

## PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN CÁC CHỦNG XẠ KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP HỢP CHẤT TỰ NHIÊN CÓ HOẠT TÍNH SINH HỌC TẠI VƯỜN QUỐC GIA NAM CÁT TIÊN VÀ KHU SINH THÁI CAM RANH

NGUYỄN THANH SƠN

*Viện Môi trường và Tài nguyên,  
Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh*

LÊ THỊ THÚY ÁI

*Trung tâm Nghiên cứu Phát triển An toàn và Môi trường Dầu khí*

Trong tổng số hợp chất tự nhiên có nguồn gốc từ sinh vật, có khoảng 20-25% hợp chất có hoạt tính sinh học, trong đó 50% là từ vi sinh vật (Berdy J, 2005). Một trong những đối tượng quan trọng nhất trong sản xuất các hợp chất có hoạt tính là xạ khuẩn vì đa số các cấu trúc có hoạt tính sinh học đều được tìm thấy ở xạ khuẩn (Sanglier, 2005). Việc khám phá các hợp chất có hoạt tính sinh học được thực hiện rất nhiều từ những năm 1970, nhưng đến nay nó vẫn rất được quan tâm. Ngày nay, sự xuất hiện các mầm bệnh mới (HIV, Ebola, mycobacter, vi sinh vật kỵ khí...) và các vi sinh vật bệnh đa kháng thuốc đã khiến nỗ lực tìm kiếm các hợp chất mới và khai thác hoạt tính sinh học ngày càng phát triển hơn.

Việt Nam có nhiều khu hệ sinh thái đa dạng. Tiềm năng khám phá hợp chất tự nhiên từ vi sinh vật, đặc biệt là xạ khuẩn chắc hẳn không nhỏ. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu phân lập và tuyển chọn các chủng xạ khuẩn có khả năng sinh tổng hợp hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học, tiến hành định danh các chủng xạ khuẩn tiềm năng dựa trên cơ sở hình thái học và phân tích trình tự gen 16S-rRNA.

### I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 1. Vật liệu

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng 12 mẫu đất cho phân lập xạ khuẩn bao gồm 8 mẫu (RCBNP00038, RCBNP00041, RCBNP00044, RCBNP00048, RCBNP00054, RCBNP00055, RCBNP00058, RCBNP00073) thu từ Vườn Quốc gia Nam Cát Tiên và 4 mẫu (CR01A, CR01B, CR9, CR12) thu từ Khu Sinh thái Cam Ranh. Các mẫu được thu ở tầng mặt tại các vị trí khác nhau với các đặc điểm sinh thái khác nhau, được đánh giá là đặc thù bởi khu hệ thực vật đặc trưng bao gồm đất rừng, đất biên, đất bùn ao... của các khu vực sinh thái phía Nam Việt Nam..

Các chủng vi sinh vật sử dụng để thử nghiệm hoạt tính sinh học bao gồm: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Penicillium* sp., *Streptomyces* sp., *Saccharomyces cerevisiae* được cung cấp từ phòng thí nghiệm vi sinh, Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh.

Các môi trường được sử dụng trong nghiên cứu (Sanglier, 2009; Trần Linh Thuộc, 2009) gồm: Môi trường ISP-2 (phân lập, nhân mầm, nuôi cấy xạ khuẩn); môi trường A8 và A9 (phân lập và kích thích xạ khuẩn tạo bào tử); môi trường L4 (lên men và tách chiết hóa học xạ khuẩn); môi trường Gauze (quan sát hình thái xạ khuẩn); môi trường pepton (nuôi cấy vi khuẩn kiểm định); môi trường Hansen (nuôi cấy nấm men kiểm định) và môi trường PGA (nuôi cấy nấm mốc kiểm định). Ngoài ra, nghiên cứu này còn sử dụng các hóa chất để tách chiết hợp chất thứ cấp và các hóa chất tách chiết gen, PCR đoạn gen trên vùng 16S-rRNA, tinh chế sản phẩm PCR...

## 2. Thiết lập thí nghiệm

### 2.1. Phân lập xạ khuẩn

Mẫu đất được mang về phòng thí nghiệm, tiến hành phơi khô mẫu 7 ngày trong điều kiện tự nhiên. Sau đó, nhặt bỏ sỏi, đá, các xác hữu cơ và đem mẫu nghiền trong cối thủy tinh rồi tiến hành sàng qua rây có đường kính 2mm. Mẫu đất nghiền xong được đựng trong các túi nhựa PE kín và bảo quản trong tủ đông  $-35^{\circ}\text{C}$ .

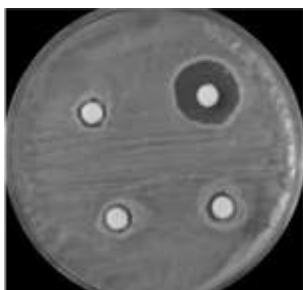
Phân lập theo phương pháp trải đĩa, môi trường ISP-2, A8, A9 được sử dụng để chọn lọc chung cho xạ khuẩn. Ngoài ra, chúng tôi còn sử dụng môi trường A8 và A9 bổ sung một trong ba loại kháng sinh Gentamycin, Tetracyclines, Kanamycin, kết hợp xử lý nhiệt ẩm ở  $65^{\circ}\text{C}$ , khoảng 30 phút trong bếp ôn nhiệt nhằm phân lập xạ khuẩn hiếm (non-*Streptomyces*).

### 2.2. Tách chiết hóa học và phân tích HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) dịch lên men

Các chủng xạ khuẩn được thuần khiết và nhân mầm trên môi trường ISP-2, chuẩn bị cho lên men thu sinh khối (MC) và dịch chiết (CF). Mỗi chủng được lên men trong 100ml môi trường L4 ở nhiệt độ  $28^{\circ}\text{C}$ , lắc trong 7-16 ngày tùy theo chủng xạ khuẩn. Sau đó, dịch nuôi cấy được tách chiết hóa học để phân tích HPLC (phương pháp sắc khí lỏng cao áp) ở hai bước sóng 254 và 214, bước đầu cho phép sàng lọc các chủng xạ khuẩn có tiềm năng sản xuất các hợp chất tự nhiên thứ cấp có hoạt tính sinh học.

### 2.3. Thử nghiệm hoạt tính sinh học

Các chủng xạ khuẩn có tiềm năng sản xuất hợp chất thứ cấp từ kết quả phân tích HPLC được tuyển chọn cho thử nghiệm hoạt tính sinh học theo mô hình đĩa giấy tẩm dịch chiết.



Vi sinh vật kiểm định

Hình 1. Mô hình đĩa giấy tẩm dịch chiết

Dịch tách chiết (MC và CF) được hòa trong methanol tinh khiết, được lọc vô trùng bằng màng lọc Whatman có đường kính  $0,2\mu\text{m}$ .

Đĩa giấy Whatman có đường kính  $6\mu\text{m}$ , được hấp khử trùng ở  $121^{\circ}\text{C}$ , 1 atm và sấy khô. Mỗi đĩa giấy tẩm  $30\mu\text{l}$  dịch chiết vô trùng.

Vi sinh vật kiểm định được hoạt hóa trên môi trường đặc trưng trước khi thử nghiệm.

### 2.4. Định danh các chủng xạ khuẩn có hoạt tính sinh học

Các chủng xạ khuẩn có hoạt tính sinh học được nuôi cấy trên môi trường ISP-2 hay A9, ở  $37^{\circ}\text{C}$ , 3-5 ngày để quan sát đại thể (hình dạng, kích thước khuẩn lạc, màu sắc bào tử, khuẩn ty khí sinh, khuẩn ty cơ chất, sự tiết sắc tố vào môi trường nuôi cấy...) và vi thể dưới kính hiển vi (hình thái cấu trúc sợi tơ và các cơ quan sinh sản ở trạng thái tự nhiên).

Cấu trúc hệ sợi bện chặt gây khó khăn cho tách chiết DNA tổng số của xạ khuẩn. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thử nghiệm phương pháp enzym kết hợp với các yếu tố lý học (nghiền, sóng siêu âm, nhiệt độ...) để thu nhận DNA tổng số. Sau đó, sử dụng cặp mồi S5 (mồi xuôi, CACTCTGGGACAAGCCCTGGA) và S6 (mồi ngược, CACGTGTGCCAGCCC AAGACAT) để nhân bản một phần gen 16S-rRNA. Chu trình phản ứng thiết lập: 1 chu kỳ ở  $95^{\circ}\text{C}$ -4 phút; 30 chu kỳ gồm có:  $94^{\circ}\text{C}$ -1 phút,  $54^{\circ}\text{C}$ -45 giây và  $72^{\circ}\text{C}$ -1 phút 45 giây; 1 chu kỳ ở  $72^{\circ}\text{C}$ -10 phút; tổng thể tích phản ứng là  $100\mu\text{l}$ . Sản phẩm phản ứng PCR được điện di

kiểm tra trên gel agarose 1% với thang DNA 1kb (Fermentas, Đức) và được tinh chế theo hướng dẫn của kit EZ-10 Spin Column. Sau đó, sử dụng môi S5 để giải trình tự một phần gen 16S-rRNA.

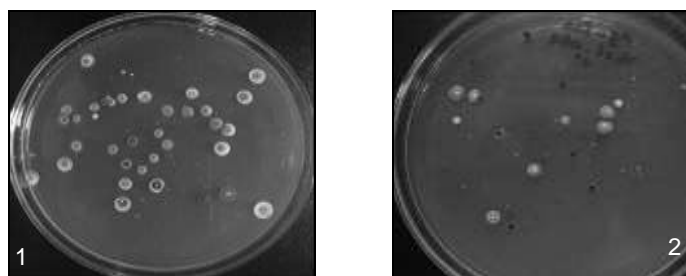
## II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 1. Phân lập xạ khuẩn

Để phân lập hiệu quả xạ khuẩn, chúng tôi đã thực hiện nhiều cách tiếp cận. Xạ khuẩn là nhóm chịu nhiệt tốt nên các mẫu đất dùng phân lập đã được xử lý nhiệt để giảm thiểu các đối tượng không mong muốn như vi khuẩn, nấm mốc. Kết quả xử lý nhiệt ẩm ở 65°C trong 30 phút tỏ ra hiệu quả. Ngoài ra, môi trường phân lập ngoài các kháng sinh cơ bản được khuyến cáo sử dụng nhằm ức chế vi khuẩn gram âm và kháng nấm, chúng tôi còn kết hợp bổ sung các kháng sinh khác như Tetracyclines, Gentamycin, Kanamycin nhằm thu nhận đặc hiệu các xạ khuẩn hiếm.

Theo các tài liệu khoa học, môi trường ISP-2 và A8 là môi trường có tính đại diện được sử dụng để phân lập. Kết quả nghiên cứu cho thấy ISP-2 không mang lại kết quả mong đợi, sau 3 tuần trải mẫu phân lập, có rất ít xạ khuẩn được quan sát (1-3 khuẩn lạc). Trong khi đó, trên môi trường A8, khá nhiều khuẩn lạc xạ khuẩn kích thước lớn, giàu bào tử xuất hiện, chủ yếu là nhóm khuẩn lạc màu nâu đến xám (đặc trưng cho *Streptomyces*) và các khuẩn lạc đen, kích thước rất nhỏ và khó phát hiện. Để thu nhận được các chủng loài đa dạng, môi trường A9 đã được thử nghiệm. Kết quả phân lập trên môi trường A9 rất thú vị: Rất đa dạng các loại khuẩn lạc xạ khuẩn (đa dạng về kích thước đến màu sắc), môi trường trong suốt rất dễ quan sát các khuẩn lạc nhỏ. Theo chúng tôi đây là môi trường thú vị nhất để sàng lọc xạ khuẩn (hình 2).

Từ 12 mẫu đất sử dụng, chúng tôi đã phân lập hơn 100 chủng khác nhau về đặc tính khuẩn lạc (màu sắc khuẩn lạc, cấu trúc hệ sợi, sự phát triển của khuẩn ty, sự tiết sắc tố...). Trong nghiên cứu này, chúng tôi chỉ tuyển chọn 41 chủng điển hình để khảo sát khả năng tổng hợp các hợp chất có hoạt tính sinh học.



Hình 2. Kết quả phân lập trên mẫu đất RCBNP00054 sử dụng các chất kháng sinh kết hợp với xử lý nhiệt ẩm

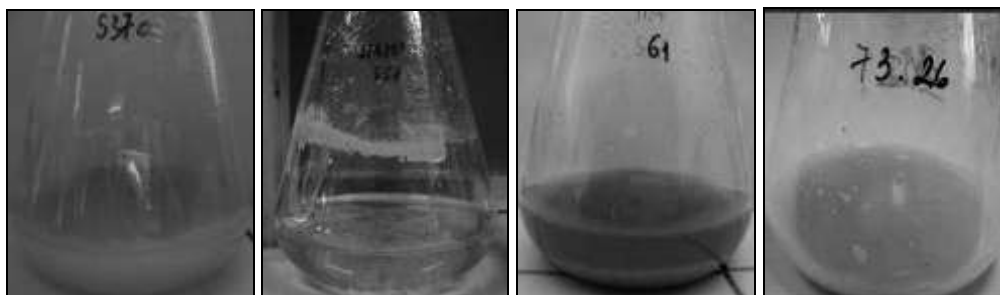
1. Môi trường A9, bổ sung kháng sinh cơ bản và Tetracyclines.
2. Môi trường A9, bổ sung kháng sinh cơ bản và Gentamycin.

### 2. Phân tích HPLC

41 chủng xạ khuẩn được tuyển chọn để nhân mầm và lên men, tạo nguyên liệu cho phân tích HPLC. Tuy nhiên, các chủng tuyển chọn đều không phát triển hay phát triển rất yếu trong môi trường nhân mầm L4 (theo khuyến cáo). Do đó, chúng tôi đã tiến hành thử nghiệm điều kiện tối ưu cho các chủng này. Môi trường A9 và ISP-2 được sử dụng thử nghiệm. Kết quả cho thấy các chủng có kích thước khuẩn lạc lớn phát triển tốt trong A9 và tốt hơn trong ISP-2. Các chủng có kích thước nhỏ vẫn chưa thể tăng sinh từ việc cấy mầm 1 hoặc 2 khuẩn lạc. Để khắc

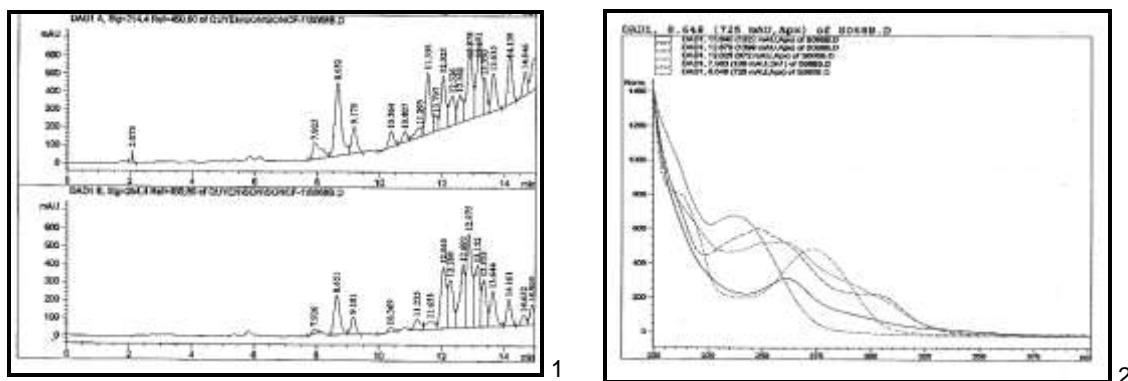
phục, sinh khối xạ khuẩn được cấy tích lũy trên môi trường thạch ISP-2, sau 5-7 ngày thực hiện cấy mầm với sinh khối khoảng 1/4-1/2 trên đĩa thạch.

Quá trình lên men dự đoán kéo dài từ 7-16 ngày (hình 3) tùy theo khả năng phát triển nhanh hay chậm và khả năng làm đổi màu môi trường lên men do sắc tố tiết. Thể tích lên men: 100ml môi trường L4, nhiệt độ 28°C và tốc độ lắc 120 vòng/phút. Ở các chủng thể hiện tiềm năng sinh tổng hợp các hợp chất thú vị sẽ được tối ưu hóa về điều kiện lên men và thời gian thu mẫu.



Hình 3. Các chủng xạ khuẩn lên men trong 100ml môi trường L4

Sau lên men, mẫu được tách thành hai pha (pha rắn-MC và pha lỏng-CF) bằng phương pháp ly tâm. MC được chiết xuất với methanol, CF được chiết xuất với ethyl acetate, sau đó được cô đặc và qua lọc trước khi phân tích HPLC. Biểu đồ sắc ký HPLC thể hiện đỉnh hấp thụ cực đại của một hợp chất (hay cấu trúc) tại thời gian lưu nhất định (retention time). Kết quả nghiên cứu cho thấy có 23 chủng xạ khuẩn có tiềm năng sản xuất các hợp chất tự nhiên có hoạt tính trong số 41 chủng được phân tích hóa học. Đặc biệt, 2 chủng S-68 và S-91 được xem là “rất thú vị” vì sản xuất khá nhiều hợp chất có đỉnh hấp thụ với thời gian lưu khác biệt (khi phân tích phân đoạn dịch thể) và phổ hấp thụ UV khá rõ (hình 4).



Hình 4. Kết quả phân tích HPLC mẫu dịch thể chủng S-68

1. Biểu đồ sắc ký HPLC; 2. Phổ hấp thụ UV

### 3. Thử nghiệm hoạt tính sinh học

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tuyển chọn 8 chủng tiêu biểu, có sự đa dạng về nguồn gốc sinh thái và chủng loài (S-37a, Tr-41.2, S-54, S-57, S-61, S-68, Tr-73.26, S-91) từ 23 chủng có kết quả thú vị khi phân tích HPLC để tiến hành thử nghiệm hoạt tính sinh học. MC và CF của các chủng tuyển chọn được thử nghiệm hoạt tính ức chế phát triển các vi sinh vật kiểm định

(theo mô tả phần vật liệu) theo phương pháp mô hình đĩa giấy tẩm dịch chiết. Với mỗi vi sinh vật kiểm định, chúng tôi thử nghiệm đối chứng với methanol. Kết quả thí nghiệm đối chứng đều “âm tính”, nghĩa là methanol không ức chế vi sinh vật kiểm định.

Kết quả khảo sát hoạt tính sinh học được tổng hợp ở bảng 1. Hầu hết các chủng đều thể hiện hoạt tính kháng vi khuẩn gram dương (*Bacillus subtilis*, *Streptomyces* sp.), tất cả không ức chế vi khuẩn gram âm (*Escherichia coli*), chỉ có một trường hợp ức chế nấm mốc (*Penicillium* sp.) và một trường hợp ức chế nấm men (*Saccharomyces cerevisiae*). Đáng chú trọng là các chủng thể hiện khả năng ức chế mạnh nhiều nhóm vi sinh vật như: **S-54**, ức chế vi khuẩn gram dương, nấm mốc và xạ khuẩn *Streptomyces*; **S-91**, ức chế vi khuẩn gram dương, nấm men và xạ khuẩn; **S-68** và **Tr-73.26** ức chế vi khuẩn gram dương và *Streptomyces*. Kết quả này khá phù hợp với kết quả phân tích hóa học bằng sắc ký HPLC, chủng S-68 và S-91 được xem là rất tiềm năng vì sản xuất nhiều hợp chất và có phổ hấp thụ UV tốt.

Bảng 1

**Khả năng ức chế vi sinh vật kiểm định của 8 chủng xạ khuẩn chọn lọc**

Chủng xạ khuẩn	Đường kính vòng ức chế sự phát triển của vi sinh vật kiểm định (mm)									
	<i>Escherichia coli</i>		<i>Bacillus subtilis</i>		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		<i>Penicillium</i> sp.		<i>Streptomyces</i> sp.	
	MC	CF	MC	CF	MC	CF	MC	CF	MC	CF
S-37a	-	-	9	9	-	-	-	-	-	-
Tr-41.2	-	-	9	9	-	-	-	-	-	-
S-54	-	-	11	10	-	-	27	-	15	-
S-57	-	-	24	-	-	-	-	-	7	-
S-61	-	-	9	7	-	-	-	-	-	8
S-68	-	-	11	23	-	-	-	-	14	-
Tr-73.26	-	-	8	10	-	-	-	-	7	12
S-91	-	-	8	18	10	34	-	-	11	-

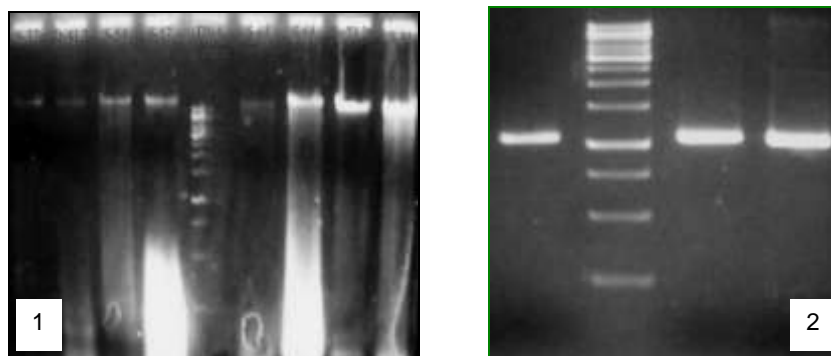
Ghi chú: Thể tích cho vào đĩa giấy là 30µl; (-): Không ức chế.

#### 4. Định danh chủng xạ khuẩn có hoạt tính sinh học

Quan sát hình thái 8 chủng xạ khuẩn cho thấy: Trên môi trường ISP-2 và A9, 6 chủng có kích thước khuẩn lạc lớn, khuẩn ty phát triển mạnh, màu sắc thay đổi từ trắng đến xám và nâu; hai chủng S-37a và S-57 có khuẩn lạc phát triển hạn chế, màu nâu và đen. Khi quan sát hình thái hiển vi, các chủng có kích thước rất nhỏ nên rất khó quan sát hệ sợi và cấu trúc sinh bào tử. Kết quả, chúng tôi chỉ quan sát được 4 chủng trên kính hiển vi (S-57, S-61, Tr-73.26, S-91), các chủng này đều có cấu trúc cơ quan sinh bào tử dạng sợi thẳng ngắn và xoắn, là cấu trúc điển hình của *Streptomyces*. Tuy nhiên, để định danh chính xác đến mức giống hay loài thì cần phải kết hợp với các phương pháp khác như thông tin về trình tự phân tử bảo tồn 16S-rRNA.

Cả 8 chủng được tách chiết genome thành công theo phương pháp nghiền cơ học và nhiệt độ cao để phá vỡ tế bào. Sau đó, DNA bộ gen được nhân bản PCR một phần vùng 16S-rRNA với cặp mồi S5 và S6 lần lượt tương ứng với vị trí trên gen là 170 và 1281. Sản phẩm PCR có kích thước khoảng 1100bp (hình 4), được xem là chứa vùng biến động nhất (khoảng 32bp gần đầu phía 5') ở xạ khuẩn theo kết quả thống kê trên tất cả các trình tự gen mã hóa 16S-rRNA của

xạ khuẩn trong ngân hàng gen (thực hiện bởi nhóm Sinh-Tin). Trong nghiên cứu này, chúng tôi chỉ nhận bản được 3 trình tự trong tổng số 8. Vậy 5 trường hợp không khuếch đại được có thể giải thích: Do nồng độ DNA bản mẫu chưa thích hợp và chất lượng DNA chưa thật sự tốt, hoặc do trình tự mỗi thiết kế chưa mang tính phổ quát. Các trường hợp này cần được khảo sát thêm để tối ưu cho phản ứng PCR và mỗi phổ quát dùng cho khuếch đại 16S-rRNA ở vi khuẩn nói chung.



Hình 5. Kết quả điện di trên gel agarose 1%

1. DNA tổng số; 2. Sản phẩm PCR một phần gen 16S-rRNA

Tất cả các sản phẩm PCR của 3 chủng S-54, S-61 và S-91 được tiến hành tinh sạch qua cột EZ-10 Spin (theo trình bày ở phần phương pháp) trước khi giải trình tự gen. Vì vùng biến động (32bp) nằm ở vị trí gần đầu 5' của sản phẩm 1100bp, nên chúng tôi chỉ thực hiện giải trình tự một chiều với mỗi xuôi S5. Trình tự được giải mã dự đoán khoảng 600bp, đủ để bước đầu xác định vị trí phân loại của các chủng xạ khuẩn quan tâm. Kết quả cho thấy hơn 600bp được giải mã với tín hiệu tốt được sử dụng để so sánh trong ngân hàng gen (NCBI). Trên NCBI, các chủng xạ khuẩn được giải trình tự có độ tương đồng cao (99%) được đề nghị cho loài *Streptomyces galbus* (chủng S-61) và loài *Streptomyces pulveraceus* (chủng S-91). Riêng chủng S-54 có 2% khác biệt được xem là trường hợp thú vị để định danh loài mới.

### III. KẾT LUẬN

Kết hợp một số phương pháp khác nhau như: Xử lý nhiệt ẩm mẫu đất, chọn lựa môi trường thích hợp, bổ sung kháng sinh kháng khuẩn và nấm mốc..., kết quả phân lập đã thuần khiết được hơn 100 chủng xạ khuẩn rất đa dạng về đặc tính khuẩn lạc và chỉ tuyển chọn lại 41 chủng để nghiên cứu. Khi phân tích HPLC, chúng tôi sàng lọc được 23 chủng xạ khuẩn có tiềm năng sản xuất các hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học và đã tuyển chọn được 8 chủng có “tiềm năng nhất” là S-37a, Tr-41.2, S-54, S-57, S-61, S-68, Tr-73.26, S-91 để thử nghiệm hoạt tính sinh học trên các vi sinh vật kiểm định cơ bản. Hầu hết các chủng đều thể hiện hoạt tính kháng vi khuẩn gram dương, tất cả không ức chế vi khuẩn gram âm, chỉ có một trường hợp ức chế nấm mốc và một trường hợp ức chế nấm men.

Quan sát hình thái cho thấy cấu trúc của 8 chủng khảo sát chủ yếu điển hình cho *Streptomyces*. Tiến hành thử nghiệm quy trình tách DNA bộ gen xạ khuẩn, kết quả bước đầu cho phép thu nhận DNA của 8 chủng chọn lọc. Chỉ có 3 trong 8 trường hợp thành công trong việc nhân bản một phần gen mã hóa 16S-rRNA. Vậy chất lượng DNA tách chiết và độ đặc hiệu oligo làm mồi cho phản ứng PCR cần được khảo sát thêm. Giải mã và phân tích một phần trình tự gen 16S-rRNA của các chủng S-61, S-91 cho phép dự đoán chúng lần lượt là *Streptomyces galbus*, *Streptomyces pulveraceus*. Riêng chủng S-54 cần được nghiên cứu thêm để xác định loài mới.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Baltz Richard H.**, 2007. Antimicrobials from Actinomycetes: Back to the Future. Vol. 2 (3): 125-130.
2. **Berdy J.**, 2005. The Journal of Antibiotics, 5: 1-26.
3. **Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Đình Quyến, Phạm Văn Ty**, 1998. Vi sinh vật học. NXB. Giáo dục, tr.: 38-41.
4. **Nguyễn Lâm Dũng, Phạm Thị Trân Châu, Nguyễn Thanh Hiền, Lê Đình Lương, Đoàn Xuân Mượu, Phạm Văn Ty**, 1978. Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học. NXB. KHKT, Tập 2: 160-175.
5. **Nguyễn Đức Lượng**, 1996. Công nghệ vi sinh vật. Trường Đại học Bách khoa thành phố Hồ Chí Minh, tập 1.
6. **Sanglier**, 2005. The Actinomycetes: Characteristics, isolation and selection.
7. **Sanglier**, 2009. About cultivation of Actinomycetes.
8. **Trần Linh Thuốc, Lê Thị Thúy Ái, Nguyễn Mỹ Phi Long, Phạm Phú Phùng**, 2009. Thực tập vi sinh năm IV. Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh, tr.: 16-22.

## ISOLATION AND SELECTION OF ACTINOMYCETES STRAINS SYNTHESIS BIOACTIVE NATURAL PRODUCTS IN NAM CAT TIEN NATIONAL PARK AND CAM RANH ECOPARK

NGUYEN THANH SON, LE THI THUY AI

### SUMMARY

More than 100 actinomycetes colonies were isolated from 12 soil samples of the Nam Cat Tien National Park and Cam Ranh Ecopark in Vietnam. Among them, 41 actinomycetes strains with different colony characteristics (i.e. color, size, aerial and substrate mycelia formation, secretion of pigment in the culture medium...) were cultured in the L4 medium for HPLC analysis. The result has showed that only 23 strains can synthesis bioactive natural products.

8 among 23 strains were selected depending on HPLC analysis such as S-37a, Tr-41.2, S-54, S-57, S-61, S-68, Tr-73.26, S-91 for assay to determine bioactivity. The result has showed that most of them were bioactive against gram-positive bacteria (*Bacillus subtilis*, *Streptomyces* sp.), but not for gram-negative bacteria (*Escherichia coli*); one strain was tolerant mold (*Penicillium* sp.), and other one was tolerant yeast (*Saccharomyces cerevisiae*).

The name of these species was identified based on morphology and molecular information on the 16S-rRNA region. The results have indicated that S-61 was named *Streptomyces galbus* and S-91 strain was *Streptomyces pulveraceus*. S-54 strain should be studied in more detail with expectation of a new species for science.