

PHÂN LẬP, SÀNG LỌC VÀ ĐỊNH DANH MỘT SỐ CHỦNG XẠ KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG KHÁNG VI SINH VẬT KIỂM ĐỊNH VÀ GÂY ĐỘC TẾ BÀO TỪ CÁC MẪU TRẦM TÍCH VÙNG BIỂN VŨNG ÁNG TẠI HÀ TĨNH

Vũ Thị Quyên^{1,✉}, Vũ Thị Thu Huyền¹, Nguyễn Mai Anh¹, Nguyễn Hải Đăng², Đoàn Thị Mai Hương¹, Phạm Văn Cường¹, Lê Thị Hồng Minh¹

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

²Trường Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: duclamminhthu@gmail.com

Ngày nhận bài: 24.4.2020

Ngày nhận đăng: 05.12.2020

TÓM TẮT

Xạ khuẩn được nghiên cứu nhiều do khả năng sinh ra các hợp chất thứ cấp có giá trị ứng dụng cao, đặc biệt là khả năng sinh kháng sinh của chúng. Hơn 40% kháng sinh được tìm ra đều có nguồn gốc từ xạ khuẩn trong đó chi *Streptomyces* chiếm ưu thế. Hơn nữa, xạ khuẩn biển trong những năm gần đây được quan tâm nhiều nhờ có khả năng sinh các chất có hoạt tính sinh học có khả năng cung cấp các cấu trúc hoá học đa dạng và mới lạ. Trong nghiên cứu này từ 8 mẫu trầm tích biển thu thập ở vùng biển Vũng Áng (Hà Tĩnh), chúng tôi đã phân lập được 20 chủng xạ khuẩn bằng bảy loại môi trường khác nhau (A1, M1, SWA, SCA, NZSG, ISP1, ISP2). Các chủng được lên men trong môi trường A1+, dịch lên men được chiết 5 lần với ethyl acetate, thu hồi cặn chiết và xác định hoạt tính kháng khuẩn và gây độc tế bào. Từ kết quả sàng lọc đã chọn được 2 chủng có hoạt tính kháng khuẩn cao nhất và có khả năng gây độc tế bào cao nhất ký hiệu là: HT03 và HT06. Cả 2 chủng đều có hoạt tính đối kháng với *Enterococcus faecalis* ATCC29212 (MIC_{HT03}= 32 µg/mL, MIC_{HT06}= 16 µg/mL), *Staphylococcus aureus* ATCC25923 (MIC_{HT03}= 64 µg/mL, MIC_{HT06}= 32 µg/mL) và *Bacillus cereus* ATCC 13245 (MIC= 16 µg/mL). Ngoài ra 2 chủng HT03 và HT06 còn có khả năng ức chế khá mạnh nấm men *Candida albicans* ATCC10231 với MIC_{HT03}= 16 µg/mL, MIC_{HT06}= 8 µg/mL. Đặc biệt hai chủng HT03 và HT06 đều thể hiện hoạt tính gây độc rất tốt trên cả 5 dòng tế bào ung thư (tế bào ung thư vú MCF-7; MDA-MB-231; tế bào ung thư phổi NCI-H1975; tế bào ung thư cổ tử cung HeLa; tế bào ung thư dạ dày AGS) ở cả hai nồng độ thử nghiệm 30 µg/mL và 100 µg/mL. Hai chủng đã được nghiên cứu các đặc điểm hình thái nuôi cấy và phân tích trình tự gen 16S rRNA, kết quả cho thấy chủng HT03 thuộc loài *Streptomyces fradiae* có độ tương đồng 99,93% với chủng *Streptomyces fradiae* ATCC và chủng HT06 thuộc loài *Nocardiopsis synnemataformans* có độ tương đồng 99,89% với chủng chuẩn của Nhật Bản *Nocardiopsis synnemataformans* DSM 44143 (NBRC 102581).

Từ khóa: hoạt tính gây độc tế bào, hoạt tính kháng vi sinh vật, *Nocardiopsis synnemataformans*, trình tự 16S RNA ribosome, *Streptomyces fradiae*, xạ khuẩn biển.

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 kháng sinh rất phong phú (Fenical, Jensen, 2006). 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 (Spellberg *et al.*, 2004). Xạ khuẩn biển được đánh giá là nguồn quan trọng trong việc sản xuất thuốc kháng sinh trong đó *Streptomyces* là

xạ khuẩn chiếm ưu thế (Luzhetskyy *et al.*, 2007; Sanglier *et al.*, 1993). Vi khuẩn này 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 (Thakur *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2003). *Streptomyces* được biết đến nhiều nhất để tổng hợp kháng sinh và hoạt tính gây độc tế bào. Kháng sinh phổ biến trong lĩnh vực y tế như streptomycin và vancomycin cũng được sản xuất từ *Streptomyces*. Một ví dụ nữa của các hợp chất trao đổi thứ cấp từ *Streptomyces*, các ammosamide được sản xuất bởi một chủng *Streptomyces* được phân lập từ trầm tích biển sâu (1618 m) ở Bahamas là sản phẩm tự nhiên đầu tiên chứa thio- γ -lactam. Hợp chất này có đóng góp đặc biệt trong việc điều trị ung thư (Kano *et al.*, 2005). Cùng với chi *Streptomyces* chi *Nocardiopsis* được cho là nhóm xạ khuẩn hiếm cũng có nhiều đóng góp trong các hoạt tính kháng sinh, kháng virus và gây độc tế bào (Ramesh, Detmer, 2019). Một ví dụ khác là loài xạ khuẩn *Nocadoiopsis* sp. A130 từ trầm tích biển ở vịnh Bái Tử Long thể hiện hoạt tính kháng khuẩn đối với vi khuẩn gram dương (*Enterococcus faecalis* –ATCC29212) và gram âm (*Escherichia coli* - ATCC25922) với giá trị MIC tương ứng là 32 $\mu\text{g/mL}$ và 64 $\mu\text{g/mL}$ (Do *et al.*, 2017). Một ví dụ nữa là chủng *Nocadiopsis* sp. được phân lập từ đất cũng sinh chất kháng khuẩn chống lại vi khuẩn gram dương bao gồm *Staphylococcus aureus*, vi khuẩn gram âm và nấm men (Sharma *et al.*, 2016). Như vậy, xạ khuẩn là một nguồn đầy tiềm năng và phong phú cho việc tìm kiếm 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, gây độc tế bào và định danh bằng sinh học phân tử của hai chủng xạ khuẩn có hoạt tính cao nhất trong 20 chủng được phân lập từ 8 mẫu trầm tích biển Vũng Áng (Hà Tĩnh).

NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu và hoá chất

Các hóa chất sử dụng cho môi trường được cung cấp từ các hãng Hidia (Ấn Độ), Sigma –

Aldrich (Mỹ), Fisher Scientific, Đức Giang (Việt Nam). Kit tách DNA tổng số của hãng Madison (Mỹ), Dream Tag PCR Master mix của hãng Thermo Scientific (Hàn Quốc), chỉ thị DNA chuẩn của Fisher Scientific, các cặp mồi để khuếch đại gen 16S rRNA (16sF: 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 16sR: 5'-AAGGAGGTGATCCAACC-3').

Các chủng vi sinh vật kiểm định

Ba chủng vi khuẩn Gram âm: *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Salmonella enterica* ATCC13076; ba chủng vi khuẩn Gram dương: *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC 13245; một chủng nấm men *Candida albicans* ATCC10231 (Microbiologics, Mỹ).

Các dòng tế bào ung thư

Năm dòng tế bào ung thư được cung cấp bởi GS. Jeong-Hyung Lee, trường ĐHQG Kangwon, Hàn Quốc: Tế bào ung thư vú *MCF-7*; tế bào ung thư vú *MDA-MB-231*; tế bào ung thư phổi *NCI-H1975*; tế bào ung thư cổ tử cung *HeLa*; tế bào ung thư dạ dày *AGS*.

Môi trường

Các môi trường sử dụng trong nghiên cứu vi sinh được tham khảo bởi Stanley và Holt (1989) có cải tiến của Khoa Hóa dược phẩm và Dược liệu học, Đại học Dược, Đại học Illinois Chicago: A1(g/l): tinh bột tan: 10, cao nấm men: 4, pepton: 2, muối biển nhân tạo: 30, thạch agar: 15; A1+(g/l): tinh bột tan: 10, cao nấm men: 4, pepton: 2, muối biển nhân tạo: 30, CaCO_3 : 1,5 mL 20mg/mL FeSO_4 , 5 mL 8mg/mL KBr, thạch agar: 15; M1(g/l): tinh bột tan: 1, cao nấm men: 0,4, pepton: 0,2, muối biển nhân tạo: 30, thạch agar: 15; SWA (g/l): muối biển nhân tạo: 30, thạch agar: 15; SCA: muối biển nhân tạo: 10g/l, CaCO_3 : 2mg/l, $\text{FeSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$: 10mg/l; $\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$: 50mg/l; casitone 300mg/l; K_2HPO_4 : 2g/l; KNO_3 : 2g/l; thạch agar: 15; NZSG (g/l): tinh bột tan: 20, cao nấm men: 5,

đường glucoza: 10, NZ amine A: 5, muối biển nhân tạo: 30, thạch agar: 15; ISP1 (g/l): cao nấm men: 2, casitone: 5, muối biển nhân tạo: 30, thạch agar: 15; ISP2 (g/l): tinh bột tan: 5, cao nấm men: 2, đường glucoza: 10, cao mạch nha: 10, muối biển nhân tạo: 30, thạch agar: 15. Môi trường nuôi cấy các dòng tế bào ung thư: DMEM, 10% FBS, penicillin: 100 units/mL, streptomycin sulphate: 100 µg/mL, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide).

Các mẫu trầm tích biển đã thu thập

Tám mẫu trầm tích biển được thu thập tại các toạ độ và độ sâu khác nhau (3–20 m) thuộc vùng biển Vũng Áng. Mẫu được lưu giữ trong các ống Falcol vô trùng, được bảo quản lạnh trong thời gian vận chuyển và được tiến hành phân lập trong 24h.

Phương pháp nghiên cứu

Phân lập các chủng xạ khuẩn

Cân 0,5 g trầm tích cho vào ống Falcol và hòa 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. Mẫu được trộn đều bằng máy vortex sau đó chuyển 50 µL dịch trong ống đã được sốc nhiệt vào một ống Eppendorf khác có chứa 450 µL nước cất đã khử trùng. Mẫu tiếp tục được trộn đều, Hút 30 µL dịch cấy trải lên 7 loại môi trường đã chuẩn bị. Các đĩa được nuôi trong tủ ẩm ở 28–30°C từ 7 đến 60 ngày. Các khuẩn lạc mọc riêng rẽ được tiến hành cấy chuyển, làm sạch trên môi trường A1.

Tạo cặn chiết thô từ dịch nuôi cấy

Các chủng xạ khuẩn được nuôi cấy trong các bình tam giác 1000mL có chứa 500 mL môi trường A1+, ở 28°C lắc 170 vòng/phút. Sau 7 ngày nuôi cấy, dịch nuôi được chiết với 300 mL ethyl acetate (5 lần x 15 phút). Chất chiết xuất sau đó được làm bay hơi dưới áp suất giảm (250 mbar, bể gia nhiệt ở 45°C) để loại dung môi thu chất chiết xuất thô (Orelle *et al.*, 2013).

Phương pháp thử 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, Greger (2000). Đây là phương pháp thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định và nấm nhằm đánh giá mức độ kháng khuẩn mạnh yếu của các mẫu thử thông qua các giá trị thể hiện hoạt tính là MIC (nồng độ ức chế tối thiểu). Mẫu chiết thô ban đầu được pha loãng trong DMSO và các kháng sinh được pha trong nước cất vô trùng ở dải nồng độ giảm dần: 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4 và 2 µg/mL với số thí nghiệm lặp lại N = 3. Bổ sung 50 µL dung dịch vi khuẩn và nấm kiểm định ở nồng độ 2.10^5 CFU/mL, nuôi lắc 120 vòng/phút ở 37°C. Sau 24 h, đọc giá trị MIC là giá trị tại giếng có nồng độ chất thử thấp nhất ức chế hoàn toàn sự sinh trưởng của vi sinh vật kiểm định. Đối chứng là kháng sinh streptomycin cho các chủng vi khuẩn và cycloheximide cho nấm men (Hadacek, Greger, 2000).

Phương pháp thử hoạt tính gây độc tế bào

Phép thử này được thực hiện theo phương pháp của Monks *et al.* (1991). Mẫu thử pha trong DMSO 10% được đưa vào các giếng của khay 96 giếng để có nồng độ nồng độ 100 µg/mL và 30 µg/mL. Tế bào ung thư được duy trì liên tục ở các điều kiện tiêu chuẩn. Sau khi tế bào phát triển đến pha log, dịch chứa 3.10^4 tế bào/mL được bổ sung vào giếng chứa chất thử và để chúng phát triển trong vòng từ 2 ngày. Một khay 96 giếng khác không có chất thử nhưng có tế bào ung thư sẽ được sử dụng làm đối chứng ngày 0. Sau 1 giờ, đĩa đối chứng ngày 0 tế bào sẽ được cố định bằng Trichloroacetic acid (TCA) (Monks *et al.*, 1991).

Sau giai đoạn phát triển trong tủ ẩm CO₂, tế bào được cố định vào đáy giếng bằng TCA trong 1 giờ, được nhuộm bằng Sulforhodamine B (SRB) trong 30 phút ở 37°C. Đổ bỏ SRB và các giếng thí nghiệm được rửa 3 lần bằng acetic acid rồi để khô trong không khí ở nhiệt độ phòng. Cuối cùng, sử dụng 10 mM unbuffered Tris base để hòa tan lượng SRB đã bám và nhuộm các phân tử protein, đưa lên máy lắc đĩa lắc nhẹ trong 10 phút và sử dụng máy ELISA Plate Reader (Bio-

Rad) để đọc kết quả về hàm lượng màu của chất nhuộm SRB qua phổ hấp phụ ở bước sóng 515 nm. Khả năng sống sót của tế bào khi có mặt chất thử sẽ được xác định thông qua công thức sau:

$$\% \text{ sống sót} = \frac{\text{OD (mẫu thử)} - \text{OD (ngày 0)}}{\text{OD (đối chứng âm)} - \text{OD (ngày 0)}} \times 100$$

% ức chế = 100% - % sống sót

Các phép thử được lặp lại 3 lần để đảm bảo tính chính xác. Camptothecin luôn được sử dụng như là chất đối chứng dương. DMSO 10% luôn được sử dụng như đối chứng âm. Giá trị IC₅₀ được xác định nhờ vào phần mềm máy tính TableCurver (Monks *et al.*, 1991).

Phương pháp định danh các chủng xạ khuẩn

Đặc điểm hình thái của chủng xạ khuẩn được xác định dựa trên các đặc điểm nuôi cấy bao gồm: màu sắc của khuẩn ty khí sinh, khuẩn tí cơ chất, hình thái khuẩn lạc (Kawamoto *et al.*, 1989; Itoh *et al.*, 1989).

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 µL chứa 10 µL H₂O khử ion vô trùng, 12,5 µL PCR Master mix, 1,0 µL mỗi với nồng độ 0,05 mM cho mỗi mỗi 16sF và 16sR, 0,5 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 kỳ, 72°C/ 8 phút và giữ mẫu ở 8°C. Ước tính kích thước sản phẩm là khoảng 1500 bp (Rajesh *et al.*, 2013). Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng kit tinh sạch của hãng Invitrogen. Trình tự gen 16S rRNA đã được giải bởi máy giải trình tự tự động ABI PRISM 3100 của hãng Bioscience (Sambrook, Russell, 2001). Trình tự gen được xử lý 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 7.0 (Sanger *et al.*, 1997).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập và sàng lọc các chủng xạ khuẩn có hoạt tính kháng khuẩn và gây độc tế bào

Phân lập và tạo cặn chiết từ các chủng xạ khuẩn phân lập được

Tám mẫu trầm tích biển thu thập được ở Vũng Áng được xử lý theo phương pháp đã nêu, rồi được cấy trải lên 7 loại môi trường phân lập với các nồng độ khác nhau sau đó nuôi ở 28–30°C từ 7–60 ngày.

Các khuẩn lạc riêng rẽ sau khi chọn được cấy rìa từng khuẩn lạc ra đĩa môi trường A1 để làm thuần khiết. Hai mươi chủng đã được phân lập có hình thái và màu sắc khuẩn lạc khác nhau (Bảng 1), các chủng này được nuôi cấy trong môi trường A1+ 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

Kết quả cho thấy 18/20 chủng phân lập đều có hoạt tính ức chế từ 1 đến 4 chủng VSVKD, trong đó 12 chủng phân lập có hoạt tính ức chế từ 3 chủng VSVKD trở lên. Ngoài ra 18/20 chủng có khả năng kháng nấm men mạnh. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi đạt được tương tự trong một vài nghiên cứu tìm các hợp chất từ xạ khuẩn biển có khả năng kháng nấm gây bệnh. Các nghiên cứu này nhằm mục đích tìm ra các kháng sinh kháng nấm đang kháng thuốc. Như vậy, xạ khuẩn biển là một trong những ứng viên tốt (Vaibhav *et al.*, 2014). Tuy nhiên trong 20 chủng xạ khuẩn phân lập được không có chủng nào kháng vi khuẩn Gram âm điều này giải thích tại sao sự nhạy cảm với các dòng kháng sinh của vi khuẩn Gram âm và vi khuẩn Gram dương là khác nhau do cấu trúc màng tế bào của hai loại này khác nhau. Kết quả trong công trình này cho kết quả thực nghiệm giống như một vài nghiên cứu trước đây tại các vùng biển Trung bộ và Đông Bắc Việt Nam (Cao Đức Danh *et al.*, 2018; Lê Thị Hồng Minh *et al.*, 2018).

Bảng 1. Mô tả 20 chủng xạ khuẩn phân lập từ các mẫu trầm tích thu thập từ vùng biển Vũng Áng (Hà Tĩnh) trong nghiên cứu này.

STT	Màu sắc và hình thái khuẩn lạc nuôi cấy	Loại mẫu	Toạ độ	Môi trường	Điều kiện xử lý	Tên chủng
1.	Màu cam nhạt, lan toả như hoa	Trầm tích	18°06'30.8"N; 106°23'12.0"E	A1	Sốc nhiệt 60°C, 8 phút	HT01
2.	Màu xám nhạt xù xì, kích thước khuẩn lạc 3–5 mm	Trầm tích	18°07'03.7"N; 106°23'15.1"E	A1	Sốc nhiệt 60°C, 8 phút	HT02
3.	Màu xám xanh, bào tử phấn, kích thước 3 mm	Trầm tích	18°05'58.9"N; 106°23'30.4"E	A1	Sốc nhiệt 60°C, 8 phút	HT03
4.	Màu cam thẫm chuyển đen, kích thước 2 mm	Trầm tích	18°06'20.0"N; 106°22'48.1"E	NZSG	Không sốc nhiệt 60°C, 8 phút	HT04
5.	Màu vàng cam, đáy màu nâu nhẹ; kích thước 2 mm	Trầm tích	18°06'25.8"N 106°23'08.8"E	NZSG	Không sốc nhiệt 60°C, 8 phút	HT05
6.	Màu trắng đục, kích thước khoảng 3 mm	Trầm tích	18°05'58.9"N; 106°23'30.4"E	M1	Không sốc nhiệt 60°C, 8 phút	HT06
7.	Màu vàng chanh, kích thước khuẩn lạc to khoảng 1,5 mm	Trầm tích	18°07'03.7"N; 106°23'15.1"E	SCA	Không sốc nhiệt 60°C, 8 phút	HT07
8.	Màu trắng, xù xì, kích thước khuẩn lạc to khoảng 2 mm	Trầm tích	18°05'55.5"N 106°23'31.7"E	M1	Không sốc nhiệt 60°C, 8 phút	HT08
9.	Màu vàng nhạt, kích thước 2 mm	Trầm tích	18°06'30.8"N; 106°23'12.0"E	M1	Không sốc nhiệt 60°C, 8 phút	HT09
10.	Màu cam nhạt, 2 mm	Trầm tích	18°06'30.8"N; 106°23'12.0"E	SWA	Không sốc nhiệt 60°C, 8 phút	HT10
11.	Cam nhạt, kích thước khuẩn lạc 3–4 mm	Trầm tích	18°06'30.8"N; 106°23'12.0"E	M1	Không sốc nhiệt 60°C, 8 phút	HT11
12.	Màu trắng trong, 3 mm	Trầm tích	18°07'03.7"N; 106°23'15.1"E	M1	Không sốc nhiệt 60°C, 8 phút	HT12
13.	Màu xám viền trắng đục, 3 mm	Trầm tích	18°06'20.0"N; 106°22'48.1"E	A1	Sốc nhiệt 60°C, 8 phút	HT13
14.	Màu vàng chanh, khuẩn lạc nhớt kích thước khoảng 2 mm	Trầm tích	18°06'25.8"N 106°23'08.8"E	ISP1	Không sốc nhiệt 60°C, 8 phút	HT14
15.	Màu vàng nhạt gồ gồ cao, kích thước 2 mm	Trầm tích	18°06'55.2"N 106°24'31.4"E	ISP1	Không sốc nhiệt 60°C, 8 phút	HT15
16.	Màu xám vàng li ti, kích thước 1 mm	Trầm tích	18°06'20.0"N; 106°22'48.1"E	ISP2	Sốc nhiệt 60°C, 8 phút	HT16
17.	Màu xám hơi ngả hồng, kích thước 3 mm	Trầm tích	18°05'45.1"N 106°23'56.2"E	ISP2	Sốc nhiệt 60°C, 8 phút	HT17
18.	Màu vàng cam chuyển đen, li ti	Trầm tích	18°07'03.7"N; 106°23'15.1"E	A1	Sốc nhiệt 60°C, 8 phút	HT18
19.	Màu trắng xám chuyển bột trắng xanh, kích thước khoảng 2 mm	Trầm tích	18°05'55.5"N 106°23'31.7"E	M1	Không sốc nhiệt 60°C, 8 phút	HT19
20.	Khuẩn lạc màu hơi cam đục, kích thước 3 mm	Trầm tích	18°06'20.0"N; 106°22'48.1"E	ISP2	Sốc nhiệt 60°C, 8 phút	HT20

Bảng 2. Giá trị nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của cặn chiết EtOAc của 20 chủng xạ khuẩn.

Tên chủng	Gram dương (+)			Gram âm (-)			Nấm
	<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> ATCC1307 6	<i>C. albicans</i> ATCC10231
Nồng độ	MIC (μ g/mL)	MIC (μ g/mL)	MIC (μ g/mL)	MIC (μ g/mL)	MIC (μ g/mL)	MIC (μ g/mL)	MIC (μ g/mL)
HT01	256	128	64	-	-	-	32
HT02				-	-	-	16
HT03	32	64	16	-	-	-	16
HT04	128	-	64	-	-	-	64
HT05	256	-	128	-	-	-	32
HT06	16	32	16	-	-	-	8
HT07	128	256	64	-	-	-	64
HT08	-	-	-	-	-	-	32
HT09	256	256	-	-	-	-	16
HT10	128	256	-	-	-	-	32
HT11	-	-	-	-	-	-	-
HT12	128	-	256	-	-	-	32
HT13	256	128	-	-	-	-	16
HT14	128	-	-	-	-	-	32
HT15	-	-	-	-	-	-	64
HT16	-	-	-	-	-	-	32
HT17	-	-	-	-	-	-	-
HT18	128	256	-	-	-	-	64
HT19	64	128	-	-	-	-	64
HT20	-	-	-	-	-	-	8
Streptomycin	256	256	128	32	256	128	-
Cycloheximide	-	-	-	-	-	-	32

Streptomycin và Cycloheximide là hai kháng sinh đối chứng.

Trong các cặn chiết thô của các chủng phân lập (Bảng 2), hai chủng ký hiệu HT03 và HT06 có hoạt tính kháng khuẩn cao nhất. Cả 2 chủng đều có hoạt tính đối kháng *Enterococcus faecalis* ATCC29212 với MIC_{HT03} = 32 μg/mL, MIC_{HT06} = 16 μg/mL, với chủng *Staphylococcus aureus* ATCC25923 với MIC_{HT03} = 64 μg/mL, MIC_{HT06} = 32 μg/mL và với chủng *Bacillus cereus* ATCC 13245 có cùng MIC = 16 μg/mL. Ngoài ra 2 chủng HT03 và HT06 còn có khả năng ức chế khá mạnh nấm men *Candida albicans* ATCC10231 với MIC_{HT03} = 16 μg/mL và MIC_{HT06} = 8 μg/mL. Cũng tương tự như trong

nghiên cứu phân lập các chủng vi sinh vật từ trầm tích biển ở vịnh Valparaíso ở Chile, các nhà nghiên cứu đã tìm ra 68 chủng trong đó xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces* chiếm ưu thế và cho hoạt động kháng khuẩn rất tốt, bên cạnh đó có một vài chủng thuộc chi *Nocardiopsis* có khả năng kháng lại vi khuẩn gram âm, gram dương và nấm (Claverías *et al.*, 2015). Trong một nghiên cứu khác, các nhà khoa học Mỹ đã phân lập được chủng xạ khuẩn từ trầm tích biển được thu thập ngoài khơi bờ biển phía nam California và được xác định là một loài *Nocardiopsis* sp. (chủng CNQ115). Chủng CNQ115 đã được nuôi cấy và

dịch nuôi cấy được chiết xuất và tạo ra hai alcaloid 4-aminoimidazole mới, nocarimidazoles A (1) và B (2) có hoạt động kháng khuẩn *Enterococcus faecalis* với MIC= 16 µg/mL và *Staphylococcus aureus* với MIC= 64 µg/mL (Leutou *et al.*, 2015).

Xác định khả năng gây độc tế bào

Kết quả thử khả năng gây độc tế bào cho thấy 14/20 chủng xạ khuẩn phân lập gây độc tế bào từ 1 đến 5 dòng tế bào ở cả hai nồng độ thử nghiệm, trong đó có 8/20 chủng phân lập gây độc tế bào từ 3 dòng tế bào trở lên ở cả 2 nồng độ nghiên cứu. Ngoài ra có 3/20 chủng phân lập gây độc rất tốt trên cả 5 dòng tế bào ung thư ở cả hai nồng độ thử nghiệm 30 µg/mL và 100µg/mL. Một nhóm các nhà khoa học Malaysia đã chứng minh khả năng sinh ra các hợp chất tự nhiên có khả năng chống oxy hoá và gây độc tế bào từ các xạ khuẩn trong đó *Streptomyces pluripotens* MUSC 137 được phân lập từ đất ngập mặn thu được từ Tanjung Lumpur, Pahang, Malaysia. Kết quả cho thấy MUSC 137 có hoạt tính chống oxy hóa đáng kể và có tác dụng gây độc tế bào chống lại một số dòng tế bào ung thư được thử nghiệm cụ thể là các tế bào MCF-7 nhạy cảm nhất với chiết xuất với IC50 thấp nhất (61,33 ± 17,10 µg /mL), tiếp theo là HCT-116 và A549 (Ser *et al.*, 2015).

Số liệu ở Bảng 3 cho thấy hai chủng HT03 và HT06 đều thể hiện hoạt tính gây độc tốt nhất trên cả 5 dòng tế bào ung thư ở cả hai nồng độ thử nghiệm 30 µg/mL và 100 µg/mL. Trong nghiên cứu xạ khuẩn từ trầm tích biển ngập mặn tại Malaysia các nhà khoa học cũng đã tìm ra tiềm năng sinh các chất chống oxy hoá và gây độc tế bào từ một chủng xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces* được phân lập (Sudha, Masilamani, 2012; Ser *et al.*, 2015).

Trong một nghiên cứu khác, các nhà khoa học Ấn Độ chứng minh rõ ràng rằng xạ khuẩn có nguồn gốc từ trầm tích biển sinh ra các chất chuyển hóa có hoạt tính sinh học có thể chống ung thư, các dòng tế bào MCF7 hay HeLa. Trong số các chủng phân lập, chủng ACT01 có nồng độ gây độc tế bào tối thiểu ở giá trị IC50 (10,13 ± 0,92 µg/mL), sau đó là chủng ACT02 (22,34 ± 5,82 µg/mL) ở 48 giờ đối với các dòng tế bào MCF-7. Tương tự, chủng ACT01 có nồng độ gây độc tế bào tối thiểu của giá trị IC50 (18,54 ± 2,49 µg/mL (Ravikumar *et al.*, 2012).

Như vậy, từ kết quả thử hoạt tính các cận chiết thô ở bảng 2 và bảng 3 chúng tôi đã lựa chọn được hai chủng HT03 và HT06 có hoạt tính tốt nhất để tiến hành định danh.

Bảng 3. Kết quả sàng lọc thử độc tế bào của mẫu hai chủng HT03 và HT06.

Đơn vị	µ g/mL	Năm dòng tế bào thử nghiệm				
		MCF-7	MDA-MB-231	Hela	NCI-H1975	AGS
		% TB sống (Sai Số)	% TB sống (Sai Số)	% TB sống (Sai Số)	% TB sống (Sai Số)	% TB sống (Sai Số)
Đối chứng		100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
HT01	30	40.58 (1,87)	42.70 (3,24)	31.09 (2,46)	38.86 (2,12)	60.78 (1,87)
	100	29.10 (2,22)	17.61 (3,21)	16.89 (1,56)	19.06 (1,67)	46.36 (2,45)
HT02	30	36.55 (1,92)	57.07 (3,12)	65.85 (3,21)	35.25 (0,97)	70.24 (2,12)
	100	30.41 (4,56)	29.97 (4,23)	52.06 (1,23)	20.65 (2,39)	59.25 (3,21)
HT03	30	25.07 (0,92)	32.35 (1,23)	9.36 (3,22)	46.90 (2,87)	42.56 (3,12)
	100	19.81 (1,45)	18.14 (3,12)	8.61 (1,93)	28.56 (2,56)	28.89 (2,56)
HT04	30	57.93 (3,45)	69.42 (1,20)	76.85 (3,23)	53.09 (1,26)	75.57 (2,13)
	100	65.84 (2,45)	56.80 (2,12)	68.98 (2,24)	34.68 (4,21)	66.84 (2,14)
HT05	30	55.06 (1,87)	46.28 (1,93)	19.78 (2,08)	25.78 (1,90)	47.48 (2,34)

	100	44.64 (2,34)	16.30 (2,34)	11.61 (1,34)	16.37 (2,12)	25.96 (0,98)
HT06	30	20.58 (0,98)	12.34 (1,89)	21.55 (2,12)	46.90 (2,43)	38.89 (1,45)
	100	9.10 (2,11)	7.62 (2,45)	16.23 (3,12)	28.56 (3,12)	22.56 (0,98)
HT07	30	56.55 (3,21)	57.67 (2,39)	85.85 (0,92)	86.55 (1,45)	57.62 (3,12)
	100	40.41 (1,78)	59.12 (1,34)	72.06 (1,34)	60.45 (2,30)	59.99 (2,12)
HT08	30	75.07 (2,92)	82.36 (4,12)	66.36 (2,67)	75.12 (1,47)	82.23 (1,34)
	100	59.81 (3,24)	78.16 (2,12)	88.62 (2,45)	59.34 (2,45)	78.24 (2,33)
HT09	30	57.97 (4,23)	49.45 (2,14)	76.85 (2,21)	37.92 (1,67)	59.43 (1,34)
	100	47.84 (2,45)	26.81 (3,12)	98.98 (3,12)	27.83 (2,45)	46.83 (3,23)
HT10	30	55.06 (2,14)	56.23 (2,11)	49.78 (0,98)	75.03 (1,45)	56.45 (1,45)
	100	44.64 (2,12)	76.23 (2,67)	41.61 (1,86)	54.61 (1,56)	76.56 (2,56)
HT11	30	60.58 (2,56)	72.73 (1,92)	41.09 (2,56)	60.52 (2,56)	72.11 (2,14)
	100	49.10 (3,21)	67.65 (1,87)	36.23 (2,56)	59.34 (1,56)	67.22 (1,34)
HT12	30	47.58 (2,45)	67.01 (2,12)	65.23 (1,23)	67.55 (2,56)	67.67 (1,23)
	100	31.41 (1,94)	59.93 (1,87)	52.78 (2,34)	51.56 (1,78)	59.45 (3,23)
HT13	30	55.07 (2,46)	42.37 (2,56)	60.35 (1,56)	75.25 (1,56)	62.32 (2,56)
	100	39.81(1,93)	28.99 (1,59)	58.78 (2,45)	59.83 (3,45)	58.94 (1,32)
HT14	30	57.99 (1,96)	69.47 (2,45)	76.54 (1,98)	87.56 (2,34)	69.11 (2,44)
	100	45.84 (0,89)	56.82 (1,98)	68.82 (2,21)	55.44 (2,12)	56.33 (2,13)
HT15	30	55.06 (2,37)	37.34 (3,24)	75.72 (2,67)	55.06 (1,45)	37.34 (3,45)
	100	44.64 (2,12)	18.32 (1,29)	70.11 (2,22)	44.64 (2,87)	18.33 (0,98)
HT16	30	60.58 (1,23)	82.74 (2,14)	47.02 (1,45)	80.53 (3,23)	82.74 (2,34)
	100	49.12 (2,57)	67.68 (3,12)	36.22 (3,45)	59.13 (2,12)	67.68 (1,34)
HT17	30	56.57 (0,97)	87.04 (2,45)	45.83 (2,12)	49.54 (3,21)	87.05 (3,23)
	100	40.41 (3,24)	59.92 (1,96)	32.34 (1,46)	40.44 (2,45)	59.93 (2,45)
HT18	30	85.06 (2,34)	62.37 (0,35)	59.32 (2,56)	85.56 (1,45)	72.33 (4,88)
	100	59.82 (1,25)	48.16 (3,78)	48.64 (1,67)	59.17 (3,24)	58.13 (2,56)
HT19	30	57.95 (2,45)	69.77 (2,78)	76.23 (3,45)	77.94 (2,12)	69.73 (4,35)
	100	35.86 (2,21)	56.23 (2,45)	68.56 (2,45)	55.82 (2,56)	56.11 (2,13)
HT20	30	85.06 (1,93)	46.56 (4,12)	79.72 (2,56)	85.24 (1,56)	76.56 (0,98)
	100	64.64 (0,97)	36.34 (1,45)	51.63 (1,56)	64.45 (3,12)	56.34 (3,54)
Camptothecin*	0.1	69.56 (2,46)	57.06 (2,34)	67.68 (1,34)	59.56 (2,13)	66.47 (2,45)
	5	37.65 (1,23)	18.61 (2,13)	26.74 (0,98)	27.57 (0,67)	21.69 (0,98)

Kết quả định danh

Hai chủng xạ khuẩn HT03 và HT06 được nuôi cấy trong 14 ngày ở 30°C trên môi trường thạch casein tinh bột (SCA). Quan sát màu sắc cho thấy, sợi khuẩn ty của chủng HT03 có màu ghi và của chủng HT06 có màu trắng đục (Hình 1). Các đặc điểm này phù hợp với đặc điểm phân

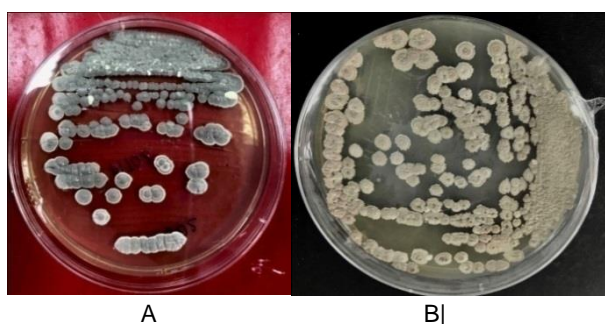
loại của chi *Streptomyces* hay chi *Nocardiopsis* (Kawamoto *et al.*, 1989; Khan., 2011).

Hai chủng có hoạt tính kháng VSVKD và gây độc tế bào cao nhất và có tiềm năng ứng dụng đã được định danh dựa trên so sánh trình tự gen 16S rRNA bằng chương trình Blast. Các gen 16S rRNA được khuếch đại bằng PCR với cặp

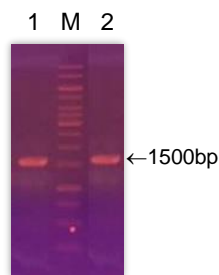
môi 16SF và 16SR, sản phẩm được tạo ra tính theo lý thuyết vào khoảng 1500 bp (Hình 2).

Các sản phẩm PCR được tinh sạch, giải trình tự và phân tích chuỗi nucleotide bằng phần mềm

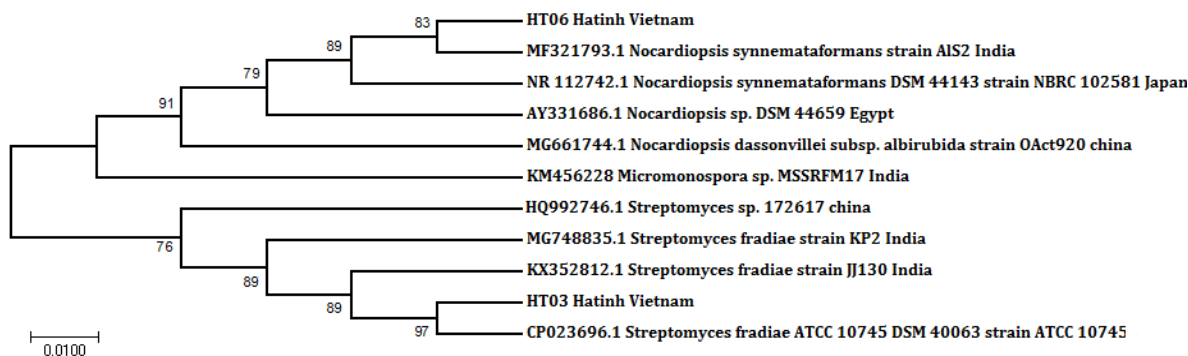
BioEdit. So sánh các trình tự gen 16S rRNA của hai chủng nghiên cứu với các trình tự trong cơ sở dữ liệu trên GenBank, kết quả cho thấy trình tự gen 16S rRNA của các chủng nghiên cứu có độ tương đồng cao (hơn 99%).



Hình 1. Phở màu sắc khuẩn ty cơ chất. (A). của 2 chủng HT03; (B). của chủng HT06.



Hình 2. Ảnh điện di sản phẩm PCR gen 16S rRNA của hai chủng nghiên cứu. M: Thang DNA chuẩn 1kb của Fisher Scientific. 1-2: Sản phẩm PCR của các chủng HT03 và HT06.



Hình 3. 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 *Streptomyces* và chi *Nocardioopsis*.

Từ một số kết quả nghiên cứu, các chủng *Streptomyces* có khả năng sản xuất các hợp chất có hoạt tính sinh học trong đó có chủng ưa mặn *Streptomyces fradiae* được phân lập từ trầm tích biển sinh kháng sinh neomycin (Kaneko *et al.*, 2007). Chủng *Streptomyces fradiae* BW 2-7 khác được phân lập từ vùng ven biển Ấn Độ sinh vancomycin chữa bệnh viêm da (Ranjith *et al.*, 2014). Hai peptide, MKN-349A và lucentamycin A, là một số chất chuyển hóa được báo cáo có nguồn gốc từ các chủng *Nocardioopsis* ở biển. Lucentamycin A là một chất gây độc tế bào được tách chiết từ *Nocardioopsis lucentensis* từ một ao

nước mặn nông ở Bahamas, là một hợp chất có chứa amino acid ethylideneproline trong tự nhiên được báo cáo. Kahakamide A là một loại kháng sinh indole N- glycosyl hiếm được phân lập từ *N. dassonvillei* từ trầm tích đại dương ở Kauai, Hawaii Muffi, có hoạt động kháng khuẩn chống lại *B. subtilis* (Fattorusso *et al.*, 2012).

Trong một công bố của nhóm nghiên cứu đã phân lập được chủng *Nocardioopsis sp.* G057 ở vùng biển Đông Bắc Việt Nam được cho là một chi xạ khuẩn hiếm, chủng này tạo ra 12 hợp chất. Hợp chất 1 (2-[(2R-hydroxypropanoyl) amino] benzamide), hợp chất 2 (3-acetyl-4-

hydroxycinnoline) và hợp chất 3 (3,3'-bis-indole), trong đó, hợp chất 1 ức chế chọn lọc *Escherichia coli* (MIC: 16 µg/mL). Các hợp chất 2 và 3 thể hiện hoạt động kháng khuẩn chống lại một số chủng vi khuẩn Gram dương và Gram âm, và nấm men *Candida albicans*. Đánh giá độc tính của các hợp chất 1 - 3 đối với bốn dòng tế bào ung thư (*KB*, *LU-1*, *HepG-2* và *MCF-7*) chỉ ra rằng hợp chất 3 tạo ra sự ức chế với các dòng tế bào *KB* và *LU* (Quyên *et al.*, 2016). Gần đây nhất các nhà khoa học Iran đã phân lập được một chủng xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces* có nguồn gốc từ trầm tích biển có khả năng kháng lại *Staphylococcus aureus* (MRSA) kháng kháng sinh methicillin và gây độc tế bào (Norouzi *et al.*, 2019).

Như vậy, nghiên cứu các hợp chất thứ cấp từ nguồn vi sinh vật biển ở Việt Nam mới được bắt đầu và quan tâm nhiều từ những năm 2011 trở lại đây, có 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 kháng sinh, gây độc tế bào cao có giá trị ứng dụng trong thực tiễn với tình hình dịch bệnh và sự phát triển của các bệnh ung thư ngày càng gia tăng là hướng nghiên cứu cần thiết, hứa hẹn nhiều triển vọng.

KẾT LUẬN

Từ 8 mẫu trầm tích thu thập được ở vùng biển Vũng Áng (Hà Tĩnh), 20 chủng xạ khuẩn có hoạt tính sinh học đã được phân lập. Các chủng đã được xác định hoạt tính kháng khuẩn và gây độc tế bào, trong đó đã chọn được 2 chủng có hoạt tính kháng khuẩn và có khả năng gây độc tế bào cao nhất ký hiệu là HT03 và HT06. Định danh hai chủng này bằng phân tích gen 16S rRNA cho thấy, chủng HT03 thuộc loài *Streptomyces fradiae* và chủng HT06 thuộc loài *Nocardioopsis synnemataformans*.

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 VAST02.05/19-20.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Danh DC, Tuan DC, Quyên TV, Anh MN, Hương TMD, Cuong VP, Minh VC, Minh THL (2018) Identification and antimicrobial activity of actinomycetes strain isolated from marine samples in the coastal area of Thanh Hoa – Quang Binh – Quang Tri. *Vietnam. J Sci Technol* 56(4) (In Vietnamese).
- Claverías FP, Undabarrena A, González M, Seeger M, Cámara B (2015) Culturable diversity and antimicrobial activity of Actinobacteria from marine sediments in Valparaíso bay, Chile. *Front Microbiol* 6: 737.
- Quyên TD, Nam VV, Anh TT, Hương TMD, Minh THL, Vương QN, Cuong VP (2017) Indole compounds from culture broth of marine actinomycete *Nocardioopsis* sp. A130. *Vietnam. J Chem* 55(6e): 120–123 (In Vietnamese).
- Fattorusso E, Gerwick W H, Tagliatalata-Scafati O, (2012) *Marine Natural Products Synthesis*. Handbook of Marine Natural Products, DOI 10.1007/978-90-481-3834-0_11.
- Fenical W, Jensen PR (2006) Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Nat Chem Biol* 2: 666–673.
- Hadacek F, Greger H (2000) Test of antifungal natural products methodologies, comparability of result and assay choice. *Phytochem Anal* 11(3): 137–147.
- Itoh T, Kudo T, Parenti F, Seino A (1989) Amended description of the genus *Kineosporia*, based on chemotaxonomic and morphological studies. *Int. J. Syst. Bacteriology* 39: 168–173.
- Kaneko T, Dougherty TJ, Magee TV (2007) Therapeutic Areas II: Cancer, Infectious Diseases, Inflammation & Immunology and Dermatology. *Comp Medi Chem* (7): 519–566.
- Kawamoto I, Williams ST, Sharpe ME, Holt JG (1989) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 4: 2442–2450.
- Khan ST (2011) *Streptomyces* associated with a marine sponge *Haliclona* sp. biosynthetic genes for secondary metabolites and products. *Environ Microbiol Black Sci Pub* 13: 391–403.
- Le Thi Hong Minh, Nguyen Mai Anh, Vu Thị Quyên, Vu Thị Thu Huyền, Doan Thị Mai Hương, Phạm Văn Cường, Châu Văn Minh (2018) Isolation, screening antimicrobial activity and identification of fungi from marine sediments of the area Thanh Lan, Co To, Vietnam. *J Biotechnol* 16(4): 721–728 (In Vietnamese).

- Lee HB, Kim CJ, Kim JS, Hong KS, Cho KY (2003) A bleaching herbicidal activity of methoxyhygromycin (MHM) produced by an actinomycete strain *Streptomyces* sp. 8E-12. *Lett Appl Microbiol* 36: 387–391.
- Leutou AS, Yang I, Kang H, Seo EK, Nam SJ, Fenical W (2015) Nocarimidazoles A and B from a marine-derived actinomycete of the genus *Nocardopsis*. *J Nat Prod* 78: 2846–2849.
- Luzhetskyy A, Pelzer S, Bechthold A (2007) The future of natural products as a source of new antibiotics. *Curr Opin Investig Drugs* 8(8): 608–613.
- Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull K, Vistica D, Hose C, Langley J, Cronise P, Vaigrow-Wolff A, et al (1991) Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J Natl Cancer Inst* 83(11): 757–66.
- Norouzi H, Rabbani K M, Danesh A (2019) Anti-MRSA activity of a bioactive compound produced by a marine *Streptomyces* and its optimization using statistical experimental design. *Iranian. J Bas Medi Sci* 22(9): 1073–1084.
- Orelle C, Carlson S, Kaushal B, Almutairi MM, Liu H, Ochabowicz A, Quan S, Pham VC, Squires CL, Murphy BT, Mankin AS (2013) Tools for characterizing bacterial protein synthesis inhibitors. *Antimic Agents Chem* 57: 5994–6002.
- Quyen VT, Van HT, Huong DTM, Cong VL, Hong ML, Brian TM, Van MC, Van CP (2016) Secondary Metabolites from an Actinomycete in Vietnam's East Sea. *NPC* 11(3): 401–404.
- Rajesh MM, Subbaiya R, Balasubramanian M, Ponmurugan, Masilamani Selvam (2013) Isolation and Identification of Actinomycetes 6 *Isopetricola variabilis* From Cauvery River Soil Sample. *Int J Curr Microbiology* 2: 236–245.
- Ramesh S, Detmer S (2019) Marine Rare Actinomycetes: A Promising Source of Structurally Diverse and Unique Novel Natural Products. *Mar Drugs* 17(5): 249.
- Ranjith KM, Brindha PV, Srigopalram S, Senthil KT, Ill SN (2014) Studies on a marine *Streptomyces fradiae* BW2-7 producing glycopeptide antibiotic Vancomycin effective against skin pathogens. *Schol Acad J Biosci* 2(11): 746–761.
- Ravikumar S, Fredimoses M, Gnanadesigan M (2012) Anticancer property of sediment actinomycetes against MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines. *Asian Pac J Trop Biomed* 2(2): 92–96.
- Saitou N, Nei MT (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biology* 4: 406–425.
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger J, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with the chain-termination inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463–5467.
- Sanglier JJ, Haag H, Huck TA, Fehr T (1993) Novel bioactive compounds from Actinomycetes. *Res. Microbiol*, 144: 633–642.
- Ser HL, Mutalib NS, Yin WF, Chan KG, Goh BH, Lee LH (2015) Evaluation of Antioxidative and Cytotoxic Activities of *Streptomyces pluripotens* MUSC 137 Isolated from Mangrove Soil in Malaysia. *Front Microbiol* 6: 1398
- Sharma P, Kalita MC, Thakur D (2016) Broad Spectrum Antimicrobial Activity of Forest-Derived Soil Actinomycete, *Nocardia* sp. PB-52. *Front Microbiol* 7: 347.
- Spellberg B, Powers JH, Brass EP, Miller LG, Edwards JE (2004) Trends in antimicrobial drug development: implications for the future. *Clin Infect Dis* 38(9): 1279–1286.
- Sudha S, Masilamani SM (2012) Characterization of cytotoxic compound from marine sediment derived actinomycete *Streptomyces avidinii* strain SU4. *Asian Pac J Trop Biomed* 2: 770–773.
- Thakur D, Yadav A, Gogoi BK, Bora TC (2007) Isolation and screening of *Streptomyces* in soil of protected forest areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites. *J Mycol Med* 17: 242–249.
- Vaibhav A, Pradipta T, Rajashri P, Sreekumar ES, Girish M, Prabhu DM, Lisette DS, Prafull R (2014) Caerulomycin A – an antifungal compound isolated from marine Actinomycetes. *Advan Microbiol* 4: 567–578.
- Williams ST, Cross T (1971) *Actinomycetes*. In: *Methods in Microbiology*, Academic Press (London), 4: 295–334.

ISOLATION, SCREENING AND IDENTIFICATION OF MICROORGANISMS HAVING ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND CAUSING CYTOTOXICITY ISOLATED FROM SEDIMENT SAMPLES OF THE VUNG ANG BAY IN HA TINH

Vu Thi Quyên¹, Vu Thi Thu Huyen¹, Nguyen Mai Anh¹, Nguyen Hai Dang², Doan Thi Mai Huong¹, Pham Van Cuong¹, Le Thi Hong Minh¹

¹*Institute of Marine Biochemistry, Vietnam Academy of Sciences and Technology*

²*University of Science and Technology of Hanoi, Vietnam Academy of Sciences and Technology*

SUMMARY

Actinomycetes has been extensively studied due to its ability to produce secondary compounds with high application value. Especially their antibiotic ability, more than 40% of antibiotics are derived from actinomycetes of which genus *Streptomyces* predominates. Moreover, marine actinomycetes have been being of great interest in recent years due to their ability to produce bioactive substances capable of providing diverse and novel chemical structures. In this study, from 8 samples of marine sediments collected in Vung Ang bay in Ha Tinh provinces, we have isolated 20 strains of actinomycetes. The strains were fermented in A1+ medium, the fermentation fluid was extracted 5 times with ethyl acetate, recovered sediment and determined antibacterial and cytotoxic activity. From the screening results, two strains with the highest antibacterial activity and highest cytotoxicity were selected ie., HT03 and HT06. Both strains had antagonistic activity of *Enterococcus faecalis* ATCC29212 with MIC_{HT03} = 32 µg/mL, MIC_{HT06} = 16µg/mL, with *Staphylococcus aureus* ATCC25923 with MIC_{HT03} = 64 µg/mL, MIC_{HT06} = 32 µg/mL and with *Bacillus cereus* ATCC 13245 has the same MIC = 16 µg / mL. In addition, the two strains HT03 and HT06 were able to strongly inhibit the yeast *Candida albicans* ATCC10231 with MIC_{HT03} = 16 µg/mL, MIC_{HT06} = 8 µg/mL. Especially, two strains, HT03 and HT06, exhibited very good toxicity on all 5 cancer cell lines (MCF-7 breast cancer cell; MDA-MB-231 breast cancer cell; lung cancer cell). NCI-H1975; HeLa cervical cancer cell; AGS gastric cancer cell) at both test concentrations of 30 µg/mL and 100µg/mL. By the analysis of 16S rRNA sequence, the results showed that the HT03 strain had the highest similarity (99.93%) to that of *Streptomyces fradiae* and *Streptomyces fradiae* ATCC. The HT06 strain was defined to belong to *Nocardiopsis synnemataformans* with the 16S sequence identity of 99.89% to the Japanese standard *Nocardiopsis synnemataformans* DSM 44143 strain NBRC-102581.

Keywords: actinomycetes, antimicrobial activity, cytotoxic activity, MIC, *Nocardiopsis*, *Nocardiopsis synnemataformans*, 16S rRNA sequence, *Streptomyces*, *Streptomyces fradiae*.