Tạp chí Công nghệ Sinh học **16**(1): 149-155, 2018

PHÂN LOẠI VÀ NGHIÊN CỨU ĐẶC TÍNH CỦA XẠ KHUẨN NỘI SINH YBQ75 PHÂN LẬP TỪ CÂY QUẾ (*CINNAMOMUM CASSIA* PRESL)

Vũ Thị Hạnh Nguyên[1], Chu Kỳ Sơn[3], Phí Quyết Tiến[1,2,] ✉

[1]*Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*
[2]*Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*
[3]*Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm, Đại học Bách Khoa Hà Nội*

✉ Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: tienpq@ibt.ac.vn

Ngày nhận bài: 14.7.2017
Ngày nhận đăng : 18.12.2017

TÓM TẮT

Ngày nay, hiện tượng gia tăng số lượng các loại bệnh truyền nhiễm và kháng thuốc kháng sinh của vi sinh vật (VSV) gây bệnh xảy ra khá phổ biến là mối quan tâm lớn của cộng đồng. Trong số những chất kháng sinh mới từ tự nhiên được công bố những năm gần đây, xạ khuẩn nội sinh trên cây dược liệu cho thấy là nguồn tổng hợp các hoạt chất kháng VSV mới. Nghiên cứu này tập trung vào định danh, đánh giá hoạt tính kháng VSV kiểm định và xác định sự có mặt của các gen chức năng liên quan đến sinh kháng sinh, sinh kháng sinh nhóm anthracyclin của chủng xạ khuẩn YBQ75 nội sinh phân lập từ cây quế (*Cinnamomum cassia* Presl) tại tỉnh Yên Bái. Dựa vào khóa phân loại Chương trình xạ khuẩn Quốc tế (ISP), kết hợp giải trình tự đoạn gen 16S rRNA chủng YBQ75 được đặt tên là *Streptomyces cavourensis* YBQ75 với số đăng kí trên GenBank là KR814822. Chủng *S. cavourensis* YBQ75 kháng được 5 loại VSV (gồm *Salmonella enterica* ATCC 14028 (22,0 mm); *Pseudomonas aeruginosa* CNLM (19,3 mm); *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (19,3 mm); *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 (17,7 mm); *Proteus vulgaris* CNLM (16,3 mm)) trên tổng số 9 VSV kiểm định. Phân tích sự có mặt của các gen chức năng liên quan đến tổng hợp kháng sinh cho thấy, chủng *S. cavourensis* YBQ75 mang cả ba gen chức năng *pks-I, pks-II* và *nrps* mã hóa polyketide synthase type I (PKS-I), polyketide synthase type II (PKS-II) và nonribosomal peptide synthetase (NRPS). Kết quả phân tích sơ bộ cho thấy chủng *S. cavourensis* YBQ75 cũng thể hiện khả năng sinh kháng sinh thuộc nhóm anthracyclin. Kết quả nghiên cứu trên chứng tỏ tiềm năng của xạ khuẩn nội sinh *S. cavourensis* YBQ75 trong tổng hợp kháng sinh kháng VSV và kháng sinh nhóm anthracyclin có thể có khả năng ức chế phát triển của tế bào ung thư.

Từ khóa: *Anthracyclin, cây quế, nonribosomal peptide synthetase, polyketide synthase, Streptomyces, xạ khuẩn nội sinh*

MỞ ĐẦU

Trong những thập kỷ qua, sản phẩm tự nhiên đã đóng vai trò quan trọng trong nghiên cứu và phát triển các loại dược phẩm mới. Nhiều nghiên cứu trên thế giới đã chỉ ra vai trò của thực vật và các hợp chất chiết xuất từ thực vật trong phòng và điều trị bệnh như là khả năng ngăn ngừa ung thư, chống co thắt, chống loét, kháng nấm, kháng khuẩn, kháng virus của cây quế (Craig, 1999). Các hoạt chất có dược tính quan trọng nằm chủ yếu trong tinh dầu của lá, vỏ cây và quả với 90% là cinnamaldehyde (Tariq, 2006). Hợp chất này có hoạt tính kháng khuẩn cao đối với cả vi khuẩn Gram dương và vi khuẩn Gram âm nhờ ức chế quá trình tổng hợp ATP (adenosin triphosphat) và gây ra sự giảm việc sản xuất ATP nội bào (Gill, Holley, 2004).

Ngoài giá trị dược lý do thành phần của cây mang lại, cây quế còn là môi trường sinh trưởng của xạ khuẩn nội sinh. Xạ khuẩn nội sinh là các xạ khuẩn từ vùng rễ xâm nhập vào rễ, thân, lá cây mà không gây hại hay cạnh tranh dinh dưỡng với cây chủ (Nalini, Prakash, 2017). Các hợp chất có hoạt tính sinh học từ xạ khuẩn nội sinh được chứng minh là rất đa dạng về mặt số lượng và hoạt tính sinh học như: chất kháng sinh, kháng ung thư, chống oxy hóa, chất diệt cỏ... (Li *et al*., 2012; Golinska *et al.,* 2015). Xạ khuẩn là nhóm VSV nội sinh hứa hẹn cung cấp nguồn VSV có khả năng tổng hợp các hợp chất trao đổi thứ cấp có hoạt tính sinh học mới như chất kháng

sinh, kháng viêm, kháng tế bào ung thư... có tiềm năng ứng dụng hiệu quả, đặc biệt anthracyclin là nhóm kháng sinh được sử dụng rộng rãi trong điều trị ung thư. Tuy nhiên, số lượng các nghiên cứu về xạ khuẩn nội sinh trên cây quế nói riêng và cây dược liệu nói chung tại Việt Nam vẫn còn rất hạn chế. Chính vì thế, nghiên cứu sàng lọc các hợp chất có hoạt tính kháng khuẩn từ xạ khuẩn nội sinh trên cây dược liệu đang là hướng nghiên cứu đầy triển vọng của các nhà khoa học trên thế giới. Bài báo này, nghiên cứu tập trung vào đặc điểm sinh học và phân loại chủng xạ khuẩn nội sinh YBQ75 có khả năng sinh kháng sinh được phân lập từ cây quế tại Yên Bái.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng xạ khuẩn nội sinh YBQ75 có hoạt tính kháng VSV được phân lập cây quế thu thập tại xã Tân Hợp, huyện Văn Yên, tỉnh Yên Bái. Mẫu thực vật *Cinnamomum cassia* Presl được phân loại bởi TS. Nguyễn Thế Cường tại Viện sinh thái và Tài nguyên sinh vật - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Các chủng VSV kiểm định *Salmonella enterica* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 11105, *Sarcina lutea* CNLM, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Proteus vulgaris* CNLM, *Pseudomonas auroginosa* CNLM, *Candida albicans* ATCC 10231, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 nhận từ Bộ sưu tập giống VSV của Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Các hóa chất dùng cho nghiên cứu được cung cấp từ các hãng Himedia (Ấn Độ), Fermentas, Merck (Đức), Trung Quốc, Biolab, Invitrogen (Mỹ), kit PureLinkTM – DNA Purification (Invitrogen, Mỹ).

Môi trường YIM38 (g/l): cao malt 4,0; cao men 4,0; glucose 4,0; thạch 20,0; nước cất 1000 ml, pH 7,2. LBA (Luria-Bertani) (g/L): cao nấm men 5,0; tryptone 10,0; NaCl 10,0; thạch 15,0; nước cất 1000 ml; pH 6,5-7,0. Hansen (g/L): glucose 50; pepton 10; KH_2PO_4 3; $MgSO_4.7H_2O$ 2; H_2O 1000 ml; agar 15-20; pH 5,0-6,0. Môi trường nuôi xạ khuẩn ISP1-ISP9 theo khóa phân loại ISP (Nomomura, 1974) và Bergey (Stanley *et al*., 1989).

Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học của chủng YBQ75

Đặc điểm hình thái của chủng xạ khuẩn YBQ75 được xác định dựa trên các đặc điểm nuôi cấy bao gồm: màu sắc của khuẩn ty khí sinh; màu sắc của khuẩn ty cơ chất; khả năng sinh sắc tố tan (Tresner, Backus, 1963) và sự hình thành sắc tố melanin. Chuỗi bào tử và bề mặt bào tử được quan sát dưới kính hiển vi điện tử sau thời gian nuôi là 7 ngày và 14 ngày (Shirling, Gottlieb, 1966; Stanley *et al*., 1989).

Đặc điểm sinh hóa: Quan sát khả năng đồng hóa nguồn cacbon và nitơ của xạ khuẩn lần lượt trên các môi trường ISP8 và ISP9 có bổ sung 1% các nguồn đường và 0,1% nguồn nitơ tương ứng (Shirling, Gottlieb, 1966; Stanley *et al*., 1989). Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến khả năng sinh trưởng của xạ khuẩn YBQ75 gồm các yếu tố: nhiệt độ (10, 15, 22, 30, 40, 45 và 50°C), pH ban đầu (3-12) và các nồng độ NaCl (1-10%) trên môi trường ISP2 (Stanley *et al*., 1989).

Phân loại dựa vào phân tích trình tự gen 16S rDNA

DNA tổng số của xạ khuẩn được tách theo phương pháp của Sambrook, Russell (2001) và gen 16S rDNA được khuếch đại bằng phương pháp PCR sử dụng cặp mồi 27F 5'-TAACACATGCAAGTCGAACG-3' và 1429R 5'-GGTGTGACGGGCGGTGTGTA-3' (Li *et al*., 2012). Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 1%, tinh sạch bằng bộ kit PureLink^{TM}-DNA Purification (Invitrogen, Mỹ) và giải trình tự 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. Trình tự gen 16S rDNA được so sánh với các trình tự tương ứng trên GenBank (NCBI) nhờ công cụ BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của chủng YBQ75

Hoạt tính kháng VSV được xác định bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch của Hadacek *et al.,* (2000).

Khuếch đại gen mã hóa PKS-I, PKS-II, NRPS của xạ khuẩn

Chủng xạ khuẩn YBQ75 được nuôi trong môi trường YIM38, sau 72 giờ 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, Russell (2001). Gen mã hóa PKS-I, PKS-II, NRPS được khuếch đại bằng phản ứng PCR dựa trên 3 bộ mồi suy biến PKS-I (K1F: 5'-TSAAGTCSAACATCGGBCA-3' và M6R: 5'-CGCAGGTTSCSGTACCAGTA-3'); PKS-II

(KSaF: 5'-TSGCSTGCTTGGAYGCSATC-3' và KSaR: 5'-TGGAANCCGCCGAABCCGCT-3'); NRPS (A3F: 5'-GCSTACSYSATSTACACSTCSGG-3' và A7R: 5'-SASGTCVCCSGTSCGGTAS-3') theo chu trình nhiệt: 95^{o}C trong 5 phút, 30 chu kì [94^{o}C trong 60 giây, 57^{o}C (K1F/M6R, A3F/A7R) hay 58^{o}C (KSaF/KSaR) trong 90 giây, 72^{o}C trong 60 giây], và chu kì cuối ở 72^{o}C trong 10 phút, giữ mẫu ở 4^{o}C (Li *et al*., 2008). Sản phẩm của phản ứng PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1,0%.

Xác định khả năng sinh kháng sinh thuộc nhóm anthracyclin

Khả năng sinh kháng sinh thuộc nhóm anthracyclin của xạ khuẩn YBQ75 dựa theo phương pháp của Trease, Vans (1996). Chủng xạ khuẩn được nuôi cấy trên môi trường thạch, sau đó đục 2 giếng trên đĩa thạch và nhỏ vào mỗi giếng dung dịch NaOH 2,0 N và HCl 1,0 N. Quan sát màu quanh giếng nếu thấy xung quanh giếng xuất hiện vòng tròn màu tím khi nhỏ NaOH và màu vàng cam khi nhỏ HCl thì chứng tỏ chủng xạ khuẩn có khả năng sinh kháng sinh thuộc nhóm anthracyclin.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

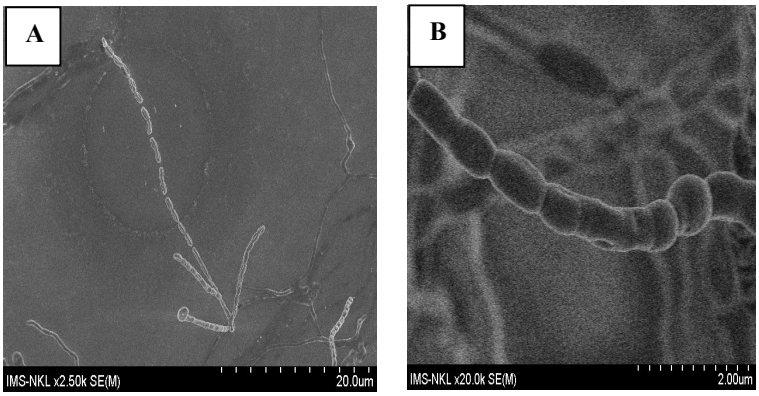
Đặc điểm hình thái của chủng xạ khuẩn YBQ75

Trên các môi trường thạch ISP, khuẩn ty khí sinh của xạ khuẩn YBQ75 có màu vàng (khi nuôi trên môi trường ISP1-5 và ISP7) và màu trắng khi nuôi trên môi trường ISP6, chủng YBQ75 không sinh melanin. Chủng YBQ75 có khuẩn ty cơ chất màu vàng đến xám, sinh nhánh mạnh và không bị đứt (Bảng 1). Như vậy, chủng YBQ75 mang các đặc điểm chung của xạ khuẩn theo khóa phân loại của Bergey (1989). Cuống sinh bào tử của chủng YBQ75 là thẳng, hơi lượn sóng (RF), số lượng bào tử khoảng 10-50 bào tử/chuỗi, bề mặt bào tử nhẵn (Sm) (Hình 1). Bào tử có hình que, kích thước từ 0,6-1,6 µm x 0,4-0,8 µm.

Bảng 1. Đặc điểm hình thái chủng xạ khuẩn YBQ75 trên các môi trường ISP.

Môi trường	Khuẩn ty		Sắc tố	
	KTKS	KTCC	Sắc tố tan	Melanin
ISP1	Vàng.2ba	Vàng.2ba	Vàng nhạt	-
ISP2	Vàng.1db	Nâu-vàng.1½db	Vàng nhạt	-
ISP3	Vàng.1½db	Xám.3ge	Vàng nâu	-
ISP4	Vàng.1½db	Vàng.1½db	-	-
ISP5	Vàng.1ba	Vàng.1ba	-	-
ISP6	Trắng.a	Nâu-đỏ.5ge	Nâu	-
ISP7	Vàng. 1½db	Vàng.1ba	-	-

Ghi chú: *KTKS: khuẩn ty khí sinh; KTCC: khuẩn ty cơ chất; -: không có.*



Hình 1. Hình thái chuỗi bào tử và bào tử của chủng xạ khuẩn YBQ75 dưới kính hiển vi điện tử quét: A (x 2500); B (x 20.000)

Đặc điểm sinh lý, sinh hóa của xạ khuẩn YBQ75

Chủng YBQ75 có khả năng đồng hóa hầu hết các nguồn đường và trừ D-glucosamine, myo-inositol, L-rhamnose. Bên cạnh đó, chủng xạ khuẩn YBQ75 có khả năng sử dụng đa số các nguồn nitơ, nhưng không sử dụng một số nguồn nitơ như: L-histidine monohydrate, L-valin, L-lysin, 2-amino-2-hydroxy-methyl 1,3 promo (Bảng 2).

Chủng xạ khuẩn YBQ75 nội sinh phát trưởng tốt trong dải nhiệt độ 25-37°C và tối ưu ở 30°C, trong khoảng pH 5,0-10, tối ưu ở pH 7,0. Chủng YBQ75 có khả năng sinh trưởng ở nồng độ muối NaCl 1-5% (Bảng 2). Kết quả này phù hợp với công bố của Sirisha *et al.,* (2013) đa số các chủng xạ khuẩn chỉ phát triển được ở nồng độ NaCl dưới 9% (Sirisha *et al*., 2013).

Đối chiếu các đặc điểm hình thái, sinh lý sinh hóa của chủng YBQ75 với khóa phân loại ISP (Nomomura, 1974) và Bergey (Stanley *et al*., 1989), chủng YBQ75 có đặc điểm tương đồng với loài *Streptomyces cavourensis* (*S. cavourensis*) do Giolitti mô tả năm 1958.

Bảng 2. Một số đặc điểm sinh học của chủng YBQ75.

Nguồn carbon (1,0%, w/v)	Khả năng sinh trưởng	Nguồn nitrogen (1,0%, w/v)	Khả năng sinh trưởng
D-glucose	+	L-asparagin monohydrat	+
D-galactose	+	L-histidine monohydrate	-
D-mantose	+	L-phenylalanin	+
α-lactose	+	L-leucin	+
L-arabinose	+	L-tryptonphan	+
D-glucosamine	-	L-arginin	+
Myo-Inositol	-	L-isoleucin	+
D-manitol	+	L-valin	-
D-fructose	+	L-methionin	+
L-rhamnose	-	L-lysin	-
D-saccharnose	+	L-threonin	+
D-sorbitol	+	L-cystein	+
D-trehalose	+	2-amino-2-hydroxy-methyl 1,3 promo	-
Đối chứng âm	-	Đối chứng âm	-
Nhiệt độ sinh trưởng tối ưu (°C)		30°C	
pH sinh trưởng tối ưu		pH 7	
Phát triển ở nồng độ muối tối ưu (%)		2%	

Ghi chú: *+ phát triển; -: không phát triển.*

Xác định trình tự gen mã hóa 16S rRNA của chủng xạ khuẩn YBQ75

Kết quả phân tích trình tự gen 16S rRNA và so sánh với các trình tự gen đã công bố trên GenBank bằng công cụ BLAST (NCBI) cho thấy: chuỗi nucleotide của gen 16S rRNA của chủng YBQ75 có độ tương đồng cao (100%) so với gen tương ứng của chủng *S. cavourensis* (Bảng 3). Kết hợp với kết quả so sánh các đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa theo khoa với khóa phân loại ISP (Nomomura, 1974) và Bergey (Stanley *et al*., 1989), do vậy chủng xạ khuẩn này được đặt tên là *Streptomyces cavourensis* YBQ75. Theo các công bố, loài *S. cavourensis* được phát hiện lần đầu tiên vào năm 1958 (Giolitti, 1958). Đây là loài xạ khuẩn có khả năng sinh kháng sinh tương đồng với penicillin và ức chế nhiều loại nấm gây bệnh. Ngoài ra, *S. cavourensis* còn có khả năng sinh erythromycin là kháng sinh nhóm macrolide có phổ ức chế VSV rộng (Berdy, 2005).

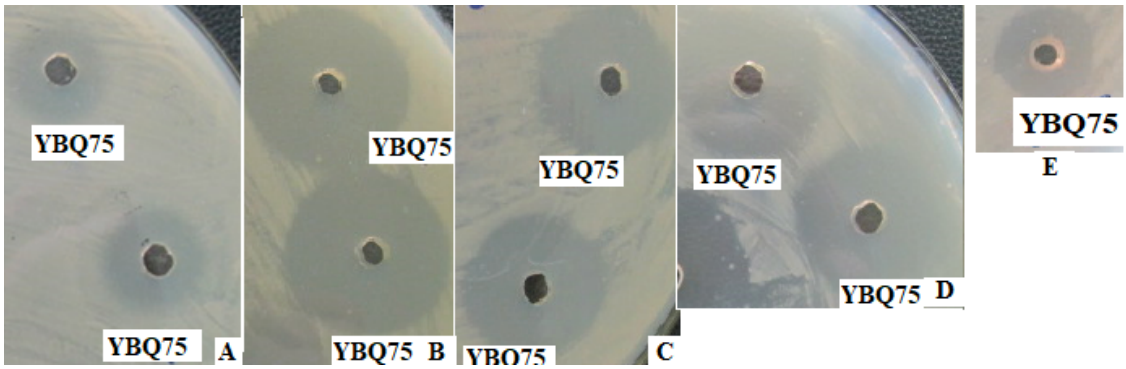
Bảng 3. Kết quả so sánh trình tự gen mã hóa 16S rRNA của chủng YBQ75 với gen tương ứng của các chủng vi khuẩn được đăng ký trên ngân hàng cơ sở dữ liệu GenBank.

Trình tự 16S rDNA của chủng xạ khuẩn được so sánh	Mã số truy cập trên GenBank	Độ tương đồng (%)
Streptomyces cavourensis NRRL 2740	NR 043851.1	100
Streptomyces sp. *CAI* 24	JN 400112.1	99
Streptomyces sp. LEN01	HM 018079.1	99
Streptomyces sp. NCCP-1327	LC 065354.1	99

Khả năng kháng vi sinh vật kiểm định của chủng YBQ75

Trong 9 chủng VSV thử nghiệm, chủng YBQ75 có khả năng ức chế 5/9 chủng VSV kiểm định như *P. aeruginosa* CNLM (19,3 ± 0,06); *S. epidermidis* ATCC 12228 (19,3 ± 0,12); *P. vulgaris* CNLM (16,3± 0,28); *S. enterica* ATCC 14028 (22,0 ± 0,15); *E. aerogenes* ATCC 13048 (17,7 ± 0,35). Đặc biệt kháng rất mạnh đối với các chủng *S. epidermidis* ATCC 12228 với đường kính kháng khuẩn cao nhất là 22 mm (± 0,35) và *P. aeruginosa* CNLM, *S. epidermidis* ATCC 12228 có vòng kháng khuẩn 19,3 mm (± 0,12) (Hình 2), trong đó *P. aeruginosa* là VSV gây bệnh, ký sinh trên người và người bệnh, gây viêm và các bệnh truyền nhiễm. Theo kết quả nghiên cứu của Skarbek, Brady (1978), phân lập và tuyển chọn chủng *S. cavourensis* AUW-83 cũng có khả năng kháng mạnh chủng *S. aureus* NRRL B-313 thuộc chi *Staphylococcus* nhưng không có báo cáo về khả năng kháng *Pseudomonas* như chủng YBQ75.

Nhiều kết quả nghiên cứu đã khẳng định khả năng kháng VSV của các chủng xạ khuẩn nội sinh. Nghiên cứu của Li *et al.,* (2012) đã công bố các chủng xạ khuẩn thể hiện phổ kháng khuẩn rộng đối với các VSV kiểm định. Tại Việt Nam, rất ít nghiên cứu về khả năng kháng VSV kiểm định của xạ khuẩn nội sinh trên cây dược liệu được công bố, đặc biệt với cây quế. Từ đây hứa hẹn xạ khuẩn nội sinh là nguồn sinh kháng sinh có nhiều ứng dụng trong tương lai.



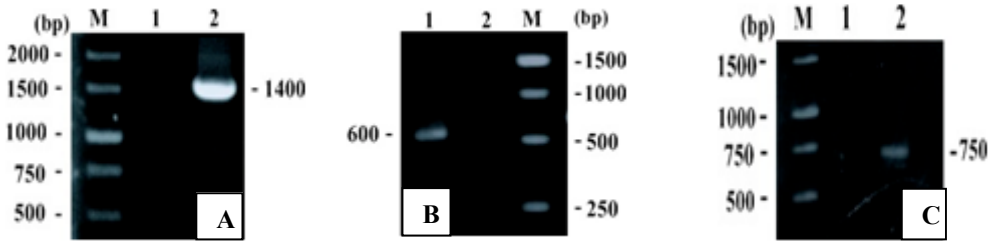
Hình 2. Hoạt tính kháng *P. vulgaris* CNLM (A); *Salmonella enterica* ATCC 14028 (B); *P. aeruginosa* CNLM (C); *S epdermidis* ATTC 12228 (D) và *E. aerogenes* ATCC 13048 (E) của chủng xạ khuẩn YBQ75.

Xác định gen mã hóa PKS và NRPS của chủng xạ khuẩn YBQ75

Phân tích gen mã hóa PKS, NRPS không những dự đoán con đường tổng hợp kháng sinh mà còn cho phép xác định quá trình hình thành gen mã hóa sinh kháng sinh trong chuỗi phản ứng sinh hóa, trao đổi chất của vật chủ. 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 chủng YBQ75. Kết quả hình 3 cho thấy, sản phẩm khuếch đại gen *pks* của chủng xạ khuẩn bằng phản ứng PCR cho một băng DNA duy nhất có kích thước 1400 bp (PKS-I), 600 bp (PKS-II) và băng DNA mã hóa gen *nrps* là 750 bp, tương ứng với kích thước mong đợi khi thiết kế mồi khuếch đại gen *pks-I, pks-II, nrps*.

Năm 2012, Li và đồng tác giả đã phân lập xạ khuẩn nội sinh trên cây ngải cứu (*Artemisia annua*)

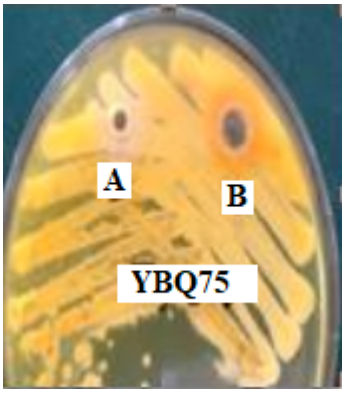
thu thập từ rừng mưa nhiệt đới tại Xishuangbanna, tỉnh Vân Nam, Trung Quốc cũng đã phát hiện các chủng xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces* có khả năng mang các gen *pks-I, pks-II, nrps* cao hơn so với các VSV nội sinh khác (Li *et al*., 2012). Kết quả nghiên cứu chứng tỏ chủng xạ khuẩn YBQ75 có tiềm năng sinh tổng hợp kháng sinh vì mang cả 3 gen chức năng.



Hình 3. Điện di đồ sản phẩm PCR khuếch đại gen *pks-I* (A) và *pksS-II* (B) và *nrps* (C) trên gel agarose 1,0%: M. DNA chuẩn (1kb); 1. Đối chứng, 2. Sản phẩm PCR chủng YBQ75.

Đánh giá khả năng sinh kháng sinh thuộc nhóm anthracyclin của chủng YBQ75

Một trong những nhóm kháng sinh có nguồn gốc từ xạ khuẩn *S. olivaceus, S. glaucescens, S. peucetius* hiện đang được sử dụng để điều trị nhiều loại ung thư thuộc nhóm anthracyclin. Đánh giá khả năng sinh anthracyclin của chủng xạ khuẩn YBQ75 dựa trên thử nghiệm biến đổi màu tại điều kiện pH acid và base (Trease, Evans, 1996). Kết quả cho thấy, chủng có thể hiện phản ứng chuyển màu da cam khi có pH acid và màu tím khi có pH kiềm. Qua phân tích sơ bộ cho thấy hợp chất do chủng xạ khuẩn YBQ75 sinh ra có thể thuộc nhóm kháng sinh anthracyclin.



Hình 4. Sự thay đổi mầu sắc theo pH môi trường (HCl 1 N -A, NaOH 2 N -B) của chủng YBQ75 tại thời điểm thử phản ứng mầu.

KẾT LUẬN

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 nội sinh trên cây quế YBQ75 được đặt tên là *Streptomyces cavourensis* YBQ75. Chủng YBQ75 thể hiện phổ kháng khuẩn rộng 5/9 chủng VSV thử nghiệm với đường kính kháng khuẩn dao động từ 16,3 đến 22,0 mm. Chủng xạ khuẩn này cũng mang 3 gen mã hóa tổng hợp kháng sinh *pks-I, pks-II* và *nrps* và có khả năng sinh kháng sinh thuộc nhóm anthracyclin (nhóm kháng sinh được sử dụng để điều trị nhiều loại ung thư). Chính vì thế, sàng lọc các chủng quý sản sinh các hợp chất có hoạt tính sinh học cao trên cây quế là hướng nghiên cứu quan trọng góp phần tìm nguồn dược liệu quý mà vẫn bảo vệ sự đa dạng tài nguyên thực vật cũng như VSV của Việt Nam.

Lời cảm ơn: *Công trình được thực hiện nhờ kinh phí của đề tài Mã số: VAST04.07/16-17 cấp Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam và hỗ trợ máy móc thiết bị thuộc Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Berdy J (2005) Bioactive metabolites. *J Antibiot* 58: 1–26.

Craig WJ (1999) Health-promoting properties of common herbs. *Am J Clin Nutr* 70: 491S–499S.

Gill AO, Holley RA (2004) Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. *Appl Environ Microb* 70: 5750–5755.

Golinska P, Wypij M, Agarkar G, Rathod D, Dahm H, Rai M (2015) Endophytic actinobacteria of medicinal plants: diversity and bioactivity. *A Van Leeuw* 108: 267–289.

Hadacek F, Greger H (2000) Testing of antifungal natural products: Methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochem Anal* 11: 137–147.

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. *Lett 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. *A Van Leeuw* 101: 515–527.

Nalini MS, Prakash (2017) Diversity and bioprospecting of actinomycete endophytes from the medicinal plants. *Appl Microbiol* 64: 261–270.

Nomomura H (1974) Key for classification and identification of 458 species of the *Streptomyces* included in ISP. *J Ferment Technol* 52(2): 78–92.

Sambrook J, Russell D (2001) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3rd. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

Shirling E, Gottlieb GD (1966) Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol* 16: 313–340.

Sirisha B, Harith R, Mohan J, Siva K, Kumar KS, Ramana T (2013) Bioactive compounds from marine actinomycetes isolated from the sediments of bay of Bengal. *IJPCBS* 3(2): 257–264.

Stanley T, Williams MG, Sharpe JG (1989) *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams and Wilkins 4: 2452–2492.

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

Trease GE, Evans WC (1996) *A textbook of Pharmacognosy*. 14th ed. Bailliere Tindall Ltd, London, 832.

Tresner HD, Buckus EJ (1963) System of color wheels for *Streptomyces* taxonomy. *Appl Environ Microb* 11: 335–338.

CLASSIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ENDOPHYTIC ACTINOMYCETES ISOLATED FROM *CINNAMOMUM CASSIA* PRESL

Vu Thi Hanh Nguyen[1], Chu Ky Son[3], Phi Quyet Tien[1,2]

[1]*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*
[2]*Graduate University of Science and Technology (GUST), Vietnam Academy of Science and Technology*
[3]*School of Biotechnology and Food Technology, Hanoi University of Science and Technology*

SUMMARY

Currently, antibiotic resistance in pathogenic bacteria is a significant clinical problem with the increase of deseases and a serious public health concern. Thus, the identification of new antimicrobial agents, especially the secondary metabolites products by endophytic actinobacteria from medical plants could be promising sources of biologically active compounds in medical fields. This study focused on identification and evaluation of antimicrobial activity against pathogens; genes involved in their secondary metabolisms, and screening of anthracycline producing capacity (mainly presented in anti-cancer antibiotics) of YBQ75 isolated from *Cinnamomum cassia* Presl. plants in Yen Bai province. Based on manual of bacterial classification, method in International *Streptomyces* Project (ISP) and the 16S rRNA gene sequence (GenBank Acc. No. KR814822), the endophytic actinomycetes YBQ75 was named *Streptomyces cavourensis* YBQ75 with 100% identity. The strain *S. cavourensis* YBQ75 showed the remarkable antibacterial activities against 5 tested pathogens (*Salmonella enterica* ATCC 14028 (22.0 mm); *Pseudomonas aeruginosa* CNLM (19.3 mm); *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (19.3 mm); *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 (17.7 mm) and *Proteus vulgaris* CNLM (16.3 mm)) in the total of 9 tested pathogens. The detection of genes involved in antibiotic synthesis indicated that the strain *S. cavourensis* YBQ75 consists of all three genes related to antibiotic synthesis including *polyketide synthase (pks-I) type I, polyketide synthase type II (pks-II)* and *nonribosomal peptide synthetase (nrps)*. Premarilly result showed that the strain *S. cavourensis* YBQ75 also present as an anthracycline productive actinomycetes. The resutls demonstrated that the endophytic actinomycetes *S. cavourensis* YBQ75 from medical plants could be promising sources for the production of antibiotics and anthracycline anticancer compounds.

Keywords: *Anthracycline, Cinnamomum cassia, endophytic actinomycetes, nonribosomal peptide synthetase, polyketide synthase, Streptomyces*