

DOI:10.22144/ctu.jvn.2019.103

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN NỘI SINH TRONG CÂY THÙ LÙ CẠNH (*Physalis angulata* L.) CÓ KHẢ NĂNG KHÁNG KHUẨN Ở KHU VỰC THÀNH PHỐ CẦN THƠ

Nguyễn Thị Thúy Duy*, Nguyễn Hữu Hiệp, Đinh Thị Thái Hà và Đỗ Thị Nhứt

Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Nguyễn Thị Thúy Duy (email: nttduy@ctu.edu.vn)

ABSTRACT

The objective of this study was to isolate antibacterial endophytic bacteria from *Physalis angulata* L. Samples of roots, stems, leaves and fruits of *Physalis angulata* L from Ninh Kieu District in Can Tho City were used as materials to isolate bacteria. Antibacterial activity was tested by disc diffusion method. The results showed a total of 62 antibacterial endophytic bacteria were isolated from *Physalis angulata* L. Twenty five strains had the ability against *Aeromonas hydrophila*, 20 strains were active against *Escherichia coli*, and 13 strains showed antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*. In addition, the results of the test about antibiotic resistance ability of the best 12 antimicrobial strains showed that 12 tested strains were able to resist to Streptomycin at various concentration varied from 0.125 to 256 mg.L⁻¹. Eleven strains were able to resist to Penicillin V at various concentration ranked from 0.125 to 0.5 mg.L⁻¹ and eight out of 12 strains showed their resistant to Cephalexin at various concentration varied between 0.125 to 256 mg.L⁻¹. Based on recording of 16S rRNA gene sequences, these three bacterial strains including DL19, DR7 and DTR12 belong to *Bacillus*, *Enterobacter* and *Bacillus* and have a closest relationship to *Bacillus amyloliquefaciens* NBRC 15535, *Enterobacter cloacae* DSM 30054 and *Bacillus subtilis* IAM 12118, respectively.

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm phân lập vi khuẩn nội sinh trong cây Thù lù cạnh đã có chức năng kháng khuẩn. Các mẫu rễ, thân, lá và trái của cây Thù lù cạnh ở khu vực quận Ninh Kiều, thành phố Cần Thơ được dùng làm nguyên liệu để phân lập vi khuẩn. Hoạt tính kháng khuẩn được khảo sát bằng phương pháp khuếch tán qua giấy lọc. Kết quả cho thấy tổng cộng có 62 dòng vi khuẩn nội sinh từ cây thù lù đã được phân lập. Trong đó, 25/62 dòng có khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh *Aeromonas hydrophila*, 20/62 dòng kháng vi khuẩn *Escherichia coli*, 13/62 dòng kháng vi khuẩn *Staphylococcus aureus*. Ngoài ra, kết quả khảo sát 12 dòng vi khuẩn kháng khuẩn cao nhất đối với khả năng kháng thuốc kháng sinh cho thấy 12 dòng vi khuẩn thử nghiệm đều có khả năng kháng Streptomycin ở nồng độ từ 0,125-256 mg.L⁻¹, 11 dòng có khả năng kháng Penicillin V với nồng độ từ 0,125-0,5 mg.L⁻¹ và 8/12 dòng có khả năng kháng Cephalexin ở nồng độ từ 0,125-256 mg.L⁻¹. Kết quả định danh thông qua trình tự 16S-rRNA cho thấy 3 dòng vi khuẩn DL19, DR7 và DTR12 lần lượt thuộc chi *Bacillus*, *Enterobacter* và *Bacillus*, có quan hệ gần gũi nhất tương ứng với loài *Bacillus amyloliquefaciens* NBRC 15535, *Enterobacter cloacae* DSM 30054 và *Bacillus subtilis* IAM 12118.

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 15/01/2019

Ngày nhận bài sửa: 24/05/2019

Ngày duyệt đăng: 30/08/2019

Title:

Isolation and selection of antibacterial endophytic bacteria from cutleaf ground cherry (*Physalis angulata* L.) in Can Tho city area

Từ khóa:

Bacillus sp, cây dược liệu, khả năng kháng khuẩn, kháng kháng sinh, thù lù cạnh, vi khuẩn nội sinh

Keywords:

Antibacterial activity, antibiotic resistance, *Bacillus* sp, endophytic bacteria, medical plants, *Physalis angulata* L

Trích dẫn: Nguyễn Thị Thúy Duy, Nguyễn Hữu Hiệp, Đinh Thị Thái Hà và Đỗ Thị Nhứt, 2019. Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn nội sinh trong cây Thù lù cạnh (*Physalis angulata* L.) có khả năng kháng khuẩn ở khu vực thành phố Cần Thơ. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 55(4B): 10-20.

1 GIỚI THIỆU

Từ lâu thuốc kháng sinh được sử dụng rất rộng rãi để điều trị nhiều loại bệnh trên người và động vật. Tuy nhiên thuốc kháng sinh lại có nhiều tác dụng phụ và việc lạm dụng thuốc quá mức không theo chỉ dẫn làm gia tăng tình trạng kháng thuốc của các vi khuẩn gây bệnh (Claudia Harper, 2002, được trích dẫn bởi Nguyễn Chính, 2005). Vì vậy, hiện nay không chỉ Việt Nam mà trên thế giới, với xu hướng “trở về với thiên nhiên” thì việc sử dụng các thuốc từ cây dược liệu ngày càng gia tăng so với việc sử dụng thuốc kháng sinh. Tác giả Kovalena (1972) đã công bố trên thế giới về việc sử dụng cây dược liệu vừa mang lại hiệu quả phòng trị bệnh cao, đồng thời không gây hại cho sức khỏe của người sử dụng. Cây thù lù cạnh (*Physalis angulata* L.) là một trong số những cây dược liệu có chứa dược tính quý được công nhận là có khả năng trị cảm sốt, yết hầu sưng đau, ho nhiều đờm, nhiệt, nôn và nấc. Ngoài ra, việc đắp ngoài da với thù lù cạnh còn giúp trị bệnh đái tháo đường (Đỗ Thanh Tuấn, 2017). Theo kiến thức Đông y, thù lù cạnh có vị đắng, tính mát, không độc, tác dụng thanh nhiệt lợi thấp, khu đàm, quả có vị chua, tính bình có tác dụng thanh nhiệt và tiêu đàm (Đỗ Thanh Tuấn, 2017).

Nhiều kết quả nghiên cứu công bố cho thấy các hợp chất chiết xuất từ cây thù lù cạnh có khả năng điều hòa miễn dịch (Milena *et al.*, 2003), hoạt tính chống ung thư gan và ung thư tử cung (Januario *et al.*, 2002), chống lại vi khuẩn gây bệnh bạch cầu lymphocytic P388 ở chuột (Chiang *et al.*, 1992), ức chế vi khuẩn *Staphylococcus aureus* (Melissa *et al.*, 2005). Ngoài ra, chiết xuất tinh dầu từ cây thù lù cạnh còn có tính kháng nấm và vi khuẩn (Osho *et al.*, 2010). Năm 2017, Suryani đã tiến hành phân lập và định danh vi khuẩn acid lactic trong quả của cây thù lù cạnh nhằm thu được chất ức chế enzyme α -glucosidase với mục đích nhằm thay thế thuốc kháng sinh điều trị bệnh tiểu đường trên người. Trong khi đó, đã có nhiều nghiên cứu cho thấy các dòng vi khuẩn nội sinh trong thực vật có khả năng tiết các hợp chất có tính kháng khuẩn với các vi khuẩn gây bệnh (Kim *et al.*, 2008; Young, 2010).

Mặc dù đã có nhiều công trình nghiên cứu về cây thù lù cạnh, nhưng các nghiên cứu trước đây chủ yếu chỉ tập trung nghiên cứu lâm sàng từ các hợp chất có hoạt tính sinh học trong cây, trong khi các nghiên cứu về vi khuẩn nội sinh có khả năng kháng khuẩn trong cây thù lù cạnh vẫn còn hạn chế. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục tiêu phân lập và tuyển chọn vi khuẩn nội sinh trong cây thù lù cạnh có khả năng kháng khuẩn ở khu vực quận Ninh Kiều, thành phố Cần Thơ và đồng thời khảo sát khả năng kháng một số hoạt chất kháng sinh của một số dòng vi khuẩn tuyển chọn.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu nghiên cứu

Cây thù lù cạnh được thu ở khu vực quận Ninh Kiều, thành phố Cần Thơ. Sử dụng môi trường PDA để nuôi cấy và phân lập vi khuẩn nội sinh. Thành phần của 1 L môi trường PDA gồm khoai tây 200 g, glucose 20 g và agar 20 g). Các dòng vi khuẩn gây bệnh gồm *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 được cung cấp từ Trung tâm Dịch vụ kỹ thuật và huấn luyện nghiệp vụ quản lý chất lượng nông, lâm, thủy sản Cà Mau. Các kháng sinh gồm PenicilinV Kali 1.000.000UI (Pharbac), Cephalixin 500mg (TV-Pharm) và Streptomycin 1g (Hanvet) được mua tại các cửa hàng thuốc tây ở khu vực thành phố Cần Thơ.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Thu thập mẫu

Mẫu cây thù lù cạnh mọc hoang được thu trong giai đoạn cây tăng trưởng tối đa và đang bắt đầu cho trái ở khu vực quận Ninh Kiều, thành phố Cần Thơ. Mẫu thu vào buổi sáng sớm hoặc chiều mát bằng cách nhổ toàn bộ thân cây và rễ kể cả phần đất xung quanh vùng rễ, cho vào túi giấy lớn mang về phòng thí nghiệm. Sau đó, tách riêng từng bộ phận gồm rễ, thân, lá và trái để phân lập vi khuẩn (Hình 1).



Hình 1: Cây Thù lù cạnh (*Physalis angulata* L.) dùng để phân lập vi khuẩn nội sinh; toàn thân (a); rễ (b); trái (c), lá (d) và thân (e)

2.2.2 Phân lập vi khuẩn nội sinh từ mẫu cây Thù lù cạnh

Xử lý mẫu: Cây thù lù cạnh sau khi thu được rửa sạch dưới vòi nước để loại bỏ đất bám ở rễ, tiếp theo tách rời từng bộ phận riêng biệt gồm trái, lá, thân và rễ và cắt thành đoạn ngắn 2-3 cm. Tiến hành khử trùng bề mặt mẫu bằng cồn 70% trong 30 giây, rửa lại bằng nước cất vô trùng 2 lần, tiếp theo cho H₂O₂ 3% vào ngập mẫu trong khoảng thời gian 3 phút, sau đó rửa lại bằng nước cất vô trùng 4 lần và để ráo nước trên giấy thấm vô trùng (thường xuyên lắc mẫu trong thời gian khử trùng). Sau đó dùng chày và cối giã nhuyễn từng bộ phận riêng biệt, cho 1-2 mL

nước cất vô trùng vào, trộn đều và để yên 2 phút cho lắng cặn, hút phần dịch trên cho vào ống nghiệm 10 mL chứa môi trường PDA bán đặc, ủ ở nhiệt độ 30°C trong tủ ủ đến khi xuất hiện vòng pellicle cách mặt môi trường 1-5 mm, tiếp tục hút 100 µL pellicle này trải đều trên đĩa petri chứa môi trường PDA đặc, ủ ở nhiệt độ 30°C trong tủ ủ nhằm theo dõi sự phát triển của khuẩn lạc sau 24-48 giờ, tiến hành phân lập và tách rỗng vi khuẩn và cuối cùng cấy trừ các dòng thuần vào trong môi trường glycerol 50% cho các nghiên cứu tiếp theo.

Quan sát hình thái khuẩn lạc, tế bào vi khuẩn và nhuộm gram: Quan sát và mô tả hình thái khuẩn lạc vi khuẩn gồm hình dạng, màu sắc, độ nổi khuẩn lạc. Riêng tế bào vi khuẩn, tiến hành nhuộm gram vi khuẩn, mô tả hình dạng, kích thước và khả năng di động của vi khuẩn.

2.2.3 Khảo sát khả năng kháng khuẩn của các dòng vi khuẩn phân lập với ba dòng vi khuẩn gây bệnh gồm S. aureus, A. hydrophila và E. coli

Mục tiêu: Tuyển chọn ra các dòng vi khuẩn có khả năng ức chế 3 dòng vi khuẩn gây bệnh.

Nguồn vi sinh vật: Sáu mươi hai dòng vi khuẩn nội sinh đã được phân lập và 3 dòng vi khuẩn gây bệnh gồm: E. coli, S. aureus và A. hydrophila.

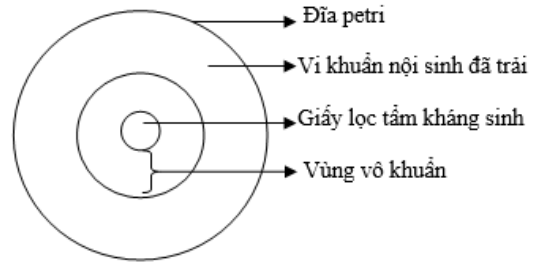
Phương pháp thực hiện: Theo phương pháp khuếch tán qua vòng giấy lọc (disk diffusion assay) của tác giả Bauer et al. (1966). Phương pháp thực hiện được mô tả ngắn gọn như sau: Vi khuẩn gây bệnh đã được nuôi tăng sinh trong môi trường LB đạt mật số 10⁷ CFU.mL⁻¹. Sau đó, dùng micropipet hút 5µL dịch vi khuẩn gây bệnh nhỏ lên bề mặt đĩa môi trường PDA đặc và trải đều bằng tấm bông vô trùng đến khi bề mặt đĩa khô. Tiếp tục dùng kẹp gấp giấy lọc đường kính 6 mm cho vào Eppendorf 2 mL chứa huyền phù vi khuẩn nội sinh phân lập từ cây thù lù đã tăng sinh trong môi trường PDA lỏng đạt mật số 10⁷ CFU.mL⁻¹, ngâm giấy lọc trong dịch vi khuẩn 10 phút. Sau đó, dùng kẹp gấp và đặt giấy lọc ở giữa trên bề mặt đĩa môi trường đã trải vi khuẩn gây bệnh. Mỗi dòng vi khuẩn nội sinh phân lập được thực hiện với 3 lần lặp lại. Đặt các đĩa petri chứa mẫu trong tủ ủ ở 30°C, quan sát khả năng tạo vòng kháng khuẩn sau 24, 48 và 72 giờ và ghi nhận kết quả. Chọn các dòng vi khuẩn có khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh cao để khảo sát khả năng kháng kháng sinh.

2.2.4 Khảo sát khả năng kháng một số hoạt chất kháng sinh gồm Penicilin, Cephalixin và Streptomycin của các dòng vi khuẩn kháng khuẩn cao

Mục tiêu: Khảo sát và đánh giá khả năng kháng kháng sinh của các dòng vi khuẩn kháng khuẩn phân

lập đối với 3 hoạt chất kháng sinh chọn lọc. Đồng thời nhằm xác định được nồng độ thấp nhất của 1 loại kháng sinh có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn sau khoảng 24 giờ nuôi cấy.

Nguyên lý: Các chất kháng sinh có thể khuếch tán trên môi trường thạch, ức chế vi sinh vật mẫn cảm với chúng và tạo thành vòng vô khuẩn. Ngược lại, những vi khuẩn nào có khả năng kháng với chất kháng sinh sẽ sinh trưởng và phát triển bình thường và không bị ức chế bởi kháng sinh. Đường kính vòng vô khuẩn thể hiện mức độ mẫn cảm của vi khuẩn với từng loại kháng sinh thử nghiệm.



Hình 2: Sơ đồ phương pháp kiểm tra khả năng kháng kháng sinh của các dòng vi khuẩn nội sinh được tuyển chọn

Đánh giá kết quả: Khả năng kháng thuốc kháng sinh được đánh giá theo 3 mức độ, dựa vào đường kính vòng vô khuẩn ở các mức độ khác nhau gồm: Mức độ kháng (K): ≤13 mm, mức độ trung gian (T): 14 – 16 mm và mức độ nhạy cảm (N): ≥17 mm.

2.2.5 Định danh một số dòng vi khuẩn kháng khuẩn

Sau khi khảo sát khả năng kháng khuẩn của các dòng vi khuẩn đã phân lập, chọn 3 dòng có đặc tính kháng khuẩn cao để giải trình tự gen 16S-rRNA. Trình tự nhận được dùng để so sánh với dữ liệu trên ngân hàng gene NCBI (National Center for Biotechnology Information) bằng chương trình BLAST để định danh vi khuẩn.

2.2.6 Xử lý số liệu:

Các số liệu thu được được xử lý bằng phần mềm Excel 2007 và phần mềm thống kê Statgraphics plus XV.

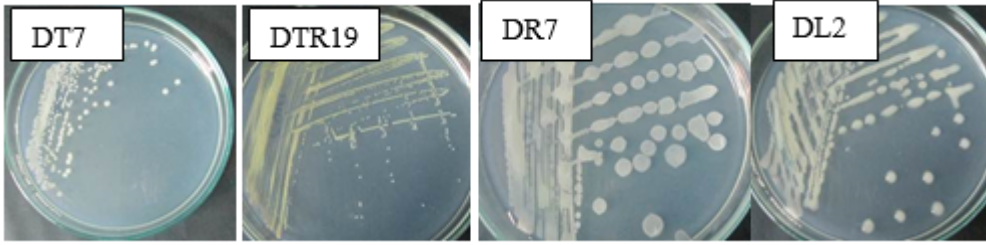
3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả phân lập vi khuẩn

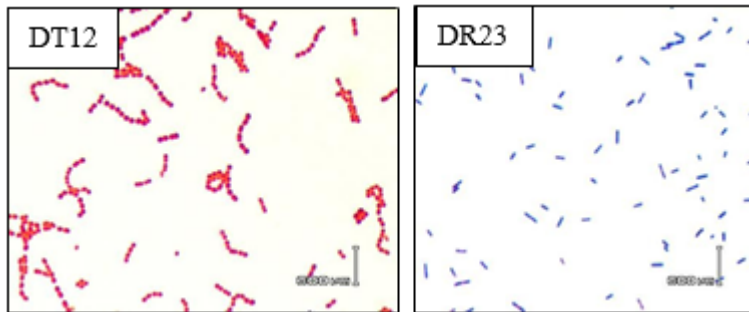
Kết quả phân lập vi khuẩn nội sinh từ các bộ phận khác nhau của cây thù lù cạnh đã thu được 62 vi khuẩn nội sinh. Trong đó, 14 dòng được phân lập từ trái, 16 dòng từ lá, 15 dòng từ thân và 17 dòng từ rễ cây thù lù cạnh. Các dòng vi khuẩn phân lập được ký hiệu như sau: DRx, DLx, DTx, DTRx với TR: trái, L: lá, T: thân, R: rễ, D: ký hiệu mã hóa riêng của nhóm phân lập vi khuẩn cây thù lù cạnh, x: thứ tự dòng vi khuẩn phân lập. Đa số các dòng vi khuẩn

phân lập được có dạng hình tròn (hoặc không đều), màu trắng đục (trắng ngà, vàng nhạt hay nâu nhạt), độ nổi mô và lồi, bìa nguyên (hoặc răng cưa), đường kính dao động từ 0,1-7 mm (Hình 3). Ngoài ra, đặc

điểm tế bào của các dòng này chủ yếu là hình que, một số có dạng hình cầu hoặc chuỗi và phần lớn là gram âm và di động (Hình 4).



Hình 3: Đặc điểm hình thái khuẩn lạc của một số dòng vi khuẩn phân lập

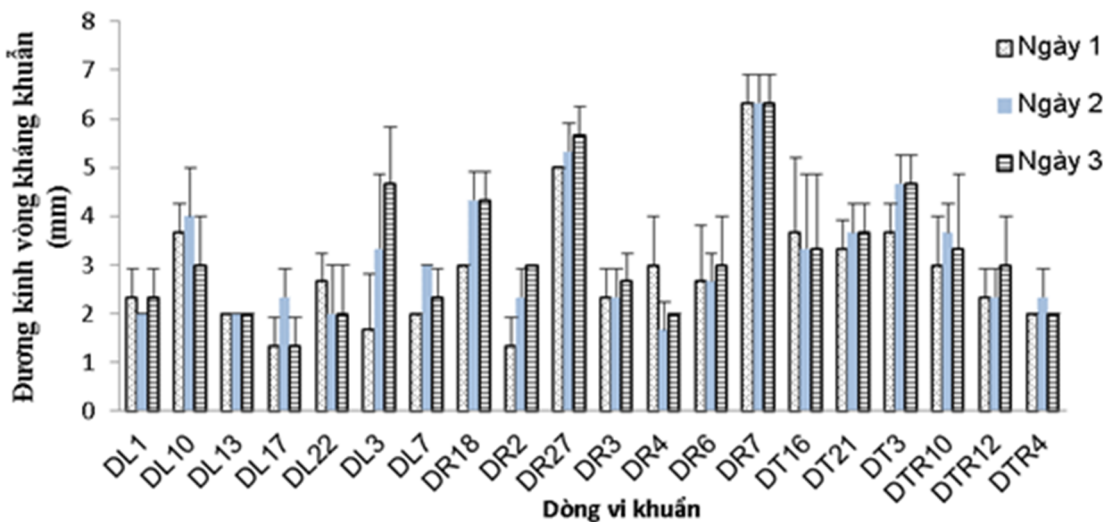


Hình 4: Đặc điểm hình thái tế bào của hai dòng vi khuẩn DT12 và DR23 (dòng DT12 - gram âm và dòng DR23 - gram dương)

3.2 Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của các dòng vi khuẩn phân lập

Sử dụng phương pháp khuếch tán qua giấy lọc giữa các dòng vi khuẩn phân lập được với 3 dòng vi

khẩn gây bệnh *E. coli*, *A. hydrophila* và *S. aureus*, quan sát sự hình thành vòng kháng trong 3 ngày liên tục.



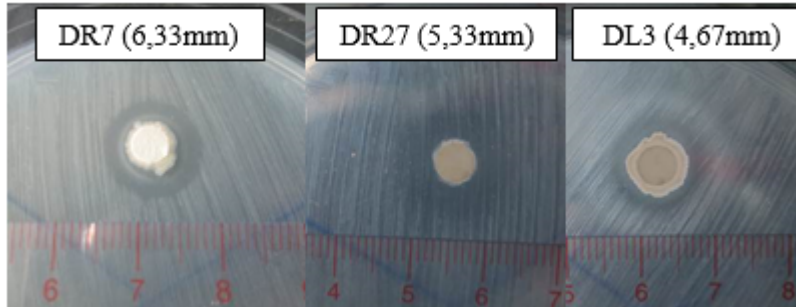
Hình 5: Đường kính vòng kháng khuẩn của 20 dòng vi khuẩn phân lập đối với vi khuẩn gây bệnh *E. coli* sau 3 ngày thí nghiệm

Từ kết quả được trình bày ở Hình 5 cho thấy 20 trong tổng số 62 dòng vi khuẩn nội sinh phân lập thể hiện khả năng đối kháng với vi khuẩn gây bệnh *E.*

coli và đường kính vòng vô khuẩn có xu hướng tăng và đạt cao nhất ở ngày thứ 2 sau khi ủ và giảm ở ngày thứ 3 (10/20 dòng). Nguyên nhân là do vi

khuẩn *E. coli* phát triển lan rộng. Bên cạnh đó, có một số dòng vi khuẩn có khả năng đối kháng tăng dần qua các ngày 1, 2 và 3 (DL3, DR18, DR2, DR27, DR3, DR6, DT21, DT3 và DTR12). Trong khi đó, 3 dòng vi khuẩn ký hiệu DL22, DR4 và DT16 thể hiện tính kháng khuẩn với vi khuẩn gây bệnh *E. coli* cao nhất ở ngày đầu tiên và sau đó giảm dần theo thời gian thí nghiệm. Riêng dòng vi khuẩn ký hiệu DL13 và DR7 vẫn giữ được khả năng kháng khuẩn với vi khuẩn gây bệnh *E. coli* liên tục trong 3 ngày nuôi cấy thông qua việc đường kính vòng kháng vẫn không thay đổi sau 3 ngày ủ. Ba dòng vi

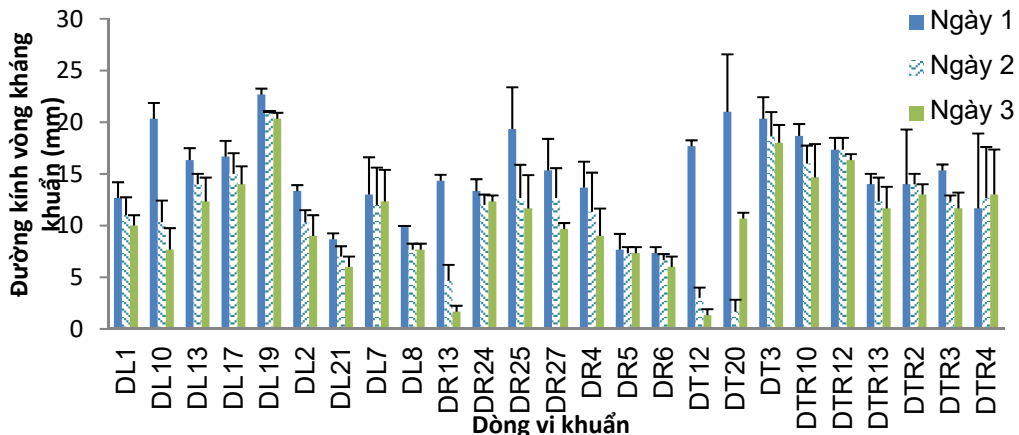
khuẩn ký hiệu DR7, DR27 và DL3 có hiệu quả kháng khuẩn tốt nhất với đường kính vòng kháng khuẩn cao nhất lần lượt đạt 6,33 mm, 5,33 mm và 4,67 mm (Hình 6). Bhoonobtong *et al.* (2012) đã phân lập được dòng vi khuẩn nội sinh từ cây dược liệu ở Thái Lan và xác định vi khuẩn này có khả năng kháng *E. coli*. Ngoài ra, các dòng vi khuẩn *Bacillus* phân lập trên cây nghệ có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn *E. coli* với đường kính vòng kháng đo được từ 11-14 mm (Kumar *et al.*, 2016).



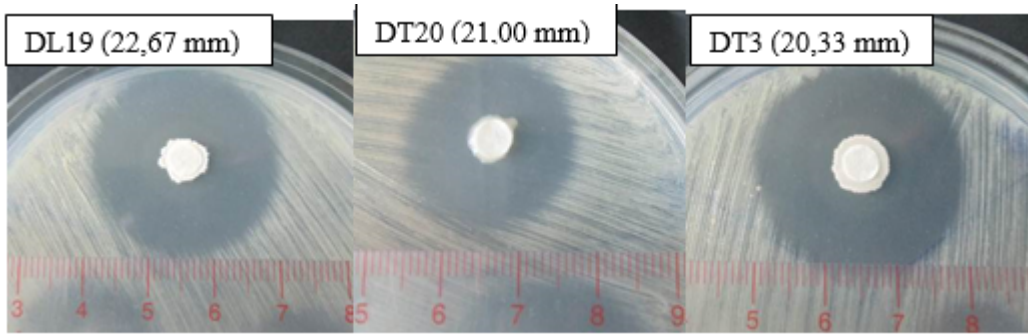
Hình 6: Khả năng kháng khuẩn của dòng vi khuẩn nội sinh phân lập ký hiệu DR7, DR27 và DL3 đối với dòng vi khuẩn *E. coli* sau 2 ngày thí nghiệm

Kết quả khảo sát khả năng ức chế dòng vi khuẩn gây bệnh *A. hydrophila* của 25 trong tổng số 62 dòng vi khuẩn phân lập được trình bày trong Hình 7 cho thấy tổng cộng có 25 trong tổng số 62 dòng vi khuẩn phân lập có khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh *A. hydrophila* sau 3 ngày ủ. Hầu hết các dòng vi khuẩn có khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh *A. hydrophila*, mạnh nhất ở ngày đầu tiên và sau đó có xu hướng giảm dần ở ngày thứ 2 và thứ 3, ngoại trừ dòng vi khuẩn DTR4 có xu hướng tăng dần từ ngày 1 đến ngày 3 (Hình 8). Dòng DL19 có tính kháng cao nhất với đường kính vòng kháng lớn nhất đạt 22,67 mm vào ngày 1, kế tiếp là 2 dòng vi khuẩn

DT20 và DT3 có đường kính vòng vô khuẩn lớn thứ 2, thứ 3 lần lượt đạt 21,00 mm, và 20,33 mm sau 1 ngày thí nghiệm. Theo nghiên cứu của Indu *et al.* (2006) về khả năng ức chế dòng vi khuẩn gây bệnh *A. hydrophila* của dịch trích tòi 50% và dịch trích 100% hạt nhục đậu khấu cho thấy hai dịch trích này cho đường kính vòng kháng khuẩn với vi khuẩn gây bệnh *A. hydrophila* lần lượt đạt 17 mm và 15 mm. Nghiên cứu của Kumar *et al.* (2016) đã phân lập dòng vi khuẩn nội sinh từ rễ cây *Azadirachta indica* A. Juss ở Ấn Độ cho thấy các dòng vi khuẩn phân lập được có khả năng kháng dòng vi khuẩn *A. hydrophila* IMS/GN11.



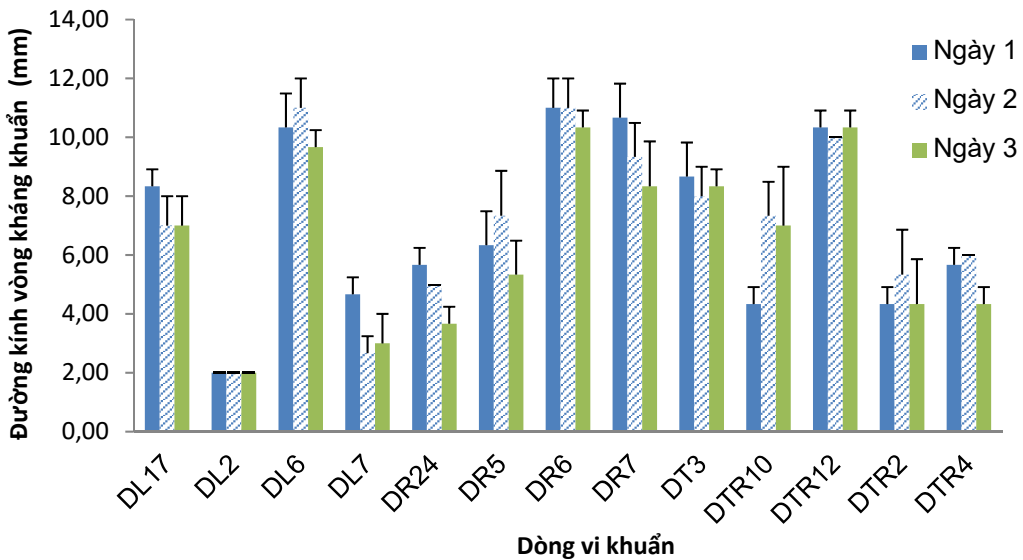
Hình 7: Đường kính vòng kháng khuẩn của 25 trong tổng số 62 dòng vi khuẩn phân lập đối với vi khuẩn gây bệnh *A. hydrophila* sau 3 ngày thí nghiệm



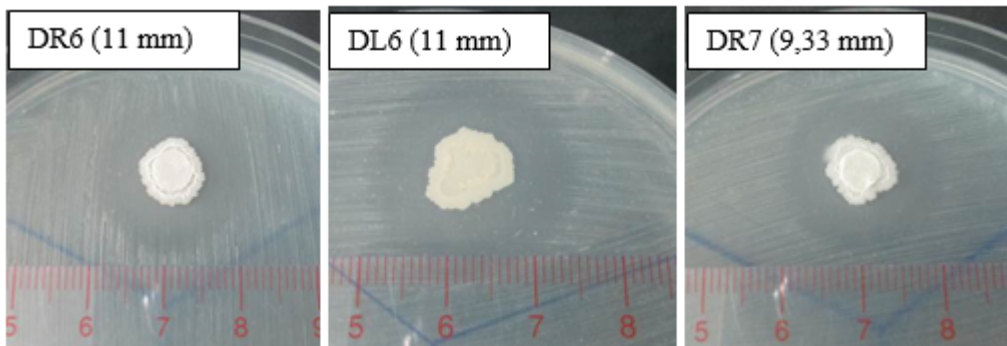
Hình 8: Khả năng kháng khuẩn của dòng vi khuẩn nội sinh phân lập ký hiệu DL19, DT20 và DT3 đối với vi khuẩn gây bệnh *A. hydrophila* sau 1 ngày thí nghiệm

Kết quả khảo sát khả năng kháng khuẩn của 13 trong tổng số 62 dòng vi khuẩn nội sinh phân lập với vi khuẩn gây bệnh *S. aureus* được trình bày trong Hình 9 cho thấy chỉ có 13 trong tổng số 62 dòng vi khuẩn phân lập được ghi nhận là có tính kháng đối với dòng vi khuẩn gây bệnh *S. aureus*. Trong đó có 4 dòng vi khuẩn phân lập từ lá, 4 dòng được phân lập từ rễ, 1 dòng từ thân và 4 dòng phân lập từ trái của Thù lù cạnh. Đa số các dòng vi khuẩn này có khả năng kháng khuẩn cao nhất ở ngày 1 và 2, sau đó, giảm xuống vào ngày thứ 3. Vòng kháng khuẩn của các dòng vi khuẩn có đường kính dao động từ 2,00-11,00 mm. Sau 2 ngày ủ, dòng DR6 và DL6 thể hiện tính kháng khuẩn với dòng vi khuẩn gây bệnh *S. aureus* mạnh nhất với đường kính vòng

kháng khuẩn 11,00 mm (Hình 10) và khác biệt với các dòng còn lại. Kế đến là dòng DR7 có khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh *S. aureus* với đường kính vòng kháng khuẩn đạt 9,33 mm (Hình 10). Các dòng vi khuẩn thử nghiệm còn lại có tính kháng khuẩn yếu hơn với đường kính vòng vô khuẩn dao động từ 2- 9 mm. Khả năng ức chế dòng vi khuẩn gây bệnh *S. aureus* của các dòng vi khuẩn nội sinh phân lập trong thân một loại cây thảo dược thuộc họ rau răm, Cốt khí (*Polygonum cuspidatum*) có đường kính vòng kháng khuẩn dao động từ 9- 15 mm (Sun *et al.*, 2013). Một nghiên cứu khác của Pal and Paul (2013) đã phân lập được các dòng vi khuẩn nội sinh trên cây *Hygrophila spinose* T, thuộc họ Ô rô với vòng vô khuẩn ức chế dòng vi khuẩn gây bệnh *S. aureus* dao động từ 3- 8 mm.



Hình 9: Đường kính vòng kháng khuẩn của 13 trong tổng số 62 dòng vi khuẩn nội sinh phân lập đối với vi khuẩn gây bệnh *S. aureus* sau 3 ngày thí nghiệm



Hình 10: Khả năng kháng khuẩn của ba dòng vi khuẩn nội sinh phân lập ký hiệu DR6, DL6 và DR7 đối với vi khuẩn gây bệnh *S. aureus* sau 2 ngày thí nghiệm

Tóm lại, từ 62 dòng vi khuẩn nội sinh phân lập được từ trong cây Thù lù cạnh, có 20 dòng vi khuẩn kháng với vi khuẩn *E. coli*, 25 dòng kháng với vi khuẩn *A. hydrophila* và 13 dòng kháng *S. aureus* (Bảng 1). Trong đó, có 5 dòng vi khuẩn kháng cả 3 dòng vi khuẩn gây bệnh gồm các dòng có ký hiệu như sau: DL17, DL7, DR6, DTR10 và DTR12. Năm dòng kháng với hai dòng vi khuẩn gây bệnh *E. coli*, *A. hydrophila* gồm các dòng có ký hiệu DL1, DL10, DL13, DR27 và DR4 và 6 dòng kháng với vi khuẩn gây bệnh *A. hydrophila* và *S. aureus* gồm các dòng có ký hiệu DL2, DR24, DR5, DT3, DTR12, DTR2 và DTR4. Ngoài ra, đa số các dòng vi khuẩn có khả năng kháng khuẩn chủ yếu được phân lập từ rễ và lá cây thù lù cạnh nhiều hơn so với các bộ phận khác như thân và trái. Từ các kết quả trên, 12 dòng vi khuẩn ký hiệu DR3, DR5, DR6, DR7, DR25, DL3, DL6, DL17, DL19, DT3, DTR10 và DTR12 được xem như là các dòng ưu tú nhất và do đó được chọn để đánh giá khả năng kháng 3 loại kháng sinh tuyến chọn.

Bảng 1: Số lượng vi khuẩn nội sinh phân lập từ cây thù lù cạnh có khả năng kháng khuẩn với 3 dòng vi khuẩn gây bệnh

Vi khuẩn gây bệnh	Số dòng có tính kháng khuẩn	Tỷ lệ (%)
<i>Escherichia coli</i>	20	32,26
<i>Aeromonas hydrophila</i>	25	40,32
<i>Staphylococcus aureus</i>	13	20,97

3.3 Khảo sát khả năng kháng ba hoạt chất kháng sinh của 12 dòng vi khuẩn tuyến chọn

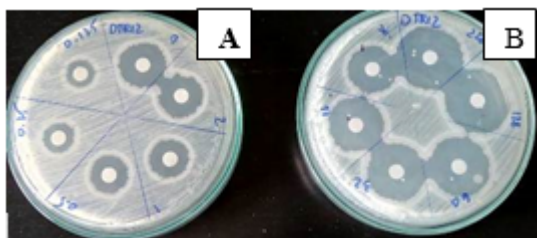
3.3.1 Kháng sinh Penicillin V

Kết quả khảo sát khả năng kháng Penicillin V của 12 dòng vi khuẩn tuyến chọn được trình bày trong Bảng 2 cho thấy các dòng vi khuẩn khảo sát đều có khả năng kháng Penicillin V ở nồng độ từ 0,125-0,5 mg.L⁻¹, chỉ riêng dòng DR25 đều biểu hiện nhạy cảm với kháng sinh này ở tất cả các nồng độ. Các dòng còn lại có khả năng kháng kháng sinh Penicillin V khác nhau ở các nồng độ dao động từ 1-256 mg.L⁻¹.

Bảng 2: Khả năng kháng kháng sinh Penicillin V ở các nồng độ khác nhau của 12 dòng vi khuẩn tuyến chọn

Dòng vi khuẩn	Đường kính vòng vô khuẩn (mm) ở các nồng độ kháng sinh (mg.L ⁻¹)											
	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
DR3	4	5	6	8	10	11	14	14	15	16	18,5	20
DR5	-	-	1	5	10	14	15	20	20	22	24	27
DR6	7	9	11	14	15	19	21	21	24	26	26	29
DR7	4	5	10	11	12	14	14	17	19	19	19	21
DR25	khđ	khđ	khđ	khđ	khđ	khđ	khđ	khđ	khđ	khđ	khđ	khđ
DL3	-	1	2	6	10	12	17	19	23	24	26	29
DL6	4	4	5	9	10	12	15	16	19	19	20	23
DL17	9	10	11	14	17	19	20	22	23	24	24	29
DL19	1	3	9	10	14	19	14	18	19	22	24	28
DT3	5	7	9	11	12,5	13	15	16	17	19	21	23
DTR10	5	8	10	12	13	14	17	18	19	22	24	26
DTR12	-	5	6	8	10	12	13	14	17	19	21	22

*Ghi chú: (-) Không tạo vòng vô khuẩn, (khđ) tạo vòng kháng hết đĩa, mức độ kháng (K): ≤13 mm, mức độ trung gian (T): 14 – 16 mm, mức độ nhạy cảm (N): ≥17 mm



Hình 11: Khả năng kháng kháng sinh Penicillin V của dòng DTR12 ở các nồng độ <8mg/L (A) và 32-256mg/L (B) sau 1 ngày thí nghiệm

Ở nồng độ 1 mg.L⁻¹, tổng cộng có 9 trong tổng số 12 dòng vi khuẩn thử nghiệm biểu hiện kháng với kháng sinh Penicillin V, 2 dòng vi khuẩn DR6 và DL17 thể hiện mức độ trung gian và chỉ có dòng DR25 biểu hiện nhạy cảm với kháng sinh ở nồng độ này. Ở nồng độ 2 mg.L⁻¹, tổng cộng có 8 trong tổng số 12 dòng vi khuẩn biểu hiện kháng với kháng sinh Penicillin V. Ở nồng độ 4 mg.L⁻¹, có 5 trong tổng số 12 dòng vi khuẩn biểu hiện kháng với kháng sinh Penicillin V gồm các dòng có ký hiệu DR3, DL3, DL6, DT3 và DTR12. Ở nồng độ 8 mg.L⁻¹, chỉ có

dòng DTR12 là có khả năng kháng kháng sinh Penicillin V (Hình 11), 6 trong tổng số 12 dòng vi khuẩn thể hiện mức độ trung gian và các dòng còn lại đều biểu hiện mức độ nhạy cảm với kháng sinh. Trong khi ở nồng độ 16 mg.L⁻¹, 12 dòng vi khuẩn thử nghiệm đều không có khả năng kháng với kháng sinh Penicillin V, có 4 dòng biểu hiện mức độ trung gian và 8 dòng biểu hiện mức độ nhạy cảm với kháng sinh Penicillin V. Ở nồng độ 32 mg.L⁻¹ và 64 mg.L⁻¹, chỉ có dòng vi khuẩn DR3 biểu hiện mức độ trung gian, trong khi các dòng vi khuẩn còn lại đều biểu hiện nhạy cảm với kháng sinh này. Cuối cùng ở nồng độ 128 mg.L⁻¹ và 256 mg.L⁻¹, tất cả các dòng vi khuẩn đều biểu hiện nhạy cảm với kháng sinh này.

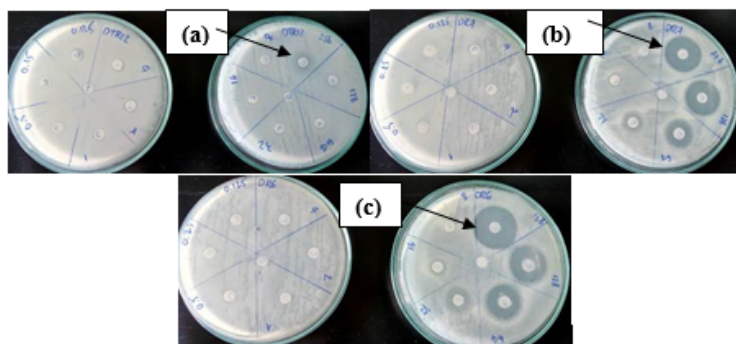
3.3.2 Kháng sinh Cephalexin

Kết quả khảo sát khả năng kháng kháng sinh Cephalexin của 12 dòng vi khuẩn tuyển chọn được trình bày trong Bảng 3 cho thấy 12 dòng vi khuẩn tuyển chọn đều có khả năng kháng kháng sinh Cephalexin với nồng độ dao động từ 0,125-64 mg.L⁻¹.

Bảng 3: Khả năng kháng kháng sinh Cephalexin ở các nồng độ khác nhau của 12 dòng vi khuẩn tuyển chọn

Dòng vi khuẩn	Đường kính vòng vô khuẩn (mm) ở các nồng độ kháng sinh (mg.L ⁻¹)											
	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
DR3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,5	3,5	9
DR5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	9
DR6	-	-	-	-	-	-	-	4	6	13	15	19
DR7	-	-	-	-	-	-	-	-	3	8	14	15
DR25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8
DL3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DL6	-	-	-	-	-	-	-	-	6	9	14	17
DL17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
DL19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	13
DT3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	10	14
DTR10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	7	12
DTR12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2

*Ghi chú: (-)Không tạo vòng vô khuẩn, mức độ kháng (K): ≤13 mm, mức độ trung gian (T): 14 – 16 mm, mức độ nhạy cảm (N): ≥17 mm

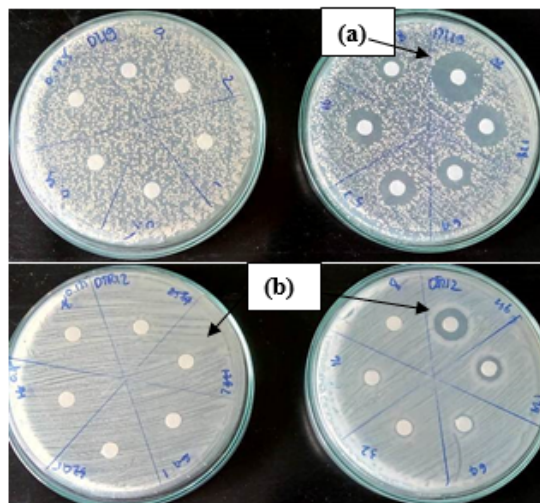


Hình 12: Khả năng kháng kháng sinh Cephalexin của dòng vi khuẩn DTR12 (a), biểu hiện trung gian với Cephalexin của dòng DR7 (b) và biểu hiện nhạy cảm với Cephalexin của dòng DR6 (c) ở nồng độ 256 mg.L⁻¹

Ở nồng độ 128 mg.L⁻¹, chỉ có 2 dòng vi khuẩn DR6 và DR7 bắt đầu biểu hiện trung gian với kháng sinh Cephalexin, trong khi đó các dòng còn lại vẫn thể hiện tính kháng với kháng sinh này. Ở nồng độ Cephalexin 256 mg.L⁻¹, có 8 trong tổng số 12 dòng vi khuẩn thử nghiệm vẫn biểu hiện tính kháng với kháng sinh Cephalexin, 2 dòng vi khuẩn ký hiệu DR7 và DT3 biểu hiện trung gian và trong khi 2 dòng vi khuẩn còn lại ký hiệu DR6 và DL6 biểu hiện nhạy cảm với kháng sinh này (Bảng 3 và Hình 12).

3.3.3 Kháng sinh Streptomycin

Kết quả khảo sát khả năng kháng kháng sinh Streptomycin của 12 dòng vi khuẩn tuyển chọn được trình bày trong Bảng 4 cho thấy tất cả 12 dòng vi khuẩn khảo sát đều có khả năng kháng Streptomycin nồng độ từ 0,125-256 mg.L⁻¹, ngoại trừ dòng DL19 bắt đầu biểu hiện nhạy cảm với kháng sinh Streptomycin ở nồng độ 256 mg.L⁻¹ (Hình 13). Điều này cho thấy kháng sinh Streptomycin không ảnh hưởng đến sự phát triển của 12 dòng vi khuẩn nội sinh kháng khuẩn tuyển chọn này.



Hình 13: Mức độ nhạy cảm với kháng sinh Streptomycin của dòng vi khuẩn DL19 ở nồng độ 0,125- 256 mg/L (a) và của dòng vi khuẩn DTR12 ở nồng độ 0,125-256 mg/L (b)

Bảng 4: Khả năng kháng kháng sinh Streptomycin ở các nồng độ khác nhau của 12 dòng vi khuẩn tuyển chọn

Dòng vi khuẩn	Đường kính vòng vô khuẩn (mm) ở các nồng độ kháng sinh (mg.L ⁻¹)											
	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
DR3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	12
DR5	-	-	-	-	-	1	2	7	7	6	9	13
DR6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	5	10
DR7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	4	10
DR25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DL3	-	-	-	-	-	-	-	1	2	6	7	11
DL6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	6	9
DL17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	7
DL19	-	-	-	-	-	3	7	7	7	10	5	14
DT3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	7
DTR10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	4	9
DTR12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	6

*Ghi chú: (-) Không tạo vòng vô khuẩn, mức độ kháng (K): ≤13 mm, mức độ trung gian (T): 14 – 16 mm và mức độ nhạy cảm (N): ≥17 mm

3.4 Định danh ba dòng vi khuẩn kháng khuẩn tốt nhất

Ba dòng vi khuẩn nội sinh phân lập ký hiệu DL19, DR7 và DTR12 đã thể hiện khả năng kháng khuẩn và kháng với kháng sinh cao được chọn để trích DNA và giải trình tự đoạn gen 16S rRNA. Dựa vào các đặc điểm về hình thái khuẩn lạc và tế bào

của vi khuẩn kết hợp với kết quả giải trình tự đoạn gen 16S rRNA của 3 dòng vi khuẩn ký hiệu DL19, DR7 và DTR12 thuộc hai chi *Bacillus* và *Enterobacter* và có mối quan hệ di truyền gần gũi lần lượt với loài *Bacillus amyloliquequefaciens* NBRC 15535, *Enterobacter cloacae* DSM 30054 và *Bacillus subtilis* IAM 12118 (Bảng 5)

Bảng 5: Kết quả định danh ba dòng vi khuẩn tuyển chọn

Dòng vi khuẩn	Loài tương đồng	Độ dài đoạn gene	Độ phủ (%)	Mức độ tương đồng (%)	Accession number
DL19	<i>Bacillus amyloliquequefaciens</i> NBRC 15535	1309	96	97	NR041455.1
DR7	<i>Enterobacter cloacae</i> DSM 30054	1305	92	97	NR117679.1
DTR12	<i>Bacillus subtilis</i> IAM 12118	1470	97	98	NR112116.2

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

4.1 Kết luận

Sáu mươi hai dòng vi khuẩn nội sinh được phân lập từ rễ, thân, lá và trái cây Thủ lù cạnh ở quận Ninh Kiều, thành phố Cần Thơ đa số có khuẩn lạc dạng hình tròn, màu trắng đục, độ nổi mô, bia nguyên, hình que, gram âm và di động. Trong số 62 dòng vi khuẩn nội sinh được phân lập, chỉ có 20 dòng vi khuẩn thể hiện tính kháng với vi khuẩn gây bệnh *E. coli*, 25 dòng vi khuẩn thể hiện tính kháng với vi khuẩn gây bệnh *A. hydrophila* và 13 dòng vi khuẩn thể hiện tính kháng với vi khuẩn gây bệnh *S. aureus*. Trong đó, có 5 dòng vi khuẩn kháng cả 3 dòng vi khuẩn gây bệnh, 11 dòng kháng cả hai dòng vi khuẩn gây bệnh *E. coli* và *A. hydrophila* và 6 dòng kháng với hai dòng vi khuẩn gây bệnh *A. hydrophila* và *S. aureus*. Trong 12 dòng tuyển chọn để khảo sát khả năng kháng với 3 hoạt chất kháng sinh cho thấy tất cả đều có khả năng kháng Streptomycin ở nồng độ dao động từ 0,125-256 mg.L⁻¹, 11 dòng vi khuẩn có khả năng kháng Penicillin V ở nồng độ dao động từ 0,125-0,5 mg.L⁻¹ và 8 dòng có khả năng kháng Cephalixin ở nồng độ từ 0,125-256 mg.L⁻¹. Các dòng DL19, DR7 và DTR12 được nhận diện lần lượt tương đồng với loài *Bacillus amyloliquefaciens* dòng NBRC, *Enterobacter cloacae* dòng DSM và *Bacillus subtilis* dòng IAM 12118 với tỷ lệ đồng hình lần lượt đạt 97%, 97% và 98%.

4.2 Đề xuất

Thử nghiệm đặc tính kháng khuẩn của những dòng vi khuẩn nội sinh phân lập trong nghiên cứu này với những dòng vi khuẩn gây bệnh khác phổ biến trên người và động vật. Đồng thời xác định thêm khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh của các dòng vi khuẩn tuyển chọn là do dịch ngoại bào (các hoạt chất do vi khuẩn tiết ra trong quá trình sinh trưởng và phát triển) hay dịch nội bào (dịch có chứa tế bào vi khuẩn) có khả năng kháng khuẩn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bauer, R., Probstle, A., Lotter, H., Wagner-Redecker, W., and Matthiesen, U., 1996. Cyclooxygenase inhibitory constituents from *Houttuynia cordata*. *Phytomedicine*, 2(4): 305-308.

Bhoonobong, A., Sawadsitang S.S.S. and Mongkolthanaruk W., 2012. Characterization of endophytic bacteria, *Bacillus amyloliquefaciens* for antimicrobial agents production. In: IPCBEE. In International Conference on Biological and Life Sciences, 2012. IACSIT press. Singapore, 40: 6-11.

Chiang HC, Jaw SM, Chen CF. and Kan WS., 1992. Antitumor agent, physalin F from *Physalis angulata* L.. *Anticancer Research*, 12(3): 837-843.

Choi Jee Young, 2010. Anti-Inflammatory Activity of *Houttuynia cordata* against Lipoteichoic Acid-Induced Inflammation in Human Dermal Fibroblasts. *Chonnam Medical Journal*, 46(3): 140-147.

Dung, T.T., Haesebrouck, F., Tuan, N.A., Sorgeloos, P., Baelem, M. and Decostere, A., 2008. Antimicrobial susceptibility pattern of *Edwardsiella ictaluri* isolate from natural outbreaks of bacillary necrosis of *Pangasianodon hypophthalmus* in Vietnam. *Microbial Drug Resistance*, 14(4): 311-316.

Đỗ Thanh Tuấn, 2017. Nghiên cứu tài nguyên cây thuốc các huyện ven biển của tỉnh Thái Bình và đề xuất biện pháp bảo tồn, phát triển bền vững. Luận văn tiến sĩ sinh học. Học viện khoa học và công nghệ. Viện hàn lâm khoa học và công nghệ Việt Nam. Hà Nội.

Gon Sup Kim, Kim Dong Hyeok, Lim Jeong Ju and et al, 2008. Biological and antibacterial activities of the natural herb *Houttuynia cordata* water extract against the intracellular bacterial pathogen *Salmonella* within the RAW 264.7 macrophage. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 31(11): 2012-2017.

Indu, M. N., Hatha, A. A. M., Abirosh, C., Harsha U. and Vivekanandan G., 2006. Antimicrobial activity of some of the South Indian spices against serotypes of *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37: 153-158.

Januário, A.H., Filho, E.R., Pietro, R. C. L. R., Kashima, S., Sato, D.N., and França, S.C., 2002. Antimycobacterial physalins from *Physalis angulata* L. (Solanaceae). *Phytotherapy Research*, 16(5): 445-448.

Kumar, A., Singh, R., Yadav, A., Giri, D.D., Singh, P.K., and Pandey, D., 2016. Isolation and characterization of bacterial endophytes of *Curcuma longa* L. *3 Biotech*. 6 (60): 2-8.

Silva, M.T., Simas, S.M., Batista, T. G.F.M., Cadarelli, P., and Tomassini, T.C.B., 2005. Studies on antimicrobial activity, in vitro, of *Physalis angulata* L. (Solanaceae) fraction and physalin B bringing out the importance of assay determination. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(7): 779-782.

Milena B.P.Soaes, Moema C.Bellintani, Ivone M.Ribeiro, Therezinha C.B.Tomassini, Ricardo Ribeiro dos Santos, 2003. Inhibition of macrophage activation and lipopolysaccharide-induced death by seco-steroids purified from *Physalis angulata* L. *European Journal of Pharmacology*, 459(1):107 – 112.

Nguyễn Chính, 2005. Đánh giá tình hình sử dụng thuốc, hóa chất trong nuôi cá tra (*Pangasius hypophthalmus*) thâm canh ở An Giang và Cần Thơ. Luận Văn thạc sĩ khoa học. Khoa Thủy sản. Trường Đại học Cần Thơ. Thành phố Cần Thơ.

- Osho, A., Adetunji, T., Fayemi, S.O and Moronkola, DO., 2010. Antimicrobial Activity of Essential Oils of *Physalis Angulata. L.* Afr J Tradit Complement Altern Med, 7(4): 303–306.
- Pal, A. and Paul, A.K., 2013. Bacterial endophytes of the medicinal herb *Hygrophila spinosa* T. Anders and their antimicrobial activity. British Journal of Pharmaceutical Research, 3(4): 795-806.
- Sun, H., He, Y., Xiao, Q., Ye, R and Tian, Y., 2013. Isolation, characterization and antimicrobial activity of endophytic bacteria from *Polygonum cuspidatum*. African Journal of Microbiology Research, 7(16): 1496-1504.
- Suryani, N.I.M., 2017. Isolation and identification of lactic acid bacteria inhibit alpha glucosidase of kersen fruit (*Muntingia calabura* L.) and ciplukan fruit (*Physalis angulata* L.). Thesis Biology. Digital Library.