

## ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG KHÁNG KHUẨN, KHÁNG NẤM CỦA MỘT SỐ CHỦNG XẠ KHUẨN PHÂN LẬP TỪ RỪNG NGẬP MẶN KHU VỰC TỈNH KHÁNH HOÀ

### EVALUATION OF THE ANTIBACTERIAL AND ANTIFUNGAL ACTIVITY OF ACTINOBACTERIA ISOLATED FROM MANGROVE FORESTS IN KHANH HOA PROVINCE

Trần Tiến Ninh, Lê Xuân Phong, Phạm Lưu Hoàng Vũ, Văn Hồng Cẩm, Nguyễn Thị Như Thường\*

Viện Công nghệ sinh học và môi trường, Trường Đại học Nha Trang

Tác giả liên hệ: Nguyễn Thị Như Thường, Email: [nhuthuongnt@ntu.edu.vn](mailto:nhuthuongnt@ntu.edu.vn)

Ngày nhận bài: 29/02/2024; Ngày phản biện thông qua: 12/04/2024; Ngày duyệt đăng: 15/05/2024

#### TÓM TẮT

Xạ khuẩn đóng vai trò quan trọng trong quá trình phân hủy chất hữu cơ từ trầm tích rừng ngập mặn và là đối tượng tiềm năng tạo ra các hợp chất có hoạt tính sinh học quan trọng. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân lập và đánh giá hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm của các chủng xạ khuẩn có nguồn gốc từ rừng ngập mặn tại khu vực tỉnh Khánh Hoà. Tổng cộng 46 chủng xạ khuẩn được phân lập từ 9 mẫu bùn thu thập tại 3 rừng ngập mặn khác nhau trong khu vực tỉnh Khánh Hoà. Trong đó, 18/46 chủng (39%) thể hiện hoạt tính đối kháng với 5 chủng vi sinh vật kiểm định. Đặc biệt, 4 chủng xạ khuẩn A11, A17, A18, A35 thể hiện hoạt tính đối kháng mạnh với 2 chủng kiểm định là *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 và *Bacillus subtilis* ATCC 6633 với đường kính vòng kháng từ 15-19 mm. Chủng xạ khuẩn A18 có hoạt tính đối kháng mạnh nhất đối với *S. aureus* ATCC 25923 và *B. subtilis* ATCC 6633, với đường kính vòng kháng lần lượt là  $18,17 \pm 0,29$  mm và  $19,67 \pm 0,58$  mm. Phân loại sơ bộ trên hệ thống môi trường ISP cho thấy chủng A18 thuộc chi *Streptomyces*. Phân tích trình tự gen 16S rRNA cho thấy chủng *Streptomyces* sp. A18 thuộc loài *Streptomyces griseorubens* với mức độ tương đồng cao nhất là 99,78% khi so sánh với cơ sở dữ liệu của các loài xạ khuẩn trên GenBank. Kết quả cho thấy xạ khuẩn từ hệ sinh thái rừng ngập mặn sẽ là nguồn cung cấp tiềm năng cho các hợp chất có hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm.

**Từ khóa:** xạ khuẩn, kháng khuẩn, kháng nấm, rừng ngập mặn.

#### ABSTRACT

Actinobacteria play an important role in the decomposition process of organic matter in mangrove sediments, and also are a potential source that can produce essential bioactive compounds. This study was carried out to isolate and evaluate the antagonistic activity of actinobacteria from the mangrove forests of Khanh Hoa province. A total of 46 distinct actinobacteria strains were isolated from nine sediment samples collected across three different mangrove forests within Khanh Hoa province. Remarkably, 18 out of the 46 strains (39%) exhibited antagonistic activity against five tested microorganisms. Especially, four isolated namely strains A11, A17, A18, and A35 showed high antagonistic activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Bacillus subtilis* ATCC 6633 with inhibition zones ranging from 15 to 19 mm. In particular, strain A18 exhibited the highest capability of inhibiting the growth of bacteria against *S. aureus* ATCC 25923 and *B. subtilis* ATCC 6633 with inhibition zones measuring  $18.17 \pm 0.29$  mm and  $19.67 \pm 0.58$  mm, respectively. Preliminary classification according to the International Streptomyces Project (ISP) showed that strain A18 belongs to the genus *Streptomyces*. Furthermore, *Streptomyces* sp. A18 was identified as *Streptomyces griseorubens* by 16S rRNA sequence analysis, with a similarity of 99.78% compared with 16S rRNA sequences of actinobacterial species on the GenBank. The results of this study indicated that mangrove-derived actinobacteria as promising sources of bioactive compounds against pathogenic bacteria and fungi.

**Keywords:** actinobacteria, antibacterial activity, antifungal activity, mangrove forest.

#### I. TỔNG QUAN

Trong những năm qua, việc lạm dụng kháng sinh để phòng trị bệnh nhiễm khuẩn đã gây ra

nhiều tình trạng bất lợi trong y tế [1], chăn nuôi [2] và nuôi trồng thủy sản [3]. Điều này có thể dẫn đến sự xuất hiện nhanh chóng của các mầm

bệnh có khả năng kháng thuốc, kháng kháng sinh mạnh [4]. Do đó, nhu cầu ngày càng tăng đối với các loại kháng sinh mới cho thấy công cuộc nghiên cứu phân lập và sàng lọc các chủng vi sinh vật nhằm tạo ra các hợp chất kháng sinh mới là nhiệm vụ cấp bách hàng đầu [4], [5].

Giữa các nguồn vi sinh vật được sử dụng rộng rãi trong thực tế để sản xuất kháng sinh thì xạ khuẩn đóng góp khoảng 70% nguồn kháng sinh tự nhiên và cũng là nguồn tạo ra nhiều hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học khác như enzyme, chất ức chế enzyme, chất điều hòa miễn dịch, chất chống oxy hóa, chống ung thư,... [6]. Xạ khuẩn (Actinobacteria) là một nhóm lớn bao gồm các vi khuẩn gram dương, hiếu khí, có tỷ lệ G-C cao trong DNA, có khả năng hình thành các sợi phân nhánh hoặc sợi nấm và bào tử vô tính [7]. Các chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính sinh học do vi sinh vật tạo ra được báo cáo là khoảng 23.000, trong đó có tới 10.000 hợp chất được tạo ra bởi xạ khuẩn (chiếm 45%). Trong tất cả các loài xạ khuẩn, khoảng 7.600 hợp chất được tạo ra bởi các loài thuộc chi *Streptomyces*, đặc biệt là các kháng sinh với hoạt tính mạnh [8]. Vì vậy mà chi *Streptomyces* được biết đến như là nguồn kháng sinh phổ biến nhất, cung cấp khoảng 2/3 lượng kháng sinh tự nhiên cho ứng dụng trong y tế, nông nghiệp và thú y [9]. Nhiều loại kháng sinh được tạo ra bởi xạ khuẩn đã được báo cáo như novobiocin, amphotericin, streptomycin, vancomycin, neomycin, gentamycin, chloramphenicol, tetracycline, erythromycin, nystatin,... [7]. Các chủng xạ khuẩn mới từ các hệ sinh thái hoặc môi trường sống chưa được khám phá được coi là nguồn rất quan trọng của các hợp chất sinh học mới [10].

Hệ sinh thái rừng ngập mặn là nguồn tiềm năng để phân lập xạ khuẩn sản xuất kháng sinh. Rừng ngập mặn là một hệ sinh thái đặc biệt phân bố ven biển các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới, nơi có hàm lượng chất hữu cơ cao hỗ trợ cho sự đa dạng của quần xã thực vật, động vật và vi sinh vật [11]. Nhiều nghiên cứu cho rằng sự căng thẳng đối với sinh vật do sự biến động nhanh chóng của các yếu tố môi trường trong rừng ngập mặn, chẳng hạn như nhiệt độ,

độ mặn và hàm lượng oxy có thể thúc đẩy sự xuất hiện của các loài mới [12]. Tình trạng này tạo ra nhiều vi sinh vật mới bao gồm cả xạ khuẩn có chứa các con đường trao đổi chất đặc biệt để thích nghi, dẫn đến việc sản xuất ra các hợp chất chuyển hóa mới có giá trị [13].

Rừng ngập mặn toàn cầu phân bố chủ yếu ở Châu Á (42%), Châu Phi (20%), Bắc và Trung Mỹ (15%), Châu Đại Dương (12%) và Nam Mỹ (11%), bao phủ khoảng 60-75% bờ biển của các khu vực nhiệt đới và cận nhiệt đới trên thế giới [14]. Việt Nam là một trong các quốc gia có diện tích rừng ngập mặn lớn với tổng diện tích khoảng 200.000 ha [15] và là một trong 16 quốc gia có mức độ đa dạng sinh học cao trên thế giới [16].

Khánh Hòa là một khu vực nằm sát biển với nhiều khu rừng ngập mặn có tiềm năng trong việc khai thác nguồn xạ khuẩn mới có khả năng sinh các hợp chất có hoạt tính sinh học. Trước năm 1975, toàn tỉnh Khánh Hòa có diện tích rừng ngập mặn ước tính khoảng 3000 ha. Nhưng trong giai đoạn 1990-2000, nhiều khu rừng ngập mặn đã bị chặt phá để xây dựng ao nuôi trồng thủy sản và đến năm 2000, tỉnh chỉ còn 100 ha rừng ngập mặn [17] và đang phải chống chịu trước tình hình biến đổi khí hậu đang diễn ra mạnh mẽ trên toàn thế giới. Trước tình hình đó, việc đẩy mạnh các nghiên cứu phân lập và sàng lọc các hợp chất kháng sinh mới từ xạ khuẩn rừng ngập mặn luôn được khuyến khích. Trong những năm gần đây, đã có một vài nghiên cứu về các vi khuẩn sinh tổng hợp các hợp chất có hoạt tính sinh học từ rừng ngập mặn Khánh Hòa [18], nhưng mối quan tâm này đối với xạ khuẩn còn hạn chế. Vì vậy, cần có nhiều nghiên cứu hơn để khai thác triệt để tiềm năng của xạ khuẩn rừng ngập mặn trong việc sản xuất các hợp chất sinh học mới.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Vật liệu nghiên cứu

9 mẫu bùn được thu thập từ rừng ngập mặn thuộc khu vực tỉnh Khánh Hòa. Các mẫu được bảo quản tại phòng thí nghiệm Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nha Trang để tiến hành phân lập xạ khuẩn.

Sử dụng 5 chủng vi sinh vật kiểm định là *Escherichia coli* ATCC 25922 (EC22), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (SA23), *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (BS33), *Vibrio harveyi* VH62 (VH62), *Candida albicans* ATCC 10231 (CA31) (được lưu trữ tại phòng thí nghiệm Viện Công nghệ sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nha Trang) để đánh giá hoạt tính đối kháng của các chủng xạ khuẩn phân lập được.

## 2. Thu mẫu và bảo quản mẫu

Mẫu bùn được thu thập tại 3 địa điểm rừng ngập mặn bao gồm Tuần Lễ, Ninh Ích và Cam Thịnh Đông tại khu vực tỉnh Khánh Hoà. Mỗi rừng ngập mặn sẽ tiến hành lấy 3 mẫu bùn tại 3 vị trí khác nhau. Vị trí lấy mẫu gần các vùng rễ của cây ngập mặn [19] và lấy vào thời điểm thủy triều rút.

Chuẩn bị dụng cụ dùng lấy mẫu vô trùng để tránh nhiễm chéo. Mẫu bùn được lấy bằng cách loại bỏ lớp đất trên bề mặt và thu lớp đất nằm ở độ sâu 5-15 cm [20] cho vào túi đã được khử trùng. Mẫu được vận chuyển về phòng thí nghiệm Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nha Trang và bảo quản lạnh ở 4°C cho đến khi tiến hành phân lập và không được quá 10 ngày.

## 3. Phân lập xạ khuẩn từ mẫu bùn

Các mẫu bùn được để khô ở nhiệt độ phòng trong 7 ngày trước khi tiến hành phân lập xạ khuẩn [21]. Mẫu bùn được phân lập bằng phương pháp pha loãng nồng độ [20], [22].

Cân 1g bùn cho vào ống nghiệm vô trùng chứa 9 ml nước muối sinh lý (0,9%) đã khử trùng sau đó trộn đều mẫu ta được nồng độ  $10^1$ . Sử dụng ống mẫu ở độ pha loãng  $10^{-1}$  tiếp tục pha loãng đến nồng độ cuối cùng là  $10^{-4}$ . Hút 100  $\mu$ l dịch ở các độ pha loãng  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  cấy trang vào các đĩa có chứa môi trường phân lập xạ khuẩn là Actinomycete Isolation Agar (AIA), Humic acid Vitamin Agar (HVA), Starch Casein Agar (SCA) và Starch Yeast Peptone Agar (SYP), bổ sung 25  $\mu$ g/ml nystatin để hạn chế sự phát triển của nấm. Các đĩa cấy đem ủ ở 30°C và quan sát từ ngày thứ 5 trở đi trong vòng 25 ngày. Xác định các chủng xạ khuẩn căn cứ vào hình thái khuẩn lạc. Khuẩn lạc các chủng xạ khuẩn

thường có bề mặt khô, dạng bột, bám chắc vào môi trường thạch, hình thành sợi nấm phân nhánh, có hoặc không có sợi nấm khí sinh [20], [22].

Từ các đĩa phân lập, chọn các khuẩn lạc đơn của xạ khuẩn cấy ria ba chiều trên môi trường Half-strength Potato Dextrose Agar (HPDA) [23] bổ sung 1,5% NaCl và nuôi trong tủ ấm ở 30°C để làm thuần.

Sau khi được làm thuần, các chủng xạ khuẩn được bảo quản trong các ống cryotube 2 ml và eppendorf 1,5 ml chứa môi trường Potato Dextrose Broth (PDB) + 1,5% NaCl bổ sung 20% glycerol ở -20°C [23].

## 4. Đánh giá khả năng kháng khuẩn, kháng nấm của các chủng xạ khuẩn

Các chủng xạ khuẩn sau khi làm thuần được nuôi lắc trên môi trường Gause I lỏng ở tốc độ 150 vòng/phút, nhiệt độ 30°C trong 7 ngày [24]. Thu dịch nuôi cấy và ly tâm ở tốc độ 8000 vòng/phút trong 20 phút, thu dịch nổi và loại bỏ sinh khối [24]. Dịch nổi được lọc vô trùng bằng đầu lọc 0,22  $\mu$ m để loại bỏ các tế bào tự do trong dịch. Phần dịch sau khi lọc được bảo quản lạnh cho đến khi sử dụng.

5 chủng vi khuẩn và nấm mục tiêu được lưu trữ tại phòng thí nghiệm Viện Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nha Trang được hoạt hoá trong môi trường Nutrient Broth (NB) đối với 3 chủng EC22, SA23 và BS33; VH62 trên môi trường Tryptic Soy Broth (TSB) + 3% NaCl; và CA31 trên môi trường PDB; cả 5 chủng được nuôi lắc qua đêm ở tốc độ 150 vòng/phút ở 37°C. Sau đó 5 chủng kiểm định được cấy ria trên môi trường thạch tương ứng và ủ qua đêm ở 37°C trước khi sử dụng để kiểm tra hoạt tính đối kháng của xạ khuẩn.

Khả năng kháng khuẩn, kháng nấm của các chủng xạ khuẩn được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch của Gebreyohannes và cộng sự [25]. Các chủng vi sinh vật kiểm định được cấy chuyên trên môi trường Nutrient Agar (đối với ba chủng EC22, BS33, SA23), môi trường Tryptone Soya Agar bổ sung 3% NaCl (đối với VH62) và Potato Dextrose Agar (đối với CA31). Sau 18-24h, sử dụng que cấy vô trùng lấy sinh khối từ khuẩn lạc trên cho vào

ống McFarland có chứa 2ml dung dịch nước muối sinh lý vô trùng cho đến khi mật độ tế bào vi sinh vật đạt  $10^8$  CFU/ml tức thông số xuất hiện trên máy là 0,5 theo tiêu chuẩn của McFarland [26]. Dùng tăm bông tiết trùng cấy trang dịch vi sinh vật kiểm định trên môi trường Mueller Hinton agar (MHA) và MHA bổ sung 3% NaCl (đối với VH62). Môi trường MHA được hấp tuyệt trùng ở  $121^\circ\text{C}$  trong 15 phút, thể tích môi trường cho mỗi đĩa petri  $\Phi$  90 mm là 20 ml. Tạo các giếng thạch với đường kính  $d = 6$  mm trên các đĩa môi trường MHA đã được cấy trang dịch vi sinh vật kiểm định, tiến hành nhỏ  $80\mu\text{l}$  dịch nuôi cấy xạ khuẩn vào các giếng. Ủ các đĩa trong tủ lạnh từ 2-4h để dịch khuếch tán vào môi trường thạch, sau đó ủ trong tủ ấm  $37^\circ\text{C}$  trong 24h [25].

Hoạt tính của chủng xạ khuẩn tiềm năng được xác định thông qua đường kính vòng vô khuẩn theo công thức:  $D - d$  (mm), trong đó  $D$  là đường kính vòng vô khuẩn,  $d$  là đường kính giếng thạch. Mức độ kháng được đánh giá thông qua đường kính vòng vô khuẩn so với tiêu chuẩn của Lorian (Kháng:  $\leq 9$  mm; Trung bình:  $\geq 10 - 13$  mm; Nhạy:  $\geq 14$  mm) [27].

## 5. Phân loại xạ khuẩn

### 5.1. Phân loại sơ bộ

Chủng xạ khuẩn tiềm năng được phân loại sơ bộ bằng cách nuôi trên hệ thống môi trường ISP 1-7 và quan sát các chỉ số như cường độ phát triển, màu sắc khuẩn ty khí sinh (KTKS), khuẩn ty cơ chất (KTCC), khả năng sinh sắc tố tan và sự hình thành sắc tố melanin sau 14 và 21 ngày nuôi trong tủ ấm ở  $30^\circ\text{C}$  theo Shirling và Gottlieb [28]. Màu sắc của KTKS và KTCC của chủng xạ khuẩn tiềm năng được so với bảng màu của Tresner và Backus [29].

Tiến hành nhuộm Gram và quan sát chủng xạ khuẩn dưới kính hiển vi ở độ phóng đại 1000 lần [5] để ghi nhận đặc điểm hình thái hệ sợi khuẩn ty và chuỗi bào tử [28].

Tất cả các đặc điểm được so sánh với khóa phân loại Bergey [30] để xác định đến chi của chủng xạ khuẩn tiềm năng.

### 5.2. Định danh bằng sinh học phân tử

Chủng xạ khuẩn tiềm năng được làm thuần trên môi trường HPDA có bổ sung 1,5% NaCl,

nuôi cấy từ 5 – 7 ngày và tiến hành tách chiết DNA. Quy trình tách chiết DNA tổng số từ khuẩn lạc được thực hiện bằng phương pháp cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) theo mô tả của Wilson [31] có cải tiến: Dùng que cấy vô trùng lấy một lượng khuẩn lạc cho vào ống eppendorf 1,5 ml đã hấp tiết trùng, bổ sung  $600\mu\text{l}$  CTAB 2% (5 ml tris HCl 2M; 0,4 ml EDTA 0,5M; 2,8 ml NaCl 5M; 0,2g CTAB; 1,8 ml nước cất) và  $200\mu\text{l}$  SDS dùng chày chuyên dụng nghiền mẫu để phá vỡ tế bào. Ủ mẫu trong bể ổn nhiệt ở nhiệt độ  $65^\circ\text{C}$  trong 15 phút. Sau đó ly tâm với tốc độ 8000 vòng/phút trong 25 phút ở nhiệt độ  $4^\circ\text{C}$ . Hút  $600\mu\text{l}$  dịch nổi cho vào ống eppendorf 1,5 ml mới, bổ sung  $250\mu\text{l}$  sodium acetate (3M) vortex đều trong 30 giây và ủ lạnh trong đá 5 – 10 phút, quan sát sự xuất hiện màu trắng sữa của dịch mẫu. Tiến hành ly tâm lạnh ở  $4^\circ\text{C}$  với tốc độ 8000 vòng/phút trong 30 phút. Thu dịch nổi vào một eppendorf 1,5 ml mới và bổ sung isopropanol với tỷ lệ là  $V_{\text{mẫu}} : V_{\text{isopropanol}} = 1:1$ , đảo nhẹ 40 lần và ủ ở nhiệt độ  $-20^\circ\text{C}$  trong vòng 20 phút. Sau đó đem ly tâm với tốc độ 8000 vòng/phút trong 25 phút ở  $4^\circ\text{C}$ , thu kết tủa và loại bỏ dịch. Bổ sung  $500\mu\text{l}$  ethanol 70% để rửa phần cặn bản kết tủa cùng với DNA, ly tâm 8000 vòng/phút trong 20 phút ở  $4^\circ\text{C}$  và loại bỏ cặn. Hòa tan tủa trong  $40\mu\text{l}$  đệm Elution, vortex đều. Thực hiện đo nanodrop và điện di trên gel agarose 1% để kiểm tra chất lượng DNA tách chiết được, đồng thời lưu trữ mẫu ở nhiệt độ  $-20^\circ\text{C}$ .

Sau khi tách chiết thành công DNA của xạ khuẩn, thực hiện phản ứng PCR khuếch đại vùng gene 16S rRNA với cặp mồi đặc hiệu 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3') [32]. Thành phần phản ứng PCR được thực hiện với tổng thể tích là  $25\mu\text{l}$  bao gồm:  $2\mu\text{l}$  DNA tổng số;  $12,5\mu\text{l}$  MyTaq HS mix;  $0,5\mu\text{l}$  mồi xuôi 27F ( $10\mu\text{M}$ );  $0,5\mu\text{l}$  mồi ngược 1492R ( $10\mu\text{M}$ );  $9,5\mu\text{l}$  nước cất khử ion vô trùng. Phản ứng PCR được thực hiện bằng máy luân nhiệt Biorad theo chu trình nhiệt:  $94^\circ\text{C}/5$  phút;  $30$  chu kỳ:  $94^\circ\text{C}/1$  phút,  $48^\circ\text{C}/1$  phút, và  $72^\circ\text{C}/1$  phút; cuối cùng  $72^\circ\text{C}/10$  phút và giữ ở  $4^\circ\text{C}/\infty$ .

Kiểm tra kết quả PCR bằng phương pháp

điện di trên gel agarose 1% có nhuộm ethidium bromide với thang chuẩn có kích thước 1kb. Quan sát kết quả dưới đèn UV bằng máy đọc gel (Transiluminator Cleaver Scientific – Anh). Sản phẩm PCR đoạn gen 16S rRNA được gửi đến Công ty Nam Khoa để giải trình tự. Trình tự nucleotide của gen 16S rRNA được phân tích bằng phần mềm Geneious 2019.2 và so sánh mức độ tương đồng với trình tự đã được công bố trên GenBank bằng chương trình BLAST [33] để định danh loài xạ khuẩn.

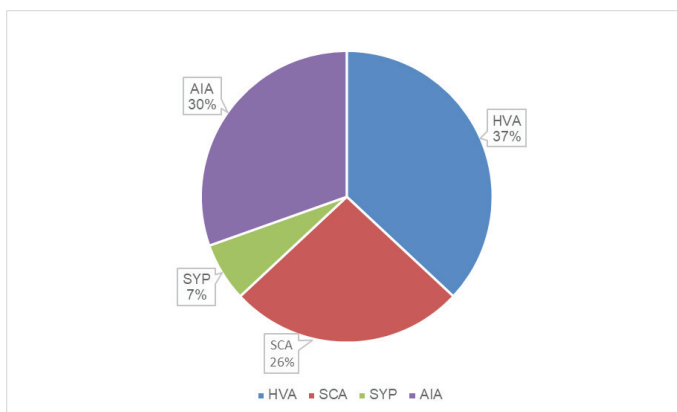
### III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 1. Bộ sưu tập xạ khuẩn từ mẫu bùn

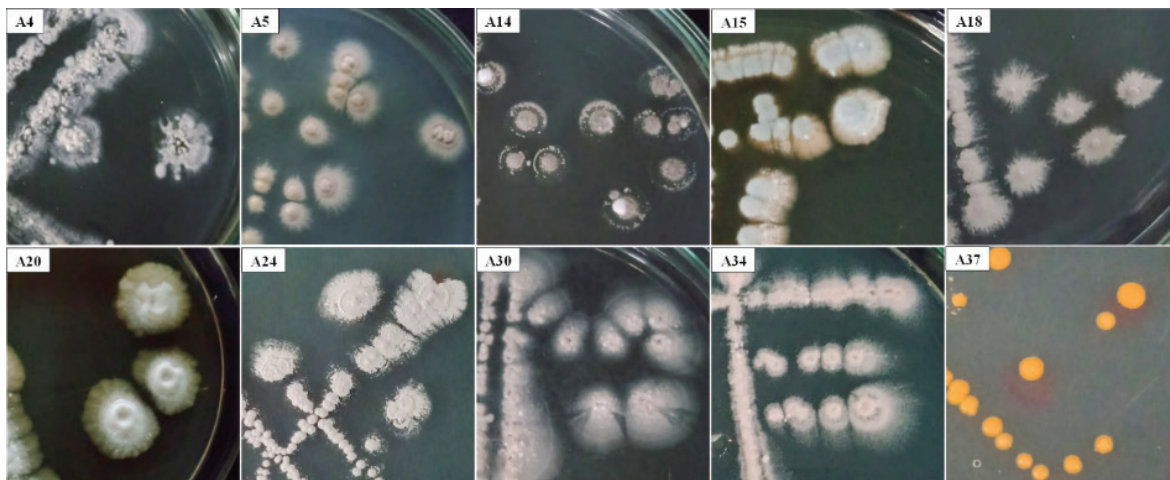
Từ 9 mẫu bùn nhóm nghiên cứu đã phân lập được 46 chủng xạ khuẩn dựa trên màu sắc và hình dạng đặc trưng của khuẩn lạc xạ khuẩn, bao gồm 17 chủng trên môi trường HVA (37%), 14 chủng trên môi trường AIA (30%), 12 chủng trên môi trường SCA (26%) và 3

chủng trên môi trường SYP (7%). Các chủng xạ khuẩn được làm thuần trên môi trường HPDA + 1,5% NaCl có đặc điểm hình thái và màu sắc đa dạng với nhóm xạ khuẩn màu nâu và màu trắng chiếm ưu thế.

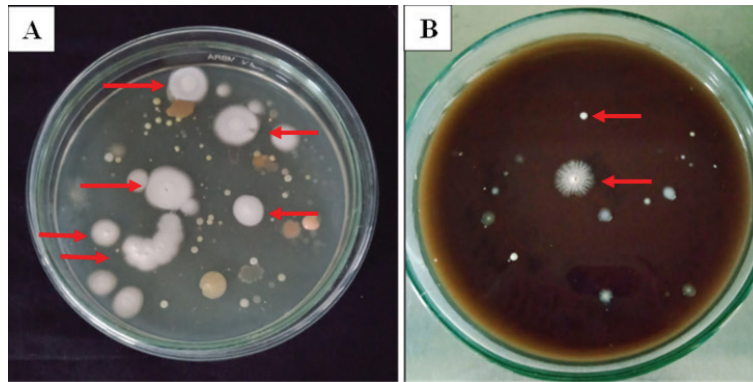
Kết quả cho thấy HVA là môi trường tiềm năng có thể sử dụng để phân lập xạ khuẩn từ mẫu bùn rừng ngập mặn. Trong một báo cáo của Hayakawa và Nonomura [34] về việc sử dụng môi trường phân lập HVA cho thấy môi trường HVA vượt trội hơn so với các môi trường khác hiện đang được sử dụng để phân lập và định lượng xạ khuẩn đất. HVA cho phép phát triển số lượng lớn nhất các khuẩn lạc xạ khuẩn thuộc về các chi *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Microbispora*, *Streptosporangium*, *Nocardia*, *Dactylosporangium*, *Microtetraspora* và *Thermomonospora* trên đĩa thạch, đồng thời hạn chế sự phát triển của các loài vi khuẩn



Hình 1: Tỷ lệ các chủng xạ khuẩn được phân lập từ các môi trường khác nhau.



Hình 2: Khuẩn lạc của một số chủng xạ khuẩn trên môi trường HPDA.



**Hình 3: Khuẩn lạc xạ khuẩn trên môi trường phân lập sau 14 ngày**  
**(A) Môi trường SCA, (B) Môi trường HVA, Mũi tên màu đỏ: khuẩn lạc xạ khuẩn.**

khác [34]. Theo sau là môi trường AIA và SCA cũng cho thấy tiềm năng sử dụng để phân lập xạ khuẩn rừng ngập mặn. Môi trường AIA dường như đặc hiệu và nhạy cảm nhất đối với xạ khuẩn vì chứa muối natri propionate hoạt động như một chất chống nấm [35]. Ngoài ra, độ trong suốt của môi trường AIA còn tạo điều kiện thuận lợi cho việc quan sát các khuẩn lạc [35]. Môi trường SCA cũng được báo cáo là phù hợp nhất cho sự phát triển của xạ khuẩn so với hệ thống môi trường ISP và một số môi trường khác như GAA (Glucose Asparagine Agar), GLAA (Glycerol Asparagine Agar), NA (Nutrient Agar) khi sử dụng để phân lập xạ khuẩn [36]. Mặc dù môi trường SYP khá hiệu quả khi sử dụng để phân lập xạ khuẩn trong một số nghiên cứu [37] nhưng kết quả cho thấy môi trường SYP không phù hợp để phân lập xạ khuẩn từ các mẫu bùn rừng ngập mặn thu thập tại khu vực tỉnh Khánh Hòa.

## **2. Đánh giá khả năng kháng khuẩn, kháng nấm**

Kết quả sàng lọc 46 chủng xạ khuẩn cho thấy có 14/46 chủng xạ khuẩn có hoạt tính đối kháng với SA23, 12/46 chủng đối kháng với BS33 và 3/46 chủng đối kháng với CA31. Không có chủng xạ khuẩn nào thể hiện hoạt tính đối kháng với EC22 và VH62 (Hình 4).

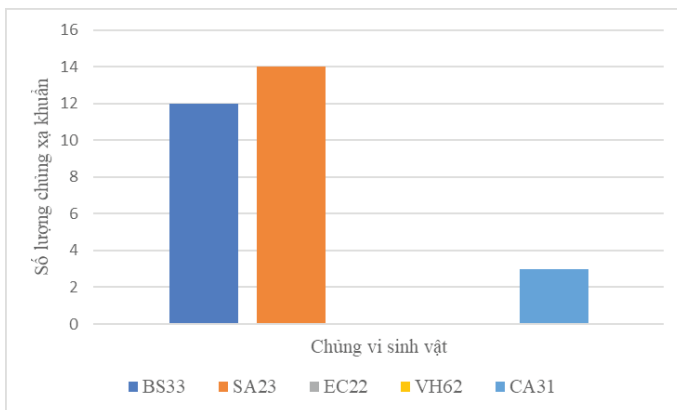
Kết quả đánh giá hoạt tính đối kháng của 18 chủng xạ khuẩn với 5 chủng vi sinh vật kiểm định được trình bày ở Bảng 1. Có 4 chủng xạ khuẩn A11, A17, A18, và A35 thể hiện hoạt tính đối kháng mạnh với 2 chủng vi sinh vật

kiểm định là SA23 và BS33 (Hình 5). Hoạt tính đối kháng với SA23 của các chủng lần lượt là: A11 ( $15,67 \pm 0,29$  mm), A17 ( $17,33 \pm 0,58$  mm), A18 ( $18,17 \pm 0,29$  mm), A35 ( $15,67 \pm 0,58$  mm). Hoạt tính đối kháng với *B. subtilis* ATCC 6633 của các chủng lần lượt là: A11 ( $18,67 \pm 0,58$  mm), A17 ( $18,5 \pm 0,5$  mm), A18 ( $19,67 \pm 0,58$  mm), A35 ( $19,17 \pm 0,29$  mm). Trong đó, chủng xạ khuẩn A18 có hoạt tính đối kháng mạnh nhất với đường kính vòng kháng  $18,17 \pm 0,29$  mm và  $19,67 \pm 0,58$  mm lần lượt với SA23 và BS33.

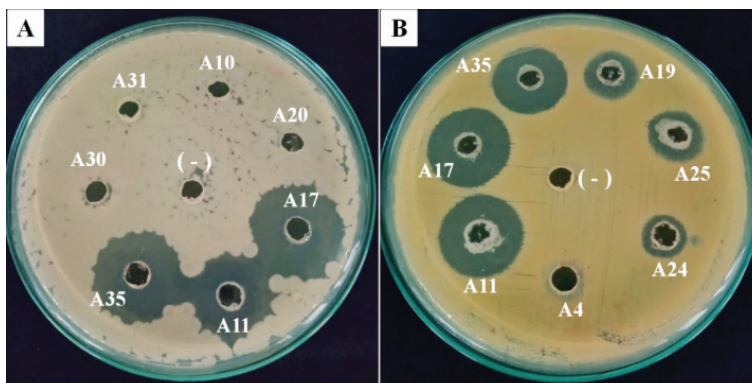
Kết quả chứng minh các chủng xạ khuẩn từ rừng ngập mặn khu vực tỉnh Khánh Hòa thể hiện hoạt tính đối kháng với vi khuẩn Gram dương nhiều hơn so với vi khuẩn Gram âm. Điều này tương tự với kết quả của một số nghiên cứu khác đã được công bố trước đây [22], [24]. Các chủng vi khuẩn Gram âm có khả năng kháng thuốc cao và ít nhạy cảm với kháng sinh hơn so với các chủng Gram dương là do sự khác biệt về cấu trúc tế bào giữa các vi sinh vật này [21]. Vi khuẩn Gram âm có màng lipopolysaccharide bên ngoài giúp thành tế bào ngăn chặn các chất hòa tan trong lipid thâm vào bên trong. Trong khi đó, vi khuẩn Gram dương dễ bị tác động hơn vì chỉ có lớp peptidoglycan bên ngoài, lớp peptidoglycan này không phải là một hàng rào chống thâm hiệu quả [38]. Một số lý do khác có thể dẫn đến sự khác biệt trong kết quả đối kháng là loại kháng sinh được sản xuất và nồng độ kháng sinh trong mẫu dịch nuôi cấy xạ khuẩn. Có thể các chủng xạ khuẩn hầu hết

chỉ sản xuất chất kháng sinh đặc hiệu với vi khuẩn Gram dương nên không chống lại các vi khuẩn Gram âm. Hay một số chủng xạ khuẩn có thể sản xuất kháng sinh chống lại vi khuẩn Gram âm nhưng nồng độ kháng sinh trong mẫu

dịch nuôi cấy thấp hơn ngưỡng nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) dẫn đến kết quả không có chủng xạ khuẩn đối kháng với nhóm vi khuẩn Gram âm được sử dụng.



Hình 4: Số lượng chủng xạ khuẩn kháng vi sinh vật kiểm định.



Hình 5: Kết quả kiểm tra hoạt tính đối kháng của các chủng xạ khuẩn với BS33 (A) và SA23 (B).

Bảng 1: Kết quả đánh giá hoạt tính đối kháng của 18 chủng xạ khuẩn với 5 chủng vi sinh vật kiểm

Chủng xạ khuẩn	Đường kính vòng kháng (D-d, mm)				
	Gram (+)		Gram (-)		Nấm men
	BS33	SA23	EC22	VH62	CA31
A1	2	-	-	-	-
A2	-	3	-	-	-
A3	2	-	-	-	-
A4	4	5	-	-	-
A8	-	2	-	-	-
A10	-	4	-	-	-
A11	18	15	-	-	-
A14	-	-	-	-	6
A17	18	17	-	-	-

Chủng xạ khuẩn	Đường kính vòng kháng (D-d, mm)				
	Gram (+)		Gram (-)		Nấm men
	BS33	SA23	EC22	VH62	CA31
A18	19	18	-	-	-
A19	6	8	-	-	-
A20	-	4	-	-	-
A22	4	3	-	-	-
A23	-	-	-	-	6
A24	8	5	-	-	4
A25	6	8	-	-	-
A26	7	5	-	-	-
A35	19	15	-	-	-

### 3. Phân loại xạ khuẩn

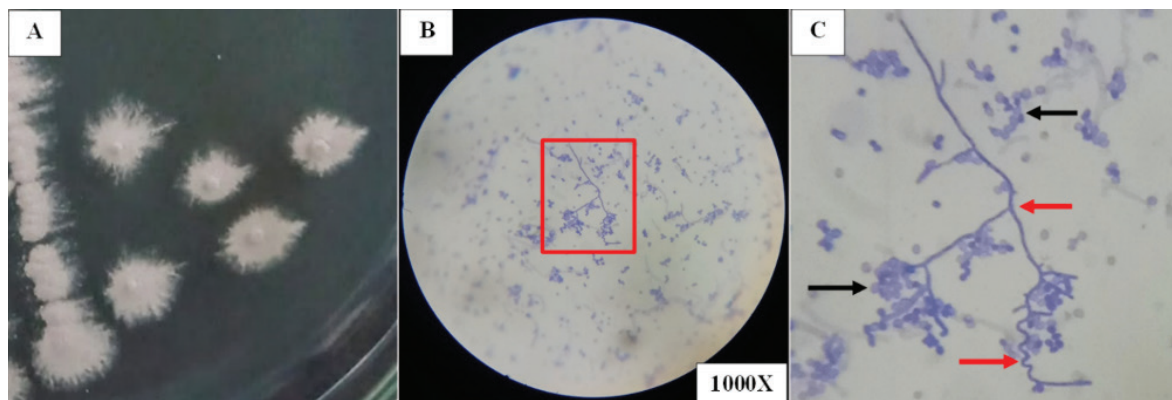
#### 3.1. Phân loại sơ bộ

Phân tích hình thái cho thấy, chủng A18 có khuẩn lạc hình oval, bề mặt khô, dạng bột, tâm nhô cao, màu nâu xám, viền phóng xạ (Hình 6 – A). Khuẩn ty cơ chất có màu vàng nhạt, khuẩn ty khí sinh dạng thẳng, phân nhánh, không phân đốt, có dạng xoắn ốc và xoắn móc câu ở đầu. Bào tử trần, dạng chuỗi dài, số lượng bào tử lớn hơn 10 bào tử trong 1 chuỗi hoàn chỉnh (Hình 6 – B,C).

Chủng A18 khi nuôi cấy trên các môi trường ISP1, ISP3, ISP4, ISP6 và ISP7, cho thấy khả năng phát triển tốt, khuẩn ty khí sinh có màu xám trắng và khuẩn ty cơ chất có màu vàng từ nhạt đến đậm sau 14 và 21 ngày. Trong khi đó, trên môi trường ISP2, chủng A18 phát triển vừa

phải, không sinh khuẩn ty khí sinh và khuẩn ty cơ chất có màu vàng nhạt sau 14 ngày nuôi cấy, đến ngày 21 khuẩn ty khí sinh màu xám trắng mới được hình thành. Trên môi trường ISP5, khuẩn lạc chủng A18 phát triển tốt, khuẩn ty khí sinh và khuẩn ty cơ chất đều có màu trắng sau 14 và 21 ngày nuôi cấy. Chủng A18 có khả năng sinh sắc tố tan màu vàng trên môi trường ISP2 sau 14 ngày nuôi cấy và môi trường ISP3 sau 21 ngày nuôi cấy. Chủng A18 không có khả năng hình thành sắc tố melanin trên môi trường ISP1, ISP6, và ISP7 (Bảng 1, Bảng 2).

So sánh các đặc điểm hình thái, màu sắc KTKS, KTCC, khả năng hình thành sắc tố tan và sắc tố melanin với khoá phân loại Bergey [30], cho thấy chủng xạ khuẩn A18 tương đồng với mô tả của chi *Streptomyces*.



Hình 6: Hình thái khuẩn lạc (A), hệ sợi khí sinh và bào tử của chủng xạ khuẩn A18 (B, C)  
Mũi tên màu đỏ: hệ sợi khuẩn ty khí sinh. Mũi tên màu đen: chuỗi bào tử.



**Bảng 2: Đặc điểm nuôi cấy của chủng A18 trên các môi trường ISP ở ngày 14**

Môi trường	Ngày 14				
	Phát triển	KTKS	KTCC	Sắc tố tan	Melanin
ISP-1	Tốt	Xám trắng	Vàng nâu	-	-
ISP-2	Vừa phải	-	Vàng nhạt	Vàng	-
ISP-3	Tốt	Xám trắng	Vàng nhạt	-	-
ISP-4	Tốt	Xám trắng	Vàng nhạt	-	-
ISP-5	Tốt	Trắng	Trắng	-	-
ISP-6	Tốt	Xám trắng	Vàng nâu	-	-
ISP-7	Tốt	Xám trắng	Vàng nâu	-	-

**Bảng 3: Đặc điểm nuôi cấy của chủng A18 trên các môi trường ISP ở ngày 21**

Môi trường	Ngày 21				
	Phát triển	KTKS	KTCC	Sắc tố tan	Melanin
ISP-1	Tốt	Xám trắng	Vàng nâu	-	-
ISP-2	Vừa phải	Xám trắng	Vàng	Vàng	-
ISP-3	Tốt	Xám trắng	Vàng	Vàng	-
ISP-4	Tốt	Xám trắng	Vàng nhạt	-	-
ISP-5	Tốt	Trắng	Trắng	-	-
ISP-6	Tốt	Xám trắng	Vàng nâu	-	-
ISP-7	Tốt	Xám trắng	Vàng nâu	-	-

### 3.2. Định danh bằng sinh học phân tử

Chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. A18 có hoạt tính đối kháng mạnh nhất với 2 chủng vi sinh vật kiểm định là SA23 và BS33 được tiến hành định danh bằng sinh học phân tử thông qua đoạn gen 16S rRNA.

Kết quả điện di sản phẩm khuếch đại đoạn gen 16S rRNA trên gel agarose 1% chứng tỏ quá trình khuếch đại đoạn gen 16S rRNA của chủng *Streptomyces* sp. A18 được thực hiện thành công. Sản phẩm PCR có band sáng rõ ràng và có kích thước khoảng 1500bp đúng như lý thuyết (Hình 7).

Kết quả giải trình tự gen 16S rRNA nhận được từ Công ty Nam Khoa được tiến hành xử lý, tinh sạch bằng phần mềm Geneious 2019.2 và so sánh độ tương đồng với các trình tự trên ngân hàng dữ liệu NCBI (National Center for Biotechnology Information) bằng chương trình BLAST. Sau khi so sánh với bộ gen của các loài vi khuẩn trên Genbank xác định chủng *Streptomyces* sp. A18 có độ tương đồng là 99,78% với chủng *Streptomyces griseorubens*

NBRC 12780 (Bảng 4).

*Streptomyces griseorubens* từ biển được báo cáo lần đầu tiên bởi Ye và cộng sự vào năm 2009, có nguồn gốc từ trầm tích dưới đáy biển ở Uy Hải, Trung Quốc. Chủng *Streptomyces griseorubens* WBF9 cho thấy hoạt động chống khối u mạnh mẽ [39]. Al-Askar và cộng sự [40] đã phân lập được chủng *Streptomyces griseorubens* E44G từ mẫu đất trồng trọt ở Ả Rập Xê-út, cho thấy hoạt tính đối kháng với nhiều loại nấm gây bệnh trên thực vật và các vi khuẩn Gram âm. Gong và cộng sự [41] đã báo cáo về xạ khuẩn phân lập từ trầm tích rừng ngập mặn tại biển Maowei, Trung Quốc. Trong đó, *Streptomyces griseorubens* là một trong 2 loài xạ khuẩn chiếm ưu thế từ các mẫu phân lập. Các chủng *Streptomyces griseorubens* từ rừng ngập mặn cho thấy hoạt tính đối kháng mạnh chống lại *Bacillus cereus* ATCC 14579 và đối kháng yếu với *Escherichia coli* ATCC 13706 [41]. Đặng Thị Thùy Dương và cộng sự [42] cũng đã phân lập được chủng xạ khuẩn *Streptomyces griseorubens* LD-X11 từ mẫu đất

thu thập ở các vùng trồng hoa Lily tại Hà Nội. Chủng *Streptomyces griseorubens* LD-X11 có khả năng đối kháng mạnh với chủng nấm *Fusarium oxysporum* LTM-N12 gây bệnh thối củ ở hoa Lily.

Chủng xạ khuẩn *Streptomyces griseorubens* A18 có khả năng đối kháng mạnh với các chủng vi sinh vật kiểm định Gram dương là *S. aureus* ATCC 25923 và *B. subtilis* ATCC 6633, cho thấy tiềm năng sản xuất hợp chất kháng khuẩn

**Bảng 4: Mức độ tương đồng trình tự gene của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. A18 với trình tự gene của các chủng xạ khuẩn có sẵn trên ngân hàng gene dựa vào trình tự gen vùng 16S-rRNA.**

Chủng xạ khuẩn	Xác định loài trên ngân hàng gen	Mã số	Độ tương đồng (%)
<i>Streptomyces</i> sp. A18	<i>Streptomyces griseorubens</i>	NBRC 12780	99,78%

#### IV. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Đã phân lập được 46 chủng xạ khuẩn từ 9 mẫu bùn rừng ngập mặn khu vực tỉnh Khánh Hoà. Tổng cộng 18/46 chủng (39%) thể hiện hoạt tính đối kháng với các chủng kiểm định và chủng A18 có hoạt tính đối kháng mạnh nhất với đường kính vòng kháng  $18,17 \pm 0,29$  mm và  $19,67 \pm 0,58$  mm lần lượt với 2 chủng kiểm định là *S. aureus* ATCC 25923 và *B. subtilis* ATCC 6633. Phân loại sơ bộ và định danh sinh học phân tử thông qua phân tích trình tự gen 16S rRNA xác định chủng A18 là *Streptomyces griseorubens* với độ tương đồng là 99,78% khi so sánh với trình tự gen 16S rRNA của các loài xạ khuẩn có sẵn trên Genbank. Kết quả nghiên cứu có ý nghĩa trong việc tìm ra các loài xạ khuẩn từ rừng ngập mặn có khả năng sinh ra các hợp chất có hoạt tính sinh học mới, ứng dụng cho sản xuất các hợp chất kháng sinh mới chống lại vi khuẩn và nấm gây bệnh kháng kháng sinh đang xuất hiện ngày càng nhiều.

Từ nghiên cứu trên nhóm đưa ra một số kiến nghị định hướng các nghiên cứu tiếp theo

nhằm mục tiêu các vi khuẩn Gram dương gây hại. Hơn nữa, với các nghiên cứu đi trước về loài xạ khuẩn *Streptomyces griseorubens* cho thấy tiềm năng của chủng *Streptomyces griseorubens* A18 có thể sử dụng để tiếp tục các nghiên cứu ứng dụng như xử lý các hợp chất hữu cơ khó phân huỷ, tác nhân kiểm soát nấm gây bệnh, hợp chất chống oxi hoá, chống ung thư.

như thử nghiệm hoạt tính đối kháng của chủng *Streptomyces griseorubens* A18 với các loài vi sinh vật gây hại phổ biến như *Staphylococcus aureus* kháng methicillin (MRSA), *Streptococcus pneumoniae*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*,... Nghiên cứu thêm về đường cong sinh trưởng để xác định thời điểm mà chủng *Streptomyces griseorubens* A18 thể hiện hoạt tính đối kháng mạnh nhất. Nghiên cứu các điều kiện nuôi cấy (như tỉ lệ tiếp giống, nhiệt độ, pH, nồng độ muối,...) để chủng xạ khuẩn *Streptomyces griseorubens* A18 tạo kháng sinh tốt nhất. Nghiên cứu tách chiết, tinh sạch, xác định bản chất hóa học và đặc tính của chất kháng sinh được tách chiết từ chủng xạ khuẩn *Streptomyces griseorubens* A18. Nghiên cứu thêm về khả năng sinh ra các loại enzyme khác nhau của chủng *Streptomyces griseorubens* A18 như amylase, cellulase, protease, lipase, chitinase,... Từ đó có thể ứng dụng chủng xạ khuẩn A18 vào thực tiễn như sản xuất chất kháng sinh ở quy mô công nghiệp, làm chế phẩm vi sinh,...

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

##### Tài liệu tiếng Việt

- Đ. T. Soa *et al.*, “Tổng Quan Về Tình Hình Kháng Kháng Sinh Của Một Số Vi Khuẩn Thường Gây Bệnh Trên Lâm Sàng Tại Việt Nam Từ 2017- 2022,” *Tạp chí Y học Việt Nam*, vol. 519, no. 1. 2022, doi: 10.51298/vmj.v519i1.3576.
- Yves Waché, “Chương IV - Vấn đề sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi và tương lai của nghiên cứu vi sinh vật đối với an toàn thực phẩm,” in *An toàn thực phẩm nông sản - Một số hiểu biết về sản phẩm, hệ thống sản xuất phân phối và chính sách nhà nước*, 2016, pp. 67–76.

3. L. C. Tuấn *et al.*, “Tình hình sử dụng kháng sinh trong nuôi tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) trên cát ở tỉnh Thừa Thiên Huế,” *Tap chí Khoa học Đại học Huế Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, vol. 130, no. 3D, pp. 131–145, Nov. 2021, doi: 10.26459/hueunijard.v130i3D.6181.

5. N. T. N. Anh, N. T. P. Thảo, V. K. Thoa, and T. T. T. Thủy, “Nghiên cứu các đặc điểm sinh học và phân loại chủng xạ khuẩn TT 8.4 từ đất trồng trọt tại Quốc Oai, Hà Nội.” Khoa Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Mở Hà Nội, 2022.

15. “Thực trạng và giải pháp bảo vệ rừng ngập mặn,” *Báo điện tử Đảng Cộng Sản Việt Nam*, 2021.

18. P. T. Miền and N. V. Khoa, “Sàng lọc vi khuẩn có khả năng kháng khuẩn từ rừng ngập mặn Ninh Ích, Ninh Hòa, Khánh Hòa,” *Vietnam Journal of Marine Science and Technology*, vol. 19, no. 4, pp. 601–610, 2019.

24. N. T. D. Hạnh, H. T. Chinh, Đ. B. Ngân, N. T. T. Thúy, N. N. Ân, and P. T. Việt, “Phân lập và tuyển chọn xạ khuẩn có khả năng sinh các hợp chất có hoạt tính cao,” *J. Sci. Technol. - IUH*, vol. 53, no. 05, Mar. 2022, doi: 10.46242/jstih.v53i05.4187.

42. Đ. T. T. Dương *et al.*, “Tuyển chọn chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng nấm *Fusarium oxysporum* gây bệnh thối củ ở cây hoa Lily,” *Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, vol. 131, no. 10, pp. 73–79, 2021.

#### **Tài liệu tiếng Anh**

4. A. Priyadarshini, S. Singdevsachan, S. Tripathy, Y. Mohanta, J. Patra, and B. Sethi, “Isolation and Identification of Actinomycetes from Mangrove Soil and Extraction of Secondary Metabolites for Antibacterial Activity,” *Br. Biotechnol. J.*, vol. 12, no. 2, pp. 1–13, Jan. 2016, doi: 10.9734/BBJ/2016/24102.

6. C. V. Dilip, S. Mulaje, and R. Mohalkar, “A Review on Actinomycetes and Their Biotechnological Application,” *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, vol. 4, no. 5, pp. 1730–1742, 2013, doi: [http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.4\(5\).1730-42](http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.4(5).1730-42).

7. M. Sharma, P. Dangi, and M. Choudhary, “Actinomycetes: Source, Identification, and Their Applications,” *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, vol. 3, no. 2, pp. 801–832, 2014.

8. J. Bérđy, “Bioactive Microbial Metabolites,” *J. Antibiot. (Tokyo)*, vol. 58, no. 1, pp. 1–26, Jan. 2005, doi: 10.1038/ja.2005.1.

9. E. A. Barka *et al.*, “Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria,” *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 80, no. 1, pp. 1–43, Mar. 2016, doi: 10.1128/MMBR.00019-15.

10. M. S. M. Selim, S. A. Abdelhamid, and S. S. Mohamed, “Secondary metabolites and biodiversity of actinomycetes,” *J. Genet. Eng. Biotechnol.*, vol. 19, no. 1, p. 72, Dec. 2021, doi: 10.1186/s43141-021-00156-9.

11. H. Thatoi, B. Behera, R. Mishra, and S. Dutta, “Biodiversity and biotechnological potential of microorganisms from mangrove ecosystems: A review,” *Ann. Microbiol.*, vol. 63, Mar. 2012, doi: 10.1007/s13213-012-0442-7.

12. D. B. Xu, W. W. Ye, Y. Han, Z. X. Deng, and K. Hong, “Natural products from mangrove actinomycetes,” *Marine Drugs*, vol. 12, no. 5, pp. 2590–2613, 2014, doi: 10.3390/md12052590.

13. A. S. Azman, I. Othman, C. M. Fang, K. G. Chan, B. H. Goh, and L. H. Lee, “Antibacterial, Anticancer and Neuroprotective Activities of Rare Actinobacteria from Mangrove Forest Soils,” *Indian J. Microbiol.*, vol. 57, no. 2, pp. 177–187, 2017, doi: 10.1007/s12088-016-0627-z.

14. G. Chandra *et al.*, “Status and distribution of mangrove forest of the world using earth observation satellite data,” *Glob. Ecol. Biogeogr.*, vol. 20, pp. 154–159, Dec. 2010, doi: 10.1111/j.1466-8238.2010.00584.x.

16. N. B. Trang, P. H. Q. Anh, K. Phommavong, and N. Q. Huy, “Characterization of Actinomyces Strains Isolated from Mangrove Forests in Vietnam,” *VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology*, vol. 32, no. 1S, pp. 391–397, 2016.
17. P. Huan and N. Lan, “A Study of Mangrove Forests in the Khanh Hoa Province of Vietnam,” *Lesn. Zhurnal (Forestry Journal)*, no. 3, pp. 64–72, Jun. 2019, doi: 10.17238/issn0536-1036.2019.3.64.
19. Y. Retnowati, L. Sembiring, S. Moeljopawiro, T. Djohan, S. Endang, and E. Soetarto, “Diversity of antibiotic-producing Actinomycetes in mangrove forest of Torosiaje, Gorontalo, Indonesia,” vol. 18, pp. 1453–1461, Jul. 2017, doi: 10.13057/biodiv/d18032.
20. R. Usha, P. Ananthaselvi, C. K. Venil, and M. Palaniswamy, “Antimicrobial and antiangiogenesis activity of Streptomyces parvulus KUAP106 from mangrove soil.pdf,” *European Journal of Biological Sciences*, vol. 2, no. 4, pp. 77–83, 2010.
21. M. M. Aly, L. A. Bahamdain, S. Abu Aba, R. H. Amasha, N. M. Bataweel, and M. Abu-Zeid, “Isolation and Molecular Identification of Streptomyces griseorubens from Al Saman Region Cave as a Producer of Antibacterial Agent,” *Int. J. Pharm. Phytopharm. Res.*, vol. 10, no. 2, pp. 110–121, 2020.
22. M. Mohseni, H. Norouzi, J. Hamedi, and A. Roohi, “Screening of antibacterial producing actinomycetes from sediments of the caspian sea.,” *Int. J. Mol. Cell. Med.*, vol. 2, no. 2, pp. 64–71, 2013, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24551793%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3920526>.
23. Y. Delbari, Y. Mohassel, E. Kakaei, and Y. Bahrami, “Identification and anti-bacterial property of endophytic actinobacteria from Thymes kotschyanus, Allium hooshidaryae, and Cerasus microcarpa,” *Sci. Rep.*, vol. 13, no. 1, p. 13145, Aug. 2023, doi: 10.1038/s41598-023-40478-x.
25. G. Gebreyohannes, F. Moges, S. Sahile, and N. Raja, “Isolation and characterization of potential antibiotic producing actinomycetes from water and sediments of Lake Tana, Ethiopia,” *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, vol. 3, no. 6, pp. 426–435, Jun. 2013, doi: 10.1016/S2221-1691(13)60092-1.
26. J. McFarland, “The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines,” *Journal of the American Medical Association*, vol. 49, no. 14, pp. 1176–1178, 1907.
27. V. Lorian, “The Need for Surveillance for Antimicrobial Resistance,” *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, vol. 16, no. 11, pp. 638–641, 1995, doi: DOI: 10.2307/30141116.
28. E. B. Shirling and D. Gottlieb, “Methods for characterization of Streptomyces species1,” *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 16, no. 3, pp. 313–340, 1966, doi: <https://doi.org/10.1099/00207713-16-3-313>.
29. H. D. Tresner and E. J. Backus, “System of color wheels for streptomycete taxonomy.,” *Appl. Microbiol.*, vol. 11, no. 4, pp. 335–338, Jul. 1963, doi: 10.1128/am.11.4.335-338.1963.
30. M. Goodfellow *et al.*, *Bergey’s Manual® of Systematic Bacteriology*. New York, NY: Springer New York, 2012.
31. K. Wilson, “Preparation of genomic DNA from bacteria.,” *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, vol. Chapter 2, p. Unit 2.4, Nov. 2001, doi: 10.1002/0471142727.mb0204s56.
32. A. Chumpitaz, J. Caro, W. Cruz, and J. León, “Rhizospheric actinomycetes from organic crops of native potato (Solanum tuberosum): isolation, phenotypic characterization, molecular identification, and impact on biocontrol of Phytophthora infestans (Mont.) de Bary,” *Sci. Agropecu.*, vol. 11, no. 2, pp. 223–231, Jun. 2020, doi: 10.17268/sci.agropecu.2020.02.09.
33. S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman, “Basic local alignment search tool,” *J. Mol. Biol.*, vol. 215, no. 3, pp. 403–410, 1990, doi: [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).

34. M. Hayakawa and H. Nonomura, “Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes,” *J. Ferment. Technol.*, vol. 65, no. 5, pp. 501–509, Jan. 1987, doi: 10.1016/0385-6380(87)90108-7.
35. Y. Ouhdouch, M. Barakate, and C. Finance, “Actinomycetes of Moroccan habitats: Isolation and screening for antifungal activities,” *Eur. J. Soil Biol.*, vol. 37, no. 2, pp. 69–74, Apr. 2001, doi: 10.1016/S1164-5563(01)01069-X.
36. C. R. Kokare, K. R. Mahadik, S. S. Kadam, and B. A. Chopade, “Isolation of bioactive marine actinomycetes from sediments isolated from Goa and Maharashtra coastlines (west coast of India),” *Indian Journal of Marine Sciences*, vol. 33, no. 3, pp. 248–256, 2004.
37. P. Njenga, Mwaura, W. JM, and G. EM, “Methods of Isolating Actinomycetes from the Soils of Menengai Crater in Kenya,” *Arch. Clin. Microbiol.*, vol. 08, no. 03, 2017, doi: 10.4172/1989-8436.100045.
38. V. Dhananjeya, N. Selvan, and K. Dhanapal, “Isolation, Characterization, Screening and Antibiotic Sensitivity of Actinomycetes from Locally (Near MCAS) Collected Soil Samples,” *J. Biol. Sci.*, vol. 10, no. 6, pp. 514–519, Aug. 2010, doi: 10.3923/jbs.2010.514.519.
39. L. Ye, Q. Zhou, C. Liu, X. Luo, G. Na, and T. Xi, “Identification and fermentation optimization of a marine-derived *Streptomyces griseorubens* with anti-tumor activity,” *Indian Journal of Marine Sciences*, vol. 38, no. 1, pp. 14–21, 2009.
40. A. A. Al-Askar, W. M. Abdulkhair, Y. M. Rashad, E. E. Hafez, K. M. Ghoneem, and Z. A. Baka, “*Streptomyces griseorubens* E44G: A Potent Antagonist Isolated from Soil in Saudi Arabia,” *Journal of Pure and Applied Microbiology*, vol. 8, pp. 221–230, 2014.
41. B. Gong, S. Chen, W. Lan, Y. Huang, and X. Zhu, “Antibacterial and Antitumor Potential of Actinomycetes Isolated from Mangrove Soil in the Maowei Sea of the Southern Coast of China,” *Iran. J. Pharm. Res. IJPR*, vol. 17, no. 4, pp. 1339–1346, 2018, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30568692>.