

Xạ khuẩn nội sinh *Streptomyces parvulus* HNR3X4 trên cây bưởi Diễn Hà Nội và tiềm năng sinh tổng hợp chất kháng khuẩn

Phan Thị Hồng Thảo^{1,*}, Nguyễn Vũ Mai Linh¹,
Nguyễn Thị Hồng Liên¹, Nguyễn Kiều Băng Tâm², Nguyễn Văn Hiếu¹

¹*Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VAST),
18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam*

²*Khoa Môi trường, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN, 334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam*

Nhận ngày 28 tháng 5 năm 2016

Chỉnh sửa ngày 25 tháng 6 năm 2016; Chấp nhận đăng ngày 06 tháng 9 năm 2016

Tóm tắt: Xạ khuẩn nội sinh tồn tại trong mô thực vật có tiềm năng sinh tổng hợp nhiều hoạt chất sinh học quý, trong đó đáng chú ý là các chất kháng khuẩn, có tiềm năng ứng dụng trong công tác bảo vệ thực vật bằng biện pháp sinh học, dần thay thế hóa chất bảo vệ thực vật, giảm thiểu nguy cơ ô nhiễm môi trường và nâng cao chất lượng nông sản. Trong nghiên cứu này, 45 chủng xạ khuẩn nội sinh được phân lập từ các cây bưởi Diễn Hà Nội được nghiên cứu đặc điểm sinh học và khả năng đối kháng với các chủng vi sinh vật kiểm định. Trong số đó, chủng HNR3X4 thể hiện hoạt tính sinh học cao, kháng vi khuẩn Gram âm, Gram dương và một số chủng nấm gây bệnh *G. candidum*, *F. oxysporum* và *F. udum* kiểm định. Xạ khuẩn HNR3X4 sinh trưởng tốt trên nhiều loại môi trường nuôi cấy với nhiệt độ phát triển từ 15÷45⁰C và pH 4÷9, sinh ra nhiều chuỗi bào tử dài dạng xoắn lò xo, với số lượng bào tử trên một chuỗi từ 10-50 bào tử có cấu trúc bề mặt nhẵn. Dựa vào nghiên cứu đặc điểm sinh học và phân tích trình tự gen 16S rDNA, chủng HNR3X4 có độ tương đồng cao 99% với các chủng *Streptomyces parvulus*, do đó được đặt tên là *S. parvulus* HNR3X4. Chủng HNR3X4 sinh tổng hợp hoạt chất kháng khuẩn cao nhất trên môi trường Gause I, ở pH 7 và nhiệt độ 37 °C.

Từ khóa: Xạ khuẩn nội sinh, phân loại xạ khuẩn, 16S rDNA, *Streptomyces parvulus*, chất kháng khuẩn.

1. Mở đầu

Vi sinh vật nội sinh là các vi sinh vật sinh sống ở các mô bên dưới lớp tế bào biểu bì của cây mà không gây ra các triệu chứng bệnh cho cây chủ [1]. Trong số các loài vi sinh vật, xạ

khuẩn nấm giữ vị trí quan trọng do sự đa dạng cao, khả năng sinh tổng hợp nhiều loại enzym và thuốc kháng sinh dùng trong nông nghiệp và y học. Xạ khuẩn nội sinh cư ngụ không những không gây bệnh cho cây chủ mà còn có khả năng thúc đẩy sự phát triển của cây chủ bằng con đường đồng hóa các chất dinh dưỡng như hòa tan phosphat, cố định nitơ tự do, hay sinh tổng hợp các hooc-môn thực vật, cung cấp các

* Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-916329586
Email: pthongthao@ibt.ac.vn

loại vitamin giúp cây tăng trưởng tốt hơn [2]. Ngoài ra, xạ khuẩn nội sinh còn có khả năng kiểm soát bệnh dịch cho cây chủ dựa trên một số cơ chế như đối kháng (antibiosis) như: sinh chất kháng sinh, sinh tổng hợp các enzym phân hủy thành tế bào của nấm bệnh, cạnh tranh về dinh dưỡng, nơi cư trú và kích thích tính chống chịu hệ thống của cây chủ [3, 4]. Gần đây đã có nhiều nghiên cứu về khả năng sinh tổng hợp các chất thứ cấp, có hoạt tính sinh học từ các loài xạ khuẩn nội sinh [5]. Điều này cho thấy xạ khuẩn nội sinh thực sự là những ứng cử viên tiềm năng trong tìm kiếm các chất kháng sinh mới, nhằm kiểm soát dịch bệnh cho cây theo hướng thân thiện môi trường và phát triển các sản phẩm thuốc mới dùng cho người và động vật. Bài báo này sẽ tập trung chủ yếu về các kết quả phân lập xạ khuẩn nội sinh trong cây Bưởi Diễn – Hà Nội, đồng thời định danh và nghiên cứu các đặc điểm sinh học và khả năng sinh tổng hợp hoạt chất kháng khuẩn của xạ khuẩn HNR3X4.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu và môi trường nuôi cấy

- Các mẫu thực vật (rễ, cành) của cây Bưởi Diễn Hà Nội.

- Nấm và vi khuẩn kiểm định: *G. candidum* VSVĐ 5, *F. oxysporum* FO5, *F. udum* VSVĐ 2 và *B. subtilis* ATCC 6633 từ bộ sưu tập giống của phòng Vi sinh vật đất. Vi khuẩn kiểm định *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 và *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 nhận từ Viện Kiểm nghiệm thuốc. Các đoạn môi khuếch đại gen 16S rDNA do Invitrogen (Hồng Kông) cung cấp.

-Môi trường nuôi cấy và phân loại: Các môi trường theo ISP (International *Streptomyces* Project) [6] và khóa phân loại Bergey [7] được sử dụng để nuôi cấy và phân loại xạ khuẩn. Môi trường thạch khoai tây (PDA) được sử dụng để nuôi cấy nấm kiểm định.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phân lập các chủng xạ khuẩn nội sinh

Mẫu thực vật sau khi được xử lý, làm sạch và phân lập theo Shutsrirung và cộng sự [8]. Các đĩa phân lập được ủ ở 28°C trong 15÷60 ngày. Các mẫu xạ khuẩn được thuần khiết và giữ trên môi trường ISP2 và sử dụng trong các nghiên cứu tiếp theo.

Nghiên cứu đặc điểm hình thái

Nghiên cứu đặc điểm sinh học theo phương pháp trong ISP (1974) và khóa phân loại Bergey [6,7]. Màu sắc của khuẩn ty cơ chất (KTCC), khuẩn ty khí sinh (KTKS) và sắc tố tan tiết ra môi trường được đánh giá theo Shirling và Gottlieb (1966) trên bảng màu của Tresner & Backus [9,10]. Hình dạng cuống sinh bào tử và bào tử được quan sát và chụp ảnh dưới kính hiển vi điện tử JSM-5000.

Tách chiết DNA và phân tích trình tự gene 16S rRNA

Phương pháp tách chiết DNA được tiến hành theo Sambrook và Russell [11]. Gen mã hóa 16S rRNA của chủng xạ khuẩn được khuếch đại bằng phản ứng PCR từ DNA tổng số bằng cặp mồi 27f (5'-TAACACATGCAAGTCGAACG-3') và 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') và tiến hành theo Shutsrirung và cộng sự [8]. Trình tự nucleotide của gen 16S rRNA được phân tích dựa trên dữ liệu Ngân hàng gen của NCBI. Độ tương đồng về trình tự được xác định và so sánh với các trình tự khác được so sánh trên ngân hàng GenBank bằng BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov). Mức độ tương đồng di truyền của các chủng được xây dựng dựa trên phần mềm CLC DNA workbench 6.6.

Đánh giá khả năng đối kháng với vi sinh vật kiểm định

Các chủng xạ khuẩn phân lập được kiểm tra dựa trên khả năng đối kháng của các chủng này với một số chủng nấm và vi khuẩn Gram (+) và Gram (-) kiểm định bằng phương pháp thoi thạch và phương pháp khuếch tán trên thạch. Khả năng đối kháng được đánh giá dựa trên vòng ức chế vi khuẩn và nấm kiểm định [12].

3. Kết quả

3.1. Phân lập xạ khuẩn nội sinh từ cây bưởi Diễn – Hà Nội

Trên tổng số 10 mẫu cành, rễ và lá của 10 cây bưởi diễn thu thập tại địa bàn Hà Nội đã phân lập được 45 chủng xạ khuẩn, trong đó xạ khuẩn nội sinh thu được ở các mẫu rễ có số lượng khuẩn lạc xạ khuẩn thu được (19 chủng chiếm 42,2%) nhiều hơn và đa dạng hơn các mẫu cành (12 chủng chiếm 26,6 %) và mẫu lá (14 chủng chiếm 31,1 %). Nghiên cứu đặc điểm nuôi cấy trên các môi trường ISP từ 1 ÷ 8, kết quả cho thấy, số lượng xạ khuẩn có màu vàng là chiếm chủ yếu (57,78 %), đứng thứ 2 là nhóm xám (31,1 %), nhóm nâu chiếm 4,4 %, xanh chiếm 2,2 % và nhóm không xác định (bề mặt khuẩn ty khí sinh không rõ) chiếm 4,4%. Trong số 45 chủng xạ khuẩn phân lập chỉ có chủng HNR3X4 sinh sắc tố melanine.

3.2. Khả năng đối kháng của xạ khuẩn phân lập

Trong số 45 chủng xạ khuẩn nội sinh phân lập có 12 chủng thể hiện khả năng kháng ít nhất một trong các chủng vi sinh vật kiểm định

(chiếm 26,67 %). Đặc biệt trong số đó chủng HNR3X4 (xạ khuẩn nội sinh tách từ rễ) thể hiện khả năng đối kháng với nhiều chủng vi sinh vật kiểm định đặc biệt với vi khuẩn Gram (+) *S. aureus* ATCC 25922 và *B. subtilis* ATCC 6633 (Bảng 1).

3.3. Nghiên cứu đặc điểm sinh học của chủng xạ khuẩn HNR3X4

Chủng HNR3X4 thuộc nhóm Vàng xám, sinh trưởng tốt trên hầu hết các môi trường ISP kiểm tra (ISP1-8), không sinh sắc tố trên môi trường ISP8 và không tạo sắc tố melanin (Bảng 2). Chủng HNR3X4 phát triển trong dải nhiệt độ từ 15 ÷ 45°C và pH từ 4 ÷ 10. Sinh trưởng tốt nhất ở 28°C và pH 7,0, chịu được nồng độ muối đến 3% và có khả năng phân hủy nhiều cơ chất như: chitin, casein, tinh bột, guaiacol, carboxymethyl cellulose và xylan với vòng phân hủy lần lượt là 15, 35, 11, 24, 31 và 38 mm. Chủng HNR3X4 có khả năng đồng hóa các nguồn carbon như: D-glucose, L-arabinose, sucrose, D-manitol, xylose, fructose, raffinose, rhamnose và cellulose.

Bảng 1. Hoạt tính kháng nấm và kháng khuẩn của xạ khuẩn nội sinh HNR3X4

Chủng vi sinh vật kiểm định	Kích thước vòng đối kháng (D, mm)	
	Cục thạch	Dịch chiết
<i>S. aureus</i> ATCC 25922	26 ± 0,42	25 ± 1,00
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	25 ± 0,50	25 ± 0,42
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 25932	7 ± 0,90	0
<i>G. candidum</i> VSVĐ 5	15 ± 0,81	7 ± 0,35
<i>F. oxysporum</i> FO5	17 ± 0,50	10 ± 0,76
<i>F. udum</i> VSVĐ 2	14 ± 0,32	6 ± 0,58

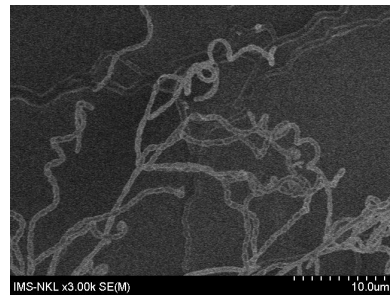
Bảng 2. Một số đặc điểm nuôi cấy của xạ khuẩn HNR3X4

Môi trường	Khuẩn ty khí sinh	Khuẩn ty cơ chất	Sắc tố	Sinh trưởng
ISP1	Vàng xám ngả vàng xám	Vàng sáng	-	++
ISP2	Vàng oliu	Vàng nâu sáng	vàng	++
ISP3	Xám oliu	Xám oliu	vàng	++
ISP4	Vàng ngả nâu	Vàng cam sáng	vàng	+++
ISP5	Vàng oliu ngả xám nhạt	Vàng đậm	vàng	++
ISP6	Vàng xám ngả xanh oliu	Vàng oliu ngả nâu	-	+
ISP7	Vàng phớt xanh ngả Xanh oliu	Vàng oliu ngả nâu	vàng	++
ISP8	Oliu ngả Xám	Vàng xám	-	++

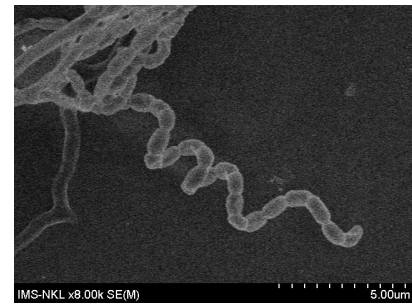
Ghi chú: Sinh trưởng: “+” kém; “++” tốt; “+++” rất tốt; (-) không sinh sắc tố.



Hình 1. Khuẩn lạc xạ khuẩn HNR3X4 trên môi trường ISP2.



a



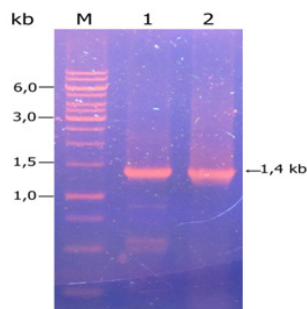
b

Hình 2. Cuống sinh bào tử (a) và bào tử (b) của xạ khuẩn nội sinh HNR3X4.

Quan sát dưới kính hiển vi điện tử với độ phóng đại 8000 lần cho thấy bề mặt bào tử của chủng HNR3X4 dạng trơn nhẵn, chuỗi bào tử thường dài với số lượng bào tử trên chuỗi từ 10-50, từ một cuống sinh bào tử có thể mọc ra 3 ÷ 4 nhánh bào tử có dạng xoắn lò xo nhẹ.

3.4. Phân tích trình tự gen 16S rDNA

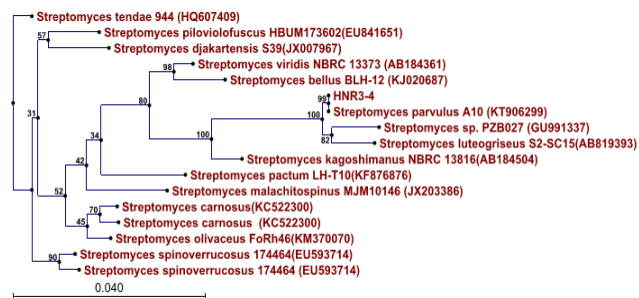
Sản phẩm khuếch đại từ DNA tổng số của chủng HNR3X4 với cặp mồi 27f và 14R cho một băng DNA duy nhất có kích thước khoảng 1400 bp (Hình 3).



Hình 3. Điện di đồ sản phẩm PCR của HNR3X4 trên gel agarose 1%.

M: Thang DNA chuẩn 300-10.000bp; 1 và 2 là sản phẩm PCR

Gen 16S rDNA của chủng HNR3-4 (1358 bp), có độ tương đồng cao (99%) với các gen tương ứng của một số xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces* (Hình 4): *S. parvulus* A10, *S. parvulus* 2297, *Streptomyces* sp PZP027 và *S. luteogriseus* S2-SC15. Như vậy, kết quả phân loại 16S rDNA cho thấy, chủng xạ khuẩn HNR3X4 có đặc điểm rất gần gũi và có độ tương đồng cao với loài *S. parvulus* nên chủng này được đặt tên là *S. parvulus* NHR3X4. Theo công bố của Naine và cộng sự (2015) xạ khuẩn *S. parvulus* là loài có khả năng sinh chất kháng khuẩn ức chế cả vi khuẩn Gram (+) và Gram (-) kiểm định [13].



Hình 4. Mức độ tương đồng di truyền giữa chủng *S. parvulus* NHR3X4 với các loài xạ khuẩn có họ hàng gần dựa vào trình tự nucleotide của gen 16S Rrna.

3.5. Lựa chọn môi trường và điều kiện thích hợp cho xạ khuẩn sinh chất kháng khuẩn

Lựa chọn môi trường

Môi trường là một trong những yếu tố quyết định, ảnh hưởng quan trọng đến sự sinh trưởng, phát triển và sinh chất kháng sinh của các chủng xạ khuẩn. Trên cơ sở một số môi trường đã được công bố sử dụng cho xạ khuẩn: SCA, Gause I, ISP 4, AH₄, môi trường khoáng có bổ sung 1% sodium propionate (KCT) ở nhiệt độ 28°C và lắc 150 vòng/phút.

Kết quả thể hiện Bảng 3 cho thấy, HNR3X4 kháng nấm cao nhất trên môi trường Gause I và cho sinh trưởng tốt nhất ở môi trường AH₄. Môi trường Gause I được lựa chọn làm môi trường sinh chất kháng sinh tốt nhất cho HNR3X4.

Ảnh hưởng của pH và nhiệt độ

Xạ khuẩn HNR3X4 được nuôi ở môi trường thích hợp được điều chỉnh pH dao động từ 6 ÷ 8, bước nhảy 0,5 bằng NaOH 1M và H₂SO₄

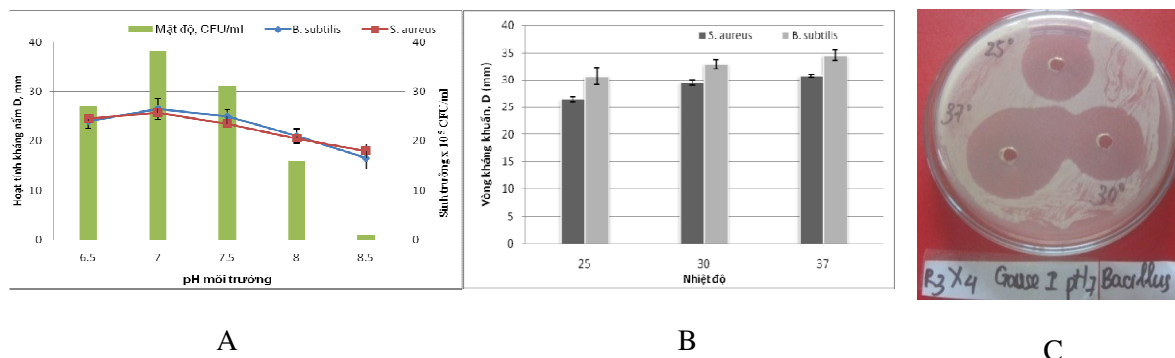
1M, lắc 150 vòng/phút trong 5 ngày. Kết quả cho thấy, chủng HNR3X4 sinh chất kháng sinh tốt nhất trên môi trường Gause I ở pH7.

Trên môi trường AH₄ với pH thích hợp và các điều kiện công nghệ giữ nguyên, tiến hành thay đổi nhiệt độ nuôi và khảo sát khả năng sinh tổng hợp hoạt chất kháng khuẩn ở nhiệt độ 25, 30 và 37°C. Kết quả ở Hình 5 cho thấy, chủng HNR3X4 sinh trưởng và sinh tổng hợp hoạt chất kháng khuẩn cao nhất ở 37°C.

pH và nhiệt độ nuôi cấy của môi trường là các yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến sản xuất chất kháng sinh của nhiều loài xạ khuẩn vì hai yếu tố này có liên quan đến hoạt tính của một số enzym quan trọng xúc tác các phản ứng trao đổi chất của tế bào và hình thành chất kháng sinh [14]. Chủng *S. parvulus* HNR3X4 trong nghiên cứu này có pH và nhiệt độ thích hợp là 7,0 và 37°C nằm trong khoảng pH và nhiệt độ thích hợp cho sinh trưởng và sinh tổng hợp chất kháng sinh được công bố từ nhiều loài *Streptomyces* sp. [15, 16].

Bảng 3. Lựa chọn môi trường thích hợp cho sinh tổng hợp chất kháng khuẩn

Môi trường	Vòng kháng khuẩn, D, mm		Mật độ (CFU/ml)
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	
SCA	22,5 ± 0,71	21,5 ± 0,71	1,1.10 ⁵
Gause 1	24,75 ± 0,35	23 ± 0,35	1,86.10 ⁶
ISP4	21,5 ± 0,71	21,5 ± 0,71	1,14.10 ⁶
AH ₄	23,5 ± 0,71	21,25 ± 1,06	5,00.10 ⁶
KCT	15 ± 1,41	12 ± 1,41	2,2.10 ⁶



Hình 5. Ảnh hưởng của pH (A), nhiệt độ môi trường (B, C) đến sinh trưởng và sinh chất kháng khuẩn của HNR3X4.

Trên môi trường thích hợp Gause I, tiến hành lên men ở các điều kiện thích hợp như nhiệt độ 37°C và pH 7,0, sau 5 ngày nuôi cấy, thu dịch chiết thô từ dịch lên men của chủng *S. parvulus* HNR3X4 bằng cách chiết trong dung môi ethyl acetate ba lần với tỷ lệ (1:1) và kiểm tra khả năng kháng khuẩn và kháng nấm. Kết quả cho thấy, hoạt chất thu được vẫn thể hiện hoạt tính kháng khuẩn mạnh với hai chủng vi khuẩn Gram (+) kiểm định ở trên, với vòng kháng đạt trên 30 mm. Tuy nhiên vòng kháng nấm nhận được giảm kích thước đáng kể từ 15 mm với nấm *F. oxysporum* FO5 xuống còn 5 mm. Kiểm tra hoạt tính phân hủy chitin cho thấy, chủng HNR3X4 có khả năng phân hủy chitin. Như vậy bước đầu có thể kết luận dịch lên men do có cả enzym phân hủy chitin và chất kháng khuẩn nên vòng kháng nấm nhận được lớn hơn so với dịch chiết thô nhận được. Tuy nhiên, cần có các nghiên cứu sâu hơn nữa để làm rõ cấu trúc của chất kháng khuẩn hay chất kháng sinh mà chúng tôi nhận được từ chủng HNR3X4, điều này sẽ mở ra một triển vọng mới trong tìm kiếm các chất kháng sinh mới trong tương lai.

4. Kết luận

1. Xạ khuẩn nội sinh HNR3X4 được phân lập từ rễ cây bưởi Diễn Hà Nội được xác định có khả năng đối kháng mạnh với vi khuẩn Gram (+) *Bacillus subtilis* và *Staphylococcus aureus*.

2. Chủng HNR3X4 có khả năng sinh tổng hợp nhiều enzyme ngoại bào vì vậy có khả năng phân hủy các cơ chất như: CMC, cơ chất tương tự lignin, tinh bột, chitin và xylan.

3. Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học và phân tích trình tự gen 16S rDNA cho thấy chủng HNR3X4 có đặc điểm gần gũi với chủng *S. parvulus* và được đặt tên là *S. parvulus* HNR3X4. Xạ khuẩn nghiên cứu có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất kháng khuẩn trên môi trường Gause I, pH =7 và nhiệt độ 37°C.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này nhận được sự hỗ trợ kính phí từ đề tài “Nghiên cứu sự đa dạng của xạ khuẩn nội sinh trên cây có múi đặc sản ở miền Bắc Việt Nam và tiềm năng sinh tổng hợp các chất kháng khuẩn và kích thích tăng trưởng thực vật của chúng” Mã số đề tài: VAST.ĐLT.12/15-16 và sử dụng trang thiết bị của phòng Thí nghiệm trọng điểm công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học.

Tài liệu tham khảo

- [1] M. Tharek, K. Dzulaikha, S. Salwani, H.G. Amir, N. Najimudin, Ascending endophytic migration of locally isolated diazotroph *Enterobacter* sp. Strain USML2 in rice, *Biotechnology*, 10 (2011) 521.
- [2] M.A. Abdalla, J.C. Matasyoh, Endophytes as Producers of Peptides: An Overview About the Recently Discovered Peptides from Endophytic Microbes, *Nat. Prod. Bioprospect.* 4 (2014) 257.
- [3] N. Malfanova, B. Lugtenberg, G. Berg, Chapter 2 in “Molecular microbial ecology of the rhizosphere”, de Bruijn FJ (ed), Wiley-Blackwell (2013).
- [4] F. Jariwala, R. Ranjan, Endophytic actinomycetes and their role protection, *Atmiya Spandan*, 1(1) (2013) 73.
- [5] B. Joseph, P. Sankarganesh, B.T. Edwin, S.J. Raj, Endophytic *Streptomyces* from Plants with Novel Green Chemistry: Review, *International Journal of Biological Chemistry* 6 (2012) 42.
- [6] H. Nomomura, Key for classification and identification of 458 species of the *Streptomyces* included in *ISP*, *J. Ferment. Technol.* 52(2) (1974) 78.
- [7] W. Wilkins, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2, Vol. 3, Vol. 4. Publisher Springer-Verlag, New York, 1989.
- [8] A. Shutsrirung, Y. Chromkaew, W. Pathom-Aree, S. Choonluchanon, N. Boonkerd, Diversity of endophytic actinomycetes in mandarin grown in northern Thailand, their phytohormone production potential and plant growth promoting activity, *Soil Science and Plant Nutrition* 59 (3) (2013) 322.
- [9] E.B. Shirling, D. Gottlieb, Cooperative description of type culture of *Streptomyces* species, *Int. J. Sys. Bacteriol.* 19(4) (1966) 391.
- [10] E.B. Shirling, D. Gottlieb, Methods for characterisation of *Streptomyces* species, *Int. J. Sys. Bacteriol.* 16(3) (1966) 313.

- [11] J. Sambrook, D.W. Russell, *Molecular cloning*. A laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 2001.
- [12] B. Intra, I. Mungsuntisuk, T. Nihira, Y. Igarashi, W. Panbangred, Identification of actinomycetes from plant rhizospheric soils with inhibitory activity against *Colletotrichum* spp., the causative agent of anthracnose disease, *BMC Research Notes* 4 (2011) 98.
- [13] J. Naine, C.S. Devi, V. Mohanasrinivasan, B. Vaishnavi, Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activity of marine *Streptomyces parvulus* VITJS11 crude extract, *S. Braz. Arch. Biol. Technol.* 58(2) (2015) 198.
- [14] J. Liang, Z. Xu, T. Liu, J. Lin, P. Cen, Effects of cultivation conditions on the production of natamycin with *Streptomyces gilvosporeus* LK-196, *Enzyme Microb. Tech.* 42 (2008) 145.
- [15] L.S. Singh, S. Mazumder, T.C. Bora, Optimisation of process parameters for growth and bioactive metabolite produced by salt-tolerant and alkaliphilic actinomycetes, *Streptomyces tanashiensis* strain A2D, *J. Mycol. Med.* 19 (2009) 225.
- [16] M.V. Arasu, V. Duraipandiyar, P. Agastian, S. Ignacimuthu, In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India), *J. Med. Mycol.* 19 (2009) 22.

Endophytic Actinomycetes *Streptomyces parvulus* HNR3X4 in Ha Noi -Dien Grapfruit Trees and the Potential to Biosynthesize Antimicrobial Substances

Phan Thi Hong Thao¹, Nguyen Vu Mai Linh¹,
Nguyen Thi Hong Lien¹, Nguyen Kieu Bang Tam², Nguyen Van Hieu¹

¹*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology (VAST),
18 Hoang Quoc Viet, Hanoi, Vietnam*

²*VNU University of Science, 334 Nguyen Trai, Hanoi, Vietnam*

Abstract: Endophytic streptomycetes colonize internal plant tissues, i.e., living under special microhabitat conditions. Endophytes were reported to have the potential to produce valuable biologically active compounds, especially antibacterial substances. Thus, endophytic streptomycetes are regarded as promising candidates for the quest of new substances for pharmaceutical and medical application. In this paper, 45 endophytic streptomycetes were isolated from Dien grapefruit trees, a specialty of Hanoi, to study their biological characteristics and antipathogen activity. Of them, the isolate HNR3X4 showed high antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, and pathogenic fungi such as *Geotrichum candidum*, *Fusarium oxysporum* and *F. udum*. This isolate could grow well on various media at a large pH range of 4 ÷ 9 and temperature range of 15 ÷ 45°C. Its spiral spore-chains bore 10 to 50 smooth spores each. Phylogenetic analysis based on 16S rDNA gene sequences indicated that strain HNR3X4 belonged to the genus *Streptomyces*, and was most closely related to *Streptomyces parvulus* A10 (99.0 % sequence similarity). Therefore, the isolate was named *S. parvulus* HNR3X4. In the shake flask culture, high antimicrobial activity of *S. parvulus* HNR3X4 was achieved in a Gause's medium I with the initial pH of 7.0 and temperature of 37 °C.

Keywords: Endophytic streptomycetes, identification of bacteria, 16S rDNA, *Streptomyces parvulus*, antibacterial activity.