

ĐÁNH GIÁ VÀ SÀNG LỌC XẠ KHUẨN NỘI CỘNG SINH TRÊN CÂY QUẾ CÓ KHẢ NĂNG KHÁNG VI SINH VẬT GÂY BỆNH

Quách Ngọc Tùng¹, Khiếu Thị Nhân^{2,3}, Chu Kỳ Sơn⁴, Vũ Thị Hạnh Nguyên¹, Vũ Thu Trang⁴, Phí Quyết Tiến¹

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Vụ Khoa học Công nghệ và môi trường, Bộ Giáo dục và Đào tạo

³Trường Khoa học sự sống, Đại học Văn Nam, Trung Quốc

⁴Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Bách Khoa Hà Nội

Ngày nhận bài: 2.5.2014

Ngày nhận đăng: 17.6.2014

TÓM TẮT

Xạ khuẩn nội cộng sinh trong các cây được liệu được đánh giá là một trong những nguồn vi sinh vật có tiềm năng sinh tổng hợp chất kháng khuẩn và kháng ung thư cao. Nghiên cứu này đánh giá khả năng kháng vi sinh vật gây bệnh của 78 chủng xạ khuẩn nội cộng sinh phân lập trên các mẫu cây quế thu thập tại tỉnh Hòa Bình. Trong tổng số xạ khuẩn được kiểm tra, 16,7% số chủng kháng *Proteus vulgaris* CNLM: 14,1% kháng lần lượt *Escherichia coli* ATCC 11105; *Sarcina lutea* CNLM, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Candida albicans* ATCC 10231, 12,8% số chủng kháng *Bacillus cereus* ATCC 11778 và 1,0% số chủng kháng *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurum ATCC 14028. Từ đó, chọn được hai chủng HBQ19, HBQ33 có khả năng ức chế mạnh lần lượt với *S. epidermidis* ATCC 12228 và *C. albicans* ATCC 10231. Khuếch đại gen liên quan đến tổng hợp kháng sinh gồm polyketide synthases type I (PKS-I), polyketide synthases type I (PKS-II) và nonribosomal peptide synthetase (NRPS) cho thấy cả hai chủng xạ khuẩn HBQ19, HBQ33 có gen PKS-I, PKS-II và không có gen NRPS. Nghiên cứu đặc điểm chính của HBQ19 và HBQ33 cho thấy, hai chủng có chuỗi bào tử xoắn, bào tử nhẵn, không sinh sắc tố, phát triển ở dải nhiệt độ 28-37°C, pH từ 5-11. Ngoài khả năng đồng hóa nhiều nguồn carbon, nitơ khác nhau, hai chủng xạ khuẩn có khả năng sinh một số enzyme thủy phân cơ bản gồm amylase, chitosanase, cellulase. Dựa vào khóa phân loại Bergey's, ISP, trình tự đoạn gen 16S rDNA, hai chủng HBQ19 và HBQ33 được định danh lần lượt là *Streptomyces angustimyceticus* HBQ19 và *Streptomyces graninisoli* HBQ33.

Từ khóa: Kháng khuẩn, polyketide synthase, nonribosomal peptide synthetase, *Streptomyces*, xạ khuẩn nội cộng sinh

MỞ ĐẦU

Một trong những thành tựu của y học hiện đại là phát triển các chất kháng sinh và kháng vi sinh vật. Tuy nhiên, việc lạm dụng chất kháng sinh đã trở thành yếu tố chính làm xuất hiện các chủng vi sinh vật gây bệnh kháng đa thuốc. Vì vậy, tìm kiếm và phát triển các hợp chất có hoạt tính sinh học từ tự nhiên như chất kháng sinh, kháng vi sinh vật, kháng tế bào ung thư, kháng viêm cũng là vấn đề mang tính toàn cầu. Trong số các phương pháp tìm kiếm chất kháng sinh, kháng ung thư mới thì sàng lọc, nuôi cấy vi sinh vật từ tự nhiên được đánh giá là cách tiếp cận hiệu quả (Demanin, Davies, 1999)

Trong những thập kỷ gần đây, thực vật nói chung và các loại thảo dược nói riêng đóng vai trò

quan trọng trong phòng và điều trị bệnh truyền nhiễm do vi sinh vật, ngăn ngừa ung thư, kích thích hệ thống miễn dịch... Trong số các loại thảo dược phổ biến, quế và hợp chất chiết xuất từ quế có nhiều công dụng như kháng nấm, chống dị ứng, chống oxy hóa, kháng các loại tế bào ung thư (Tariq, 2006). Ngoài giá trị khoa học do thành phần của cây mang lại, cây quế còn là môi trường sinh trưởng của xạ khuẩn nội sinh.

Xạ khuẩn nội cộng sinh là các xạ khuẩn sống bên trong các mô thực vật mà không gây hại bay cạnh tranh dinh dưỡng với cây chủ (Bacon, White, 2000). Trái lại, chúng tăng cường khả năng trao đổi chất, miễn dịch cho vật chủ bằng cách sản xuất các sản phẩm trao đổi chất như kháng sinh (Castillo *et al.*, 2003); kháng u và kháng viêm (Higashide *et al.*, 1977); sản xuất chất kích thích tăng trưởng thực vật

(Merzaeva, Shirokikh, 2010). Cho đến nay, số lượng các nghiên cứu về xạ khuẩn nội cộng sinh trên cây quế nói riêng và cây được liệu nói chung tại Việt Nam vẫn còn rất hạn chế. Trong bài báo này, nghiên cứu tập trung vào đánh giá và phân loại các chủng xạ khuẩn nội cộng sinh có hoạt tính kháng vi sinh vật cao được phân lập từ các mẫu quế thu thập tại tỉnh Hòa Bình.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng giống vi sinh vật

Bộ sưu tập xạ khuẩn nội cộng sinh gồm 78 chủng được phân lập từ các mẫu cây quế thu thập tại xã Thung Nai, huyện Cao Phong, tỉnh Hòa Bình. Các chủng vi sinh vật kiểm định: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 11105, *Sarcina lutea* CNLM, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Proteus vulgaris* CNLM, *Candida albicans* ATCC 10231, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 nhận từ Bộ sưu tập giống Vi sinh vật của phòng Công nghệ lên men, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Môi trường nuôi cấy

Môi trường YIM 38 (g/L): cao malt 4,0; cao men 4,0; glucose 4,0; agar 20,0; H₂O 1000 ml; pH 7,2. Môi trường LBA (Luria-Bertani) (g/L): cao nấm men 5,0; tryptone 10,0; NaCl 10,0; agar 15,0; H₂O 1000 ml; pH 6,5-7,0. Môi trường ISP1 (g/L): tryptone 5,0; cao nấm men 3,0; thạch 18,0; H₂O 1000 ml; pH 7,0. Môi trường ISP2 (g/L): cao nấm men 3,0; cao malt 10,0; dextrose 4,0; agar 20,0; H₂O 1000 ml; pH 7-7,2. Môi trường ISP7 (g/L): glycerol 15,0; L-tyrosine 0,5; L-asparagine 1,0; FeSO₄·7H₂O 0,01; K₂HPO₄ 0,5; MgSO₄·7H₂O 0,5; NaCl 0,5; muối A 1 ml; agar 20,0; H₂O 1000 ml; pH 7,2-7,4. Môi trường ISP9 (g/L): (NH₄)₂SO₄ 2,64; KH₂PO₄ 2,38; K₂HPO₄ 5,65; MgSO₄ 1,0; dung dịch muối B 1 ml, nguồn cacbon 10,0; agar 20,0; H₂O 1000 ml; pH 6,8-7,0.

Đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của các chủng xạ khuẩn

Khả năng kháng vi sinh vật kiểm định của các chủng xạ khuẩn nội cộng sinh được xác định theo phương pháp đục lỗ thạch kết hợp hiệu chỉnh theo phương pháp Dmitrieva (Egorow, 1976). Các chủng xạ khuẩn được nuôi cấy trong môi trường YIM38 ở 30°C trên máy lắc tốc độ 200 rpm/phút, sau 5 ngày nuôi cấy, ly tâm thu dịch lên men ở 12.000 vòng/phút

trong 5 phút. Vi sinh vật kiểm định được gọt đều trên đĩa thạch LBA, sau đó đục lỗ thạch, nhỏ 100 µl dịch nuôi cấy xạ khuẩn vào lỗ thạch. Vòng kháng khuẩn được quan sát sau 16-24 giờ nuôi cấy ở 30°C.

Khuếch đại gen mã hóa PKS-I, PKS-II, NRPS

Các chủng xạ khuẩn được nuôi trong môi trường YIM38, sau 72 h nuôi cấy, ly tâm thu tế bào ở 10.000 vòng/phút trong 5 phút. DNA tổng số được tách chiết theo phương pháp của Sambrook và Russell (Sambrook, Russell, 2001). Gen mã hóa các enzyme đóng vai trò chính trong tổng hợp sản phẩm trao đổi chất thứ cấp được khuếch đại bằng phản ứng PCR dựa trên 3 bộ motif đặc hiệu cho PKS-I (K1F: 5'-TSA AGT CSA ACA TCGGBC A-3' và M6R: 5'-CGC AGG TTS CSG TAC CAGTA-3'); PKS-II (KSaF: 5'-TSG CST GCT TGG AYG CSA TC-3' và KSaR: 5'-TGG AAN CCG CCG AAB CCG CT-3'); NRPS (A3F: 5'-GCS TACSYS ATS TAC ACS TCS GG-3' và A7R: 5'-SAS GTCVCC SGT SCG GTA S-3') theo chu trình nhiệt: 95°C trong 5 phút, 30 chu trình (94°C trong 60 giây, 57°C (K1F /M6R, A3F /A7R) hay 58°C (KSaF /KSaR) trong 90 giây, 72°C trong 60 giây, 72°C trong 10 phút, giữ mẫu ở 4°C (Li *et al.*, 2012). Sản phẩm của phản ứng PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1,0%.

Phân loại xạ khuẩn dựa theo đặc điểm sinh học và phân tích trình tự gen 16S rDNA

Phân loại chủng xạ khuẩn bằng phương pháp truyền thống được thực hiện theo khóa phân loại xạ khuẩn quốc tế ISP (Shirling, Gottlieb, 1966) và Bergey (2001). Gen 16S rDNA được khuếch đại bằng phản ứng PCR, sử dụng cặp mồi GR1: 5'-TAACACATGCAAGTCGAACG-3' và GF1: 5'-GGTGTGACGGGCGGTGTGTA-3'. Sản phẩm của phản ứng PCR được kiểm tra, tinh sạch, giải trên máy đọc trình tự tự động ABI PRISM®3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Kết quả giải trình tự gen hai chiều được kiểm tra bằng phần mềm phân tích DNA STAR (Lasergene Inc., Madison, WI, Mỹ), so sánh với các gen tương ứng đăng ký trên ngân hàng cơ sở dữ liệu GenBank bằng công cụ BLAST trên NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khả năng kháng vi sinh vật kiểm định của chủng xạ khuẩn nội cộng sinh trên cây quế chúng xạ

khả năng nội cộng sinh có hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định

Kiểm tra phổ kháng khuẩn của 78 chủng xạ khuẩn cho thấy, các chủng ức chế sự phát triển của vi sinh vật kiểm định ở mức độ khác nhau. Kết quả nghiên cứu cho thấy 16 chủng xạ khuẩn có khả năng kháng ít nhất 1 loại vi sinh vật kiểm định (chiếm 20,5% tổng

số xạ khuẩn thử nghiệm). Trong 78 chủng xạ khuẩn, 13 chủng thể hiện hoạt tính kháng *Proteus vulgaris* (chiếm 16,7%); 11 chủng kháng *E. coli* ATCC 11105, *Sarcina lutea* CNLM, *S. epidermidis* ATCC 12228, *Candida albicans* ATCC 10231 (chiếm 14,1%); 10 chủng kháng *Bacillus cereus* ATCC 11778 (chiếm 12,8%) và 1 chủng kháng *Salmonella* Typhimurium ATCC 13048 (Bảng 1).

Bảng 1. Khả năng kháng vi sinh vật kiểm định của 78 chủng xạ khuẩn nội cộng sinh.

Chủng vi sinh vật kiểm định	Xạ khuẩn kháng vi sinh vật kiểm định	
	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Gram (-)		
<i>E. coli</i> ATCC 11105	11	14,1
<i>Proteus vulgaris</i> CNLM	13	16,7
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 13048	1	1,0
Gram (+)		
<i>Sarcina lutea</i> CNLM	11	14,1
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	11	14,1
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	10	12,8
Nấm men		
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	11	14,1

Nhiều kết quả nghiên cứu trên thế giới đã chứng minh khả năng kháng vi sinh vật của các chủng xạ khuẩn nội cộng sinh. (Zhao *et al.*, 2005) tiến hành phân lập 560 chủng xạ khuẩn từ 26 cây được liệu tại cao nguyên Panxi, Trung Quốc và trong đó 60 chủng thuộc chi *Streptomyces* có hoạt tính kháng ít nhất một loại vi sinh vật kiểm định. Nghiên cứu khác của Li *et al.*, (2012) đã thông báo, phân lập 228 chủng xạ khuẩn nội cộng sinh trên cây thanh hao hoa vàng, 31 chủng thể hiện phổ kháng khuẩn rộng với các vi sinh vật kiểm định trừ *E. coli* YIM 1011 và 19 chủng ức chế mạnh sự phát triển của nó. Tại Việt Nam, rất ít nghiên cứu về khả năng kháng vi sinh vật của xạ

khẩn nội cộng sinh trên cây quế được công bố. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi gợi ý, xạ khuẩn phân lập từ quế có thể là nguồn sinh kháng sinh hứa hẹn nhiều ứng dụng trong tương lai.

Với mong muốn tuyển chọn các chủng xạ khuẩn có hoạt tính kháng vi sinh vật cao ứng dụng trong công nghệ y dược học, chúng HBQ19 có đường kính vòng kháng khuẩn cao nhất với chủng *S. epidermidis* ATCC 12228 (27,0 mm) và chủng HBQ33 có đường kính vòng kháng khuẩn cao nhất đối với chủng *C. albicans* ATCC 10231 (23,2 mm) được tuyển chọn cho các nghiên cứu tiếp theo (Bảng 2).

Bảng 2. Hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của chủng xạ khuẩn HBQ19 và HBQ33.

Chủng xạ khuẩn	Đường kính vòng kháng vi sinh vật (mm)						
	1	2	3	4	5	6	7
HBQ19	9,8	18,4	27,0	16,4	11,8	18,6	18,3
HBQ33	18,4	9,5	0	0	23,2	0	1,18

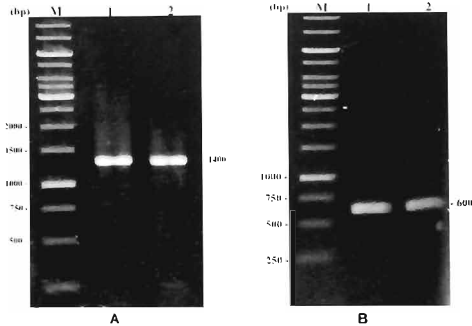
Ghi chú: 1. *Eschenchia coli* ATCC 11105, 2. *Proteus vulgans* CNLM; 3. *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, 4. *Bacillus cereus* ATCC 11778, 5. *Candida albicans* ATCC 10231, 6. *Saronella* Typhimurium ATCC 14028; 7. *Sarcina lutea* CNLM.

Xác định gen mã hóa PKS và NRPS của hai chủng xạ khuẩn HBQ19, HBQ33

Nhiều tài liệu trên thế giới công bố, một số sản phẩm trao đổi chất có hoạt tính sinh học ở xạ khuẩn được tổng hợp bởi 3 nhóm enzyme: polyketide synthases (PKS-I, PKS-II) và nonribosomal peptide synthetase (NRPS) (Gonzalez *et al.* 2005). Do đó, sàng lọc và đánh giá các gen liên quan đến quá trình trao đổi chất thứ cấp là rất cần thiết để đánh giá tiềm năng sinh tổng hợp chất kháng sinh của hai chủng HBQ19, HBQ33

Kết quả hình 1 cho thấy, sản phẩm khuếch đại

gen PKS của hai chủng xạ khuẩn bằng phản ứng PCR cho một băng DNA duy nhất có kích thước 1400 bp (PKS-I) và 600 bp (PKS-II) và không xuất hiện băng DNA mã hóa gen NRPS (Hình 1). Li *et al.* (2008) khi nghiên cứu xạ khuẩn nội cộng sinh trên một số cây dược liệu thu thập từ rừng mưa nhiệt đới tại Xishuangbanna, tỉnh Vân Nam, Trung Quốc cũng đã phát hiện các chủng xạ khuẩn mang gen PKS-I (chiếm 34,1%), PKS-II (chiếm 63,4%) và NRPS (61,0%) (Li *et al.*, 2008). Kết quả nghiên cứu chứng tỏ cả hai chủng xạ khuẩn HBQ19, HBQ33 có tiềm năng sinh tổng hợp kháng sinh vì có gen PKS-I, PKS-II mặc dù không có gen NRPS.



Hình 1. Điện di đồ sản phẩm PCR khuếch đại gen PKS-I (A) và PKS-II (B) trên gel agarose 1.0%. Bảng M: Thang DNA chuẩn (1kb). 1. Sản phẩm PCR từ chủng HBQ19, 2. Sản phẩm PCR từ chủng HBQ33.

Đặc điểm sinh học của hai chủng xạ khuẩn HBQ19, HBQ33

Đặc điểm sinh học của chủng HBQ19 và HBQ33 đã được nghiên cứu theo phương pháp mô tả trong khóa phân loại xạ khuẩn quốc tế ISP (Shirling, Gottlieb, 1966) và Bergey (2001), kết quả nghiên cứu trình bày trong bảng 3.

Về hình thái, chủng HBQ19 có cấu trúc chuỗi bào tử chùm, xoắn móc câu (RF), trên mỗi chuỗi có 15-25 bào tử, bào tử dạng nhẵn. Cấu trúc chuỗi bào tử chủng HBQ33 dạng xoắn lò xo (S), mỗi chuỗi có 10-50 bào tử, bào tử dạng nhẵn.

Kết quả nghiên cứu đặc điểm sinh lý, sinh hóa cho thấy, chủng HBQ19 và HBQ33 có khả năng đồng hóa được nhiều nguồn cacbon và nitơ khác nhau. Đặc biệt, hai chủng đều sinh trưởng tốt ở dải nhiệt từ 28 - 37°C và pH từ 5 - 11. Khi nồng độ muối $\geq 3\%$, chủng HBQ19 sinh trưởng yếu và không sinh trưởng, chủng HBQ33 phát triển tốt ở nồng độ muối $\leq 5\%$. Ngoài ra, hai chủng có khả năng sinh một số enzyme ngoại bào như: amylase, CMCase, chitinase, catalase. So sánh đặc điểm sinh học của hai chủng xạ khuẩn này với các đặc điểm trong khóa phân loại xạ khuẩn cho thấy chúng đều thuộc chi *Streptomyces*.

Bảng 3. Một số đặc điểm sinh học của chủng HBQ19 và HBQ33.

Đặc điểm	HBQ19	HBQ33
Hình thái và sắc tố		
Khuẩn ty cơ chất	Trắng (a)	Đỏ (4gc)
Khuẩn ty ký sinh	Trắng (a)	Xám (7fe)
Cường sinh bào tử	Xoắn (RF)	Xoắn (S)
Dạng bào tử	Nhấn (Sm)	Nhấn (Sm)
Melanin		
Khả năng phân hủy (1%, w/v)		
Casein		
Tinh bột		+
Carboxymethyl cellulose (CMC)		+
Chitosan		+
Catalase		
Đồng hóa nguồn Carbon (1%, w/v)		
Galactose		
Lactose		
L-arabinose		
Myo-inositol		
Manitol		
D-Fructose		
L-Rhamnose		
Saccharnose		
Trehalose		
Đồng hóa nguồn Nitơ (1%, w/v)		
L-Asparagin monohydrat		
L-Histidine monohydrat		
L-Leucin		
L-Tryptophan		
L-Isoleucin		
L-Valin		
L-Methionin		
L-Lysin		+
Nhiệt độ sinh trưởng (°C)	28 - 37°C	28 - 37°C
pH sinh trưởng	5-11	5-11
Phát triển ở nồng độ muối (%)	1-3%	1-5%

Xác định trình tự gen mã hóa 16S rDNA của hai chủng xạ khuẩn HBQ19 và HBQ33

Kết quả phân tích trình tự gen 16S rDNA và so sánh với các trình tự gen đã công bố trên GenBank bằng công cụ BLAST (NCBI) cho thấy: gen 16S rDNA của chủng HBQ19 và HBQ33 có độ tương đồng cao (100% và 99%) so với gen tương ứng của chủng *Streptomyces angustmyceticus* S2 và chủng *Streptomyces graminisoli* JR-19 (Bảng 4). Dựa vào kết quả nghiên cứu về đặc điểm hình thái, sinh lý-sinh hóa và phân tích trình tự gen 16S rDNA, chủng xạ khuẩn HBQ19 và HBQ33 được định danh lần lượt là

Streptomyces angustmyceticus HBQ19 và *Streptomyces graminisoli* HBQ33.

Theo các công bố cho thấy, loài *Streptomyces graminisoli* được phát hiện lần đầu tiên vào năm 2014 (Lee, Whang, 2014). Do vậy, các công bố hiện có về loài xạ khuẩn này còn rất hạn chế và các đặc điểm về loài xạ khuẩn này cần được nghiên cứu sâu hơn. Ngoài ra, *Streptomyces angustmyceticus* gần đây được định danh là phân nhóm dưới loài của xạ khuẩn thuộc loài chính *Streptomyces hygroscopicus*. Đây là loài xạ khuẩn có khả năng sinh kháng sinh validamycin A-loại

kháng sinh ức chế nhiều loại nấm gây bệnh trên thực vật. Ngoài ra, đây là loại kháng sinh được đánh giá là an toàn với người sử dụng và loài xạ

khẩu này cũng an toàn và không gây bệnh cho người, động và thực vật (Kumar, Goodfellow, 2010).

Bảng 4. Kết quả so sánh trình tự gen mã hóa 16S rDNA của chủng HBQ19 và HBQ33 với gen tương ứng của các chủng vi khuẩn được đăng ký trên ngân hàng cơ sở dữ liệu GenBank

Chủng xạ khuẩn	Trình tự gen 16S rDNA của chủng xạ khuẩn được so sánh	Mã số truy cập trên GenBank	Độ tương đồng (%)
HBQ19	<i>Streptomyces angustimyceticus</i> S2	KF712390 1	100
	<i>Streptomyces</i> sp. RM521	AB735444 1	100
	<i>Streptomyces</i> sp. RM395	AB735443 1	100
HBQ33	<i>Streptomyces graminisoli</i> JR-19	HQ267975	99
	<i>Streptomyces shenzhenensis</i> MDMG-1	KF973316 1	99
	<i>Streptomyces shenzhenensis</i> MDMG-6	KF973306 1	99

KẾT LUẬN

Đánh giá khả năng kháng vi sinh vật của 78 chủng xạ khuẩn nội cộng sinh trên cây quế cho thấy 16 chủng có khả năng sinh kháng sinh. Từ đó, đã tuyển chọn được hai chủng HBQ19 và HBQ33 có hoạt tính kháng khuẩn mạnh với *C. albicans* ATCC 10231, *S. epidemidis* ATCC 12228. Đây là hai chủng có đặc điểm hình thái, sinh hóa giống chỉ *Streptomyces* và đều có gen PKS-I, PKS-II trong hệ gen; không có gen NRPS. Dựa vào kết quả nghiên cứu về đặc điểm hình thái, sinh lý-sinh hóa và phân tích trình tự gen 16S rDNA, chủng xạ khuẩn HBQ19 và HBQ33 được định danh lần lượt là *Streptomyces angustimyceticus* HBQ19 và *Streptomyces graminisoli* HBQ33.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện nhờ kinh phí của Bộ Giáo dục và Đào tạo cấp cho đề tài "Nghiên cứu đa dạng và khả năng sinh hợp chất kháng sinh, chất chống ung thư của xạ khuẩn nội cộng sinh trên một số cây dược liệu tự nhiên". Các tác giả trân trọng cảm ơn GS. Lê Văn Jun, Đại học Văn Nam, Trung Quốc đã giúp đỡ về kỹ thuật phân lập xạ khuẩn nội cộng sinh và khuếch đại các gen liên quan đến cơ chế tổng hợp kháng sinh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bacon CW, White JF (2000) *Microbial endophytes*. New York: Marcel Dekker.

Casillo U, Harper JK, Strobel GA, Sears J, Alesi K, Ford E, Lin J, Hunter M, Marania M, Ge H, Yaver D, Jensen JB, Porter H, Robison R, Miller D, Hess WM, Condon M,

Teplow D (2003) Kakadumycins, novel antibiotics from *Streptomyces* sp. NRRL 30566, an endophyte of *Grevillea pteridifolia*. *FEMS Microbiol Lett* 234:183-190

Denmain A, Davies J (1999) *Manual of industrial microbiology and biotechnology*. ASM. Washington DC. Egorov NX (1976) *Thực tập vi sinh vật học*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.

Gillis M, Vandamme P, De Vos P, Swings J, Kersters K (2001). *Polyphasic taxonomy. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Edn, Vol. 1. Edited by Boone DR, Castenholz RW, Garrity GM. New York: Springer.

Gonzalez I, Ayuso-Sacido A, Anderson A, Genilloud O (2005) Actinomycetes isolated from lichens: evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. *FEMS Microbiol Ecol* 54: 401-415.

Higashide E, Asai M, Otsu TS, Kozay Y, Hasegawa T, Kishi T, Sugino Y, Yoneda M (1977) Ansamitocins, a group of novel maytansinoid antibiotics with antitumour properties from *Nocardia*. *Nature* 270: 721-722.

Kumar Y, Goodfellow M (2010) Reclassification of *Streptomyces hygrosopicus* strains as *Streptomyces aldersoniae* sp. nov., *Streptomyces angustimyceticus* sp. nov., comb. nov., *Streptomyces ascomyceticus* sp. nov., *Streptomyces decoyicus* sp. nov., comb. nov., *Streptomyces milbemyceticus* sp. nov. and *Streptomyces wellingtoniae* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 60: 769-775.

Lee HJ, Whang KS (2014) *Streptomyces graminisoli* sp. nov. and *Streptomyces rhizophilus* sp. nov., isolated from bamboo (*Sasa borealis*) rhizosphere soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 64: 1546-1551.

Li J, Zhao GZ, Chen HH, Wang HB, Qin S, Zhu WY, Xu LH, Jiang CL, Li WJ (2008) Antitumour and antimicrobial activities of endophytic streptomycetes from

pharmaceutical plants in rainforest. *Let Appl Microbiol* 47: 574-580.

Li J, Zhao GZ, Huang HY, Qin S, Zhu WY, Zhao LX, Xu LH, Zhang S, Li WJ, Strobel G (2012) Isolation and characterization of culturable endophytic actinobacteria associated with *Artemisia annua* L. *Antonie van Leeuwenhoek* 101: 515-527.

Merzaeva and Shirokikh (2010) The production of Auxins by the endophytic bacteria of winter Rye. *Appl Biochem Microbiol* 3: 44-50.

Sambrink J, Russell DW (2001) *Molecular cloning. A*

laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY

Shirling EG and Gottlieb D (1966) Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol* 16: 313-340.

Tariq N (2006) Antimicrobial activity of *cinnamomum cassia* against diverse microbial flora with its nutritional and medicinal impacts *Pak J. Bot* 38: 169-174.

Zhao PJ, Fan LM, Li GH, Zhu N, Shen YM (2005) Antibacterial and antitumor macrolides from *Streptomyces* sp Is9131. *Arch Pharm Res* 28: 1228-1232

ASSESSMENT AND SCREENING OF ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF ENDOPHYTIC ACTINOMYCETES ASSOCIATED WITH *CINNAMOMUM LOUREIRI*

Quach Ngoc Tung¹, Khieu Thi Nhan^{2,3}, Chu Ky Son⁴, Vu Thi Hanh Nguyen¹, Vu Thu Trang^{4*}, Phi Quyet Tien^{1*}

¹Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

²Department of Science, Technology and Environment, Ministry of Education and Training

³School of Life Science, Yunnan University, China

⁴School of Biotechnology and Food Technology, Hanoi University of Science and Technology

SUMMARY

Endophytic actinomycetes associated with medicinal plants are known as producers of bioactive substances with high commercial value such as antimicrobial, anticancer capabilities. In this study, 78 endophytic actinomycetes were isolated from *Cinnamomum loureiri* plants collected in Hoa Binh province. Experimental results showed that 16.7% of total isolates inhibited the growth of *Proteus vulgaris* CNLM; the same ratio of 14.1% inhibited *Escherichia coli* ATCC 11105, *Sarcina lutea* CNLM, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Candida albicans* ATCC 10231; 12.8% inhibited *Bacillus cereus* ATCC 11778 and 1% displayed antagonistic activity against *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028. Among those tested, the isolates HBQ19, HBQ33 showed the highest activity against *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Candida albicans* ATCC 10231, respectively. Amplification of genes involved in the biosynthesis of antibiotics including polyketide synthases type I (PKS-I), polyketide synthases type II (PKS-II) and nonribosomal peptide synthetase (NRPS) found that both isolates HBQ19, HBQ33 possessed genes PKS-I, PKS-II and did not have NRPS gene. The description of the morphological, biochemical and physiological properties showed that both isolates HBQ19 và HBQ33 have the spiral chains of spores with the smooth surfaces, no soluble pigments, well-growth at 28-37°C; temperature, pH ranges for growth at 28-37 °C, pH 5-11. Besides the ability to utilize different carbon, nitrogen sources, both isolates can synthesize hydrolytic enzymes such as amylase, chitinase and cellulase. Based on the criteria of International *Streptomyces* Project (ISP), Bergey's Manual of Determinative Bacteriology and sequence analysis of gene 16S rDNA, the strains HBQ19 và HBQ33 were classified as *Streptomyces angustimyceticus* HBQ19, *Streptomyces gramineus* HBQ33, respectively.

Keywords: Antimicrobial activity, endophytic actinomycetes, nonribosomal peptide synthetase, polyketide synthase, *Streptomyces*

*Authors for correspondence. Tel: +84-4-38363257, Fax: +84-4-38363144, E-mail. tienpa@ibt.ac.vn