

ĐÁNH GIÁ TÍNH ĐA DẠNG VÀ HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA XẠ KHUẨN Ở RỪNG NGẬP MẶN XUÂN THỦY - NAM ĐỊNH

NGUYỄN THỊ THU THỦY, NGUYỄN THỊ VÂN, NGUYỄN KIM NỮ THẢO

*Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học,
Đại học Quốc gia Hà Nội*

Xạ khuẩn là một trong những nhóm vi sinh vật rất quan trọng bởi khả năng cung cấp một lượng lớn các sản phẩm trao đổi chất sơ cấp và thứ cấp có ý nghĩa trong công nghiệp, dược phẩm, nông nghiệp như các loại enzym, chất kháng sinh, chất kháng nấm, chất ức chế các dòng tế bào ung thư [6]. Hầu hết các chất có hoạt tính sinh học này được phát hiện từ các chủng xạ khuẩn phân lập được ở trên cạn [10]. Tuy nhiên, khả năng phát hiện các hoạt chất mới từ xạ khuẩn trên cạn ngày càng giảm dần và các nhà khoa học đã và đang chuyển sang khai thác tiềm năng nghiên cứu xạ khuẩn từ biển. Nhiều loài xạ khuẩn mới đã được phát hiện từ biển thuộc các chi *Dietzia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Salinispora*, *Marinophilus*, *Solwaraspora*, *Salinibacterium*, *Aeromicrobium*, *Williamsia* và *Verucosipora* trong thời gian gần đây. Theo đó, nhiều chất mới cũng được công bố có nguồn gốc từ xạ khuẩn biển, trong số đó, có rất nhiều chất có hoạt tính sinh học quý, có khả năng kháng vi khuẩn, kháng tế bào ung thư như Abyssomicin C [9], Diazepinomicin [2], Salinosporamide A [3]...

Tuy nhiên, các nghiên cứu phân lập thường chưa có đánh giá được toàn diện mức độ đa dạng sinh học của xạ khuẩn bởi vì cho đến nay, đa số xạ khuẩn vẫn chưa nuôi cấy được. Chính vì vậy, để đánh giá một cách toàn diện và khách quan hơn về độ đa dạng của xạ khuẩn, phương pháp điện di Gradient Gel biến tính (DGGE) đã được phát triển và sử dụng rộng rãi [7]. Trong phương pháp này, một đoạn gen 16S rDNA được nhân lên bằng cặp mồi đặc trưng cho xạ khuẩn, sau đó được phân tách trên gel polyacrylamide với gradient biến tính. Các đoạn DNA với thành phần nucleotide khác nhau sẽ biến tính ở các nồng độ chất biến tính khác nhau. Sự phân bố và số lượng băng có trên bản gel đại diện cho sự có mặt các nhóm xạ khuẩn chính trong mẫu được phân tích [4].

Các nghiên cứu đa dạng xạ khuẩn ở Việt Nam thường được tập trung trên cạn mà chưa có các nghiên cứu đa dạng và tiềm năng ứng dụng của xạ khuẩn biển. Những khu vực có tính đa dạng cao như Vườn Quốc gia Xuân Thủy đã được nghiên cứu nhiều về động thực vật [8] nhưng vẫn chưa có đánh giá đa dạng xạ khuẩn của rừng ngập mặn này. Chính vì vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành thu thập các mẫu đất ở các điểm khác nhau trong rừng ngập mặn Xuân Thủy để đánh giá độ đa dạng của xạ khuẩn tại khu vực này bằng cả hai hướng tiếp cận, phân lập và DGGE. Đồng thời, một số hoạt tính sinh học của các chủng xạ khuẩn phân lập được cũng được khảo sát trong nghiên cứu này.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Thu thập mẫu

Chín mẫu đất và trầm tích được thu thập tại Vườn Quốc gia Xuân Thủy - Nam Định. Tọa độ tại mỗi điểm lấy mẫu được ghi nhận trên máy định vị GPS. Độ sâu lấy mẫu được đo bằng thước đo. Nhiệt độ không khí tại thời điểm lấy mẫu được ghi nhận bằng nhiệt kế. Mẫu được bảo quản ở 4°C cho đến khi được nghiên cứu.

2. Phân lập xạ khuẩn biển [5]

Mỗi mẫu trầm tích lấy 500 mg, được pha loãng tới 2 nồng độ 10^{-2} và 10^{-3} và trải lên đĩa Petri chứa hai môi trường khác nhau NaST21Cx (dung dịch A: 750 ml nước biển khử trùng, K_2HPO_4

1g, vỏ tôm 1g và 16g Agar; dung dịch B: 250 ml nước biển khử trùng, 1g KNO₃, MgSO₄ 1g, CaCl₂. H₂O 1g, FeCl₃0,2 g, MgSO₄.H₂O(1g) và HV (Humic acid 1g, CaCO₃ 0,02 g, FeSO₄.7H₂O 0,01g, KCl 1,7 g, MgSO₄.7H₂O 0,05g, Na₂HPO₄ 1g, vitamin B 10ml, Agar 16g, nước biển khử trùng 1l, pH 7). Cả hai môi trường được bổ sung nalidixic acid 20mg/l và cycloheximide 50 mg/l. Đĩa phân lập được ủ ở 28°C và 50°C trong vòng 14 ngày. Các khuẩn lạc có hình thái khác nhau được lựa chọn và ria lên môi trường YS (Cao nấm men 2g, tinh bột 10g, nước cất 1l). Các chủng xạ khuẩn tinh sạch được bảo quản trong 20% glycerol ở -70°C.

3. Tách chiết DNA tổng số từ mẫu môi trường [11]

Sử dụng 1 gram mẫu trầm tích được đánh tan bằng hạt thủy tinh trong 1 ml nước khử trùng trong 20 phút. Thêm 2,7 ml extraction buffer (100 mM Tris pH8; 100 mM EDTA pH 8; 100 mM sodium phosphate, pH8; 100 mM NaCl; CTAB 1%), 20µl proteinase K. Ủ trong máy lắc 225 rpm, 37°C trong 30 phút. Thêm 300 µl SDS (20%), ủ ở 65°C trong 2 giờ, sau 25 phút lắc mẫu một lần. Thêm một thể tích PCI (Phenol: Chloroform: Isoamylalcohol 25:24:1) bằng thể tích mẫu trong ống. Li tâm 500rpm trong 10 phút. Thu dịch nổi, thêm một lượng isopropanol bằng 0.6 thể tích dịch trong ống. Ủ tại nhiệt độ phòng trong 1 giờ, li tâm 18000 rpm trong 25 phút. Bỏ dịch nổi, rửa cặn bằng 80% ethanol lạnh. Li tâm 18000 rpm trong 15 phút. Bỏ dịch nổi, cô chân không cặn ở nhiệt độ phòng tới khô. Thêm 40 µl nước để hòa DNA, giữ DNA ở -20°C.

4. Phản ứng PCR khuếch đại đoạn 433 bp của gene 16S rDNA [4]

Đoạn 1175 bp của gene 16S rDNA được khuếch đại từ mẫu DNA tổng số bằng phản ứng PCR sử dụng cặp mồi F243 (5'-GGATGAGCCCGCGGCCTA-3') & R1378 (5'-CGGTGTGTACAAGCCCGGGAACG-3'), trong đó mồi F243 là mồi đặc trưng cho xạ khuẩn. Sau đó, đoạn 433 bp được khuếch đại từ sản phẩm của phản ứng PCR trên sử dụng cặp mồi F984GC (5'-gc.-AACGCGAAGAACCTTAC-3') và R1378. Thành phần cho 25 µl hỗn hợp phản ứng gồm: 12.5 µl Go Taq Colorless Master (Promega, Madison, WI USA), 2.5 µl BSA (3mg/ml) (New England BioLabs), 2.5 µl MgCl₂ (2 mM), 1 µl mồi F243, 1 µl mồi R1378, 1.5 µl DMSO, 3 µl H₂O, 1µl DNA. Phản ứng khuếch đại gồm 35 chu kỳ, với 1 phút biến tính ở 94°C, 1 phút bắt cặp mồi ở 63°C, 2 phút ở 72°C để kéo dài mạch, bước cuối cùng là 72°C trong 10 phút và giữ lạnh ở 4°C. Sản phẩm PCR được điện di và kiểm tra trên gel agarose 1%.

5. DGGE [4]

Thành phần gel biến tính gồm 0.17% (vol/vol) TEMED (N,N,N',N'-tetramethylenediamine), 0.03% (wt/vol) ammonium persulfate, acrylamide-N,N'-methylenebisacrylamide (60:1), 20X TAE buffer, urea và formamide (phụ thuộc vào gradient biến tính). Gradient biến tính được sử dụng trong thí nghiệm này là 30% tới 60% (với 100% chất biến tính tương ứng 7M urea cộng với 40% (vol/vol) deionized formamide). Điện di đúng trong dịch TAE 1X ở nhiệt độ 60°C, hiệu điện thế 150 V trong 6 giờ.

6. Đánh giá hoạt tính enzyme [1]

Thỏi thạch mang chủng xạ khuẩn kích thước 5 mm được đặt lên các đĩa thạch kiểm tra chứa 1% cơ chất (cellulose, chitin, tinh bột hoặc casein). Sau 48 giờ nuôi cấy ở 28°C, khả năng phân giải cơ chất được kiểm tra bằng các loại thuốc nhuộm thích hợp.

7. Đánh giá hoạt tính kháng sinh [1]

Thỏi thạch mang chủng xạ khuẩn kích thước 5 mm được đặt lên các đĩa thạch kiểm tra chứa vi sinh vật kiểm định bao gồm *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Fusarium oxysporum*. Sau 24 giờ nuôi cấy ở 37°C đối với vi khuẩn và 28°C đối với nấm, khả năng kháng khuẩn và kháng nấm được xác định bằng vòng kháng xung quanh thỏi thạch.

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Phân lập các chủng xạ khuẩn từ rừng ngập mặn Xuân Thủy

Chín mẫu đất được thu thập từ rừng ngập mặn Xuân Thủy. Tọa độ, nhiệt độ, pH, độ muối của từng vị trí lấy mẫu được trình bày trong bảng 1. Lưu ý rằng các mẫu đất này được thu thập ở cả vùng đệm (S1, S2), vùng lõi của rừng ngập mặn Xuân Thủy (S6, S7, S8, S9), cửa sông (S3) và bãi biển (S4, S5). Vùng đệm được sử dụng để chăn nuôi thủy hải sản. Vùng lõi được bảo tồn nghiêm ngặt. Ngoài ra, các mẫu cũng được thu thập ở các độ sâu khác nhau.

Bảng 1

Vị trí lấy mẫu và các thông số liên quan

Tên mẫu	Tọa độ	Nhiệt độ (°C)	pH	Độ muối (ppt)
S1	N20°14'04"; E 106°31'03"	31	6.20	0.21
S2	N 20°14'10"; E106°30'21"	35	6.13	0.21
S3	N 20°14'40"; E 106°35'25"	31	7.46	3.20
S4	N 20°14'30"; E 106°34'57"	31	7.32	4.16
S5	N 20°14'30"; E 106°34'57"	31	7.30	2.32
S6	N 20°13'21"; E 106°35'18"	30	7.58	2.14
S7	N20°13'21"; E 106°35'18"	30	7.45	2.14
S8	N 20°13'25"; E 106°33'17"	31	7.54	2.43
S9	N20°13'30"; E 106°32'36"	31	7.63	4.70

Tổng số 92 chủng xạ khuẩn đã được phân lập từ 9 mẫu đất, trung bình một mẫu phân lập được 10 chủng xạ khuẩn. Số lượng chủng xạ khuẩn phân lập được ở các mẫu dao động rất lớn từ 2 cho tới 22 chủng (Bảng 2). Sự khác biệt về số lượng chủng phân lập được ở các mẫu có thể là do sự khác biệt về đặc điểm mẫu được lấy. Số lượng chủng xạ khuẩn phân lập được nhiều nhất là từ mẫu S3 (với 22 chủng). Mẫu S3 được thu thập từ cửa sông là khu vực có độ phú dưỡng cao nên đặc biệt phù hợp cho sự phát triển của xạ khuẩn- nhóm vi khuẩn sống dị dưỡng dựa vào mùn bã hữu cơ có sẵn trong môi trường. Mẫu có số lượng chủng phân lập lớn thứ hai là mẫu S5 với 21 chủng. Đây là mẫu cát ven biển, chịu ảnh hưởng của hoạt động thủy triều. Trái ngược với 2 khu vực trên, số lượng chủng xạ khuẩn phân lập được giảm đáng kể trong mẫu đất ngập nước trong khu vực lõi của rừng ngập mặn, khu vực ít chịu ảnh hưởng của con người.

Bảng 2

Số lượng chủng xạ khuẩn được phân lập từ từng mẫu theo phương pháp pha loãng và RC

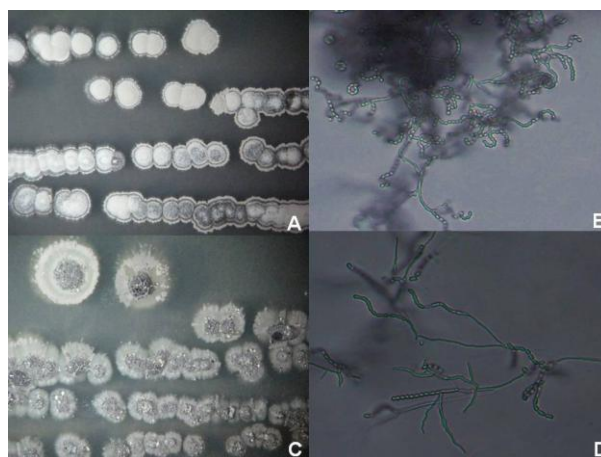
Mẫu	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	Tổng
Phương pháp Pha loãng	8	3	22	9	21	4	3	12	6	88
RC	0	0	0	0	0	1	2	1	0	4

Đặc biệt, 4 chủng chịu nhiệt đã được phân lập ở 50°C được kí hiệu lần lượt là XT13-A-05, XT13-A-55, XT13-A-21, XT13-A-82. 92 chủng xạ khuẩn được phân lập rất đa dạng về hình thái, màu sắc khuẩn lạc và hình thái chuỗi bào tử. Màu của khuẩn ti khí sinh đa dạng từ màu trắng, nâu, xám tới màu vàng, cam, đỏ. Sau 7 ngày nuôi cấy trên môi trường YS các chủng được giữ trong glycerol 20% ở -20°C tại IMBT.

2. Phân loại các chủng xạ khuẩn

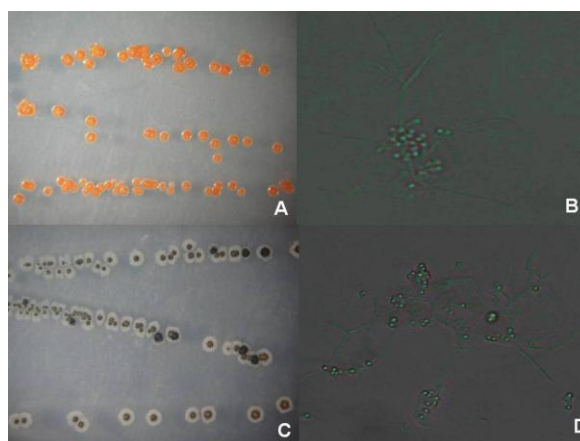
Sau khi nuôi cấy 10 đến 15 ngày trên môi trường YS bằng phương pháp cấy thạch mỏng, hệ sợi và hình thái chuỗi bào tử của xạ khuẩn được quan sát dưới kính hiển vi. Kết quả quan sát

cho thấy, trong tổng số 92 chủng xạ khuẩn phân lập được, 56 chủng có chuỗi bào tử với hình thái đặc trưng cho chi *Streptomyces*, với chuỗi bào tử dạng RF, RA hoặc S. Màu sắc của khuẩn ti cơ chất chuyển từ trắng qua xám kèm với bề mặt xù xì (Hình 1). 36 chủng thuộc các chi xạ khuẩn hiếm hoặc không quan sát được chuỗi bào tử bằng kính hiển vi quang học. Trong số đó, có một số chủng được xác định thuộc chi *Micromonospora* với bào tử đơn được sinh ra trực tiếp trên đầu sợi cơ chất (Hình 2). Để phân loại chi tiết hơn, 36 chủng này được lựa chọn để phân loại bằng phương pháp giải trình tự gen 16S rDNA. Kết quả giải trình tự cho thấy trong số 36 chủng, 14 chủng thuộc chi *Streptomyces*, 20 chủng thuộc chi *Micromonospora* và 2 chủng thuộc chi *Actinomadura*. 24 loài xạ khuẩn khác nhau đã được xác định dựa vào 16S rDNA bao gồm 10 loài thuộc chi *Streptomyces*, 13 loài thuộc chi *Micromonospora*, 1 loài thuộc chi *Actinomadura*.



Hình 1: Hình thái khuẩn lạc và chuỗi bào tử của hai chủng được phân lập thuộc chi *Streptomyces*. Khuẩn lạc (A) và chuỗi bào tử dạng xoắn (B) của chủng XT13-A-05 trên đĩa thạch YS sau 7 ngày nuôi cấy. Khuẩn lạc (C) và chuỗi bào tử dạng lượn sóng (D) của chủng XT13-A-21 trên đĩa thạch YS sau 7 ngày nuôi cấy.

(ảnh: Nguyễn Kim Nữ Thảo và cs, 2015)

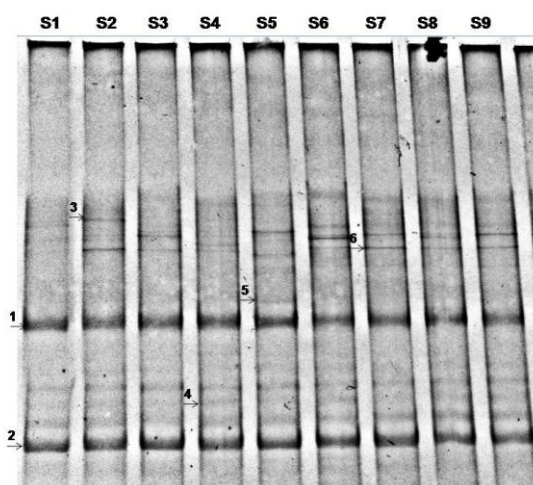


Hình 2: Hình thái khuẩn lạc và hình thái chuỗi bào tử của hai chủng được phân lập chi *Micromonospora*. Khuẩn lạc (A) và bào tử đơn (B) của chủng XT13-A-91 chi *Micromonospora* trên đĩa thạch YS sau 15 ngày nuôi cấy. Khuẩn lạc (C) và bào tử đơn (D) của chủng XT13-A-29 chi *Micromonospora* trên đĩa thạch YS sau 15 ngày nuôi cấy

(ảnh: Nguyễn Kim Nữ Thảo và cs, 2015)

3. Đánh giá độ đa dạng của xạ khuẩn trong các mẫu được thu thập bằng phương pháp DGGE

DNA tổng số của 9 mẫu đất được thu thập được từ rừng ngập mặn Xuân Thủy được tách như đã mô tả chi tiết trong phần phương pháp. Đoạn 1175 bp của gene 16S rDNA được khuếch đại từ mẫu DNA tổng số này bằng phản ứng PCR sử dụng cặp mồi F243 và R1378. Trong đó mồi F243 là mồi đặc trưng cho xạ khuẩn, do vậy, chỉ đoạn gen 16S rDNA của các chủng xạ khuẩn có mặt trong mẫu được khuếch đại. Sau đó, đoạn 433 bp được khuếch đại từ sản phẩm của phản ứng PCR trên sử dụng cặp mồi F984GC và R1378, trong đó, kẹp GC được thiết kế trong mồi xuôi phục vụ cho bước chạy điện di DGGE sau đó. Kết quả DGGE của đoạn 16S rDNA đặc trưng cho xạ khuẩn trong 9 mẫu đất được thể hiện ở hình 3. Kết quả cho thấy nhìn chung, các mẫu được thu thập có độ tương đồng cao về số lượng và vị trí các băng, đặc biệt với 2 băng đậm.



Hình 3: Kết quả chạy DGGE của 9 mẫu đất thu thập tại Vườn Quốc gia Xuân Thủy. Các băng được cắt và giải trình tự là các băng được đánh số trong hình (ảnh: Nguyễn Kim Nữ Thảo và cs, 2015)

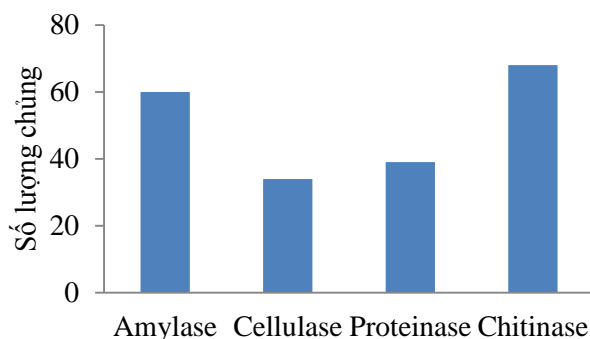
Sáu băng trên bản gel DGGE đã được cắt, khuếch đại một lần nữa bằng phản ứng PCR sử dụng cặp mồi F984 và R1378 và sau đó được giải trình tự. Kết quả giải trình tự cho thấy, băng 1 có độ tương đồng gần nhất với loài thuộc chi *Saccharospora*, băng 2 tương đồng với loài thuộc chi *Actinoplanes*, băng 3 tương đồng với loài thuộc chi *Nocardioides*, băng 4 tương đồng với loài thuộc chi *Pimelobacter*, băng 5 tương đồng với loài thuộc chi *Friedmanniella* và băng 6 tương đồng với loài thuộc chi *Janibacter*. Kết quả trên cho thấy, bằng phương pháp DGGE, hai chi chiếm số lượng lớn nhất trong các mẫu đất của rừng ngập mặn Xuân Thủy là *Saccharospora* và *Actinoplanes*. Tiếp đến, chi *Pimelobacter* cũng có mặt trong cả 9 mẫu được phân tích nhưng hiện băng nhạt hơn hai chi trên nhiều lần. Ngoài ra, chi *Nocardioides* chỉ xuất hiện trong mẫu S2 và chi *Friedmanniella* chỉ xuất hiện trong mẫu S5.

Có thể thấy rằng ba chi duy nhất phân lập được là *Streptomyces*, *Micromonospora* và *Actinomadura* không xuất hiện trên kết quả DGGE. Ngược lại, không có chủng nào thuộc 6 chi xuất hiện trên bản gel DGGE được phân lập. Trước hết, phương pháp phân lập chỉ thu được rất ít các chủng xạ khuẩn có trong mẫu môi trường. Vì vậy, việc đánh giá đa dạng sinh học bằng phương pháp phân lập sẽ chỉ cho kết quả tương đối, không khách quan và đầy đủ. Các chi thường thấy trong các mẫu phân lập có thể không phải là các chi chiếm số lượng lớn trong mẫu mà chỉ là các chi dễ mọc và mọc nhanh nhất trên môi trường nhân tạo. Tuy nhiên, cũng cần tính

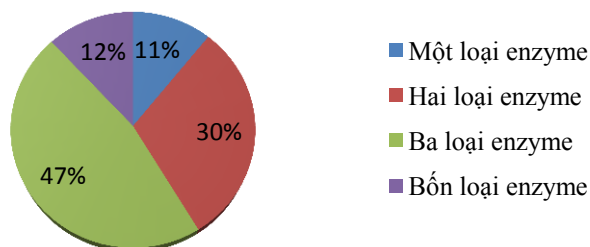
tới khả năng môi PCR được sử dụng không bắt cặp dễ dàng với DNA của một số chủng nhất định. Cũng cần lưu ý rằng, ngoài 6 băng được giải trình tự trên, còn rất nhiều băng xuất hiện trên bản gel DGGE ở hình 4. Vì vậy, các nghiên cứu sâu hơn cần được thực hiện để đưa ra các kết luận chi tiết hơn. Ngoài ra, phương pháp DGGE chỉ cho kết quả trình tự của đoạn DNA khoảng 300 bp, vì vậy, việc phân loại chỉ tạm dừng đến chi. Chính vì vậy, các phương pháp khác như tạo thư viện clone cũng nên được thực hiện để có được kết quả phân loại chuẩn xác đến loài.

4. Đánh giá hoạt tính enzyme của các chủng xạ khuẩn được phân lập

Khả năng sinh enzyme ngoại bào amylase, chitinase, protease và cellulase của 92 chủng xạ khuẩn phân lập được từ rừng ngập mặn Xuân Thủy được khảo sát như mô tả trong phần phương pháp. Kết quả khảo sát được thể hiện trong hình 4 và hình 5. Trong số 92 chủng xạ khuẩn, 11 chủng (12%) có khả năng sinh cả 4 loại enzyme được khảo sát, 43 chủng (47%) có khả năng sinh 3 loại enzyme, 28 chủng (30%) sinh 2 loại enzyme và 10 chủng (11%) sinh 1 loại enzyme. Số chủng sinh enzyme chitinase là lớn nhất với 68 chủng (chiếm 74%). Đặc biệt, chủng XT13-A-82 được phân lập ở điều kiện nhiệt độ 50°C và có khả năng sinh cả 4 loại enzyme với hoạt tính cao. Kết quả giải trình tự cho thấy chủng XT13-A-82 có độ tương đồng tới 99,7% với loài *Streptomyces thermoviolaceus subsp. apingens* DSM 41392(T). Đây có thể là chủng xạ khuẩn với tiềm năng ứng dụng lớn trong việc sản xuất các enzyme chịu nhiệt độ cao.



Hình 4: Số lượng chủng xạ khuẩn được phân lập có hoạt tính enzyme

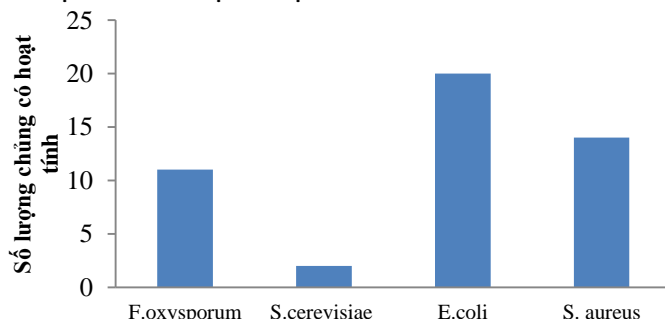


Hình 5: Tỷ lệ chủng xạ khuẩn có khả năng sinh enzyme

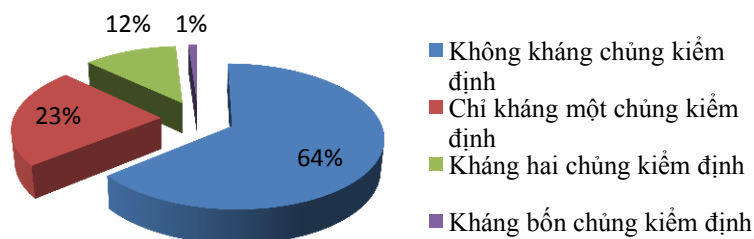
5. Đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật của các chủng xạ khuẩn được phân lập

Hoạt tính kháng vi sinh vật của các chủng xạ khuẩn được kiểm tra trên 4 chủng đối chứng: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces cerevisiae* và *Fusarium oxysporum*. Kết quả đánh giá hoạt tính được thể hiện trong hình 6 và hình 7. Trong số 92 chủng, 28 chủng (30%) có khả năng kháng ít nhất một chủng kiểm định. Đặc biệt chủng XT13-A-10 có khả năng

kháng đồng thời cả 4 chủng kiểm định. Ngoài ra, chủng XT13-A-21 được phân lập ở điều kiện nhiệt độ 50°C có khả năng kháng tốt với chủng *E. coli* và *S. aureus* với vòng hoạt tính có kích thước tương ứng lần lượt là 12 mm và 23 mm. Hai chủng này cần được nghiên cứu sâu hơn để đánh giá tiềm năng ứng dụng của các chất có hoạt tính sinh học do chúng sinh ra. Liên hệ với các nghiên cứu trước đây, kết quả nghiên cứu trên cho thấy rừng ngập mặn là nguồn lý tưởng để tìm ra những chất có hoạt tính sinh học từ xạ khuẩn.



Hình 6: Số lượng chủng xạ khuẩn có khả năng kháng vi sinh vật kiểm định



Hình 7: Tỷ lệ chủng xạ khuẩn có khả năng kháng vi sinh vật kiểm định

III. KẾT LUẬN

Tổng số 92 chủng xạ khuẩn đã được phân lập từ 9 mẫu đất thu thập từ rừng ngập mặn Xuân Thủy, Nam Định. Theo kết quả phân loại hình thái và phân tích 16S rDNA, trong số các chủng phân lập được có 20 chủng thuộc chi *Micromonospora*, 2 chủng thuộc chi *Actinomadura* và 70 chủng còn lại thuộc chi *Streptomyces*.

Kết quả phân tích biến tính DGGE cho thấy, các mẫu thu thập tại Xuân Thủy có độ tương đồng cao về tính đa dạng và thành phần chi xạ khuẩn sinh sống. Nhiều chi xạ khuẩn hiếm chiếm ưu thế trong các mẫu ngập mặn này như *Saccharopolyspora*, *Actinoplanes*, *Nocardioides*, *Janibacter* and *Friedmanniella* nhưng vẫn chưa được phân lập.

Kết quả đánh giá hoạt tính sơ bộ cho thấy nhiều chủng xạ khuẩn phân lập được có khả năng sinh enzyme với hoạt tính mạnh, trong đó chủng XT13-A-82 được phân lập ở điều kiện nhiệt độ 50°C có khả năng sinh cả 4 loại enzyme amylase, chitinase, protease và cellulase. 30% số chủng xạ khuẩn phân lập được có khả năng kháng ít nhất một trong bốn chủng kiểm định được lựa chọn. Đặc biệt chủng XT13-A-10 có khả năng kháng đồng thời cả 4 chủng kiểm định. Do đó, bộ xạ khuẩn được phân lập tại Xuân Thủy là nhóm sinh vật rất triển vọng để ứng dụng vào nhiều lĩnh vực đời sống như: công nghiệp giấy, công nghiệp thực phẩm, công nghiệp lên men, xử lý rác thải hữu cơ hay công nghiệp dược phẩm, thuốc thú y, thuốc bảo vệ thực vật,...

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Nhiệm vụ Bảo tồn và Lưu giữ nguồn gen vi sinh vật và NEF Research Grant Programme.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Bauer, A. W., W. M. M. Kirby, J. C. Sherris, M. Turck**, 1966. Am. J. Clin. Pathol. 36: 493-496.
2. **Charan, R. D., J. Janso, V. Bernan, X. Feng, G.T. Carter**, 2004. Journal of Natural Products, 67: 1431-1433.
3. **Feling, R. H., T. J. Mincer, C. A. Kauffman, P. R. Jensen, W. Fenical**, 2003. Angewandte Chemie International Edition in English, 42 (3): 355-357.
4. **Heuer, H., M. Krsek, P. Baker, K. Smalla, E. M. Wellington**, 1997. Applied Environmental Microbiology, 63 (8): 3233-3241.
5. **Magarvey, N. A., J. M. Keller, V. Bernan, M. Dworkin, D. H. Sherman**, 2004. Applied Environmental Microbiology, 70 (12): 7520-7529.
6. **Mukesh, S.**, 2014. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 3: 801-832.
7. **Myers, R. M., S. G. Fischer, L. S. Lerman, T. Maniatis**, 1985. Nucleic Acids Research, 13(9): 3131-3145.
8. **Nhuan, M. T., N. T. M. Ngoc, N. Q. Huong, N. T. H. Hue, N. T. Tue, P. B. Ngoc**, 2009. Journal of Wetlands Ecology, 2(1): 1-16.
9. **Riedlinger, J., H. Zahner, B. Krismer, A.T. Bull, L.A. Maldonado, A.C. Ward, M. Goodfellow, B. Bister, D. Bischoff**, 2004. Journal Antibiot (Tokyo), 57: 271-279.
10. **Talbot, G.H., J. Bradley, J.E. Edwards, D. Gilbert, M. Scheld, J.G. Bartlett**, 2006. Clin. Infect. Dis. 42: 657-668.
11. **Zhou, J., M. A. Bruns, J. M. Tiedje**, 1996. Applied Environmental Microbiology, 62(2): 316-22.

THE BIODIVERSITY AND BIOACTIVITY OF SOIL ACTINOMYCETES IN XUAN THUY MANGROVE FOREST, NAM DINH PROVINCE

NGUYEN THI THU THUY, NGUYEN THI VAN, NGUYEN KIM NU THAO

SUMMARY

Marine actinomycetes are promising sources in search for new drugs, however their potential for producing biologically active molecules is poorly studied. Therefore, in this study, we aimed to investigate the biodiversity and bioactivity of marine actinomycetes in XuanThuy National Park. The combination of culture-dependent and culture-independent methods have demonstrated that marine actinomycetes existing in the mangrove was quite diverse. Culture-dependent experiments were performed with different isolation methods. A total of 92 actinomycete strains was isolated corresponding to 3 different genera: *Streptomyces* (70 strains), *Micromonospora* (20 strains) and *Actinomadura* (2 strains). Remarkably, 3 strains (XT13-A-04, XT13-A-11, XT13-A-12) might belong to novel taxa due to their < 98% identity of the 16S rRNA gene sequence to known species based on BLAST search. On the other hand, the result of DGGE analysis of actinomycetes in each sample proved the existence of several other rare actinomycete genera, including *Saccharopolyspora*, *Actinoplanes*, *Norcardioides*, *Janibacter* and *Friedmanniella*. The results of screening bioactivities of isolated strains demonstrated that the isolated actinomycetes from mangrove forest showed the good potential in enzyme productions (amylase, cellulase, chitinase, proteinase) as well as in antibiotic productions against testing strains (*E. coli*, *S. aureus*, *S. cerevisiae* and *F. oxysporum*). These results showed that mangrove actinomycetes would be of great interest that serve as alternative sources of bioactive compounds used for biotechnological and pharmaceutical applications.