

## Screening of mangrove - derived bacteria from Ninh Ich, Ninh Hoa, Khanh Hoa for antimicrobial producers

Pham Thi Mien\*, Nguyen Van Khoa

*Institute of Oceanography, VAST, Vietnam*

\*E-mail: [mien.pham@gmail.com](mailto:mien.pham@gmail.com)

Received: 24 December 2018; Accepted: 30 June 2019

©2019 Vietnam Academy of Science and Technology (VAST)

### Abstract

In the context of global climate changes, mangroves are not only considered as an important ecological region but also as a source of exploitation of specific biological objects for researches and applications. In this study, mangrove-derived bacteria were isolated and screened for antimicrobial producers. Also, the strains with potential antibacterial activity were identified by 16S rRNA gene analysis. Results showed that 43% of 21 strains possessed antibacterial activity. The strain R10 showed inhibition against all four indicator bacteria and was identified as *Bacillus pumilus* with the highest sequence similarity of 100% to *Bacillus pumilus* NCTC10337 (GenBank accession number LT906438.1). The strain R7 inhibited *Serratia marcescens* causing severe “white spot” disease in reef building coral *Acropora palmata* and was closely related to *Bacillus toyonensis* BCT 7112 (GenBank accession number NR121761.1) with 99% sequence similarity. The strain R3 was the strongest strain against *Bacillus subtilis* compared with other strains which revealed the same antimicrobial activity pattern. The strain R3 was affiliated with *Bacillus marisflavi* TF-11 (GenBank accession number NR025240.1) with 98% sequence similarity and may be considered to represent new species. Moreover, the strain R9 inhibited only Gram negative tested strain and this strain was considered as a potential candidate for further search of antibiotics with spectrum of Gram negative bacteria.

**Keywords:** Mangrove - derived bacteria, *Bacillus* sp., antimicrobial activity.

## Sàng lọc vi khuẩn phân lập từ rừng ngập mặn có khả năng kháng khuẩn

Phạm Thị Miên\*, Nguyễn Văn Khoa

Viện Hải dương học, Viện Hàn lâm khoa học và công nghệ Việt Nam, Việt Nam

\*E-mail: mien.pham@gmail.com

Nhận bài: 24-12-2018; Chấp nhận đăng: 30-6-2019

### Tóm tắt

Trong bối cảnh biến đổi khí hậu toàn cầu, rừng ngập mặn không chỉ là một vùng sinh thái quan trọng mà còn là nguồn khai thác các đối tượng sinh vật đặc thù nhằm nghiên cứu, áp dụng để phục vụ nhiều lĩnh vực nông nghiệp thủy sản và công nghiệp. Trong nghiên cứu này, vi khuẩn rừng ngập mặn được phân lập, tách chiết và thử nghiệm khả năng kháng khuẩn, chủng tiềm năng được định danh bằng 16S rRNA. Kết quả cho thấy có 9/21 chủng vi khuẩn có hoạt tính kháng khuẩn. Chủng R10 kháng cả 4 vi khuẩn kiểm định và được xác định là *Bacillus pumilus* với mức độ tương đồng về trình tự gen 16S rRNA cao nhất là 100% với *Bacillus pumilus* NCTC10337 (GenBank No. LT906438.1). Chủng R7 chỉ kháng *Serratia marcescens* - gây bệnh đốm trắng nghiêm trọng ở san hô tạo rạn, có mức độ tương đồng về trình tự gen 16S rRNA cao nhất 99% đối với vi khuẩn *Bacillus toyonensis* BCT 7112 (GenBank No. NR121761.1). Vi khuẩn R3 kháng lại *Bacillus subtilis* mạnh nhất so với những chủng có cùng kiểu kháng khuẩn. Chủng R3 có mức độ tương đồng về trình tự gen 16S rRNA cao nhất là 98% đối với chủng *Bacillus marisflavi* TF-11 (GenBank No. NR025240.1) và do đó có thể là loài mới, cần nghiên cứu thêm để khẳng định. Ngoài ra, chủng R9 chỉ kháng vi khuẩn Gram âm mà không kháng vi khuẩn Gram dương, được xem xét như một chủng tiềm năng nhằm nghiên cứu tìm kiếm chất kháng sinh với phổ kháng khuẩn Gram âm trong tương lai.

**Từ khóa:** Vi khuẩn từ rừng ngập mặn, *Bacillus* sp., hoạt động kháng khuẩn.

### MỞ ĐẦU

Theo ước tính gần đây nhất của Jusoff (2013) [1], hiện tại diện tích đầm ngập mặn chiếm khoảng 181.000 km<sup>2</sup> hoặc bao phủ khoảng 75% diện tích đới ven bờ ở vùng biển nhiệt đới và cận nhiệt đới của thế giới [2]. Từ năm 1988, Alongi công bố rằng ở rừng ngập mặn nhiệt đới, 91% tổng sinh khối vi sinh vật là vi khuẩn và nấm, 7% khác là tảo, và 2% là nguyên sinh bào khác [3]. Do rừng ngập mặn luôn có những đặc tính đặc thù riêng theo vùng địa lý như độ mặn, nhiệt độ, áp suất, bức xạ nhiệt, chính vì thế vi sinh vật sống ở những vùng rừng ngập mặn ở những vùng địa lý khác nhau thì cũng có những đặc điểm sinh lý sinh hóa khác nhau kể cả khi so sánh cùng đơn vị

loài [4]. Sự đa dạng vi khuẩn cổ và vi khuẩn rừng ngập mặn được nghiên cứu đầu tiên bằng phương pháp sinh học phân tử công bố bởi Yan et al., (2006) [5] và Liang et al., (2007) [6]. Hệ sinh thái rừng ngập mặn đang trở thành điểm nóng cho việc khảo sát sinh học và khám phá sản phẩm tự nhiên. Các loài xạ khuẩn rừng ngập mặn khác nhau đang được xem như là nguồn tài nguyên đầy hứa hẹn và hiệu quả cần được khám phá. Tính đến năm 2013, đã có 73 chất mới và 49 chất đã biết được phân lập từ các loài xạ khuẩn rừng ngập mặn. Chúng bao gồm alkaloids, các chất dẫn xuất benzen, dẫn xuất cyclopentenone, dilactones, macrolides, 2-pyranones và sesquiterpenes. Nhiều hợp chất đã được kiểm nghiệm và chứng minh là thuốc

kháng sinh tiềm năng mới, thuốc chống uốn ván và kháng virus, các chất chống đông máu và các chất chống oxy hoá. Hơn nữa, một số con đường sinh tổng hợp của chúng cũng đã được khám phá và công bố bởi Xu et al., [7]. Vi khuẩn rừng ngập mặn là nguồn của các chất có hoạt tính sinh học mang đặc điểm của hệ sinh thái rừng ngập mặn hoàn toàn khác với những đặc điểm của hệ sinh thái trên cạn, một số nghiên cứu tiêu biểu đã công bố tìm được các chất mới, có hoạt tính sinh học quan trọng như chất xiamycin có khả năng chống virus HIV [8] chất chống ung thư vú dòng tế bào MDA-MB-231 đồng thời có hoạt tính kháng khuẩn [9]. Nấm *Aspergillus flavipes* cộng sinh với cây rừng ngập mặn có khả năng sinh chất kháng sinh flavipenes, chất này ở liều lượng thấp đã có khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh *Staphylococcus aureus* (8,0 µg/ml) và vi khuẩn *Bacillus subtilis* (0,25 µg/ml), hơn thế chất kháng sinh này còn có khả năng chống lại hỗn hợp đa chủng dưới loài *S. aureus* trong một khối kết dính được gọi là biofilm bằng cơ thể thấm qua màng biofilm và tiêu diệt các chủng dưới loài bao bọc bên trong biofilm. Đây là một phát hiện vô cùng quan trọng trong thời điểm hiện tại vì hệ vi khuẩn trong một biofilm của những vi khuẩn gây bệnh, đặc biệt với *S. aureus* là chủng gây bệnh nhiễm trùng máu, vì thực sự chúng có nhiều biến đổi về gen và đa số là kháng thuốc kháng sinh hiện hành [10]. Một nghiên cứu khác tìm kiếm vi sinh vật từ rừng ngập mặn cho mục đích tìm kiếm các chủng có khả năng sinh kháng sinh cho thấy có đến 26,38% của 144 chủng có hoạt tính hai chủng đang được nghiên cứu tiếp theo để tìm kiếm các enzyme phân hủy cellulose, sinh enzyme protease, amylase nhằm tạo ra sản phẩm sinh học ứng dụng trong nông nghiệp và thủy sản [11]. Chất chiết từ nấm *Trichoderma* có nguồn gốc từ rừng ngập mặn Pichavaram (Ấn Độ) chống lại vi khuẩn gây bệnh cho người và cho cá [12]. Một số nghiên cứu tìm kiếm vi khuẩn rừng ngập mặn sinh chất kháng sinh cũng được thực hiện tại Việt Nam. Điển hình là công trình phân lập được 55 chủng xạ khuẩn khác nhau từ rừng ngập mặn Cần Giờ, trong đó chủng F46 có khả năng kháng nấm *Fusarium* sp. mạnh [13]. Xạ khuẩn *Streptomyces* sp. QN63 được phân lập từ trầm

tích rừng ngập mặn tại Yên Hưng Quảng Ninh được xác định là một chủng có khả năng chịu nhiệt, sinh chất kháng sinh kháng phổ rộng, đáng kể là chất kháng sinh từ chủng xạ khuẩn này có khả năng kháng mạnh vi khuẩn *Staphylococcus aureus* nhờn thuốc kháng sinh [14]. Rừng ngập mặn khu vực Ninh Hòa Khánh Hòa có vai trò rất lớn đối với toàn hệ sinh thái ven bờ tại đây, có thể nói rừng ngập mặn không chỉ đóng góp về cân bằng sinh thái mà còn về phát triển kinh tế đặc biệt nghề nuôi thủy sản. Mục đích của nghiên cứu này nhằm tìm kiếm những chủng vi khuẩn tiềm năng nội tại có khả năng sinh kháng sinh, để phục vụ những nghiên cứu sâu hơn áp dụng vi khuẩn nội tại vào vùng nuôi thủy sản ven bờ.

## PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### Thu mẫu, phân lập vi khuẩn

Mẫu trầm tích được thu khi thủy triều xuống tại vị trí có tọa độ 12°24'9"N, 109°10'4"E ở rừng ngập mặn Ninh Ích (Ninh Hòa, Khánh Hòa). Mẫu trầm tích được thu cách bề mặt 5 cm, được chứa trong túi PE vô trùng, bảo quản trong thùng đá lạnh và vận chuyển về phòng Sinh thái biển, Viện Hải dương học để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo. Vi khuẩn từ trầm tích được phân lập lên thuần trên môi trường Nutrient Agar (Himedia, Ấn Độ) Czapek Agar (CSA) của Difco™, Hoa Kỳ, R-2A Agar Ấn độ, và M2 [15]. Hình dạng khuẩn lạc và các đặc điểm hình thái được ghi chú, nhuộm đơn, soi kính và chụp hình, xác định Gram dựa trên kết quả phản ứng KOH [16].

### Phương pháp kiểm tra khả năng kháng khuẩn

Phương pháp đường cây vuông góc: Vi khuẩn cần kiểm tra được cấy trên NA theo một đường thẳng, cấy vi khuẩn kiểm định thành một đường vuông góc với chủng cần kiểm tra. Sau 24 h nuôi cấy ở 37°C đối với *Bacillus subtilis* (ATCC6633), *Escherichia coli* O157, *Salmonella typhimurium* (ATCC 6994) ở 25°C đối với *Serratia marcescens* PDL100 (ATCC BAA-632) thì đọc kết quả. Nếu tại vị trí vuông góc có khoảng cách vô khuẩn chứng tỏ chủng cần kiểm tra có khả năng sinh kháng sinh ngoại bào kháng lại vi khuẩn kiểm định. Kiểm tra khả năng kháng khuẩn qua nuôi cấy tách chiết chất thô và thử nghiệm trên môi

trường chuẩn Mueller Hinton Agar (MHA-Himedia, Ấn độ) dựa theo nguyên lý khuếch tán thạch của Bauer et al., (1966) [17]. Vi khuẩn cần kiểm tra khả năng kháng khuẩn được nuôi trong 100 ml môi trường BM (yeast extract: 1 g/l, beef extract: 1 g/l, tryptone: 2 g/l, glucose: 10 g/l), lắc 120 rpm ở nhiệt độ phòng ( $30^{\circ}\text{C} \pm 1$ ) trong 72 h, dùng ethylacetate để tách chiết chất thô và làm bay hơi dung môi sau đó lấy lại chất thô với 1 ml methanol (Grade). Dùng 30  $\mu\text{l}$  chất thô hòa tan trong methanol nhỏ vào 4 giếng thạch (n = 4) đã cấy vi khuẩn chuẩn trên MHA với đối chứng âm là giếng chỉ có 30  $\mu\text{l}$  methanol, sau đó ủ đĩa có chất thô với các vi khuẩn *B. subtilis*, *E. coli* và *S. typhimurium* ở  $37^{\circ}\text{C}$ , vi khuẩn *S. marcescens* ở  $25^{\circ}\text{C}$ . Sau 24 h đọc kết quả dương tính nếu

xung quanh giếng có xuất hiện vòng vô khuẩn, đo đường kính (mm) và tính vòng kháng khuẩn trung bình với Microsoft excel.

### Phương pháp định danh

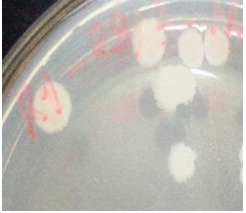
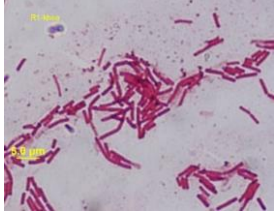

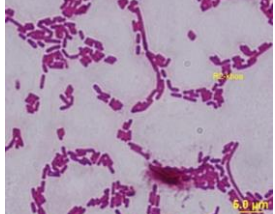
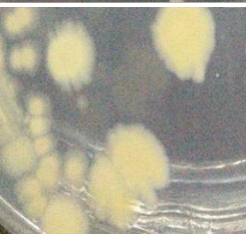
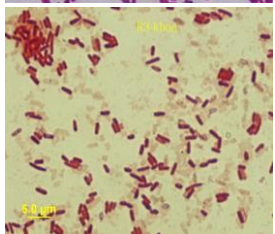
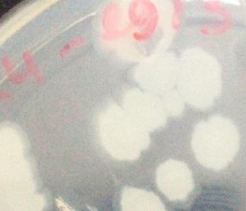

Tách ADN và định danh đến loài qua phân tích trình tự gen 16S rRNA [18].




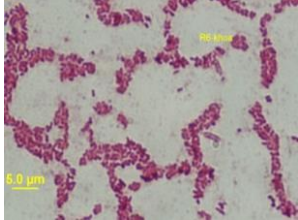

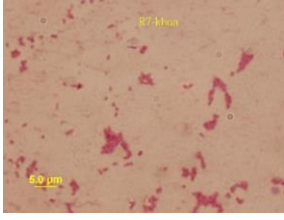

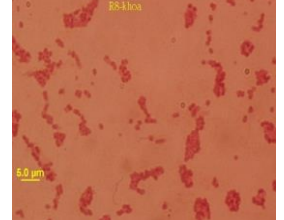

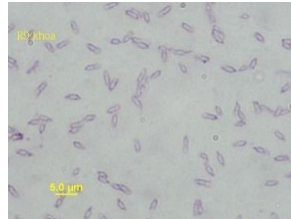

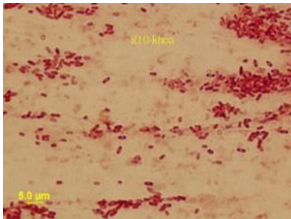
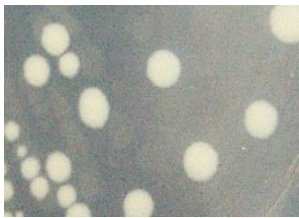

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN


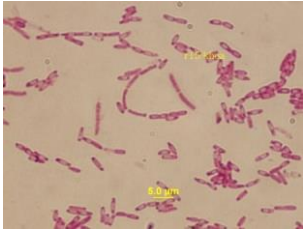


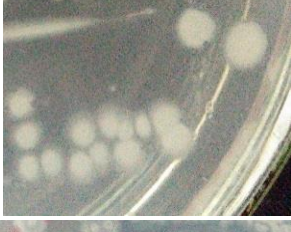
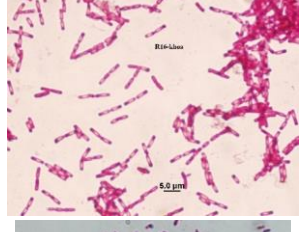

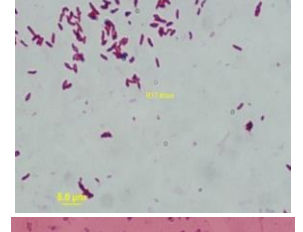

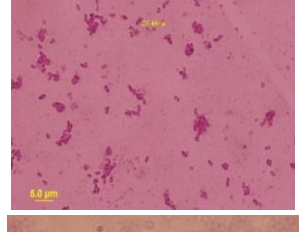

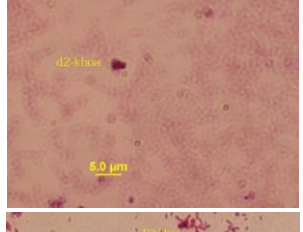
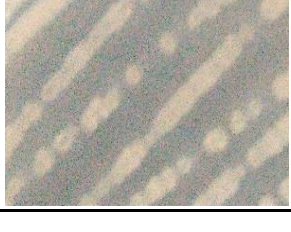
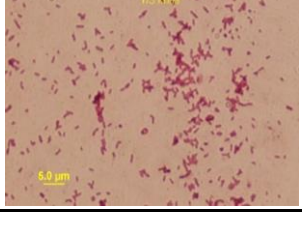
### Đặc điểm hình thái khuẩn lạc


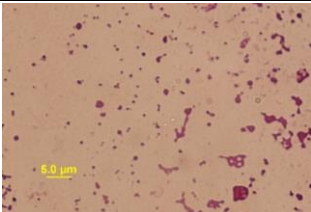

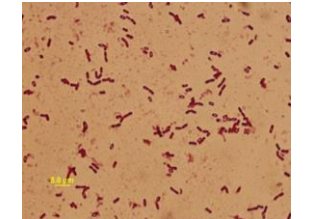

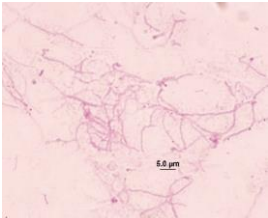
Tổng số 21 khuẩn lạc có kích thước và màu sắc hình dạng tương đối khác nhau đã được phân lập trong đó gồm, R2A: 15 chủng, CSA: 5 chủng, M2: 1 chủng. Đặc điểm hình dạng, kích thước, màu sắc khuẩn lạc phân lập sau 24 h nuôi cấy trên môi trường NA được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Đặc điểm khuẩn lạc, tế bào của các chủng vi khuẩn phân lập được từ mẫu trầm tích

Chủng	Đường kính đk (mm) Màu sắc Hình dạng	Hình ảnh khuẩn lạc	Hình ảnh tế bào
R1	Đk: 9–11, trắng tròn, lồi, vìa răng cưa, bề mặt khô. Trục khuẩn Gram dương, chuỗi ngắn, kích thước $0,7 \times 4,0 \mu\text{m}$ .		
R2	Đk: 7–9, ngả vàng, tròn, mép đều. Bề mặt bóng, tâm khuẩn lạc lồi. Trục khuẩn Gram dương, chuỗi ngắn, bào tử trung tâm, kích thước $0,6 \times 1,5 \mu\text{m}$		
R3	Đk: 9–13, vàng sậm tâm tròn, rìa răng cưa không đều, bề mặt bóng. Trục khuẩn Gram dương, bào tử trung tâm, kích thước $0,5 \times 1,5 \mu\text{m}$		
R4	Đk: 16–18, trắng, hơi tròn, bề mặt khô. Trục khuẩn Gram dương, bào tử lệch tâm, kích thước $0,6 \times 1,5 \mu\text{m}$ .		

R5	Đk: 9–13, trắng ngà, mép hơi loang nhầy. Trục khuẩn Gram dương, chuỗi ngắn, bào tử lệch tâm, kích thước $0,5 \times 3,0 \mu\text{m}$ .		
R6	Đk: 2,0–2,5, vàng sậm tròn mặt lồi bóng, mép đều. Cầu khuẩn Gram dương, kích thước $0,3 \mu\text{m}$ .		
R7	Đk: 1,5–2,0 vàng tròn lồi, bề mặt bóng. Cầu khuẩn Gram dương kích thước $0,6 \mu\text{m}$ .		
R8	Đk: 3,0–4,0 trắng vàng nhạt, tròn lồi, mép đều, bề mặt bóng. Cầu khuẩn Gram dương, kích thước $0,5 \mu\text{m}$ .		
R9	Đk: 4,0–5,0 trắng, tròn, khô, rìa nhầy. Trục khuẩn Gram dương, bào tử lệch tâm, kích thước $0,7 \times 1,2 \mu\text{m}$ .		
R10	Đk: 4–5, trắng tròn, rìa răng cưa. Trục khuẩn Gram dương, bào tử trung tâm, kích thước $0,3 \times 0,7 \mu\text{m}$		
R11	Đk: 7–8, trắng, tròn, khô, rìa có thùy. Trục khuẩn Gram dương chuỗi dài, kích thước $0,7 \times 2,5 \mu\text{m}$ .		

R12	Mọc lan bất định, trắng, rẽ nhánh, nhảy. Trục khuẩn Gram dương, chuỗi, bào tử lệch tâm, kích thước $0,6 \times 2,5 \mu\text{m}$ .		
R15	Đk: 3-4, vàng, tâm tròn có rìa hoa, nhẵn lồi. Trục khuẩn Gram dương, chuỗi dài, kích thước $0,7 \times 2,5 \mu\text{m}$ .		
R16	Đk: 3-4, trắng tròn, khô, có rìa tròn màu nhạt. Trục khuẩn Gram dương, chuỗi ngắn, bào tử lệch tâm, kích thước $0,6 \times 2,5 \mu\text{m}$ .		
R17	Đk: 3-5, trắng hơi ngả vàng, tròn, bóng nhảy, rìa dày sậm màu. Trục khuẩn Gram dương, bào tử lệch tâm, kích thước $0,5 \times 1,2 \mu\text{m}$ .		
D1	Đk: 2-3, trắng vàng, hơi tròn, viền trắng nhảy. Trục khuẩn Gram dương, bào tử trung tâm, kích thước $0,3 \times 1,2 \mu\text{m}$ .		
D2	Đk: 4-5, vàng, hơi tròn, khô, lồi. Cầu khuẩn Gram dương, kích thước $0,6 \mu\text{m}$ .		
D3	Đk: 2-3, vàng hồng, tròn, khô cứng, bám thạch. Trục khuẩn Gram dương, kích thước $0,3 \times 1 \mu\text{m}$ .		

D4	Đk: 0,5–1, trắng trong, tròn, bề mặt nhầy. Cầu khuẩn Gram dương, kích thước 0,5 $\mu\text{m}$ .		
D6	Bất định, hơi vàng trong, khối nhầy to, xù xì. Trục khuẩn Gram dương, bào tử trung tâm, kích thước 0,3 $\times$ 0,6 $\mu\text{m}$ .		
M1	Đk: 1–2, xám trắng tròn, khô, bám thạch Dạng sợi, kích thước không xác định.		

Qua bảng mô tả đặc điểm, hình dạng, màu sắc khuẩn lạc của 21 chủng vi khuẩn cho thấy, vi khuẩn phân lập từ trầm tích rừng ngập mặn trong nghiên cứu này rất đa dạng về hình dạng khuẩn lạc, tế bào. Từ kết quả phản ứng KOH để xác định Gram cho thấy, vi khuẩn Gram dương chiếm ưu thế với 15/21 chủng, đa số các tế bào có hình dạng trục khuẩn, hình cầu và có một chủng dạng sợi (M1).

#### Hoạt tính kháng khuẩn qua đường vuông góc

Tất cả các chủng phân lập từ rừng ngập mặn Ninh Ích được thí nghiệm không thể hiện sự kháng khuẩn. Từ kết quả này cho thấy những chủng này có thể không sinh chất kháng sinh ngoại bào.

#### Hoạt tính kháng khuẩn bằng phương pháp khuếch tán thạch

Kết quả cho thấy có 9 chủng vi khuẩn có khả năng kháng ít nhất một trong số 4 vi khuẩn chuẩn. Các kiểu kháng khuẩn của các chủng có hoạt tính kháng khuẩn được thể hiện qua hình 1.

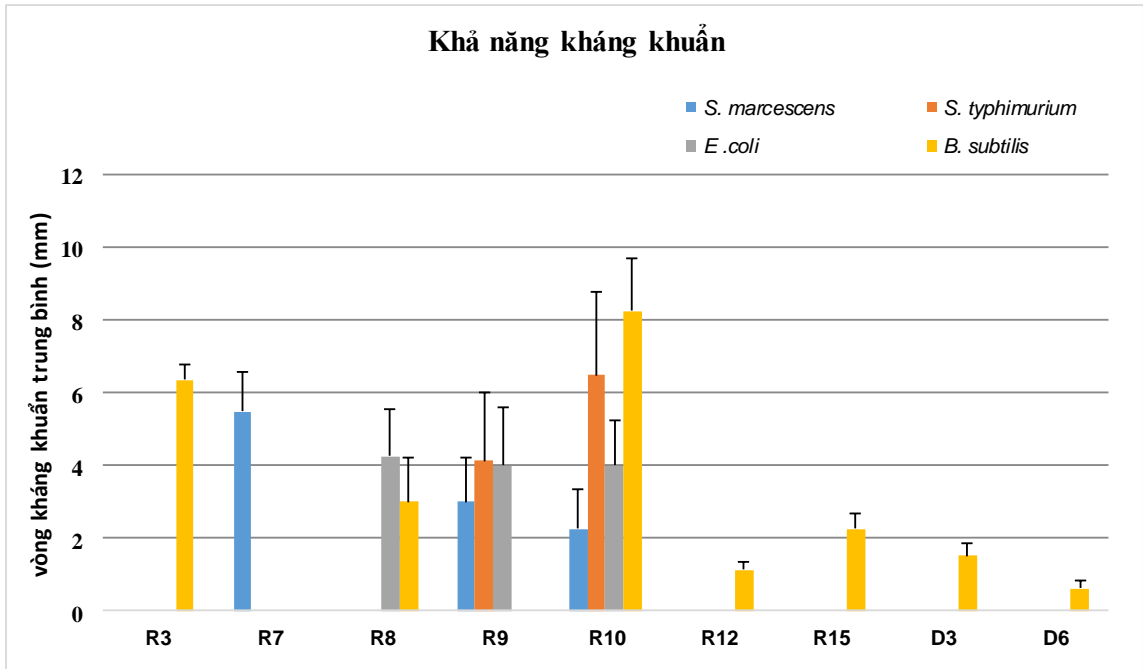
Ba chủng R7, R9 và R10 có khả năng kháng lại vi khuẩn *S. marcescens* với đường kính vòng kháng khuẩn dao động từ 2,25–5,50 mm, hai chủng R9 và R10 kháng lại vi khuẩn *S.*

*typhimurium* với đường kính vòng kháng khuẩn tương ứng là 4,13–6,50 mm. Ba chủng R8, R9 và R10 kháng lại vi khuẩn *E. coli* với đường kính vòng kháng khuẩn dao động từ 4,00–4,25 mm. Bảy chủng R3, R8, R10, R12, R15, D3 và D6 có khả năng kháng lại vi khuẩn *B. subtilis* với đường kính vòng kháng khuẩn dao động từ 0,60–8,25 mm.

Trong nghiên cứu này, chủng R10 có hoạt tính kháng mạnh nhất với đường kính vòng kháng khuẩn trung bình đối với mỗi chủng chuẩn từ 2,25 mm (đối với *S. marcescens*) và 8,25 mm đối với *B. subtilis*. So sánh với hoạt tính kháng khuẩn của *Streptomyces* phân lập từ trầm tích tại Kerala, Ấn Độ. Chủng *Streptomyces* I-1 ức chế đáng kể *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 với 12 mm, *S. aureus* là 15 mm, *Bacillus cereus* là 17  $\pm$  0,2 mm, *Serratia marcescens* là 12 mm, nấm *Penicillium* sp. là 12  $\pm$  0,2 mm, nấm men *Candida albicans* là 20  $\pm$  0,5 mm và *Cryptococcus neoformans* là 12 mm [19]. Đặc điểm về hình thái khuẩn lạc và tế bào cho thấy chủng R10 có thể thuộc chi *Bacillus*. Chủng R10 là chủng duy nhất trong nghiên cứu này có khả năng kháng lại cả 4 vi khuẩn kiểm định đặc biệt chủng này kháng mạnh vi khuẩn kiểm định *B. subtilis* (hình 1), điều đó cho thấy đây

là chủng có khả năng sinh kháng sinh phổ rộng, kháng cả vi khuẩn Gram dương và Gram âm. Trong khi chủng R3, R12, R15, D3 và D6 chỉ kháng *B. subtilis*, R7 chỉ kháng *S. marcescens*. Chủng R9 không kháng *B. subtilis* trong khi kháng lại ba chủng chuẩn còn lại. Chủng R8 vừa kháng vi khuẩn Gram dương *B. subtilis* và vi khuẩn Gram âm *E. coli*. Tính theo tỷ lệ phần trăm các chủng có hoạt tính đối với từng vi khuẩn kiểm định

chuẩn cho thấy 7/9 kháng vi khuẩn *B. subtilis* chiếm, 3/9 kháng *S. marcescens* và *E. coli* chiếm và 2/9 kháng *S. typhimurium*. Từ kết quả này cho thấy thực sự vi khuẩn rặng ngập mặn có phổ kháng khuẩn tương đối rộng, đặc biệt chủng R9, R10 trong nghiên cứu này có khả năng kháng khuẩn rộng với vòng vô khuẩn, chúng thực sự là những chủng có khả năng sinh chất kháng sinh phổ rộng.



Hình 1. Khả năng kháng khuẩn của vi khuẩn phân lập từ rừng ngập mặn

### Định danh các chủng tiềm năng qua phân tích trình tự 16S rRNA

Các chủng R3, R12, R15, D3 và D6 đều chỉ kháng *B. subtilis* mà không kháng các chủng kiểm định còn lại, kết quả về đặc điểm hình thái khuẩn lạc tế bào cho thấy các chủng này đều có đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào khác nhau. Trừ chủng D3, các chủng còn lại chúng đều có những đặc điểm thuộc chi *Bacillus* như là những vi khuẩn hiếu khí, tế bào hình que, Gram dương có sinh bào tử, phản ứng catalase dương tính, có khả năng di động. Vi khuẩn R3 là chủng chỉ kháng lại *B. subtilis* với vòng kháng khuẩn cao nhất so với những chủng có cùng kiểu kháng khuẩn còn lại như R12, R15, D3 và D6. Do đó, chủng này cũng được phân

loại đến loài dựa vào gen 16S rRNA. Kết quả cho thấy chủng R3 có mức độ tương đồng về gen cao nhất là 98% đối với chủng *Bacillus marisflavi* TF-11 (GenBank No. NR025240.1). Với mức độ tương đồng về gen cao nhất là 98% so sánh với các chủng đã có dữ liệu trong ngân hàng gen, theo Stackebrand và Ebers [20] có thể xác định là loài mới. Do đó, chủng R3 có thể là loài mới và cần được nghiên cứu sâu hơn về các đặc điểm sinh hóa để khẳng định.

Vi khuẩn R7 thể hiện khả năng kháng khuẩn duy nhất với vi khuẩn *S. marcescens* gây bệnh đốm trắng (white pox) ở san hô *Acropora palmate*, đồng thời chủng này có hoạt tính kháng khuẩn tương đối cao (hình 1). Do đó chủng R7 được định danh qua 16S rRNA, kết



quả cho thấy chủng R7 có mức độ tương đồng về gen cao nhất 99% đối với vi khuẩn *Bacillus toyonensis* BCT 7112 (GenBank No. NR121761.1).

Chủng R10 có khả năng kháng lại cả 4 chủng vi khuẩn kiểm định và được xác định là có tương đồng về gen cao nhất là 100% với *Bacillus pumilus* NCTC10337 (GenBank No. LT906438.1). Đa số các chủng vi khuẩn có hoạt tính kháng khuẩn trong nghiên cứu này là vi khuẩn Gram dương thuộc chi *Bacillus*, thực sự *Bacillus* đã được biết là ứng viên tiềm năng cho nghiên cứu sản sinh các chất có hoạt tính [18]. Tuy nhiên, một nghiên cứu khác công bố các chủng Gram âm như *Pseudonocardia endophytica* phân lập từ rừng ngập mặn ở Ấn Độ, có sinh chất hoạt tính có thể kháng lại vi khuẩn gây bệnh cho người và gây bệnh cho thực vật, đáng kể là hoạt tính kháng nấm của chất tự nhiên được sinh ra từ vi khuẩn này có hoạt độ kháng nấm cao có thể so sánh với các chất kháng nấm thương mại đang dùng phổ biến trên thị trường hiện nay như griseofulvin và amphotericin B [21].

## KẾT LUẬN

Có 21 chủng vi khuẩn khác nhau về đặc điểm hình dạng và kích thước tế bào được phân lập từ 4 loại môi trường. Trong đó 9 chủng có khả năng kháng khuẩn và tỷ lệ số chủng có hoạt tính kháng khuẩn chiếm 43%. Có 5 kiểu kháng khuẩn được phát hiện: Chủng R3, R12, R15, D3 và D6 chỉ kháng *B. subtilis*, trong đó R3 kháng mạnh nhất. Chủng R7 chỉ kháng duy nhất vi khuẩn Gram âm *S. marcescens*. Chủng R8 có khả năng kháng mạnh với *E. coli* (4,25 mm), và *B. subtilis* (3,00 mm). Đặc biệt chủng R10 thể hiện kháng mạnh cả 4 vi khuẩn kiểm định. Đáng chú ý chủng R9 chỉ kháng vi khuẩn Gram âm như *S. marcescens*, kháng mạnh *S. typhimurium* (4,13 mm), và *E. coli* (4,00 mm). Chủng R3 có thể là loài mới khi có mức độ tương đồng về gen cao nhất là 98% đối với *Bacillus marisflavi* TF-11 (GenBank No. NR025240.1). Vi khuẩn R7 có mức độ tương đồng về gen cao nhất 99% đối với vi khuẩn *Bacillus toyonensis* BCT 7112 (GenBank No. NR121761.1). Đặc biệt chủng R10 thể hiện kháng mạnh cả 4 vi khuẩn kiểm định, và chủng này được xác định có mức độ gen gần nhất với

*Bacillus pumilus* NCTC10337 (GenBank No. LT906438.1). Chủng R9 được xem như một chủng tiềm năng, nhằm nghiên cứu sản xuất chất kháng sinh chỉ kháng vi khuẩn Gram âm trong những nghiên cứu tiếp theo.

**Lời cảm ơn:** Đây là kết quả mở rộng của đề tài mã số VAST02.01/17–18. Tập thể tác giả xin chân thành cảm ơn phòng Sinh Vật phù du, phòng Thí nghiệm Trọng điểm cấp Viện Hàn lâm về An toàn thực phẩm và Môi trường (khu vực miền Trung), Viện Hải dương học đã hỗ trợ cho sử dụng các trang thiết bị máy móc phân tích.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Kamaruzaman, J., 2013. Malaysian mangrove forests and their significance to the coastal marine environment. *Polish Journal of Environmental Studies*, 22(4), 979–1005.
- [2] Yang, J., Gao, J., Cheung, A., Liu, B., Schwendenmann, L., and Costello, M. J., 2013. Vegetation and sediment characteristics in an expanding mangrove forest in New Zealand. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 134, 11–18.
- [3] Alongi, D. M., 1988. Bacterial productivity and microbial biomass in tropical mangrove sediments. *Microbial ecology*, 15(1), 59–79.
- [4] Fenical, W., 1993. Chemical studies of marine bacteria: developing a new resource. *Chemical Reviews*, 93(5), 1673–1683.
- [5] Yan, B., Hong, K., and Yu, Z. N., 2006. Archaeal communities in mangrove soil characterized by 16S rRNA gene clones. *The Journal of Microbiology*, 44(5), 566–571.
- [6] Liang, J. B., Chen, Y. Q., Lan, C. Y., Tam, N. F., Zan, Q. J., and Huang, L. N., 2007. Recovery of novel bacterial diversity from mangrove sediment. *Marine Biology*, 150(5), 739–747.
- [7] Xu, D. B., Ye, W. W., Han, Y., Deng, Z. X., and Hong, K., 2014. Natural products from mangrove actinomycetes. *Marine drugs*, 12(5), 2590–2613.
- [8] Ding, L., Münch, J., Goerls, H., Maier, A., Fiebig, H. H., Lin, W. H., and Hertweck,

- C., 2010. Xiamycin, a pentacyclic indolosesquiterpene with selective anti-HIV activity from a bacterial mangrove endophyte. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 20(22), 6685–6687.
- [9] Abdelfattah, M. S., Elmallah, M. I. Y., Hawas, U. W., El-Kassem, L. T. A., and Eid, M. A. G., 2016. Isolation and characterization of marine-derived actinomycetes with cytotoxic activity from the Red Sea coast. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(8), 651–657.
- [10] Bai, Z. Q., Lin, X., Wang, Y., Wang, J., Zhou, X., Yang, B., ... and Liu, Y., 2014. New phenyl derivatives from endophytic fungus *Aspergillus flavipes* AIL8 derived of mangrove plant *Acanthus ilicifolius*. *Fitoterapia*, 95, 194–202.
- [11] Arumugam, T., Kumar, P. S., Kameshwar, R., and Prapanchana, K., 2017. Screening of novel actinobacteria and characterization of the potential isolates from mangrove sediment of south coastal India. *Microbial pathogenesis*, 107, 225–233.
- [12] Narendran, R., and Kathiresan, K., 2016. Antimicrobial activity of crude extracts from Mangrove-derived *Trichoderma* species against human and fish pathogens. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 6, 189–194.
- [13] Nguyen Van Hieu, Nguyen Phuong Nhue, Vu Thi Hanh Nguyen, Phan Thi Hong Thao, Pham Thanh Huyen, Phi Quyet Tien, Le Gia Hy. 2012. Studying On Marine Actinomycete strain HLD 3.16 From The Coast of Vietnam producing antimicrobial. *Vietnam Journal of Science and Technology*, 50(5), 579–591.
- [14] Duong Minh Lam, Dang Ngoc Quang, Nguyen Thi Ha, 2013. Isolation, Purification and Characterization of penicillin resisting *Staphylococcus aureus* Inhibiting Antibiotic from *Streptomyces* sp. QN63. *Vietnam Journal of Science and Technology*, 51(5), 555–563.
- [15] Mincer, T. J., Jensen, P. R., Kauffman, C. A., and Fenical, W., 2002. Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(10), 5005–5011.
- [16] Halebian, S., Harris, B., Finegold, S. M., and Rolfe, R. D., 1981. Rapid method that aids in distinguishing Gram-positive from Gram-negative anaerobic bacteria. *Journal of clinical microbiology*, 13(3), 444–448.
- [17] Pham, T. M., Wiese, J., Wenzel-Storjohann, A., and Imhoff, J. F., 2016. Diversity and antimicrobial potential of bacterial isolates associated with the soft coral *Alcyoniumdigitatum* from the Baltic Sea. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 109(1), 105–119.
- [18] Bayer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C., and Turck, M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *American Journal of Clinical Pathogens*, 45(4), 493–496.
- [19] Das, A., Bhattacharya, S., Mohammed, A. Y. H., and Rajan, S. S., 2014. In vitro antimicrobial activity and characterization of mangrove isolates of streptomycetes effective against bacteria and fungi of nosocomial origin. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57(3), 349–356.
- [20] Stackebrandt, E., 2006. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol. Today*, 33, 152–155.
- [21] Mangamuri, U. K., Muvva, V., Poda, S., Chitturi, B., and Yenamandra, V., 2016. Bioactive natural products from *Pseudonocardia endophytica* VUK-10. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 14(2), 261–267.