

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN XẠ KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG SINH CÁC HỢP CHẤT CÓ HOẠT TÍNH CAO

NGUYỄN THỊ DIỆU HẠNH¹, HỨA TRƯỜNG CHINH², ĐẶNG BÍCH NGÂN¹, NGUYỄN THỊ THANH THÚY¹, NGUYỄN NGỌC AN¹, PHẠM TẤN VIỆT¹

¹Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp thành phố Hồ Chí Minh

²Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh
phamtanviet@iuh.edu.vn

Tóm tắt: Xạ khuẩn có vai trò quan trọng trong việc sản xuất enzyme ngoại bào và các hợp chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính sinh học cao. Việc tìm kiếm các chủng xạ khuẩn có hoạt tính sinh học nhằm ứng dụng vào các lĩnh vực khác nhau là cần thiết. Trong nghiên cứu này, từ 20 mẫu đất thu nhận ở 2 tỉnh Bến Tre và Long An, 40 chủng xạ khuẩn đã được phân lập và làm thuần. Hơn 50% các chủng xạ khuẩn khảo sát có khả năng sinh tổng hợp ít nhất 1 trong 4 loại enzyme ngoại bào như amylase, cellulase, protease và chitinase. Dịch nuôi cấy của 17 chủng xạ khuẩn thể hiện hoạt tính đối kháng với ít nhất 1 trong 4 chủng vi khuẩn kiểm định: *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* và *Staphylococcus aureus* và 24 chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng ít nhất 1 trong 7 chủng nấm mốc kiểm định: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium equiseti*, *Neoscytalidium dimidiatum*, *Aspergillus* sp., *Aspergillus fumigatus*, *Colletotrichum siamense* và *Penicillium chermesinum*. Hai chủng xạ khuẩn CNXK 3 và CNXK 72 đã được định danh và được xác định lần lượt thuộc chi *Amycolaptosis* và *Streptomyces*. Nghiên cứu này cho thấy tiềm năng ứng dụng xạ khuẩn có hoạt tính sinh học trong sản xuất enzyme công nghiệp, trong các chế phẩm đối kháng với vi khuẩn gây bệnh và kiểm soát nấm bệnh trên cây trồng, góp phần bảo vệ môi trường bền vững và sức khỏe con người.

Từ khóa: Xạ khuẩn, enzyme ngoại bào, kháng khuẩn, kháng mốc, kiểm soát sinh học

ISOLATION AND SELECTION OF ACTINOMYCETES PRODUCING HIGH-BIOACTIVE SUBSTANCES

Abstract: Actinomycetes play an important role in the production of extracellular enzymes and secondary metabolic compounds with high biological activities. A total of 40 actinomycetes strains were isolated from soil samples of Ben Tre and Long An provinces. More than 50% of the actinomycetes strains were determined biosynthesis ability of one of four extracellular enzymes such as amylase, cellulase, protease and chitinase. Culture suspension of seventeen actinomycetes strains showed antagonistic activity against at least 1 of 4 tested bacterial strains such as *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus*. Moreover, 24 actinomycetes strains exhibited antifungal activity against at least 1 of 7 strains of plant pathogenic fungi such as *Fusarium oxysporum*, *Fusarium equiseti*, *Neoscytalidium dimidiatum*, *Aspergillus* sp., *Aspergillus fumigatus*, *Colletotrichum siamense*, and *Penicillium chermesinum*. The two strains CNXK 3 and CNXK 72 were identified to belong to the genus *Amycolaptosis* and *Streptomyces*, respectively. This study showed the potential of the application of metabolites from actinomycetes in industrial enzyme production, in biocontrol of pathogenic bacteria and pathogenic fungi as well as development of sustainable environment.

Keywords: Actinomycetes, extracellular enzyme, antibacterial, antifungal.

1 GIỚI THIỆU

Xạ khuẩn thuộc nhóm vi khuẩn Gram dương, hiếu khí, sống hoại sinh, sinh trưởng và phát triển dưới dạng sợi không có vách ngăn, phân bố rộng rãi ở nhiều loại môi trường sinh thái khác nhau. Trong môi trường đất, xạ khuẩn có vai trò quan trọng trong việc làm màu mỡ thêm cho đất, phân hủy chất thải thành chất mùn, các chất phức tạp thành những chất ở dạng đơn giản. Xạ khuẩn có các đặc tính sinh lý và chuyển hóa đa dạng, có khả năng sinh tổng hợp nhiều loại enzyme ngoại bào như protease, lipase, amylase, cellulase, urease, ... góp phần duy trì và cân bằng hệ sinh thái đất [1], [2]. Trong các nghiên cứu đã công bố, riêng bộ gene của *Streptomyces coelicolor* có khả năng mã hóa một lượng lớn protein ngoại bào bao gồm: 60 loại protease, 13 loại chitinase hoặc chitosanase, 8 loại cellulase hoặc endoglucanase và 3 loại amylase [3].

Enzyme có nguồn gốc từ xạ khuẩn thường hoạt động tốt ở nhiệt độ cao và trong khoảng pH rộng nên được ứng dụng nhiều trong các ngành công nghiệp sản xuất. α -Amylase được sản xuất từ chủng xạ khuẩn *Nocardioopsis* sp. hoạt động tốt nhất ở 70°C và pH=5,0 trong nghiên cứu của Stamford và cộng sự (2001) [4]. Với những tiến bộ của ngành công nghệ sinh học, amylase được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau như hóa học lâm sàng, dược phẩm, phân tích cũng như trong quá trình đường hóa tinh bột, sản xuất bia và chưng cất [5]. Grigorevski de Lima và cộng sự (2005) đã cho thấy cellulase có nguồn gốc từ các chủng xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces* được ứng dụng trong quá trình phân hủy cellulose, hemicellulose, lignin có khả năng chịu nhiệt tốt lên đến 50°C trong 1 giờ [6]. Trong nghiên cứu của D. S. Ningthoujam và cộng sự (2009), protease ngoại bào từ chủng xạ khuẩn *Nocardioopsis prasina* AH-4 hoạt động tốt nhất ở 55°C, pH 7,0-10,0 [7]. Vì vậy, protease có nguồn gốc từ xạ khuẩn có khả năng ứng dụng nhiều trong lĩnh vực thuộc da, dược phẩm, sản xuất chất tẩy rửa sinh học như trong báo cáo của Jeyadharshan và cộng sự (2013) [8]. Trong khi đó, chitinase từ xạ khuẩn *Streptomyces sporovirgulis* cũng được sản xuất trong nghiên cứu của Swiontek Brzezinska (2013) và được xem là tác nhân kiểm soát sinh học hiệu quả [9].

Bên cạnh đó, sự kháng với kháng sinh và sự gia tăng các loại bệnh là mối quan tâm lớn của cộng đồng. Việc sử dụng thuốc bảo vệ thực vật không đúng cách, không đúng liều lượng đã hình thành tính kháng thuốc của mầm bệnh, ảnh hưởng xấu đến môi trường và sức khỏe con người [10]. Do đó, việc nghiên cứu lựa chọn các tác nhân mới từ tự nhiên có khả năng đối kháng với mầm bệnh được ưu tiên hàng đầu. Ngoài khả năng hình thành mối liên hệ cộng sinh với rễ cây thì xạ khuẩn còn kích thích cây sinh trưởng phát triển thông qua việc sản sinh một số hormone tăng trưởng ở thực vật. Sự có mặt của xạ khuẩn đối kháng trong đất làm giảm cơ hội phát triển và khả năng kháng kháng sinh của mầm bệnh nhờ vào các cấu trúc hóa học đa dạng từ các hợp chất chuyển hóa thứ cấp của chúng [11]. Các chất chuyển hóa từ xạ khuẩn có tác dụng kháng khuẩn, kháng nấm, chống oxy hóa, chống ung thư, chống giun sán, chống sốt rét và chống viêm nên xạ khuẩn là loài vi sinh vật luôn được chú trọng trong các nghiên cứu. Vào thời điểm hiện tại, hàng nghìn chất chuyển hóa của xạ khuẩn đã được mô tả, chiếm một phần đáng kể các chất chuyển hóa của vi sinh vật [12], [13]. Vì vậy, nghiên cứu phân lập và sàng lọc xạ khuẩn có hoạt tính sinh học là việc làm cần thiết, hướng đến việc ứng dụng các hợp chất có hoạt tính sinh học có nguồn gốc từ tự nhiên an toàn và hiệu quả.

2 VẬT LIỆU & PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Phân lập xạ khuẩn

Các chủng xạ khuẩn được phân lập từ các mẫu đất thu nhận từ 2 tỉnh Bến Tre và Long An. Các mẫu đất được pha loãng trong nước cất vô trùng, 100 μ l dung dịch đất sau pha loãng được trải đều lên đĩa Petri có chứa môi trường Gause I (tinh bột tan 20,0 g; K_2HPO_4 0,5 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 g; KNO_3 1,0 g; NaCl 0,5 g; $FeSO_4$ 0,01 g; agar 20,0 g; nước cất đủ 1000 ml; pH 7,2-7,4), và ủ ở 37°C trong 5-10 ngày. Quan sát và nhận diện các khuẩn lạc đặc trưng của xạ khuẩn, tiến hành cấy rìa trên môi trường Gause I cho đến khi thu được các chủng xạ khuẩn thuần, không nhiễm tạp vi sinh vật khác [14]. Hình thái vi thể của các chủng xạ khuẩn được kiểm tra sau khi nuôi trên môi trường Gause I trong 5-7 ngày ở 37°C. Cấu trúc cuống sinh bào tử được quan sát trên tiêu bản phòng ẩm bằng kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 1000 lần. Các chủng xạ khuẩn được bảo quản ở 4°C để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

2.2 Đánh giá khả năng sinh tổng hợp enzyme ngoại bào của xạ khuẩn

Khả năng sinh tổng hợp enzyme ngoại bào của các chủng xạ khuẩn được kiểm tra thông qua vòng phân giải cơ chất trên môi trường thạch tương ứng. Môi trường Gause I có chứa 10,0 g tinh bột tan được sử dụng để đánh giá khả năng sinh tổng hợp amylase và thay thế 10,0 g tinh bột tan trong thành phần của môi trường lần lượt thành CMC (carboxymethyl cellulose), casein, chitin với khối lượng tương đương để kiểm tra khả năng sinh tổng hợp cellulase, protease và chitinase. Các chủng xạ khuẩn được nuôi cấy trong môi trường thích hợp ở 37°C trong 7 ngày. Sau thời gian nuôi ủ, vòng phân giải thể hiện hoạt tính amylase, cellulase và chitinase được kiểm tra bằng thuốc thử lugol. Trong khi đó, vòng phân giải casein đặc trưng cho hoạt tính protease được nhận diện bằng dung dịch TCA 10% (trichloroacetic acid). Khả năng sinh tổng hợp enzyme ngoại bào của các chủng xạ khuẩn được xác định bằng cách so sánh độ lớn vòng phân giải cơ chất $D-d = x$ (mm) với D là đường kính vòng phân giải và d là đường kính khuẩn lạc của xạ khuẩn, x là kích thước thực của vòng phân giải cơ chất [15].

2.3 Đánh giá khả năng đối kháng vi khuẩn kiểm định của xạ khuẩn

Các chủng vi khuẩn được sử dụng để xác định hoạt tính kháng khuẩn trong nghiên cứu này gồm 3 chủng gram dương là *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* và 4 chủng gram

âm gồm *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) và *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311). Các chủng này được lưu giữ tại Bộ môn Công nghệ Sinh học, Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp Tp. HCM ở điều kiện -20°C và được hoạt hoá qua đêm trong môi trường Luria-Bertani broth (LB Broth) (Tryptone 10,0 g; cao nấm men 5,0 g; NaCl 10,0 g; nước cất đủ 1000 ml; pH 7,0-7,2) ở 37°C trước khi thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.

Khả năng kháng khuẩn của các chủng xạ khuẩn được thực hiện theo phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường LB Broth đến khi đạt được độ đục là 0,5 theo tiêu chuẩn McFarland. Dịch vi khuẩn (100 μl) được trải trên đĩa môi trường LB agar và đầu tip vô trùng được sử dụng để khoan tạo các giếng thạch có đường kính 8 mm, 100 μl dịch xạ khuẩn sau thời gian nuôi cấy 7 ngày trên môi trường lỏng Gause I được ly tâm loại bỏ tế bào tại 4°C , 13000 rpm trong 15 phút và được thêm vào các giếng thạch. Tiếp theo, các đĩa Petri được để yên ở 4°C trong 2 giờ cho dịch xạ khuẩn khuếch tán đều vào môi trường thạch. Mẫu đối chứng âm được thực hiện với môi trường lỏng Gause I vô trùng. Khả năng kháng khuẩn của các chủng xạ khuẩn đối với vi khuẩn kiểm định được xác định thông qua đường kính vòng vô khuẩn sau 16-18 giờ nuôi ủ ở 37°C [15], [16].

2.4 Đánh giá khả năng đối kháng nấm mốc gây bệnh của xạ khuẩn

Các chủng mốc gây bệnh thực vật như *Fusarium oxysporum*, *Fusarium equiseti*, *Colletotrichum siamense*, *Neoscytalidium dimidiatum*, *Penicillium chermesinum*, *Aspergillus* sp., *Aspergillus fumigatus* được sử dụng trong các thử nghiệm kiểm tra khả năng kháng mốc của các chủng xạ khuẩn. Các chủng này được phân lập, định danh bằng phương pháp sinh học phân tử và lưu giữ tại Bộ môn Công nghệ Sinh học, Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp Tp. HCM. Các chủng nấm mốc được cấy chuyển trên môi trường PGA, ủ 3-5 ngày ở nhiệt độ phòng cho tơ nấm phát triển để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo. Khả năng đối kháng của xạ khuẩn đối với nấm mốc được thực hiện theo phương pháp khuếch tán giếng thạch [17]. Giống nấm mốc kiểm định được cấy điểm trên đĩa Petri chứa môi trường PGA cách mép đĩa 1,0 cm và ủ ở nhiệt độ phòng. Sau 24 giờ, dùng tip vô trùng tạo giếng thạch có đường kính 8 mm trên bề mặt đĩa thạch đã cấy nấm mốc kiểm định, 100 μl dịch xạ khuẩn sau thời gian nuôi cấy 7 ngày trên môi trường Gause I lỏng được nhỏ vào giếng thạch đã khoan và giữ yên trong 2 giờ tại 4°C . Các đĩa được ủ ở nhiệt độ phòng và quan sát khả năng đối kháng sau 3-5 ngày nuôi ủ.

2.5 Định danh xạ khuẩn

Chủng xạ khuẩn thể hiện hoạt tính sinh học nổi trội được tiến hành định danh ở mức phân tử bằng phương pháp giải trình tự đoạn gen 16S-rRNA với cặp mồi 27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' và 1492R 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' và phương trình PCR như sau 95°C - 5 phút, 30 chu kỳ tiếp theo (95°C - 30 giây; 55°C - 40 giây; 72°C - 90 giây) và 72°C - 5 phút bởi công ty Nam Khoa Biotek (793/62 Trần Xuân Hưng, Quận 7, Hồ Chí Minh) và kết quả giải trình tự được so sánh với cơ sở dữ liệu 16S-rRNA của xạ khuẩn có sẵn trên National Center for Biotechnology Information (NCBI) bằng công cụ BLASTN (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Kết quả giải trình tự 2 chiều của vùng trình tự 16S ribosomal RNA được kiểm tra độ chính xác và thiết lập trình tự consensus bằng phần mềm FinchTV và Seaview. Các trình tự được sắp giống bằng phần mềm ClustalX2.1. Cây phả hệ thể hiện mối quan hệ di truyền giữa chủng xạ khuẩn nghiên cứu và các loài khác hiện có trên dữ liệu GenBank được xây dựng bằng phần mềm Mega5.0 theo phương pháp Neighbor Joining.

2.6 Phương pháp thống kê và xử lý số liệu

Giá trị kết quả của các thí nghiệm là trung bình của 3 lần lặp lại. Số liệu được tính toán bằng phần mềm Excel 2013.

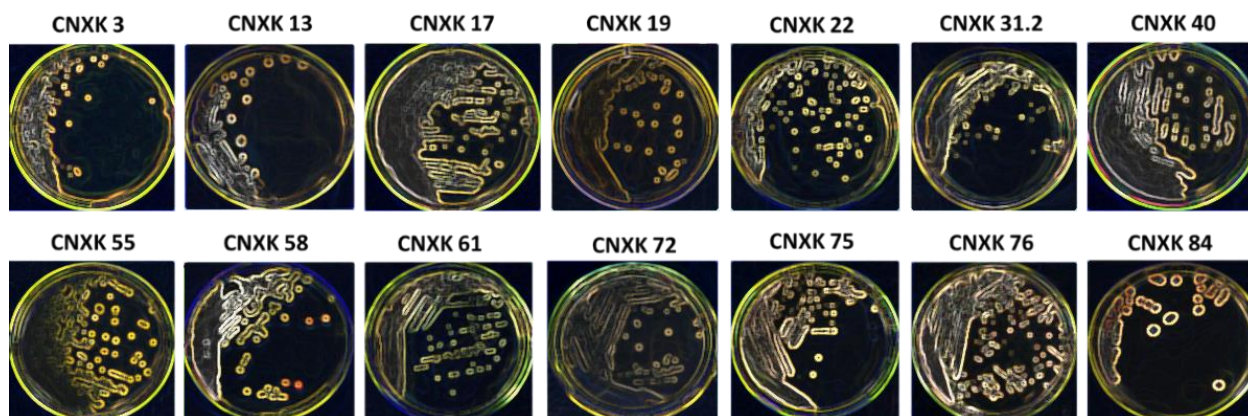
3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Phân lập và thuần khiết các chủng xạ khuẩn

Xạ khuẩn được tìm thấy khắp nơi trên thế giới, chúng phân bố rộng rãi ở cả hệ sinh thái trên cạn và dưới nước, chủ yếu tập trung ở lớp đất mặt, chiếm khoảng 20-40% tổng sinh vật trong đất [1], [18], [19]. Từ nhiều mẫu đất khác nhau, 121 chủng xạ khuẩn đã được phân lập và thuần khiết. Dựa vào sự khác nhau về hình dạng, kích thước khuẩn lạc, màu sắc khuẩn ty và sắc tố khuếch tán trên môi trường thạch nuôi cấy Gause I sau khi ủ 7 ngày ở 37°C , 121 chủng xạ khuẩn được xác định còn 40 chủng xạ khuẩn khác nhau. Các chủng xạ khuẩn được kí hiệu lần lượt là CNXX 1 đến CNXX 121 và được phân thành 5 nhóm khác nhau về màu sắc của khuẩn ty khí sinh dựa trên bảng màu phân loại của Tresner và Buckus [20]. Hình thái đại thể và sự phân nhóm của các chủng xạ khuẩn được thể hiện trong hình 1 và bảng 1.

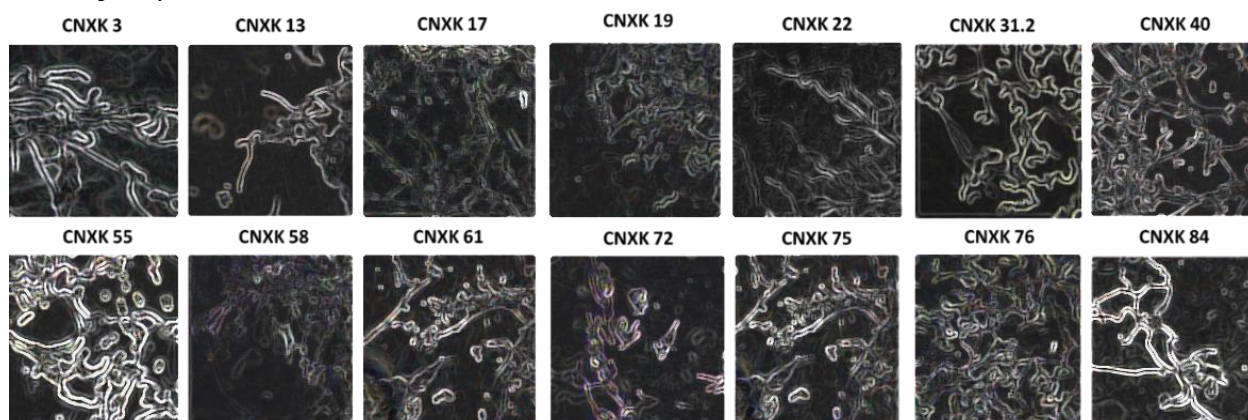
Bảng 1: Sự phân nhóm của các chủng xạ khuẩn phân lập được trên môi trường Gause I dựa trên màu sắc của khuẩn ty khí sinh

Nhóm màu	Số chủng	Tỷ lệ (%)
Xám	14	35,0
Đỏ	5	12,5
Vàng	3	7,5
Xanh lá	1	2,5
Trắng	17	42,5



Hình 1: Hình thái khuẩn lạc của một số chủng xạ khuẩn phân lập được trên môi trường Gause I

Các đặc điểm vi thể được quan sát theo sự mô tả của Hoàng Hải-Dur Ngọc Thành (2008), Nguyễn Lân Dũng và cộng sự (2012) [21], [22]. Hình thái vi thể của các chủng xạ khuẩn được thể hiện trong hình 2. Hình thái vi thể của 40 chủng xạ khuẩn được quan sát trên tiêu bản phòng âm sau 5-7 ngày nuôi ủ dưới kính hiển vi quang học ở độ phóng đại X1000 có các đặc điểm như: khuẩn ty khí sinh phân nhánh mạnh mẽ, không có vách ngăn; cuống sinh bào tử dạng thẳng, lượn uốn cong, xoắn lò xo với số lượng vòng xoắn từ 2-5 vòng, phân bố theo kiểu mọc đơn, mọc đối, mọc vòng hay mọc thành chùm; bào tử tồn tại ở dạng đơn lẻ, mọc thành cụm hoặc bào tử dính lại với nhau tạo thành chuỗi bào tử. Căn cứ vào hình thái vi thể, các chủng xạ khuẩn phân lập được có hình thái cuống sinh bào tử đa dạng và phần lớn là dạng xoắn lò xo đặc trưng của chi *Streptomyces*.



Hình 2. Hình thái vi thể của một số chủng xạ khuẩn khi quan sát bằng kính hiển vi quang học ở độ phóng đại X1000

3.2 Khả năng sinh tổng hợp enzyme ngoại bào của xạ khuẩn

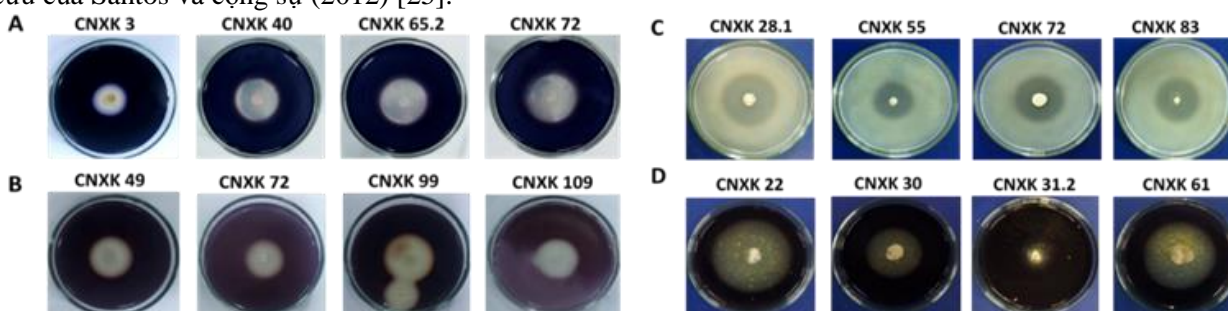
Khả năng sinh tổng hợp enzyme ngoại bào của các chủng xạ khuẩn được xác định dựa trên khả năng phân hủy nguồn cơ chất cảm ứng có trong môi trường nuôi cấy và được nhận biết bằng thuốc thử đặc trưng. Căn cứ vào vòng phân giải cơ chất và đường kính khuẩn lạc, hoạt tính enzyme ngoại bào của các chủng xạ khuẩn được xác định sơ bộ và thể hiện trong bảng 2 hình 3.

Bảng 2. Hoạt tính enzyme ngoại bào của các chủng xạ khuẩn sau 7 ngày nuôi cấy trên môi trường Gause I

Enzyme	Số xạ khuẩn thể hiện khả năng sinh enzyme ngoại bào			
	Mạnh (+++)	Trung bình (++)	Yếu (+)	Không hoạt tính (-)
Amylase	2	11	7	20
Cellulase	1	15	6	18
Protease	3	4	13	20
Chitinase	3	3	15	19

$D-d = x$; $x > 20 \text{ mm}$ (+++); $x = 10-20 \text{ mm}$ (++); $x = 1,0-10 \text{ mm}$ (+); $x < 1,0 \text{ mm}$ (-)

Từ 40 chủng xạ khuẩn phân lập được, 20 chủng được ghi nhận có khả năng sinh tổng hợp amylase ngoại bào. Với kích thước vòng phân giải tinh bột là $26 \pm 2 \text{ mm}$ sau 7 ngày nuôi cấy, chủng xạ khuẩn CNXK 72 được đánh giá là có khả năng sinh tổng hợp amylase ngoại bào cao hơn so với các chủng xạ khuẩn còn lại và được đánh giá có hoạt tính mạnh khi so sánh với chủng xạ khuẩn *Streptomyces albofaciens* NA1 trong nghiên cứu của Lê Thị Hiền (2016) và chủng xạ khuẩn X38 trong nghiên cứu của Ngô Thị Thường Châu (2009), khi kích thước vòng phân giải tinh bột của các chủng xạ khuẩn trong 2 nghiên cứu này lần lượt là 25 và 16,5 mm [18], [23]. Ngoài ra, chủng xạ khuẩn CNXK 72 còn cho thấy khả năng sản sinh amylase ngoại bào cao hơn 8 chủng *Streptomyces* S1-S8 trong nghiên cứu của Sathya Rengasamy và cộng sự (2018) [24], và tương tự như chủng *Streptomyces* sp. SLBA-08 được chọn lọc từ 286 chủng xạ khuẩn trong nghiên cứu của Santos và cộng sự (2012) [25].



Hình 3: Khả năng sinh tổng hợp enzyme ngoại bào của xạ khuẩn trên môi trường có chứa nguồn cơ chất thích hợp. (A) Amylase, (B) Cellulase, (C) Protease, (D) Chitinase

Trên môi trường Gause-CMC, 21 chủng xạ khuẩn được ghi nhận là có khả năng sinh tổng hợp cellulase ngoại bào. Với kích thước vòng phân giải CMC là $22 \pm 1,5 \text{ mm}$, chủng xạ khuẩn CNXK99 có hoạt tính cellulase ngoại bào cao nhất. Khi so sánh khả năng phân giải CMC, 4 chủng xạ khuẩn CNXK49, CNXK72, CNXK99 và CNXK109 cho hoạt tính cellulase tương đương với các chủng xạ khuẩn trong nghiên cứu của Trần Hoàng Dũng và cộng sự (2018) [15] và nghiên cứu của El-Sersy và cộng sự (2010) [26].

Tương tự, trên môi trường Gause-casein, 21 chủng xạ khuẩn có khả năng sinh tổng hợp protease ngoại bào đã được xác định. Với kích thước vòng phân giải casein là $24 \pm 2 \text{ mm}$, chủng xạ khuẩn CNXK28.1 được đánh giá là có khả năng sinh tổng hợp protease ngoại bào tương tự với chủng *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-49 trong nghiên cứu của Naif Abdullah Al-Dhabi và cộng sự (2020) [27] và có hoạt tính cao hơn các chủng xạ khuẩn trong nghiên cứu của Subramani Ramesh và cộng sự (2009) [28].

Trong khi đó, môi trường Gause-chitin được sử dụng để cảm ứng xạ khuẩn sinh tổng hợp chitinase ngoại bào. Sau 7 ngày nuôi cấy, 21 chủng xạ khuẩn được xác định có khả năng sinh chitinase ngoại bào. Với đường kính là $36 \pm 1 \text{ mm}$, chủng xạ khuẩn CNXK22 có kích thước vòng phân giải chitin cao nhất. Khả năng sinh tổng hợp chitinase ngoại bào của chủng CNXK 22 được đánh giá mạnh hơn khi được so sánh với khả năng sinh tổng hợp chitinase của chủng *Streptomyces xylophagus* I2 trong nghiên cứu của Dao Thi Luong [29] và các chủng xạ khuẩn phân lập từ đất trồng rau trong nghiên cứu của Trương Thanh Thảo (2019) [30].

Qua quá trình khảo sát sơ bộ khả năng sinh tổng hợp enzyme ngoại bào của 40 chủng xạ khuẩn CNXK, hơn 50% các chủng xạ khuẩn có khả năng tiết ít nhất 1 trong 4 loại enzyme amylase, cellulase, protease và chitinase. Trong số đó, 4 chủng xạ khuẩn CNXK72, CNXK99, CNXK28.1 và CNXK22 lần lượt cho hoạt

tính phân giải tinh bột, CMC, casein và chitin cao nhất. Các chủng xạ khuẩn có hoạt tính enzyme ngoại bào rất có tiềm năng ứng dụng trong các ngành công nghiệp sản xuất cũng như có hiệu quả trong các ứng dụng xử lý ô nhiễm môi trường do hàm lượng tinh bột, cellulose, protein hoặc chitin quá cao.

3.3 Khả năng đối kháng các chủng vi khuẩn gây bệnh của xạ khuẩn

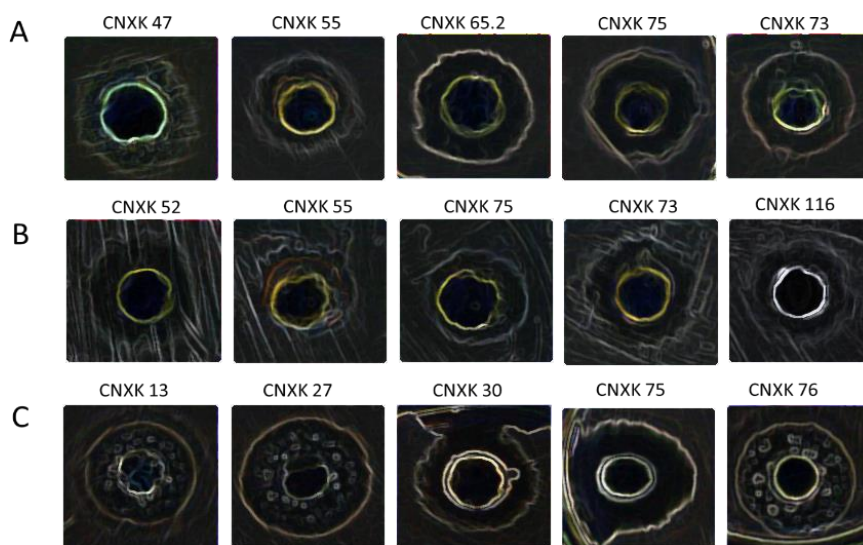
Xạ khuẩn là nhóm vi sinh vật phân bố rộng rãi trong các loại môi trường tự nhiên. Chúng có khả năng sinh tổng hợp các hợp chất có hoạt tính sinh học quan trọng có giá trị thương mại cao và phát triển các tác nhân điều trị mới. Gần 80% kháng sinh trên thế giới có nguồn gốc từ xạ khuẩn, có tầm quan trọng trong y học với các đặc tính kháng khuẩn, kháng u, kháng nấm, kháng virus [16], [31].

Để đánh giá khả năng kháng khuẩn, các chủng xạ khuẩn và vi khuẩn kiểm định (*Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*) được nuôi cấy trên môi trường tương ứng là Gause I broth và LB broth. Hoạt tính kháng khuẩn của xạ khuẩn được kiểm tra bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Kết quả được thể hiện trong bảng 3 và hình 4.

Bảng 3. Khả năng đối kháng các vi khuẩn kiểm định của xạ khuẩn

Vi sinh vật kiểm định	Số xạ khuẩn thể hiện khả năng kháng khuẩn			
	Mạnh (+++)	Trung bình (++)	Yếu (+)	Không hoạt tính (-)
<i>B. subtilis</i>	4	0	1	35
<i>B. cereus</i>	6	1	5	28
<i>S. aureus</i>	0	1	4	35
<i>E. coli</i>	0	0	1	39
<i>S. typhi</i>	0	0	0	40

$D-d = x$; $x > 20 \text{ mm}$ (+++); $x = 10-20 \text{ mm}$ (++); $x = 1,0-10 \text{ mm}$ (+); $x < 1,0 \text{ mm}$ (-)



Hình 4. Khả năng kháng khuẩn kiểm định của xạ khuẩn. (A) *B. subtilis*; (B) *S. aureus* và (C) *B. cereus*

Khi phân tích dữ liệu từ bảng 3 và hình 4, hoạt tính kháng khuẩn của 40 chủng xạ khuẩn khảo sát thể hiện 5 chủng có khả năng đối kháng với *B. subtilis* (CNXK47, CNXK55, CNXK65.2, CNXK73, CNXK75), 12 chủng đối kháng với *B. cereus* (CNXK 09, CNXK13, CNXK27, CNXK30, CNXK 53, CNXK 55, CNXK 67, CNXK75, CNXK76, CNXK 83, CNXK 84), 1 chủng đối kháng với *E. coli* (CNXK52), 5 chủng đối kháng với *S. aureus* với đường kính vòng vô khuẩn từ 8-23 mm (CNXK52, CNXK 55, CNXK73, CNXK75, CNXK116) và không có chủng xạ khuẩn nào có khả năng đối kháng với *S. typhi*. Khả năng đối kháng của các chủng xạ khuẩn đối với các vi sinh vật gây bệnh cũng được kiểm tra trong nhiều nghiên cứu, M. Arifuzzaman và cộng sự (2010) đã cho thấy nhiều chủng xạ khuẩn được phân lập từ vùng đất Sundabans có khả năng đối kháng với các chủng vi khuẩn Gram âm gây bệnh như *Shigella boydii*, *Pseudomonas*, *Vibrio cholerae*-0139, *Plesiomonas*, *Hafnia* spp., *Escherichia coli*-186LT [32]. Năm 2010, Narendra Kumar và

cộng sự đã kiểm tra hoạt tính đối kháng *Staphylococcus aureus* của 177 chủng xạ khuẩn được phân lập từ vùng đất nhiễm kiềm và đất vườn, 15 chủng xạ khuẩn có hoạt tính đã được ghi nhận [33]. Khả năng đối kháng của xạ khuẩn CNXK lên các chủng vi khuẩn kiểm định thể hiện tương đương như trong các nghiên cứu trên. Do đó, các chủng xạ khuẩn CNXK cho thấy tiềm năng ứng dụng trong việc sản xuất các hợp chất chuyển hóa thứ cấp có nguồn gốc tự nhiên để ứng dụng trong các lĩnh vực khác nhau, đặc biệt là y tế.

3.4 Khả năng đối kháng các chủng nấm mốc gây bệnh của xạ khuẩn

Nấm gây bệnh trên cây trồng gây thiệt hại đáng kể đối với nền nông nghiệp trên toàn thế giới. Việc sử dụng quá nhiều thuốc diệt nấm có bản chất hóa học trong nông nghiệp đã ảnh hưởng đến sức khỏe con người, ô nhiễm môi trường và hình thành khả năng kháng thuốc của mầm bệnh. Vì vậy, việc sử dụng các hợp chất đối kháng có nguồn gốc từ tự nhiên là một phương pháp thay thế hiệu quả. Các hợp chất đối kháng có nguồn gốc từ vi sinh vật được sử dụng rộng rãi để kiểm soát nấm gây bệnh trên cây trồng và được chứng minh làm giảm thiểu đến mức tối đa các tác dụng phụ. Xạ khuẩn được xem là sinh vật có khả năng sinh tổng hợp nhiều hợp chất chuyển hóa thứ cấp có phổ kháng khá rộng đối với nấm bệnh [34], [35]. *Streptomyces xiamenensis* S257, *Streptomyces viriabilis* S28, *Streptomyces iakyrus* S233 trong nghiên cứu của Nguyễn Thị Phong Lan và cộng sự cho thấy tiềm năng đối kháng với nấm gây bệnh đạo ôn ở lúa thông qua những cơ chế cạnh tranh về chất dinh dưỡng, tạo kháng sinh, tiết enzyme ngoại bào (2015) [36].

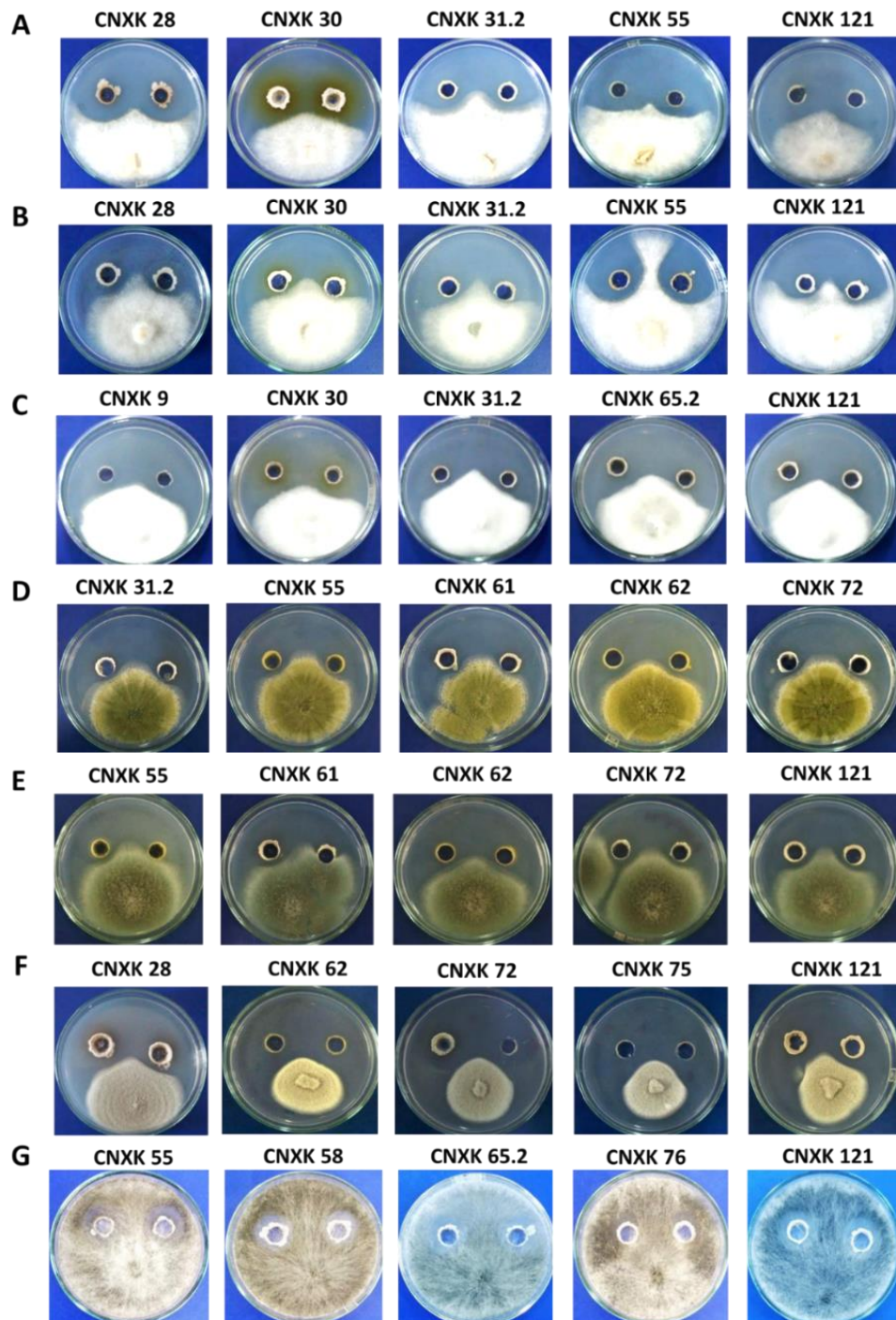
Để kiểm tra khả năng đối kháng của xạ khuẩn với nấm mốc gây bệnh, thí nghiệm được thực hiện bằng cách thu dịch nuôi cấy xạ khuẩn và kiểm tra hoạt tính đối kháng của với 7 chủng nấm mốc gây bệnh trên thực vật như *Fusarium oxysporum*, *Fusarium equiseti*, *Neoscytalidium dimidiatum*, *Aspergillus* sp., *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium chermesinum*, *Colletotrichum simense*. Kết quả được thể hiện trong bảng 4 và hình 5.

Bảng 4. Bảng tổng hợp khả năng đối kháng nấm mốc gây bệnh của dịch nuôi cấy xạ khuẩn

Vi sinh vật kiểm định	Số xạ khuẩn thể hiện khả năng kháng mốc			
	Mạnh (+++)	Trung bình (++)	Yếu (+)	Không hoạt tính (-)
<i>F. oxysporum</i>	4	4	7	25
<i>F. equiseti</i>	1	0	6	33
<i>C. siamense</i>	2	3	3	32
<i>N. dimidiatum</i>	0	2	10	28
<i>P. chermesinum</i>	0	3	6	31
<i>Aspergillus</i> sp.	0	0	9	31
<i>A. fumigatus</i>	0	0	5	35

$D-d = x$; $x > 20 \text{ mm}$ (+++); $x = 10-20 \text{ mm}$ (++) ; $x = 1,0-10 \text{ mm}$ (+); $x < 1,0 \text{ mm}$ (-)

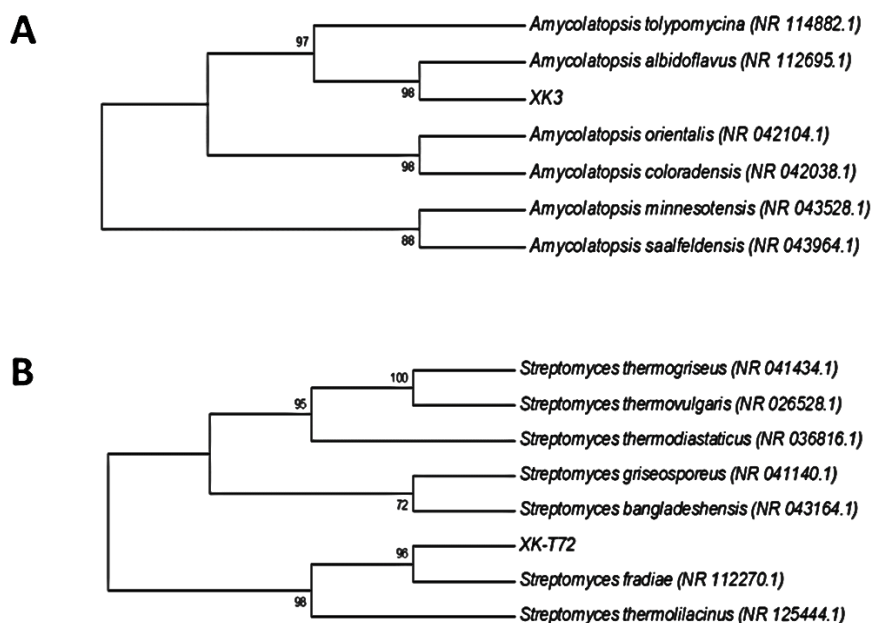
Kết quả kiểm tra khả năng đối kháng trên các loại nấm mốc gây bệnh, chủng xạ khuẩn CNXK121 có khả năng đối kháng với cả 7 loại nấm mốc kiểm định, thể hiện tiềm năng ứng dụng trong thực tiễn để ngăn ngừa và kiểm soát các bệnh nhiễm nấm thường gặp trên cây trồng. 24/40 chủng xạ khuẩn thể hiện hoạt tính đối kháng với ít nhất 1 trong 7 chủng nấm mốc kiểm định với đường kính vòng kháng nấm mốc 8-22 mm. Khả năng đối kháng với nấm mốc của các chủng xạ khuẩn cũng được ghi nhận trong nhiều nghiên cứu khác nhau. Trong nghiên cứu của Sutthinan Khamna và cộng sự (2009), 23/455 chủng xạ khuẩn được phân lập từ vùng đất xung quanh rễ của cây dược liệu có khả năng đối kháng với các loại nấm gây bệnh như *Alternaria brassicicola*, *Collectotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium digitatum* và *Sclerotium rolfsii* [31]. Năm 2010, A. Kavitha và cộng sự đã kiểm tra khả năng kháng mốc của 4 chủng xạ khuẩn A1, A2, A3 và A4 được phân lập từ các mẫu đất đá ong vùng Guntur và cho thấy khả năng đối kháng với *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans* và *Fusarium oxysporum* [37]. Như vậy, với khả năng đối kháng của các chủng xạ khuẩn CNXK với 7 chủng nấm mốc gây bệnh thường thấy trên thực vật, các chủng xạ khuẩn CNXK cho thấy tiềm năng ứng dụng trong sản xuất các hợp chất kháng mốc hoặc các chế phẩm vi sinh trong việc phòng và điều trị nấm bệnh trên cây trồng.



Hình 5. Khả năng kháng nấm mốc kiểm định của dịch nuôi cấy xạ khuẩn. (A) *F. oxysporum*; (B) *F. equiseti*; (C) *C. siamense*; (D) *Aspergillus* sp.; (E) *A. fumigatus*; (F) *P. chermesinum*; (G) *N. dimidiatum*

3.5 Định danh xạ khuẩn

Một phần trình tự đoạn gen mã hóa cho 16S-rRNA (900 bp) của xạ khuẩn CNXK3 (có khả năng sinh tổng hợp amylase) và chủng xạ khuẩn CNXK 72 (thể hiện khả năng sinh tổng hợp cellulose và khả năng kháng mốc) được kiểm tra với trình tự mỗi như trên và so sánh với ngân hàng dữ liệu trên NCBI. Kết quả cho thấy gen mã hóa cho 16S-rRNA của chủng CNXK 3 và CNXK 72 có sự tương đồng lần lượt với các chủng xạ khuẩn thuộc chi *Amycolaptosis* và *Streptomyces*. Dựa trên các kết quả thu được, cây phả hệ của chủng xạ khuẩn CNXK 3 và CNXK 72 với các loài gần được xây dựng và được xác định chủng xạ khuẩn CNXK 3 thuộc chi *Amycolaptosis* và CNXK 72 thuộc chi *Streptomyces* (hình 6).



Hình 6. Cây phả hệ thể hiện mối quan hệ di truyền (vùng vùng trình tự 16S ribosomal RNA) giữa chủng xạ khuẩn CNXK3 (A) và CNXK72 (B) và các taxa từ dữ liệu NCBI, được xây dựng bằng phần mềm Mega5.0 theo phương pháp Neighbor Joining với bootstrap 1000 lần lặp lại được giữ lại.

4 KẾT LUẬN

Xạ khuẩn có khả năng sinh tổng hợp đa dạng các loại enzyme ngoại bào và các hợp chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính sinh học cao. Từ các mẫu đất thu nhận được ở 2 tỉnh Bến Tre và Long An, 40 chủng xạ khuẩn đã được phân lập và làm thuần. Trong đó, 4 chủng xạ khuẩn CNXK72, CNXK99, CNXK28.1 và CNXK22 có khả năng sinh tổng hợp 4 loại enzyme lần lượt là amylase, cellulase, protease và chitinase với vòng phân giải cao (> 25mm). Dịch môi trường nuôi cấy của 17 chủng xạ khuẩn thể hiện hoạt tính đối kháng ít nhất 1 trong 4 chủng vi khuẩn kiểm định và 24 chủng xạ khuẩn thể hiện hoạt tính đối kháng với ít nhất 1 trong 7 chủng nấm mốc kiểm định với kích thước đường kính vòng kháng khuẩn và kháng mốc từ 8 đến 23 mm. Các chủng xạ khuẩn có hoạt tính sinh học sẽ được định danh và thử nghiệm tạo chế phẩm sinh học sản sinh enzyme hoặc đối kháng vi sinh vật, thể hiện khả năng ứng dụng vào các ngành công nghiệp sản xuất, đóng vai trò như các tác nhân điều trị mới có nguồn gốc từ tự nhiên, ứng dụng trong ngành y tế cũng như là tác nhân kiểm soát sinh học trong phòng ngừa và quản lý nấm bệnh trên cây trồng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] M. Sharma, P. Dangi, and M. Choudhary, "Actinomycetes: Source, Identification, and Their Applications", *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.*, vol. 3, no. 2, pp. 801–832, 2019.
- [2] R. Jog, G. Nareshkumar, and S. Rajkumar, "Plant growth promoting potential and soil enzyme production of the most abundant Streptomyces spp. from wheat rhizosphere", *J. Appl. Microbiol.*, vol. 113, no. 5, pp. 1154–1164, 2012, doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05417.x.
- [3] R. E. de Lima Procópio, I. R. da Silva, M. K. Martins, J. L. de Azevedo, and J. M. de Araújo, "Antibiotics produced by Streptomyces", *Brazilian J. Infect. Dis.*, vol. 16, no. 5, pp. 466–471, 2012, doi: 10.1016/j.bjid.2012.08.014.
- [4] T. L. M. Stamford, N. P. Stamford, L. C. B. B. Coelho, and J. M. Araújo, "Production and characterization of a thermostable α -amylase from *Nocardiopsis* sp. endophyte of yam bean," *Bioresour. Technol.*, vol. 76, no. 2, pp. 137–141, 2001, doi: 10.1016/S0960-8524(00)00089-4.

- [5] A. De Schrijver and R. De Mot, “Degradation of pesticides by actinomycetes”, *Crit. Rev. Microbiol.*, vol. 25, no. 2, pp. 85–119, 1999, doi: 10.1080/10408419991299194.
- [6] A. L. Grigorevski De Lima, R. Pires Do Nascimento, E. P. Da Silva Bon, and R. R. R. Coelho, “*Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-industrial by-products and its potential use in the detergent and textile industries”, *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 37, no. 2, pp. 272–277, 2005, doi: 10.1016/j.enzmictec.2005.03.016.
- [7] D. S. Ningthoujam, P. Kshetri, S. Sanasam, and S. Nimaichand, “Screening, Identification of Best Producers and Optimization of Extracellular Proteases from Moderately Halophilic Alkalithermotolerant Indigenous Actinomycetes”, *World Appl. Sci. J.*, vol. 7, no. 7, pp. 907–916, 2009.
- [8] V. N. Jeyadharshan, “Production and Partial Purification of Protease by Actinomyces Species”, *Int. J. Sci. Res. Publ.*, vol. 3, no. 1, pp. 2250–3153, 2013, [Online]. Available: www.ijsrp.org.
- [9] M. Swiontek Brzezinska, U. Jankiewicz, and K. Lisiecki, “Optimization of cultural conditions for the production of antifungal chitinase by *Streptomyces sporovirgulis*”, *Appl. Biochem. Microbiol.*, vol. 49, no. 2, pp. 154–159, 2013, doi: 10.1134/S0003683813020014.
- [10] S. H. Son, Z. Khan, S. G. Kim, and Y. H. Kim, “Plant growth-promoting rhizobacteria, *Paenibacillus polymyxa* and *Paenibacillus lentimorbus* suppress disease complex caused by root-knot nematode and fusarium wilt fungus”, *J. Appl. Microbiol.*, vol. 107, no. 2, pp. 524–532, 2009, doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04238.x.
- [11] G. L. Cai, C. L. Wei, Y. Q. Ji, M. W. Hui, T. Liu, and W. L. De, “Identification of an antifungal metabolite produced by a potential biocontrol actinomycetes strain A01”, *Brazilian J. Microbiol.*, vol. 39, no. 4, pp. 701–707, 2008, doi: 10.1590/S1517-83822008000400020.
- [12] E. Busti, P. Monciardini, L. Cavaletti, R. Bamonte, A. Lazzarini, M. Sosio, and S. Donadio, “Antibiotic-producing ability by representatives of a newly discovered lineage of actinomycetes”, *Microbiology*, vol. 152, no. 3, pp. 675–683, 2006, doi: 10.1099/mic.0.28335-0.
- [13] H. S. Chaudhary, B. Soni, A. R. Shrivastava, and S. Shrivastava, “Diversity and versatility of actinomycetes and its role in antibiotic production”, *J. Appl. Pharm. Sci.*, vol. 3, no. 8 SUPPL, 2013, doi: 10.7324/JAPS.2013.38.S14.
- [14] L. D. Sette, V. M. De Oliveira, and G. P. Manfio, “Isolation and characterization ofalachlor-degrading actinomycetes from soil,” vol. 87, no. 2, pp. 81–89, 2005, doi: 10.1007/s10482-004-1129-2.
- [15] Michael J. Leboffe and Burton E. Pierce, “Microbiology: laboratory theory and application-third edition”. Englewood, CO: Morton publishing, 2010.
- [16] A. Pandey, I. Ali, K. S. Butola, T. Chatterji, and V. Singh, “Isolation and characterization of actinomycetes from soil and evaluation of antibacterial activities of actinomycetes against pathogens”, *Int. J. Appl. Biol. Pharm. Technol.*, vol. 2, no. 4, pp. 384–392, 2011.
- [17] J. Yu, Q. Liu, C. Chen, and X. Qi, “Antifungal activity change of *Streptomyces rimosus* MY02 mediated by confront culture with other microorganism”, *J. Basic Microbiol.*, vol. 57, no. 3, pp. 276–282, 2017, doi: 10.1002/jobm.201600498.
- [18] Lê Thị Hiền, Đinh Văn Lợi, Vũ Thị Vân, Nguyễn Văn Giang, “Phân lập và tuyển chọn các chủng xạ khuẩn (*Streptomyces* spp.) đối kháng nấm bệnh cây”, *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, tập 12, số 5, trang 656–664, 2014.
- [19] M. R. Aghamirian and S. A. Ghiasian, “Isolation and Characterization of Medically Important Aerobic Actinomycetes in Soil of Iran (2006 - 2007)”, *Open Microbiol. J.*, vol. 3, no. 1, pp. 53–57, 2009, doi:

- 10.2174/1874285800903010053.
- [20] H. D. Tresner and E. J. Backus, “System of color wheels for streptomycete taxonomy”, *Appl. Microbiol.*, vol. 11, pp. 335–338, 1963, doi: 10.1128/aem.11.4.335-338.1963.
- [21] Hoàng Hải, Dư Ngọc Thành, “Vi sinh vật đại cương”, Nhà xuất bản Nông nghiệp Hà Nội, trang 32–39, 2008.
- [22] Nguyễn Lâm Dũng, Phạm Văn Ty, Dương Văn Hợp, Nguyễn Liên Hoa, Đinh Thúy Hằng, Đào Thị Lương, Nguyễn Thị Hoài Hà, Lê Hoàng Yến, Nguyễn Kim Nữ Thảo, Nguyễn Văn Bắc, Hoàng Văn Minh, “Vi sinh vật học”, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật Hà nội, 2012.
- [23] Ngô Thị Tường Châu, Phạm Thị Ngọc Lan, Phan Thị Thảo Ly, Lê Văn Thiện, Nguyễn Ngân Hà, “Phân lập, tuyển chọn và sử dụng vi sinh vật ưa nhiệt trong phân hủy sinh khối bùn thải nhà máy tinh bột sắn FOCOCEV Thừa Thiên Huế”, *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN Các Khoa học Trái đất và Môi trường*, tập 32, số 1S (2016), trang 31–37, 2016.
- [24] S. Rengasamy and U. Thangaprakasam, “Isolation, Screening and Determination of A-Amylase Activity From Marine Streptomyces Species,” *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, vol. 10, no. 4, p. 122, 2018, doi: 10.22159/ijpps.2018v10i4.24447.
- [25] É. R. dos Santos, Z. N. S. Teles, N. M. Campos, D. A. J. de Souza, A. S. da R. Bispo, and R. P. do Nascimento, “Production of α -amylase from *Streptomyces* sp. SLBA-08 strain using agro-industrial by-products,” *Brazilian Arch. Biol. Technol.*, vol. 55, no. 5, pp. 793–800, 2012, doi: 10.1590/S1516-89132012000500020.
- [26] N. A. El-Sersy, H. Abd-Elnaby, G. M. Abou-Elela, H. A. H. Ibrahim, and N. M. K. El-Toukhy, “Optimization, economization and characterization of cellulase produced by marine *Streptomyces ruber*”, *African J. Biotechnol.*, vol. 9, no. 38, pp. 6355–6364, 2010, doi: 10.5897/AJB10.677.
- [27] N. A. Al-Dhabi, G. A. Esmail, A. K. M. Ghilan, and M. V. Arasu, “Isolation and screening of *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-49 from the environment of Saudi Arabia with concomitant production of lipase and protease in submerged fermentation”, *Saudi J. Biol. Sci.*, vol. 27, no. 1, pp. 474–479, 2020, doi: 10.1016/j.sjbs.2019.11.011.
- [28] S. Ramesh, M. Rajesh, and N. Mathivanan, “Characterization of a thermostable alkaline protease produced by marine *Streptomyces fungicidicus* MML1614”, *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 32, no. 6, pp. 791–800, 2009, doi: 10.1007/s00449-009-0305-1.
- [29] D. T. Luong, N. A. Tuan, N. T. Van, L. T. H. Yen, M. F. Jaspar-Versali, J. Dommes, and D. V. Hop, “Study in an Actinomycetes Producing Chitinase and Chitin Deacetylase”, pp. 439–448.
- [30] Trương Thanh Thảo, Nguyễn Thị Thu Nga, Võ Quốc Cảnh, “Phân lập và tuyển chọn những chủng xạ khuẩn triển vọng đối kháng với tuyến trùng *Pratylenchus* sp. trong điều kiện phòng thí nghiệm”, *Can Tho Univ. J. Sci.*, vol. 55, no. 2B, p. 19, 2019, doi: 10.22144/ctu.jvn.2019.044.
- [31] J. Solecka, J. Zajko, M. Postek, and A. Rajnisz, “Biologically active secondary metabolites from Actinomycetes”, *Cent. Eur. J. Biol.*, vol. 7, no. 3, pp. 373–390, 2012, doi: 10.2478/s11535-012-0036-1.
- [32] M. Arifuzzaman, M. R. Khatun, and H. Rahman, “Isolation and screening of actinomycetes from Sundarbans soil for antibacterial activity”, *African J. Biotechnol.*, vol. 9, no. 29, pp. 4615–4619, 2010, doi: 10.5897/AJB10.339.
- [33] N. Kumar, R. K. Singh, S. K. Mishra, A. K. Singh, and U. C. Pachouri, “Isolation and screening of soil Actinomycetes as source of antibiotics active against bacteria”, *Int. J. Microbiol. Res.*, vol. 2, no. 2, pp. 12–16, 2010, doi: 10.9735/0975-5276.2.2.12-16.
- [34] K. Kathiresan, R. Balagurunathan, and M. M. Selvam, “Fungicidal activity of marine actinomycetes against

- phytopathogenic fungi”, vol. 4, no. April, pp. 271–276, 2005.
- [35] H. Sharma and L. Parihar, “Antifungal activity of extracts obtained from actinomycetes”, *J. Yeast Fungal Res.*, vol. 1, no. 10, pp. 197–200, 2010.
- [36] Nguyễn Thị Phong Lan, Võ Thị Thu Ngân, Trần Phước Lộc, Trần Hà Anh, “Tuyển chọn các chủng xạ khuẩn (*Streptomyces* spp.) đối kháng nấm *Pyricularia grisea* gây bệnh đạo ôn hại lúa”, *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, tập 13, số 8, trang 1442–1451, 2015.
- [37] A. Kavitha, M. Vijayalakshmi, P. Sudhakar, and G. Narasimha, “Screening of actinomycetes strains for the production of antifungal metabolites”, *African J. Microbiol. Res.*, vol. 4, no. 1, pp. 027–032, 2010.

Ngày nhận bài: 11/08/2020

Ngày chấp nhận đăng: 06/04/2021