

PHÂN LẬP VÀ SÀNG LỌC CÁC CHỦNG XẠ KHUẨN THUỘC CHI *MICROMONOSPORA* CÓ HOẠT TÍNH SINH HỌC TỪ TRẦM TÍCH VỊNH HẠ LONG - CÁT BÀ

Lê Thị Hồng Minh^{1,*}, Vũ Thị Quyên¹, Nguyễn Mai Anh¹, Phạm Việt Cường^{1,3}, Phạm Văn Cường¹, Đoàn Thị Mai Hương¹, Brian T. Murphy², Châu Văn Minh¹

¹Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm KHCNVN, 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

²Department of Medicinal Chemistry and Pharmacognosy, College of Pharmacy, University of Illinois at Chicago

³Viện Nghiên cứu Khoa học Miền Trung, Viện Hàn lâm KHCNVN, TP Huế

*Email: lhminhbkk@gmail.com

Đến Toà soạn: 23/9/2015; Chấp nhận đăng: 28/4/2016

TÓM TẮT

Vì sinh vật được đặc biệt quan tâm do khả năng sinh ra các hợp chất thứ cấp có giá trị ứng dụng cao. Các chất có hoạt tính sinh học có thể cung cấp cho chúng ta các cấu trúc hoá học đa dạng và mới lạ. Trong nghiên cứu này chúng tôi đã phân lập được 39 chủng xạ khuẩn từ 9 mẫu trầm tích biển thu thập ở Vịnh Hạ Long - Cát Bà. Các chủng được lên men trong môi trường kháng khuẩn. Từ kết quả sàng lọc đã chọn được 3 chủng có hoạt tính kháng khuẩn cao nhất ký hiệu là G016, G017 và G019. Cả 3 chủng đều có hoạt tính đối kháng *Enterococcus faecalis* ATCC29212 với MIC_{G016} = 64 µg/ml, MIC_{G017} = 128 µg/ml, MIC_{G019} = 64 µg/ml và với chủng *Bacillus cereus* ATCC 13245 có cùng MIC = 128 µg/ml. Ngoài ra 2 chủng G017 và G019 còn có khả năng ức chế khá mạnh nấm men *Candida albicans* ATCC10231 với MIC_{G017} = 2 µg/ml, MIC_{G019} = 8 µg/ml. Ba chủng đã được nghiên cứu các đặc điểm hình thái nuôi cấy và phân tích trình tự gen 16S ARN riboxom, kết quả cho thấy cả 3 chủng đều thuộc chi *Micromonospora*.

Từ khoá: xạ khuẩn, *Micromonospora*, hoạt tính kháng vi sinh vật, MIC, trình tự 16S ARN riboxom.

1. MỞ ĐẦU

Xạ khuẩn là một nhóm vi khuẩn dạng sợi, có mặt khắp nơi trong môi trường trên cạn và môi trường biển, có khả năng sản sinh ra thuốc kháng sinh rất phong phú [1]. Trong số các hợp chất tự nhiên do vi sinh vật sinh ra đã được công bố sử dụng trên toàn thế giới thì 45 % được sinh ra từ xạ khuẩn, 38 % từ nấm và 17 % từ vi khuẩn [2]. Xạ khuẩn biển được đánh giá là nguồn quan trọng trong việc sản xuất thuốc kháng sinh. Một số chất kháng sinh mới được phát hiện từ chúng, ví dụ rifamicin từ *Micromonospora* [3].

Các loài thuộc chi *Micromonospora* là xạ khuẩn chiếm ưu thế, có thể được phân lập từ môi trường sống dưới nước như suối, hồ bùn, trầm tích sông, cát bãi biển, bọt biển và trầm tích biển [4, 5]. *Micromonospora* cùng với chi *Streptomyces* được biết đến nhiều nhất để tổng hợp kháng sinh, đặc biệt là kháng sinh nhóm aminoglycoside, enediyne, và kháng sinh oligosaccharide [6]. Kháng sinh phổ biến trong lĩnh vực y tế như gentamicin và netamicin thuộc nhóm kháng sinh aminoglycoside thu được từ *Micromonospora*.

Ngoài ra, *Micromonospora* còn là nguồn sản xuất thuốc kháng sinh chống khối u. Đáng chú ý - *Micromonospora lupini* sp. Nov sản xuất các anthraquinon, lupinacidins A và B kháng u [7]. Các phân tử hoạt tính sinh học khác, như vitamin B12 và các hợp chất kháng nấm cũng được tổng hợp từ các loài *Micromonospora* [8, 9]. Đặc biệt, các loài *Micromonospora* biển gần đây đã nổi lên như là nguồn của chế phẩm sinh học [10]. Các alkaloid, diazepinomicin kháng khuẩn được xác định từ một loài *Micromonospora* biển cho thấy tiềm năng của nó như là một ứng cử viên thuốc tương lai do chất chống oxy hóa và chống protease hoạt động [11]. Hiện nhiên là xạ khuẩn như là một nguồn đầy tiềm năng và phong phú của các chất có hoạt tính sinh học

Trong khuôn khổ bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả về nuôi cấy, sàng lọc hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định và định danh bằng sinh học phân tử của một số chủng vi sinh vật có hoạt tính cao được phân lập từ trầm tích biển Hạ Long, Cát Bà.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Các hóa chất: Casitone, malt extract, yeast extract, Peptone, Instant ocean, CaCO₃, NZSG, Tinh bột tan, Agar, các kháng sinh cycloheximide, Streptomycin. . được mua của hãng Himedia (Ấn Độ), Sigma (Đức), dùng để pha các loại môi trường A1, M1, SWA, A+, SCA, NZSG và ISP1, ISP2 sử dụng trong phân lập, nuôi cấy, định danh và thử hoạt tính.

Kit tách DNA tổng số của hãng Madison, Mỹ, master mix cho PCR của hãng Bioneer, Hàn Quốc, bộ BigDyeR Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) sử dụng cho phản ứng đọc trình tự DNA; chi thị DNA chuẩn (Invitrogen), Taq DNA polymeraza, Các cặp mồi để khuếch đại gen 16s rDNA (16sF, 16sR)

Các chủng vi sinh vật kiểm định gồm: 3 chủng vi khuẩn Gram âm (-): *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Salmonella enterica* ATCC13076; 3 chủng vi khuẩn Gram dương (+): *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC 13245; 1 chủng nấm men *Candida albicans* ATCC10231

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Thu thập mẫu

Các mẫu trầm tích biển được lấy tại các địa điểm và độ sâu khác nhau tại đáy biển vùng Hạ Long - Cát Bà được lưu giữ trong các ống Eppendorf vô trùng, được bảo quản lạnh trong thời gian vận chuyển về phòng thí nghiệm và được tiến hành phân lập ngay.

- Phân lập các chủng xạ khuẩn

Cân 0,5 g trầm tích hoà trong 4,5 ml nước cất vô trùng, dùng thanh inox cho qua ngọn lửa đèn cồn khử trùng chờ nguội rồi đưa vào đảo đều mẫu, sốc nhiệt ở nhiệt độ 60 °C trong 8 phút, dùng máy vortex trộn đều mẫu sau đó hút 50 µl dịch trong ống đã được sốc nhiệt vào một ống eppendorf khác có chứa 450 µl nước cất đã khử trùng, trộn mẫu đều rồi hút 50 µl dịch cấy châu vào đĩa có chứa 6 loại môi trường đã chuẩn bị. Các đĩa được nuôi trong tủ ẩm ở 28 – 30 °C từ 7 - 30 ngày, lựa chọn các khuẩn lạc cấy chuyển làm sạch sang môi trường A1 [12, 13].

- Tạo cặn chiết thô từ dịch nuôi cấy

Các chủng xạ khuẩn đã được nuôi cấy trên môi trường có chứa 4 g/l glucose, 4 g/l nấm men, 1 g chiết xuất từ malt, 3 g/l muối biển (Instant ocean), pH 7,0, tại 200 rpm và 30 °C. Sau 7 ngày nuôi cấy, dịch lên men được chiết xuất với ethyl acetate (5 lần). Các chất chiết xuất được làm bay hơi dưới áp suất giảm để loại dung môi thu cặn chiết thô [14].

- Phương pháp xác định hoạt tính kháng khuẩn

Hoạt tính kháng khuẩn của các chủng xạ khuẩn được xác định theo phương pháp pha loãng đa nồng độ của Hadacek (2000) [15]. Đây là phương pháp thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiềm định và nhằm đánh giá mức độ kháng khuẩn mạnh yếu của các mẫu thử thông qua các giá trị thể hiện hoạt tính là nồng độ ức chế tối thiểu MIC (Minimum Inhibition Concentration). Mẫu cần thử ban đầu được pha loãng trong DMSO ở dải nồng độ giảm dần: 256 µg/ml, 128 µg/ml, 64 µg/ml, 32 µg/ml, 16 µg/ml, 8 µg/ml, 4 µg/ml và 2 µg/ml với số thí nghiệm lặp lại N = 2. Bổ sung 50 µl dung dịch vi khuẩn và nấm ở nồng độ 5.10^3 CFU/ml, ủ ở 37 °C. Sau 24 giờ, đọc giá trị MIC. Giá trị MIC được xác định tại giếng có nồng độ chất thử thấp nhất ức chế hoàn toàn sự sinh trưởng của vi sinh vật sau 24 giờ nuôi cấy và được xác định chính xác dựa trên số liệu đo độ đục tế bào bằng máy quang phổ Bioteck và phần mềm GraphPad Prism data. Đồi chứng là kháng sinh Streptomycin hoặc Tetramycin cho các chủng vi khuẩn và Cycloheximide cho nấm men và vi nấm nói chung

- Phương pháp định danh các chủng xạ khuẩn

Các chủng xạ khuẩn được nuôi cấy trong 14 ngày ở 30 °C trên môi trường thạch casein tinh bột (SCA) và kiểm tra bằng kính hiển vi điện tử quét SEM (scanning electron microscopy) model JSM-5410 LV; JEOL, mẫu được chuẩn bị như mô tả của Itoh et al [16]. Đặc điểm hình thái của chủng xạ khuẩn được xác định dựa trên các đặc điểm nuôi cấy bao gồm màu sắc của khuẩn ti khí sinh, khuẩn ti cơ chất, hình thái khuẩn lạc [17].

Sử dụng phương pháp xác định trình tự gen 16S rRNA để định danh các chủng xạ khuẩn đã được lựa chọn. Phản ứng khuếch đại gen được thực hiện trong một thể tích hỗn hợp 25,0 µl chứa 16,3 µl H₂O khử ion vô trùng, 2,5 µl đệm 10X, 1,5 µl 25 mM MgCl₂, 0,5 µl 10 mM dNTP, 0,2 µl của Taq polymerase, 1,0 µl primer với nồng độ 0,05 mM 16sF (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG3') và 0,05 mM 16sR (5'-AAGGAGGTGATCCAACC3') [18] và 2,0 µl DNA tổng số. Chu trình nhiệt của PCR là: 94 °C/2 phút (94 °C/1 phút, 58 °C/1 phút, 72 °C/1 phút 20 giây) × 30 chu kì, 72 °C/ 8 phút và giữ mẫu ở 8 °C. Ước tính kích thước sản phẩm là khoảng 1500 bp. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng kit tinh sạch của hãng Invitrogen. Giải trình tự gen 16S rRNA đã được thực hiện bởi máy giải trình tự tự động ABI PRISM 3100 của hãng Bioscience. Trình tự gen được xử lí bởi chương trình BioEdit v.2.7.5 và so sánh với dữ liệu ngân hàng gen của NCBI. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng bằng chương trình MEGA version 4.1 [19].

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập và xác định hoạt tính kháng khuẩn

9 mẫu trầm tích biển thu thập được ở Vịnh Hạ Long - Cát Bà, được xử lý theo phương pháp đã nêu, cấy cấy lên các môi trường phân lập với các nồng độ khác nhau sau đó nuôi ở 28 °C từ 7 - 30 ngày (Hình 1 và Hình 2).



Hình 1 Một số hình ảnh thu thập mẫu ở Hạ Long - Cát Bà.



Hình 2 Hình thành khuẩn lạc trên các môi trường phân lập sau 14-30 ngày nuôi.

Sau khi tiến hành lựa chọn các khuẩn lạc riêng rẽ đặc trưng cho các mẫu, cấy rìa các khuẩn lạc đó ra đĩa môi trường để thuần khiết và phục vụ cho các chủng nghiên cứu tiếp theo. 39 chủng có hình thái và màu sắc khuẩn lạc khác nhau, các chủng này được nuôi cấy trong môi trường đã nêu ở phần phương pháp, dịch lên men được chiết xuất với ethyl acetate (5 lần) thu cặn thô, xác định hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định với cặn thô. Kết quả đã sàng lọc được 3 chủng có hoạt tính kháng vi sinh vật cao là G016, G017, G019 (Bảng 1).

Bảng 1. Giá trị MIC của cặn chiết EtOAc của 3 chủng có hoạt tính cao.

S T T	Tên chủng	Gram dương (+)			Gram âm (-)			Năm
		<i>E. faecalis</i> ATCC29212	<i>S. aureus</i> ATCC25923	<i>B. cereus</i> ATCC13245	<i>E. coli</i> ATCC25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	<i>S. enterica</i> ATCC13076	
	Nồng độ	MIC(µg/ml)	MIC(µg/ml)	MIC(µg/ml)	MIC(µg/ml)	MIC(µg/ml)	MIC(µg/ml)	
1	G016	64	256	128	-	-	-	
2	G017	128	-	128	-	-	2	
3	G019	64	-	128	-	-	8	
K S	Strep	256	256	128	32	256	128	
	Cyc	-	-	-	-	-	32	

Strep: Streptomycin

KS: Kháng sinh

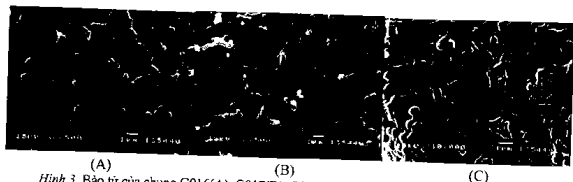
Cyc: Cycloheximide

Kết quả xác định hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của cặn chiết thô cho thấy cả 3 chủng đều có khả năng ức chế các chủng Gram dương *E. faecalis* ATCC 13124 với MIC_{G016} = 64 µg/ml, MIC_{G017} = 128 µg/ml, MIC_{G019} = 64 µg/ml và *B. cereus* ATCC13245 với MIC = 128

$\mu\text{g/ml}$, chỉ có chủng G016 có khả năng ức chế *S. aureus* ATCC25923 với $\text{MIC}_{\text{G0:6}} = 256 \mu\text{g/ml}$. Ngoài ra 2 chủng G017 và G019 còn có khả năng ức chế khá mạnh nấm men *Candida albicans* ATCC10231 với $\text{MIC}_{\text{G017}} = 2 \mu\text{g/ml}$, $\text{MIC}_{\text{G019}} = 8 \mu\text{g/ml}$. Giải thích nguyên nhân sự nhạy cảm với kháng sinh khác nhau của các vi khuẩn Gram âm và Gram dương có thể do sự khác biệt về hình thái, cấu trúc, trong đó vi khuẩn Gram âm có một màng ngoài gồm các thành phần lipopolysaccharide, hàm lượng lipid và lipoprotein cao. Cấu trúc này giúp cho thành tế bào khó bị tác động. Các chủng Gram dương nhạy cảm với kháng sinh hơn do chỉ có một lớp peptidoglycan bên ngoài, cấu trúc này không phải là một hàng rào ngăn cản sự thâm thấu hiệu quả của thành tế bào [20, 21].

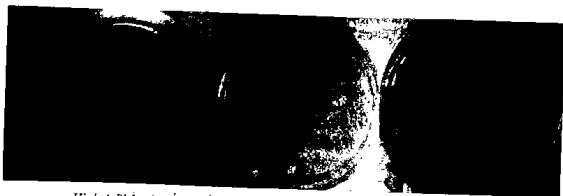
3.2. Kết quả định danh

Các chủng xạ khuẩn G016(A), G017(B), G019(C) được nuôi cấy trong 14 ngày ở 30°C trên môi trường thạch casein tinh bột (SCA). Quan sát dưới kính hiển vi điện tử SEM cho thấy sợi khuẩn tị cơ chất phát triển tốt trên nền cơ chất của môi trường, nhưng sợi khuẩn tị khi sinh thì rất yếu. Bào tử được sinh ra đơn lẻ và có đường kính khoảng $0,5 - 1 \mu\text{m}$. Bào tử là dạng nổi và mịn trên bề mặt và không di chuyển được (Hình 3).



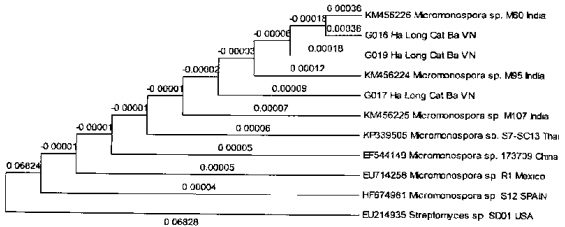
Hình 3 Bào tử của chủng G016(A), G017(B), G019(C) dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM).

Các chủng xạ khuẩn được nuôi cấy trong 14 ngày ở 30°C trên môi trường thạch casein tinh bột (SCA). Quan sát màu sắc sợi khuẩn tị cho thấy, chủng G016 có màu vàng, màu cam ở chủng G017 và nâu đen sau khi hình thành bào tử ở chủng G019 (Hình 4). Các đặc điểm này phù hợp với đặc điểm phân loại của chi *Micromonospora* [22, 23].



Hình 4. Phổ màu sắc khuẩn tị cơ chất của 3 chủng G016(A), G017(B), G019(C)

Xác định trình tự gen 16S ARN riboxom của 3 chủng G016(A), G017(B), G019(C). Các trình tự thu được được phân tích bởi phần mềm BioEdit và so sánh với cơ sở dữ liệu trên GenBank bằng phần mềm Blast. Kết quả cho thấy trình tự gen 16S ARN riboxom của các chủng nghiên cứu có độ tương đồng cao (hơn 99 %) so với các chủng trên ngân hàng Gene Quốc tế (Hình 5).



Hình 5. Cây phát sinh loài dựa trên trình tự gen 16S rRNA cho thấy mối quan hệ giữa các chủng nghiên cứu với các thành viên đại diện của các chi *Micromonospora* sp.

Nghiên cứu quan hệ của các chủng trên cây phát sinh loài (Hình 5) cho thấy, chủng G016, G017, G019 có mối quan hệ gần gũi với các chủng thuộc chi *Micromonospora*. Trong đó, chủng G016 và G019 có độ tương đồng cao (hơn 99 %) so với *Micromonospora* M60 có mã số trên GenBank là KM 456226; chủng G017 tương đồng (hơn 99 %) với chủng *Micromonospora* M95 mang mã số KM 456224 được phân lập từ vùng ngập mặn ở Ấn Độ.

Từ một số kết quả nghiên cứu các chủng *Micromonospora* để sản xuất các hợp chất có hoạt tính sinh học đã được đề cập. Đáng chú ý, một chủng ưa mặn *Micromonospora lomaivitiensis*, được phân lập từ *Polysynchraton lithostrotum*. Chủng này tạo ra hai lomaiviticins A và B gây độc tế bào khối u mạnh, cấu trúc của lomaiviticins gần tương tự với kháng sinh kanamycin... Các thiocoraline kháng u được tách chiết từ *Micromonospora* phân lập từ một loài san hô ở Ấn Độ Dương đã được ứng dụng để sản xuất IB-96212, có tính chất gây độc tế bào [24, 25].

Nghiên cứu các hợp chất thứ cấp từ nguồn vi sinh vật biển ở Việt Nam mới chỉ được bắt đầu, có rất ít các nghiên cứu đã công bố, mặc dù nguồn đa dạng vi sinh vật biển của nước ta là rất lớn nhờ vị trí địa lý tiếp giáp với biển. Do vậy, việc tiến hành nghiên cứu các hợp chất thứ cấp của nguồn vi sinh vật biển Việt Nam nhằm phát hiện các chất có hoạt tính sinh học cao có giá trị ứng dụng trong lĩnh vực y dược là hướng nghiên cứu cần thiết, hứa hẹn nhiều triển vọng.

4. KẾT LUẬN

Từ 9 mẫu Trầm tích thu thập được ở vịnh Hạ Long- Cát Bà, đã phân lập được 39 chủng xạ khuẩn. Từ kết quả sàng lọc hoạt tính kháng khuẩn đã lựa chọn được 3 chủng có hoạt tính cao

nhất G016, G017 và G019. Các chủng đã được xác định hình thái và định danh bằng trình tự gen 16S ARN riboxom. Kết quả cho thấy chủng G016 và G019 tương đồng cao (hơn 99 %) so với *Micromonospora* sp. M60 có mã số trên GenBank là KM 456226; Chủng G017 tương đồng (hơn 99 %) với chủng *Micromonospora* sp. M95 mang mã số KM 456224 được phân lập từ vùng ngập mặn ở Ấn Độ. Các kết quả ban đầu thu được mở ra triển vọng nghiên cứu về nhóm *Micromonospora*, đặc biệt *Micromonospora* từ môi trường biển, là nguồn tiềm năng quan trọng trong lĩnh vực Y Dược để chống lại các tác nhân gây bệnh.

Lời cảm ơn. Công trình này được hoàn thành với sự tài trợ kinh phí của Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, đề tài mã số VAST. TĐ. ĐAB 04/ 13-15

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Fenical W, Jensen P. R. -Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria, Nat. Chem. Biology **2** (2006) 666-673.
2. Arnold L. D., Sergio S. - Microbial drug discovery: 80years of progress, J. Antibiotics **62** (2009) 5-16.
3. Huang H., Hu Y., Fang Z., Zhang K., Bao S. -*Micromonospora rifamycinia* sp. nov., a novel actinomycetes from mangrove sediments, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **58** (2008) 17-20.
4. Rifaat H. M. - The biodiversity of actinomycetes in the River Nile exhibiting antifungal activity, J. Mediter. Ecol **4** (2003) 5-7
5. Eccleston G. P., Brooks P.R., Kurtboke D. I. The occurrence of bioactive Micromonosporae in aquatic habitats of the sunshine coast in Australia, Mar Drugs **6** (2008) 243-261
6. Lam K. S. - Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes, Curr. Opin Microbiology **9** (2006) 245-251.
7. Igarashi Y., Trujillo M. E., Martínez-Molina E., Yanase S., Miyanaga S., Obata T., Sakurai H., Saiki I., Fujita T., Furumai T. - Antitumor anthraquinones from an endophytic actinomycete *Micromonospora lupini* sp. Nov, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **17** (2007) 3702-3705.
8. Wagman G. H., Gannon R.D., Weinstein M. J. - Production of vitamin B12 by *Micromonospora*, Applied Microbiology **17** (1969) 648-649.
9. Nolan F. C., Cross T. - Isolation and screening of actinomycetes, Academic Press, London, 1988, pp. 2132-2141
10. Das S., Ward L. R., Burke C. - Prospects of using marine actinobacteria as probiotics in aquaculture, Applied Microbiology & Biotechnology **81** (2008) 419-429
11. Usama R. A., Matthias S., Eman M.O., Tanja S., Stephanie G., Helga S and Ute H. - Antioxidant and Anti-Protease Activities of Diazepinomicin from the Sponge-Associated *Micromonospora* Strain RV115, Mar Drugs **10** (2012) 2208-2221.
12. Williams S. T. and Davies F. L. - Use of antibiotics for selective isolation and enumeration of Actinomycetes in soil, Journal of General Microbiology **38** (1965) 251-261
13. Williams S. T., Cross T. - Actinomycetes. In: Methods in Microbiology, Academic Press (London) **4** (1971) 295-334.
14. Cédric O., Skylar C., Bindiya K., Mashal M.A., Haipeng L., Anna O., Quan S., Van Cuong Pham, Catherine L.S., Brian T. Murphy and Alexander S.M. Tool for

- characterizing bacterial protein synthesis inhibitors, *Antimicrob. Agents Chemother.* **57** (2013) 5994- 6002.
15. Hadacek F., Greger H. - Test of antifungal natural products methodologies, comparability of result and assay choice, *Phytochem. Anal.* **90** (2000) 137-147.
 16. Itoh T., Kudo T., Parenti F., Seino A. - Amended description of the genus *Kineosporia*, based on chemotaxonomic and morphological studies, *Int. J. Syst. Bacteriology* **39** (1989) 168-173.
 17. Tremner H. D., Buckus E. J. - System of color wheels for *Streptomyces* taxonomy, *Appl. Microbiology* **11** (1963) 335-338.
 18. Rajesh M. M., Subbaiya R., Balasubramanian M. - Ponmurugan and Masilamani Selvam. Isolation and Identification of Actinomycetes *Isopterocola variabilis* From Cauvery River Soil Sample, *Int.J.Curr. Microbiology* **2** (2013)236-245.
 19. Saitou N., Nei M. - The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees, *Mol. Biology.* **4** (1987) 406-425.
 20. Basilio A., González L, Vicente M F., Gorrochategui J., Cabello A., González A., Genilloud O. - Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity, *J. Appl Microbiology* **95** (2003) 814-823.
 21. Oskay M., Same A., Azeri C. - Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey, *Afr. J. Biotechnology* **3** (2004) 441-6.
 22. Kawamoto I., Williams S. T., Sharpe M. E., Holt J. G. - *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* **4** (1989) 2442-2450.
 23. John G.H., Noel R. K., Peter H A., James T. S., Stanley T. S.- *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 9th edition, 2000.
 24. Kanoh K., Matsuo Y., Adachi K., Imagawa H. - Mechercharmycins A and B, cytotoxic substances from marine-derived Thermoactinomyces sp. YM3-251, *Journal of Antibiotics* **4** (2005) 289-92.
 25. Fred C. - Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria, *Amer. J. Medicine* **119** (2006) 3-10.

ABSTRACT

ISOLATION AND SCREENING OF ANTIMICROBIAL COMPOUNDS OF MICROMONOSPORA STRAINS ISOLATED FROM HA LONG – CAT BA BAY'S SEDIMENTS

Le Thi Hong Minh^{1,*}, Vu Thi Quyen¹, Nguyen Mai Anh¹, Pham Viet Cuong^{1,3}, Pham Van Cuong¹, Doan Thi Mai Huong¹, Brian T. Murphy², Chau Van Minh¹

¹*Institute of Marine Biochemistry, VAST, 18 Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Hanoi*

²*Department of Medicinal Chemistry and Pharmacognosy, College of Pharmacy, University of Illinois at Chicago*

³*Mien Trung Institute of Scientific Research, VAST, Hue city*

*Email: lhminhbk@gmail.com

Microorganisms are especially interested due to the ability to produce secondary compounds with high value application. The bioactive substances could give us new and varied chemical structures. In this study, 39 strains of actinomycetes were isolated from 9 Sediments samples. The strains were fermented in A1 medium, fermentation broths were extracted 5 times with ethyl acetate, then the residue of extracts was collected to test the activity against some reference bacteria. From the results of screening, 3 strains of actinomycetes that have the highest biological activity (Code: G016, G017, G019) were selected. These strains have the quite strong inhibition on two strains of Gram positive bacteria, as *Enterococcus faecalis* ATCC29212 and *Bacillus cereus* ATCC13245 with MIC values less than or equal to the MIC value of the reference antibiotic (MIC_{G016} = 64 µg/ml, MIC_{G017} = 128 µg/ml, MIC_{G019} = 64 µg/ml). In addition, two strains G017 and G019 were active against *Candida albicans* ATCC10231 with respective values MIC_{G017} = 2 µg/ml, MIC_{G019} = 8 µg/ml. These strains were subjected to morphological and phylogenetic investigation based on 16S rRNA gene sequences. The obtained results indicate that strains G016, G017, and G019 belong to Genus *Micromonospora*.

Keywords. actinomycetes, *Micromonospora*, antimicrobial activity, MIC, 16S rRNA gene sequences.