân nhánh.
PH A1	Giữa màu xám, xung quanh màu trắng đục	Khuẩn lạc	Đều, tròn, khuẩn lạc nhô, mặt khô không trơn, thời gian xuất hiện 7 ngày, đường kính 12 mm (Hình 4a, b).
		Nhuộm Gram	Gram (+), dạng sợi dài, không có vách ngăn ngang, không phân nhánh.
QN A1	Màu trắng đục	Khuẩn lạc	Đều, tròn, khuẩn lạc xù xì, xòe rộng, mặt trơn không khô, thời gian xuất hiện 7 ngày. Đường kính 15 mm (Hình 5a, b).
		Nhuộm Gram	Gram (+), dạng sợi dài, không có vách ngăn ngang, không phân nhánh.



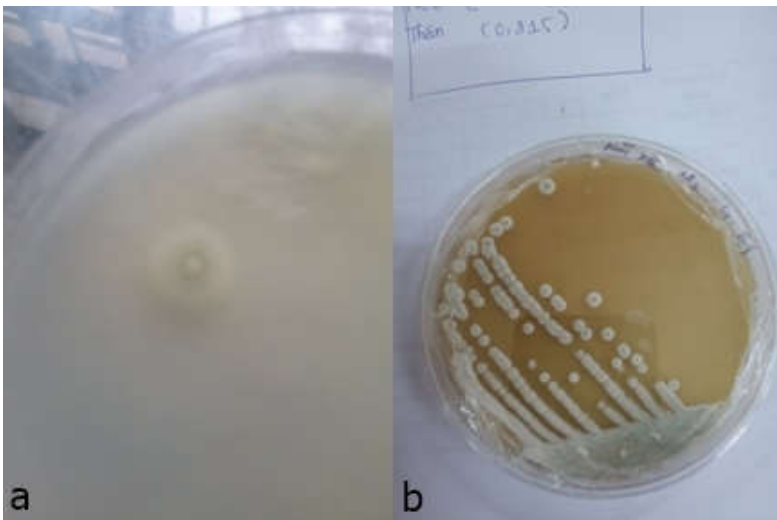
Hình 1. Khuẩn lạc của xạ khuẩn chủng DH A1 phát triển trên môi trường MT1 (a), MT2 (b)



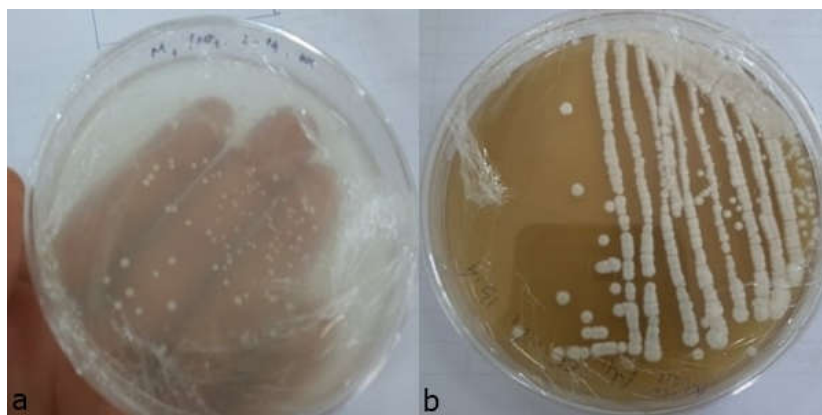
Hình 2. Khuẩn lạc của xạ khuẩn chủng DM A1 phát triển trên môi trường MT1 (a), MT2 (b)



Hình 3. Khuẩn lạc của xạ khuẩn chủng DM A2 phát triển trên môi trường MT1 (a), MT2 (b)



Hình 4. Khuẩn lạc của xạ khuẩn chủng PH A1 phát triển trên môi trường MT1 (a), MT2 (b)



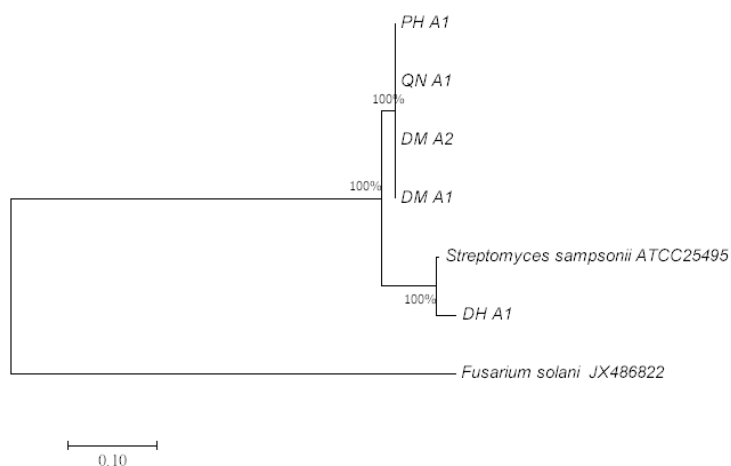
Hình 5. Khuẩn lạc của xạ khuẩn chủng QN A1 phát triển trên môi trường MT1 (a), MT2 (b)

3.2. Định danh xạ khuẩn

Các chủng xạ khuẩn được định danh bằng phương pháp sinh học phân tử giải trình tự đoạn gen 16S rRNA, các đoạn gen sau khi đã giải trình tự sẽ được tra cứu bằng phần mềm BLAST và so sánh với dữ liệu gen trên GENBANK.

Kết quả cho thấy: Chủng DH A1, DM A1, DM A2, PH A1, QN A1 có trình

tự nucleotide tương đồng từ 94-98 so với chủng *Streptomyces sampsonii* ATCC 25495. Cây phát sinh loài dựa trên dựa trên trình tự một phần của gen 16S rRNA của chủng xạ khuẩn và vùng tương ứng ở đoạn gen 16S rRNA của chủng *Streptomyces sampsonii* ATCC 25495 được thể hiện ở hình 6.



Hình 6. Cây phát sinh loài được xây dựng dựa trên trình tự một phần của gen 16S rRNA của chủng xạ khuẩn và vùng tương ứng ở đoạn gen 16S rRNA của chủng *Streptomyces sampsonii* ATCC 25495. Các số ở các nhánh biểu thị tỷ lệ phần trăm trùng khớp. Tỷ lệ ở phía dưới biểu thị khoảng cách tiến hóa của các nucleotide thay thế trên mỗi vị trí.

Xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces* (ngành: Actinobacteria) là vi khuẩn Gram dương, có hàm lượng G + C cao (70%), xạ khuẩn có thể sống trong nhiều môi trường đất khác nhau với hình thái sợi đặc trưng phân nhánh. *Streptomyces* sp. đã được công nhận rộng rãi là vi sinh vật công

nh nghiệp quan trọng do tiềm năng của nó trong đa dạng sản xuất các chất chuyển hóa thứ cấp (Lee và cs., 2014b; Ser và cs., 2015; Tan và cs., 2015) bao gồm thuốc kháng sinh (Lee và cs., 2014a), thuốc chống ung thư, thuốc chống ký sinh trùng, thuốc ức chế miễn dịch và enzyme

(Manivasagan và cs., 2013). Theo báo cáo của một số nghiên cứu thì xạ khuẩn *S. sampsonii* có thể phân lập được từ đất nông nghiệp (Jain và cs., 2016) hay từ đất vườn ngập nước (Jain và Jain, 2007). Từ kết quả của nghiên cứu này cho thấy *S. sampsonii* còn có thể phân lập được từ bùn đáy ao nuôi tôm. Do khả năng sản xuất các hợp chất hóa học phổ rộng của xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces* và có thể tạo ra các hợp chất kháng khuẩn và kháng sinh tiềm năng, nên các loài xạ khuẩn này có thể có

giá trị như probiotic trong nuôi trồng thủy sản.

3.3. Một số đặc điểm sinh hoá của các chủng xạ khuẩn phân lập được

3.3.1. Khảo sát khả năng sản xuất enzyme của xạ khuẩn

Kết quả khảo sát khả năng sản xuất enzyme cellulase, amylase, lipase, gelatinase của các chủng xạ khuẩn được thể hiện ở Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả khảo sát khả năng sản sinh enzyme của các chủng xạ khuẩn

Chủng xạ khuẩn/môi trường phân giải	Cellulase	Amylase	Lipase	Gelatinase
DH A1	+	+	+	-
DM A1	+	+	+	-
DM A2	+	+	+	-
PH A1	+	+	-	+
QN A1	+	+	+	+

(+) có khả năng phân giải enzyme; (-) không có khả năng phân giải enzyme.

Qua Bảng 2 cho thấy các chủng DH A1, DM A1, DM A2, PH A1, QN A1 đều có khả năng sản xuất enzyme cellulase, amylase, lipase (ngoại trừ chủng PH A1 là không có khả năng sản xuất enzyme lipase). Các chủng xạ khuẩn đã phân lập được không có khả năng sản xuất enzyme gelatinase, ngoại trừ hai chủng PH A1 và QN A1.

Xạ khuẩn là một trong những loài vi sinh vật có khả năng sản sinh ra cellulase và đã được áp dụng rộng rãi trên thế giới (Arjit và cs., 2012; Ashutosh, 2008). Khi kiểm tra hoạt tính enzyme của một số chủng xạ khuẩn trên môi trường Starch Casein Agar (SCA), Lechevalier và Lechevalier (1970) đã cho thấy rằng xạ khuẩn có khả năng sản sinh nhiều loại enzyme, có thể là do kết quả của việc chọn lọc sinh học tự nhiên để tồn tại trong môi trường. Shamar và Choudhary (2014) báo cáo rằng các loại vi khuẩn trong môi trường có thể ảnh hưởng đến chức năng sinh học của xạ khuẩn.

Actinomycetes là vi khuẩn Gram dương dạng sợi, có mặt khắp nơi trong đất, được biết đến như là loại vi sinh vật sản xuất nhiều enzyme ngoại bào với các đặc tính phân hủy polymer, bao gồm chitinase (Gupta và cs., 1995). Tất cả các chủng phân lập được cho thấy khả năng sản xuất các loại enzyme ngoại bào như cellulase, lipase, amylase, gelatinase và chitinase. Bên cạnh đó, chitin là thành phần phổ biến đối với các sinh vật sống trong môi trường nước, là thành phần chính cấu tạo lớp vỏ của động vật không xương sống, vảy cá và thành tế bào của nhiều loại nấm (Souza và cs., 2011). Cellulose cũng là chất khá phổ biến trong sinh vật và được xem như là một polymer sinh học (Arjit và cs., 2012).

Khả năng sản xuất enzyme (protease, amylase, lipase), và các axit hữu cơ đã được ghi nhận từ các loại xạ khuẩn trong nuôi trồng thủy sản. You và cs. (2005) ghi nhận một số chủng *Streptomyces* sinh ra các enzyme làm tăng khả năng hấp thụ chất dinh dưỡng cho tôm nuôi. Jain và cs. (2016) ghi nhận *S. sampsonii* có khả năng thủy phân casein, gelatin, collagen và khi sử dụng *S. sampsonii* làm chế phẩm sinh học thì nó có khả năng phân giải các chất hữu cơ trong

môi trường nhờ khả năng tiết ra các enzyme này. Ngoài ra, nó còn làm tăng các vi khuẩn nitrate và có khả năng kháng nấm cao.

3.3.2. Kết quả kiểm tra tính dung huyết của các chủng xạ khuẩn phân lập được

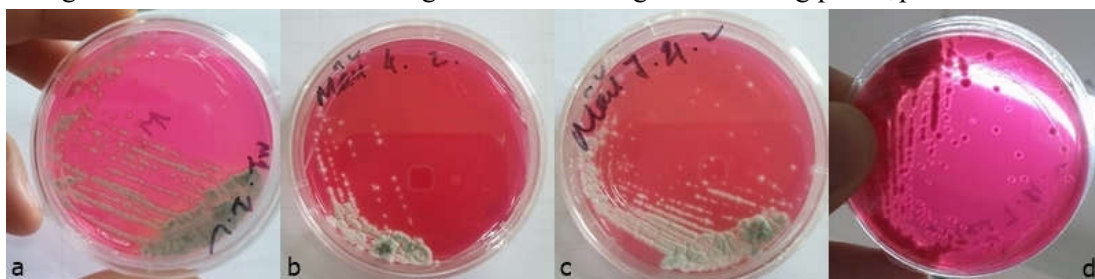
Bảng 3. Khả năng dung huyết của các chủng xạ khuẩn phân lập được

Chủng xạ khuẩn	Khả năng dung huyết máu tôm
DH A1	-
DM A1	-
DM A2	-
PH A1	-
QN A1	-

Theo Kumar và Achuthankutty (2006), các chủng xạ khuẩn phân lập được từ trầm tích biển không gây bệnh cho tôm và không có báo cáo nào về xạ khuẩn có thể là tác nhân gây bệnh cho động vật thủy sản. Trong nghiên cứu này, sau 7 ngày nuôi cấy trên môi trường Rose-Bengal có bổ sung máu tôm, các chủng xạ khuẩn đều không làm vỡ tế bào máu tôm chứng tỏ các

Khi nuôi cấy các chủng xạ khuẩn trên môi trường Rose-Bengal có bổ sung máu tôm, không thấy xuất hiện các vòng dung huyết (Bảng 3, Hình 8) chứng tỏ các chủng xạ khuẩn không có khả năng dung giải tế bào máu của tôm.

chủng này không có khả năng gây bệnh cho tôm. Do khả năng của các chủng xạ khuẩn này có thể phát triển trong môi trường nước mặn và không gây bệnh cho tôm, nên có thể ứng dụng các chủng xạ khuẩn này trong ao nuôi tôm như là chế phẩm sinh học. Tuy nhiên, các thử nghiệm sâu hơn cần được nghiên cứu để tìm ra liều dùng và cách dùng phù hợp.



Hình 8. Khả năng dung huyết của chủng xạ khuẩn DH A1 (a), PH A1 (b), DM A1 (c) và QN A1 (d) trên môi trường Rose-Bengal có bổ sung máu tôm

3.4. Khả năng kháng khuẩn của các chủng xạ khuẩn phân lập được

Khả năng kháng lại vi khuẩn *V. parahaemolyticus* của các chủng xạ khuẩn được thể hiện ở Bảng 4. Các chủng xạ khuẩn đều có khả năng kháng lại sự phát triển của chủng vi khuẩn *V.*

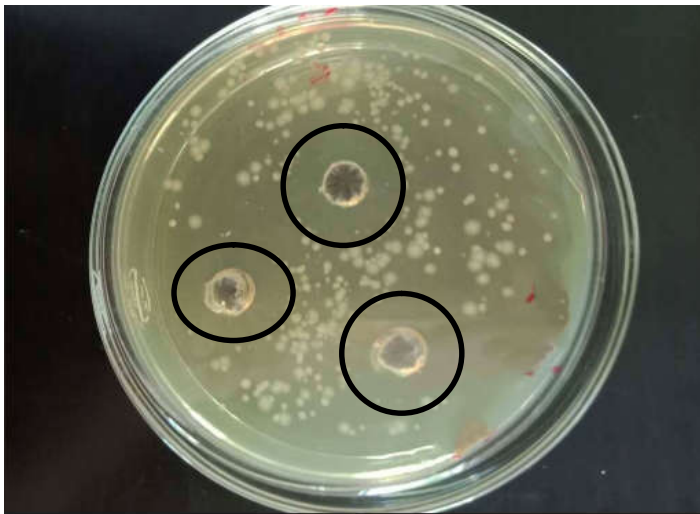
parahaemolyticus, với khả năng kháng khuẩn của các chủng này tương đối tốt thể hiện qua các vòng vô khuẩn trên môi trường (Hình 9). Đường kính vòng tròn vô khuẩn xuất hiện do khả năng khuếch tán của kháng sinh do xạ khuẩn sản sinh vào môi trường nuôi cấy.

Bảng 4. Đường kính vòng vô khuẩn và khả năng kháng khuẩn của các chủng xạ khuẩn phân lập được

Chủng xạ khuẩn	Đường kính lỗ thạch (mm)	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)	Khả năng kháng <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
DH A1	5	15-17	+
DM A1	5	14-18	+
DM A2	5	11-18	+
PH A1	5	13-17	+
QN A1	5	14-16	+

Streptomyces đã được chứng minh khả năng sản sinh các hợp chất ức chế và chất chuyển hóa có sự liên quan đến sự suy giảm của việc hình thành màng bọc sinh học, hoạt động cảm biến chống lại các tác nhân gây bệnh (You và cs., 2007) và các hoạt động chống độc lực của vi khuẩn *Vibrio* sp. (Iwatsuki và cs., 2008). Ngoài ra, một số chủng *Streptomyces* có khả năng sản xuất bacteriocins, siderophores có

thể ảnh hưởng đến sự phát triển của mầm bệnh *Vibrio* sp. bởi sự cạnh tranh sắt trong môi trường nước (Lechevalier và Lechevalier, 1970; You và cs., 2005). Đặc biệt, *S. sampsonii* còn tiết ra các chất thuộc nhóm kháng sinh polyene, ngoài khả năng kháng khuẩn còn có khả năng kháng nấm *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Microsporium gypseum* và *Trichophyton* sp. (Jain và Jain, 2007).



Hình 9. Vòng vô khuẩn của chủng DM A2 lên vi khuẩn *V. parahaemolyticus*.

Mohanraj và Sekar (2013) cho rằng nếu sử dụng xạ khuẩn trong hệ thống nuôi thủy sản thì có khả năng ức chế được sự phát triển của vi khuẩn *Vibrio*. Nghiên cứu của Châu và cs. (2016) cho thấy các chủng *Streptomyces* sp. phân lập tại Thừa Thiên Huế có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn *V. harveyi* và *V. parahaemolyticus*, tuy nhiên, khi cho vào môi trường ao nuôi tôm thì khả năng phát triển của các chủng này rất kém và hầu như rất khó để phân lập lại. Khả năng kháng khuẩn của xạ khuẩn phụ thuộc rất

lớn vào môi trường nuôi cấy (Jose và Jebakumar, 2013), chính vì vậy việc đưa xạ khuẩn vào ao nuôi tôm cần phải được nghiên cứu sâu hơn để đảm bảo sự phát triển của chúng.

4. KẾT LUẬN

Từ các mẫu bùn thu từ các ao nuôi tôm tại Thừa Thiên Huế, phân lập được 5 chủng xạ khuẩn: DH A1, DM A1, DM A2, PH A1, QN A1.

Các chủng tuyển chọn đã được định danh bằng phương pháp giải trình tự gen

16S rRNA. Kết quả các chủng có trình tự nucleotide giống với chủng *Streptomyces sampsonii* ATCC 25495 từ 94%-98%.

Các chủng xạ khuẩn phân lập được có khả năng sản sinh enzyme amylase, cellulase, lipase (trừ chủng PH A1 không có khả năng sản sinh lipase) và 2 chủng PH A1 và QN A1 có khả năng sản sinh enzyme gelatinase.

Các chủng xạ khuẩn phân lập được không có khả năng dung giải tế bào máu tôm nên có thể sử dụng chủng xạ khuẩn này như là chế phẩm sinh học trong phòng và trị bệnh trên tôm.

Các chủng xạ khuẩn phân lập được có khả năng kháng lại sự phát triển của chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh trên tôm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tài liệu tiếng Việt

Chi cục Thủy sản Thừa Thiên Huế (2019). Báo cáo tình hình nuôi trồng thủy sản tại tỉnh Thừa Thiên Huế năm 2018.

Nguyễn Lâm Dũng, Phạm Thị Trân Châu, Nguyễn Thanh Hiền, Lê Đình Lương, Đoàn Xuân Mượu, Phạm Văn Ty. (1978). *Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học, Tập 3*. Hà Nội: Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.

Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Đình Quyển, Phạm Văn Ty. (1998). *Vi sinh vật học*. Hà Nội: Nhà xuất bản Giáo dục.

Nguyễn Hoàng Minh Huy. (2006). *Khảo sát đặc điểm và vai trò của chủng xạ khuẩn Streptomyces dicklowii*. Luận văn Thạc sĩ khoa học, trường Đại học Sư phạm thành phố Hồ Chí Minh.

2. Tài liệu tiếng nước ngoài

Arjit, D., Mahdi, E.B., Prashanti, K., Sandeep, S. & Sourav, B. (2012). Enzymatic screening and random amplified polymorphic DNA fingerprinting of soil streptomycetes isolated from Wayanad district in Kerala, India. *Journal of Biological Sciences*, 12, 43-50.

Ashutosh, K. (2008). *Pharmaceutical Microbiology*. New Delhi: New Age

International (P) Ltd.

Châu, N. T. T., Thanh, L. T. H. & Anh, N. H. T. (2016). Characterization of Actinomycetes antagonistic to *Vibrio parahaemolyticus* isolated from shrimp pond sediment. *Vietnam National University of Journal of Science: Earth and Environmental Sciences*, 32, 1-9.

Gupta, R., Saxena, R. K., Chaturvedi, P., & Virdi, J. S. (1995). Chitinase production by *Streptomyces viridificans*: its potential in fungal cell wall lysis. *Journal of Applied Bacteriology*, 78, 378-383.

Iwatsuki, M., Uchida, R., Yoshijima, H., Ui, H., Shiomi, K., Matsumoto, A., Takahashi, Y., Abe, A., Tomoda, H., & Omura, S. (2008). Guadinomines, type III secretion system inhibitors, produced by *Streptomyces* sp. K01-0509. I: taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. *Journal of Antibiotics (Tokyo)*, 61, 230-236.

Jain, P. K. & Jain, P. C. (2007). Isolation, characterization and antifungal activity of *Streptomyces sampsonii* GS 1322. *Indian Journal of Experimental Biology*, 45, 203-206.

Jain, R., Jain, A., Rawat, N., Nair, M., & Gumashta, R. (2016). Feather hydrolysate from *Streptomyces sampsonii* GS 1322: A potential low cost soil amendment. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 121(6), 672-677.

Jose, P. A., & Jebakumar, S. R. D. (2013). Phylogenetic appraisal of antagonistic, slow growing actinomycetes isolated from hypersaline inland solar salterns at Sambhar salt Lake, India. *Frontiers in Microbiology*, 4, 190.

Kumar, S. S., Philip, R., & Achuthankutty, C. T. (2006). Antiviral property of marine actinomycetes against white spot syndrome virus in penaeid shrimps. *Current Science*, 91, 807-811.

Lakshmi, C. V., Kumar, M. & Khanna, S. (2008). Biotransformation of chlorpyrifos and bioremediation of contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 62, 204-209.

Lechevalier, M. P. & Lechevalier, H. (1970). Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes.

- International Journal of Systematic Bacteriology*, 20, 435–443.
- Lee, L. H., Zainal, N., Azman, A. S., Eng, S. K., Ab Mutalib, N. S., Yin, W. F., & Chan, K. G. (2014a). *Streptomyces pluripotens* sp. nov., a bacteriocin-producing streptomycete that inhibits meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, (64), 3297–3306.
- Lee, L. H., Zainal, N., Azman, A. S., Eng, S. K., Goh, B. H., Yin, W.F., Ab Mutalib, N. S., & Chan, K. G. (2014b). Diversity and antimicrobial activities of actinobacteria isolated from tropical mangrove sediments in Malaysia. *Scientific World Journal*, 1-14.
- Manivasagan, P., Venkatesan, J., Sivakumar, K., & Kim, S. K. (2013). Marine actinobacterial metabolites: current status and future perspectives. *Microbiological Research*, (168), 311–332.
- Mohanraj, G. & Sekar, T. (2013). Isolation and screening of actinomycetes from marine sediments for their potential to produce antimicrobials. *International Journal of Life Science Biotechnology and Pharma Research*, 2(3), 115-126.
- Ser, H. L., Palanisamy, U. D., Yin, W. F., Abd Malek, S. N., Chan, K. G., Goh, B. H., & Lee, L. H. (2015). Presence of antioxidative agent, Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro- in newly isolated *Streptomyces mangrovisoli* sp. nov. *Frontiers in Microbiology*, (6), 854.
- Sharma, M., Dangi, P., & Choudhary, M. (2014). Actinomycetes: Source, identification, and their applications. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(2), 801-83.
- Souza, C. M., Schwabe, T. M., Pichler, H., Ploier, B., Leitner, E., Guan, X. L., Wenk, M. R., Riezman, I., & Riezman, H. (2011). A stable yeast strain efficiently producing cholesterol instead of ergosterol is functional for tryptophan uptake, but not weak organic acid resistance. *Metabolic Engineering*, 13(5), 555-69.
- Tan, L. T.-H., Ser, H.-L., Yin, W.-F., Chan, K.-G., Lee, L.-H., & Goh, B.-H. (2015). Investigation of antioxidative and anticancer potentials of *Streptomyces* sp. MUM256 isolated from Malaysia mangrove soil. *Frontiers in Microbiology*, (6), 1316.
- Weisburg, W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., & Lane D.J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*, 173(2), 697-703.
- 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. *World Journal of Microbiology and Biotechnololy*, (21), 679–682.
- You, J., Xue, X., Cao, L., Lu, X., Wang, J., Zhang, L., & Zhou, S. (2007). Inhibition of *Vibrio* biofilm formation by a marine actinomycete strain A66. *Applied Microbiology and Biotechnology*, (76), 1137–1144.