

INVESTIGATION OF *IN VITRO* ANTIOXIDANT AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITIES OF ENDOPHYTIC BACTERIA IN *Catharanthus roseus*

Tran Chi Linh¹, Ta Lam Tai², Nguyen Thi Kim Ngan³, Vo Hoang Long²,
Tran Nguyen Kim Ngan², Ly Khoi Nguyen², Nguyen Tan Thanh², Huynh Van Truong^{3*}
¹Nam Can Tho University, ²Can Tho University, ³Can Tho University of Medicine and Pharmacy

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 02/5/2024	The study was conducted to select endophytic bacterial strains in <i>Catharanthus roseus</i> that have anti-oxidant and anti-inflammatory properties <i>in vitro</i> . The study isolated and preliminary identified the morphological characteristics of 11 strains of endophytic bacteria in <i>Catharanthus roseus</i> . Antioxidant activity of endophytic bacterial strains was determined by the method of total antioxidant capacity, reducing power and neutralizing 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical. The anti-inflammatory activity of endophytic bacterial strains was determined based on their ability to inhibit bovine serum albumin denaturation. Endophytic bacterial strains are capable of producing antioxidants with concentrations ranging from 5.34±0.26 to 175.44±0.46 mg AAE/mL. The anti-inflammatory content of endophytic bacterial strains ranges from 14.35±0.54 to 30.35±0.20 mg DE/mL. Research results show that the antioxidant and anti-inflammatory activities of endophytic bacterial strains depend on polyphenol and flavonoid content. Endophytic bacterial strains in <i>Catharanthus roseus</i> show the potential to produce secondary metabolites with antioxidant and anti-inflammatory properties.
Revised: 17/6/2024	
Published: 17/6/2024	
KEYWORDS	
Anti-inflammatory	
Antioxidant	
<i>Catharanthus roseus</i>	
Endophytic bacterial	
Flavonoids	
Polyphenols	

KHẢO SÁT HOẠT TÍNH KHÁNG OXY HÓA VÀ KHÁNG VIÊM *IN VITRO* CỦA VI KHUẨN NỘI SINH TRONG CÂY DỪA CẠN (*Catharanthus roseus*)

Trần Chí Linh¹, Tạ Lâm Tài², Nguyễn Thị Kim Ngân³, Võ Hoàng Long²,
Trần Nguyễn Kim Ngân², Lý Khôi Nguyên², Nguyễn Tấn Thành², Huỳnh Văn Trường^{3*}
¹Trường Đại học Nam Cần Thơ, ²Trường Đại học Cần Thơ, ³Trường Đại học Y Dược Cần Thơ

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 02/5/2024	Nghiên cứu được thực hiện nhằm tuyển chọn các dòng vi khuẩn nội sinh trong cây dứa cạn có khả năng kháng oxy hoá và kháng viêm <i>in vitro</i> . Nghiên cứu đã phân lập và nhận diện sơ bộ các đặc điểm hình thái của 11 dòng vi khuẩn nội sinh trong cây dứa cạn. Hoạt tính kháng oxy hóa của các dòng vi khuẩn nội sinh được xác định nhờ vào phương pháp kháng oxy hóa tổng số, năng lực khử và trung hòa gốc tự do 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. Hoạt tính kháng viêm của các dòng vi khuẩn nội sinh được xác định dựa vào khả năng ức chế sự biến tính albumin huyết thanh bò. Các dòng vi khuẩn nội sinh có khả năng sản sinh chất kháng oxy hóa với hàm lượng dao động từ 5,34±0,26 đến 175,44±0,46 mg AAE/mL. Hàm lượng chất kháng viêm của các dòng vi khuẩn nội sinh dao động từ 14,35±0,54 đến 30,35±0,20 mg DE/mL. Kết quả nghiên cứu cho thấy, hoạt tính kháng oxy hóa và kháng viêm của các dòng vi khuẩn nội sinh phụ thuộc vào hàm lượng polyphenol và flavonoid. Các dòng vi khuẩn nội sinh trong cây dứa cạn cho thấy tiềm năng sản sinh các hợp chất chuyển hóa thứ cấp có khả năng kháng oxy hóa và kháng viêm.
Ngày hoàn thiện: 17/6/2024	
Ngày đăng: 17/6/2024	
TỪ KHÓA	
Dứa cạn	
Flavonoid	
Kháng oxy hóa	
Kháng viêm	
Polyphenol	
Vi khuẩn nội sinh	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.10250>

* Corresponding author. Email: hvtruong@ctump.edu.vn

1. Giới thiệu

Viêm là một cơ chế phòng thủ của cơ thể con người được kích hoạt bởi các kích thích độc hại bên ngoài và nội sinh do sự phá hủy tế bào cơ học, hóa học hoặc sinh học. Cytokine tham gia vào phản ứng viêm được đặc trưng là các cytokine tiền viêm (interleukin- 1β , interleukin-6 và yếu tố hoại tử khối u- α) và các cytokine kháng viêm (interleukin- $1R\alpha$, interleukin-4, interleukin-10) và yếu tố chuyển đổi tăng trưởng- $\beta 1$. Các cytokine tiền viêm tăng cường nhiễm trùng toàn thân và bắt đầu phản ứng miễn dịch với bệnh tật, trong khi các cytokine kháng viêm chống lại những tác động này để giảm viêm và thúc đẩy quá trình lành vết thương. Ngoài ra, tình trạng viêm còn thúc đẩy và điều chỉnh nhiều phản ứng sinh học như apoptosis, hoại tử và tự thực bào do stress oxy hóa [1], [2]. Stress oxy hóa và viêm được chứng minh có mối liên quan mật thiết với nhau. Sự hiện diện của các tế bào viêm dẫn đến quá trình nitrate hóa và oxy hóa các đại phân tử sinh học như protein, lipid, deoxyribonucleic acid và ribonucleic acid. Quá trình này tạo ra nhiều gốc tự do, bao gồm cả các loại oxy phản ứng và nitơ phản ứng dẫn đến stress oxy hóa. Quá trình viêm và stress oxy hóa kết hợp với nhau dẫn đến nguy cơ mắc các bệnh lý về tim mạch, ung thư, đái tháo đường, viêm gan, suy thận và thoái hóa thần kinh [3], [4]. Hiện nay, viêm và stress oxy hóa có thể được kiểm soát bằng cách bổ sung các hợp chất chuyển hóa thứ cấp có nguồn gốc từ thực vật. Tuy nhiên, số lượng các hoạt chất chuyển hóa thứ cấp do thực vật tạo ra trong môi trường sống tự nhiên thường thấp và điều này chủ yếu phụ thuộc vào các yếu tố môi trường, trạng thái sinh lý và tuổi của thực vật. Bên cạnh đó, thực vật bị khai thác để ly trích các hợp chất chuyển hóa thứ cấp dẫn đến nguy cơ cạn kiệt. Quá trình tổng hợp nhân tạo các chất chuyển hóa thứ cấp thực vật thường không đạt hiệu quả cao do các phản ứng trao đổi chất phức tạp [5], [6]. Do đó, các nhà khoa học đang quan tâm tìm kiếm nguồn cung cấp các hợp chất chuyển hóa thứ cấp mới có tác dụng tương tự như thực vật làm thuốc.

Những phát triển mới trong hệ sinh thái vi sinh vật cho thấy rằng một số khả năng chịu đựng hoặc đề kháng của thực vật có bắt nguồn từ vi khuẩn nội sinh (VKNS), giúp kích thích sinh trưởng và sản xuất ra các hợp chất chuyển hóa thứ cấp có lợi cho thực vật [6], [7]. Các hợp chất chuyển hóa thứ cấp này cũng sở hữu nhiều hoạt tính sinh học có giá trị đối với con người. Nhiều nghiên cứu phân lập VKNS trên các loài thực vật khác nhau đã được thực hiện. Tuy nhiên, các nghiên cứu về VKNS có hoạt tính kháng oxy hóa và kháng viêm trong cây dứa cạn vẫn chưa được thực hiện. Dứa cạn là một cây thuốc có vị hơi đắng, tính mát, tác dụng hoạt huyết, tiêu thũng, hạ huyết áp, giải độc, thông tiểu tiện, chữa huyết áp cao, tiêu hóa kém, tẩy giun và hạ sốt. Nhiều công trình nghiên cứu cho thấy, dứa cạn có khả năng kháng oxy hóa, kháng khuẩn và gây độc tế bào ung thư [8] – [10]. Nghiên cứu này tập trung vào hoạt tính sinh học của các dòng VKNS trong cây dứa cạn, bước đầu nhằm tìm ra dòng VKNS có hoạt tính sinh học tiềm năng.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Cây dứa cạn được thu vào tháng 02 năm 2023 tại quận Bình Thủy, thành phố Cần Thơ. Cây dứa cạn được định danh dựa vào đặc điểm hình thái bởi ThS. Trần Chí Linh (Bộ môn Sinh học, Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ) tại Phòng thí nghiệm Thực vật và Động vật, Bộ môn Sinh học, Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ.

Thiết bị được sử dụng trong nghiên cứu: Tủ sấy (Mettler UNB 200, Mettler, Đức), tủ cấy vô trùng (ThienTruong Scientific, Việt Nam), cân phân tích (PA213, Ohaus, Mỹ), máy đo quang phổ (Thermo Scientific Multiskan GO, Phần Lan), bếp điện từ (SHD 6800, Shunhouse, Trung Quốc), micropipette (Nichiryo LE, Nhật Bản), máy đo pH (C1020, Consort, Bỉ) và máy khuấy từ gia nhiệt (MS7-H550-Pro, Scilogex, Mỹ), nồi hấp khử trùng nhiệt ước (SA-300VL, Sturdy Industrial Co., Ltd, Đài Loan) và một thiết bị khác.

Hóa chất được sử dụng trong nghiên cứu: Môi trường potato dextrose broth (Himedia, Ấn Độ), ethanol (Cemeco, Việt Nam), hydrogen peroxide (Xilong, Trung Quốc, bộ nhuộm Gram (Nam Khoa, Việt Nam), agar (Hải Long, Việt Nam), Folin-ciocalteu (Merck, Đức), sodium carbonate (Xilong, Trung Quốc), gallic acid (Meck, Đức), aluminum chloride hexahydrate (Xilong, Trung Quốc), natri hydroxide (Merck, Đức), quercetin (Merck, Đức), kali ferricyanide (Merck, Đức), ferric chloride (Merck, Đức), trichloroacetic acid (Merck, Đức), 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (Sigma-Aldrich, Mỹ), ascorbic acid (Sigma-Aldrich, Mỹ) và sodium nitrite (Xilong, Trung Quốc) và một số hóa chất khác.



Hình 1. Cây dứa cạn (*Catharanthus roseus*)

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập và nuôi cấy VKNS trong cây dứa cạn

Nhóm nghiên cứu đã tiến hành thu lấy rễ, thân và lá của cây dứa cạn để phân lập VKNS theo mô tả của Đái Thị Xuân Trang và cộng sự [11]. Các dòng VKNS thuần chủng được nuôi tăng sinh trong môi trường potato dextrose broth để thu lấy dịch ngoại bào bằng cách chủng 400 μL của dòng VKNS ($\text{OD}_{600}=0,5$) vào 19600 μL môi trường potato dextrose broth, pH 7. Sau đó, các dòng VKNS được nuôi tăng sinh 24 giờ ở 30°C trên máy lắc ngang 200 vòng/phút. Sau 24 giờ, dịch nuôi tăng sinh được ly tâm 3000 vòng/phút trong 15 phút loại bỏ tế bào thu được dịch ngoại bào. Dịch ngoại bào được lưu trữ trong lọ thủy tinh ở 4°C sử dụng cho khảo sát tiếp theo.

2.2.2. Định lượng polyphenol và flavonoid tổng

Hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng trong dịch ngoại bào của các dòng VKNS được xác định theo mô tả của Trần Chí Linh và cộng sự [12]. Hàm lượng polyphenol, flavonoid trong dịch ngoại bào của các dòng VKNS lần lượt được xác định dựa trên phương trình đường chuẩn gallic acid (mg GAE/mL dịch ngoại bào) và quercetin (mg QE/ mL dịch ngoại bào).

2.2.3. Khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa *in vitro*

Phương pháp trung hòa gốc tự do 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), năng lực khử (Reducing power, RP) và kháng oxy hóa tổng số (total antioxidant capacity, TAC) theo mô tả của Trần Chí Linh và cộng sự [12] được sử dụng để khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa của dịch ngoại bào. Ascorbic acid được sử dụng làm chất đối chứng dương và môi trường PDB được sử dụng làm đối chứng âm. Hàm lượng chất kháng oxy hóa có trong dịch ngoại bào của các dòng VKNS ở các phương pháp kháng oxy hóa được xác định dựa trên phương trình đường chuẩn ascorbic acid (mg AAE/ mL dịch ngoại bào).

2.2.4. Khảo sát khả năng kháng viêm *in vitro*

Hoạt tính kháng viêm của dịch ngoại bào chiết xuất từ các dòng VKNS được xác định dựa vào khả năng ức chế sự biến tính albumin huyết thanh bò (bovine serum albumin, BSA) theo mô tả của Trần Chí Linh và cộng sự [12]. Diclofenac và môi trường PDB lần lượt được sử dụng như chất đối chứng dương và đối chứng âm trong thử nghiệm ức chế sự biến tính BSA. Khả năng kháng viêm *in vitro* được xác định dựa vào hàm lượng chất kháng viêm có trong dịch ngoại bào của các dòng VKNS. Hàm lượng chất kháng viêm có trong dịch ngoại bào của các dòng VKNS được xác định dựa trên phương trình đường chuẩn diclofenac (mg DE/mL dịch ngoại bào).

2.2.5. Định danh một số dòng VKNS tiềm năng

Các dòng VKNS có khả năng tổng hợp polyphenol, flavonoid, chất kháng oxy hóa và kháng viêm tiềm năng được lựa chọn để định danh. Trình tự gene *16S rRNA* của các dòng VKNS được khuếch đại bằng phản ứng chuỗi polymerase (Polymerase Chain Reaction, PCR) theo mô tả của Aravind và cộng sự [13]. Trình tự gene *16S rRNA* của các dòng VKNS được khuếch đại bằng cách sử dụng đoạn mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và đoạn mồi 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'). Quá trình PCR được thực hiện ở 95°C (5 phút), 35 chu kỳ – 94°C (1 phút), 53°C (1 phút), 72°C (1,5 phút) và 72°C (5 phút). Sản phẩm PCR của gene *16S rRNA* được giải trình tự tại công ty Macrogen (Macrogen, Inc. Seoul, Hàn Quốc). Các so sánh BLAST được thực hiện tại Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia (NCBI) để chọn ra các dòng vi khuẩn có độ tương đồng cao. Các đặc điểm hình thái của tế bào vi khuẩn được quan sát bằng kính hiển vi quang học (Olympus, Japan). Cây phát sinh chủng loài của các dòng VKNS dựa vào trình tự gene *16S rRNA* được xây dựng bằng phần mềm Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11.0.13 (MEGA 11.0.13).

2.2.6. Thống kê phân tích số liệu

Dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình \pm sai số chuẩn của thí nghiệm với ba lần lặp lại. Các số liệu được phân tích phương sai (ANOVA) với kiểm định Tukey's bằng phần mềm Minitab 16 (Sydney, NSW, Australia), sự khác biệt được xác định có ý nghĩa thống kê ở mức 5% ($p < 0,05$).

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Kết phân lập các dòng VKNS trong cây dứa cựa

Nghiên cứu đã phân lập được 11 dòng VKNS trong cây dứa cựa. Trong đó có 5 dòng phân lập từ rễ chiếm 45,46%, 3 dòng phân lập từ thân chiếm 27,27% và 3 dòng phân lập từ lá chiếm 27,27%.

Bảng 1. Tỷ lệ đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào của các dòng VKNS

Chỉ tiêu	Mô tả	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Hình dạng khuẩn lạc	Tròn nhỏ (< 2 mm)	9	81,82
	Tròn lớn (\geq 2 mm)	2	18,18
Hình dạng tế bào	Que	10	90,91
	Cầu	1	9,09
Gram	Âm	5	45,45
	Dương	6	54,55
Màu sắc	Trắng ngà	6	54,55
	Trắng đục	1	9,09
	Trắng sữa	4	36,36
Độ nổi	Mô	7	63,64
	Lài	4	36,36
Bìa	Nguyên	10	90,91
	Răng cưa	1	9,09

Các dòng VKNS trong cây dứa cạn đều có đặc tính là sinh trưởng và phát triển trong điều kiện vi hiếu khí, khi phát triển tạo thành màng mỏng pellicle cách mặt môi trường khoảng 1-1,5 cm. Các dòng VKNS trong cây dứa cạn được nhóm nghiên cứu mã hóa cụ thể như sau: CR-Rx, CR-Sx, CR-Lx với CR: *Catharanthus roseus*, R: Root (rễ), T: Stem (thân) và L: Leaves (lá). Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào của các dòng VKNS trong cây dứa cạn được thống kê và mô tả cụ thể trong Bảng 1 và Bảng 2.

Bảng 2. Đặc điểm hình thái và tế bào của các dòng VKNS trong cây dứa cạn

STT	Dòng vi khuẩn	Hình dạng khuẩn lạc	Dạng bìa	Độ nổi	Kích thước (mm)	Màu sắc	Hình dạng tế bào	Gram
1	CR-L1	Tròn nhỏ	Nguyên	Mô	0,2	Trắng sữa	Que	Âm
2	CR-L2	Tròn nhỏ	Nguyên	Lài	2,0	Trắng ngà	Que	Dương
3	CR-L3	Tròn nhỏ	Nguyên	Mô	0,6	Trắng sữa	Que	Dương
4	CR-R1	Tròn nhỏ	Nguyên	Mô	0,3	Trắng ngà	Que	Âm
5	CR-R2	Tròn to	Nguyên	Mô	1,0	Trắng ngà	Que	Âm
6	CR-R3	Tròn nhỏ	Nguyên	Lài	1,5	Trắng ngà	Que	Âm
7	CR-R4	Tròn to	Răng cưa	Lài	2,0	Trắng ngà	Que	Dương
8	CR-R5	Tròn nhỏ	Nguyên	Mô	1,5	Trắng sữa	Que	Dương
9	CR-S1	Tròn nhỏ	Nguyên	Lài	0,4	Trắng ngà	Que	Dương
10	CR-S2	Tròn nhỏ	Nguyên	Mô	0,7	Trắng đục	Que	Dương
11	CR-S3	Tròn nhỏ	Nguyên	Mô	0,8	Trắng sữa	Cầu	Âm

Kết quả ở Bảng 1 và Bảng 2 cho thấy, khuẩn lạc các dòng VKNS phân lập được đều có dạng hình tròn. Kích thước khuẩn lạc trong khoảng 0,2 mm đến 2 mm. Khuẩn lạc màu trắng ngà có 6 dòng (chiếm 54,55%), màu trắng sữa có 4 dòng (chiếm 36,58%) và trắng đục có 1 dòng (chiếm 9,09%). Tế bào vi khuẩn hình que có 10 dòng (chiếm 90,91%) và hình cầu có 1 dòng (chiếm 9,09%). Các dòng VKNS trong cây dứa cạn có cả Gram dương (6 dòng, chiếm 54,55%) và Gram âm (5 dòng, chiếm 45,45%).

3.2. Kết quả định lượng polyphenol và flavonoid

Polyphenol và flavonoid đã được coi là dược phẩm dinh dưỡng trong y học để điều trị một số bệnh do lối sống hiện đại. Một số polyphenol và flavonoid phổ biến đã được thương mại hóa là kaempferol, quercetin, genistein, rutin, catechin. Bên cạnh nguồn polyphenol và flavonoid từ thực vật, các dòng VKNS trong cây dứa cạn cũng được chứng minh có thể sản sinh ra polyphenol và flavonoid. Các dòng VKNS trong cây dứa cạn có khả năng sản sinh polyphenol với hàm lượng dao động từ 81,19±0,79 đến 132,97±0,62 mg GAE/mL dịch ngoại bào và hàm lượng flavonoid dao động từ 10,97±0,15 đến 29,84±0,24 mg QE/mL dịch ngoại bào (Bảng 3). Dòng vi khuẩn CR-L2, CR-R2 và CR-R3 có khả năng sản sinh polyphenol và flavonoid nhiều hơn khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với các dòng vi khuẩn còn lại.

3.3. Kết quả khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa in vitro

Chất kháng oxy hóa là các hợp chất có khả năng ngăn ngừa, trì hoãn hoặc ức chế quá trình oxy hóa deoxyribonucleic acid, lipid màng và protein, do đó bảo vệ trực tiếp tế bào khỏi tổn thương oxy hóa. Khả năng kháng oxy hóa của dịch ngoại bào từ các dòng VKNS trong cây dứa cạn đã được xác định dựa trên phương pháp TAC, RP và DPPH, đây là các thử nghiệm kháng oxy hóa phổ biến đã được sử dụng rộng rãi để đánh giá hoạt tính kháng oxy hóa trên nhiều đối tượng. Khả năng kháng oxy hóa của các VKNS trong cây dứa cạn được khảo sát và trình bày trong Bảng 3. Nghiên cứu đã chứng minh được các dòng VKNS trong cây dứa cạn có khả năng tạo ra chất kháng oxy hóa có khả năng trung hòa hoặc khử được nhiều gốc tự do khác nhau. Kết quả khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa còn cho thấy, hàm lượng chất kháng oxy hóa ở cả 3 phương pháp RP, TAC và DPPH hầu hết có sự tỷ lệ thuận với hàm lượng polyphenol, flavonoid. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, hàm lượng chất kháng oxy hóa mà các dòng VKNS trong cây

dừa cạn sản sinh ra dao động từ $5,34 \pm 0,26$ đến $175,44 \pm 0,46$ mg AAE/mL dịch ngoại bào. Trong đó, hàm lượng chất kháng oxy hóa tổng số mà các dòng VKNS trong cây dừa cạn trong nghiên cứu của chúng tôi (hàm lượng chất kháng oxy hóa tổng số dao động từ $138,93 \pm 0,30$ đến $175,44 \pm 0,46$ mg AAE/mL dịch ngoại bào) sản sinh ra nhiều hơn các dòng VKNS trong cây cò sen (hàm lượng chất kháng oxy hóa tổng số dao động từ $32,52 \pm 1,59$ đến $113,33 \pm 5,63$ mg AAE/mL dịch ngoại bào) mà Đái Thị Xuân Trang và cộng sự [11] đã công bố. Như vậy, dòng VKNS trong cây dừa cạn cho thấy khả năng cung cấp nguồn chất kháng oxy hóa đầy tiềm năng.

3.4. Kết quả khảo sát hoạt tính kháng viêm in vitro

Cơ chế viêm rất quan trọng đối với chức năng của sinh vật và được kiểm soát chặt chẽ liên quan đến nhiều yếu tố. Viêm sinh lý là kết quả của sự di nhập bạch cầu đến các mô bị tổn thương để loại bỏ mầm bệnh, sửa chữa mô và trở lại cân bằng nội môi. Tuy nhiên, khi bản chất tự giới hạn của phản ứng viêm và cơ chế kiểm soát không cân bằng, tình trạng viêm mất kiểm soát có thể dẫn đến sự phát triển của nhiều bệnh nghiêm trọng [14]. Nghiên cứu của chúng tôi đã tiến hành sàng lọc hoạt tính kháng viêm của các dòng VKNS trong cây dừa cạn thông qua phản ứng bảo vệ protein BSA khỏi sự biến tính do nhiệt. Kết quả nghiên cứu cho thấy, các dòng VKNS trong cây dừa cạn có khả năng sản sinh chất kháng viêm với hàm lượng dao động từ $14,35 \pm 0,54$ đến $30,35 \pm 0,20$ mg DE/mL dịch ngoại bào (Bảng 3).

Bảng 3. Hàm lượng polyphenol, flavonoid, chất kháng oxy hóa và chất kháng viêm in vitro có trong dịch ngoại bào của các dòng VKNS trong cây dừa cạn

STT	Dòng vi khuẩn	Polyphenol ⁽¹⁾	Flavonoid ⁽²⁾	DPPH ⁽³⁾	RP ⁽⁴⁾	TAC ⁽⁵⁾	BSA ⁽⁶⁾
1	CR-L1	$81,19^e \pm 0,79$	$16,71^f \pm 0,24$	$12,51^{bcd} \pm 0,11$	$79,33^f \pm 0,20$	$150,04^f \pm 0,45$	$29,42^{bcd} \pm 0,23$
2	CR-L2	$132,97^a \pm 0,62$	$29,84^a \pm 0,24$	$14,27^a \pm 0,10$	$90,38^a \pm 0,19$	$175,44^a \pm 0,46$	$30,35^a \pm 0,20$
3	CR-L3	$106,54^{cd} \pm 3,81$	$14,41^g \pm 0,19$	$12,06^{ef} \pm 0,03$	$77,39^g \pm 0,15$	$145,58^g \pm 0,34$	$28,48^{ef} \pm 0,06$
4	CR-R1	$111,78^b \pm 2,18$	$10,97^h \pm 0,15$	$5,34^g \pm 0,26$	$74,50^i \pm 0,13$	$138,93^i \pm 0,30$	$14,35^g \pm 0,54$
5	CR-R2	$112,60^b \pm 1,67$	$22,76^b \pm 0,32$	$12,94^b \pm 0,11$	$84,43^b \pm 0,27$	$161,75^b \pm 0,62$	$30,33^{ab} \pm 0,22$
6	CR-R3	$110,55^{bc} \pm 0,25$	$21,89^c \pm 0,31$	$12,79^b \pm 0,02$	$83,69^c \pm 0,26$	$160,06^c \pm 0,60$	$30,01^{ab} \pm 0,02$
7	CR-R4	$108,59^{bc} \pm 0,98$	$20,66^d \pm 0,27$	$12,72^{bc} \pm 0,06$	$82,66^d \pm 0,22$	$157,68^d \pm 0,52$	$29,86^{abc} \pm 0,13$
8	CR-R5	$110,80^{bc} \pm 0,65$	$14,82^e \pm 0,15$	$12,17^{def} \pm 0,04$	$77,73^e \pm 0,13$	$146,37^e \pm 0,30$	$28,71^{def} \pm 0,09$
9	CR-S1	$108,75^{bc} \pm 0,37$	$16,30^f \pm 0,32$	$12,31^{cde} \pm 0,06$	$78,99^f \pm 0,27$	$149,25^f \pm 0,62$	$29,00^{cde} \pm 0,13$
10	CR-S2	$111,53^b \pm 0,49$	$12,15^h \pm 0,24$	$11,79^f \pm 0,37$	$75,49^h \pm 0,19$	$141,21^h \pm 0,46$	$27,90^f \pm 0,77$
11	CR-S3	$103,60^d \pm 0,62$	$19,07^e \pm 0,24$	$12,61^{bc} \pm 0,02$	$81,32^e \pm 0,20$	$154,60^e \pm 0,45$	$29,63^{abc} \pm 0,05$

(1) Hàm lượng polyphenol được xác định dựa vào phương trình đường chuẩn gallic acid có dạng: $y = 0,0078x + 0,0608$ ($R^2 = 0,9972$), đơn vị mg GAE/mL dịch ngoại bào. (2) Hàm lượng flavonoid được xác định dựa vào phương trình đường chuẩn quercetin có dạng: $y = 0,0011x + 0,0517$ ($R^2 = 0,9971$), đơn vị mg QE/mL dịch ngoại bào. (3) Hàm lượng chất có khả năng trung hòa gốc tự do DPPH được xác định dựa vào phương trình đường chuẩn ascorbic acid có dạng: $y = -0,8179 + 1,1592$ ($R^2 = 0,9958$), đơn vị mg AAE/mL dịch ngoại bào. (4) Hàm lượng chất có năng lực khử được xác định dựa vào phương trình đường chuẩn ascorbic acid có dạng: $y = 0,0119x + 0,0847$ ($R^2 = 0,9981$), đơn vị mg AAE/mL dịch ngoại bào. (5) Hàm lượng chất kháng oxy hóa tổng số được xác định dựa vào phương trình đường chuẩn ascorbic acid có dạng: $y = 0,0106x - 0,0024$ ($R^2 = 0,9978$), đơn vị mg AAE/mL dịch ngoại bào. (6) Hàm lượng chất kháng viêm được xác định dựa vào phương trình đường chuẩn diclofenac có dạng: $y = 6,5792x - 0,0902$ ($R^2 = 0,991$), đơn vị mg DE/mL dịch ngoại bào. Trong cùng một cột, các số trung bình theo sau bởi một hoặc những chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% bằng phép thử Tukey's.

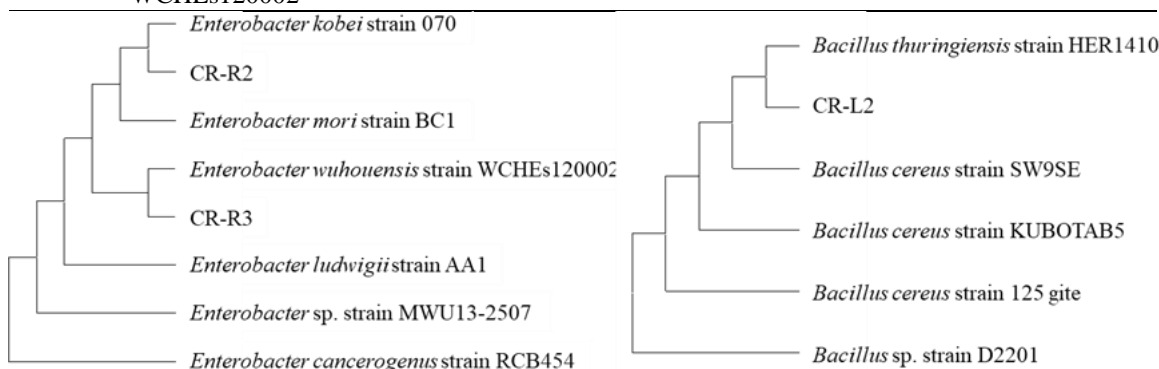
3.5. Kết quả định danh một số dòng VKNS tiềm năng

Kết quả khảo sát cho thấy, dòng vi khuẩn CR-L2, CR-R2 và CR-R3 có khả năng sản sinh polyphenol, flavonoid, kháng oxy hóa và kháng viêm hiệu quả hơn các dòng vi khuẩn còn lại. Do đó, dòng vi khuẩn CR-L2, CR-R2 và CR-R3 đã được chọn để giải trình gene *16S RNA* để giải

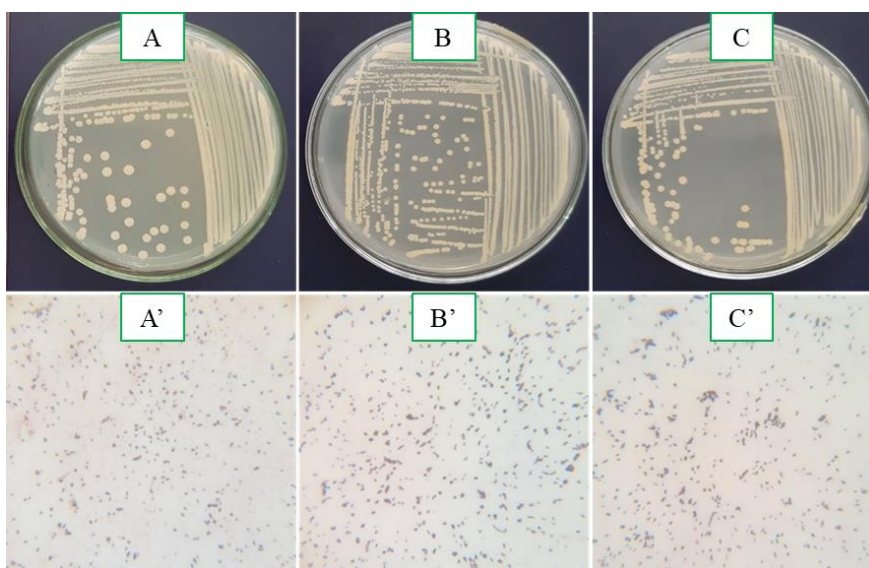
trình tự. Kết quả định danh được trình bày trong Bảng 4 và Hình 2 cho thấy, dòng vi khuẩn CR-R2 và CR-R3 thuộc chi *Enterobacter* còn dòng vi khuẩn CR-L2 thuộc chi *Bacillus*.

Bảng 4. Kết quả nhận diện các dòng VKNS trong cây dừa cạn

Dòng	Loài tương đồng	Chiều dài đoạn gene	Độ phủ (%)	Mức độ tương đồng (%)	Accession number
CR-L2	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain HER1410	1439	100	99,93	CP050183.1
CR-R2	<i>Enterobacter kobei</i> strain 070	825	100	100	CP050073.1
CR-R3	<i>Enterobacter wuhouensis</i> strain WCHEs120002	819	100	99,88	MK567957.1



Hình 2. Cây phát sinh chủng loại dòng vi khuẩn CR-L2, CR-R2 và CR-R3



Hình 3. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc, tế bào của vi khuẩn CR-L2, CR-R2 và CR-R3
A, B, C lần lượt là đặc điểm hình thái khuẩn lạc của dòng vi khuẩn CR-L2, CR-R2 và CR-R3
A', B', C' lần lượt là đặc điểm hình thái tế bào của dòng vi khuẩn CR-L2, CR-R2 và CR-R3 dưới kính hiển vi quang học (Olympus, Japan) ở độ phóng đại 400 lần.

Đặc điểm hình thái của dòng vi khuẩn CR-L2, CR-R2 và CR-R3 được trình bày trong Hình 3. Dòng vi khuẩn CR-R2, CR-R3 được mô tả là có tế bào hình que và Gram âm phù hợp với kết quả định danh (chi *Enterobacter* có tế bào hình que, Gram âm). Dòng vi khuẩn CR-L2 được mô tả tế bào có dạng hình que, Gram dương cho thấy sự phù hợp với kết quả định danh thuộc chi *Bacillus*. Như vậy, các dòng vi khuẩn thuộc chi *Enterobacter* và *Bacillus* sống nội sinh trong cây dừa cạn được xác định có khả năng sản sinh polyphenol, flavonoid, kháng oxy hóa và kháng viêm.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã phân lập được 11 dòng VKNS từ rễ, thân và lá của cây dứa cạn. Các dòng VKNS trong cây dứa cạn đều có thể được nuôi cấy trong điều kiện phòng thí nghiệm và sản sinh polyphenol, flavonoid. Các dòng VKNS trong cây dứa cạn có khả năng kháng oxy hóa và kháng viêm. Hoạt tính kháng oxy hóa và kháng viêm của các dòng VKNS trong cây dứa cạn có liên quan đến hàm lượng polyphenol và flavonoid mà các dòng vi khuẩn sản sinh ra. Trong đó, dòng vi khuẩn CR-L2, CR-R2 và CR-R3 cho thấy khả năng sản sinh polyphenol, flavonoid, hàm lượng chất kháng oxy hóa và kháng viêm vượt trội hơn các dòng vi khuẩn còn lại. Kết quả định danh cho thấy, dòng vi khuẩn CR-L2 thuộc chi *Bacillus* và dòng vi khuẩn CR-R2 và EM-L3 thuộc chi *Enterobacter*. Nghiên cứu gợi ý hoạt động khai thác các hợp chất chuyển hóa thứ cấp mà các dòng VKNS trong cây dứa cạn tạo ra như một tác nhân giúp hỗ trợ điều trị các bệnh liên quan đến gốc tự do và viêm nhiễm. Hoạt tính kháng oxy hóa và kháng viêm cho thấy tiềm năng sử dụng các hợp chất chuyển hóa thứ cấp mà các dòng VKNS trong cây dứa cạn sản sinh để phục vụ cho nhu cầu chăm sóc sức khỏe của con người.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] D. Zheng, T. Liwinski, and E. Elinav, "Interaction between microbiota and immunity in health and disease," *Cell Research*, vol. 30, pp. 492-506, 2020.
- [2] A. A. Al-Qahtani, F. S. Alhamlan, and A. A. Al-Qahtani, "Proinflammatory and anti-inflammatory interleukins in infectious diseases: A comprehensive review," *Tropical Medicine and Infectious Disease*, vol. 9, p. 13, 2024.
- [3] L. Zuo, E. R. Prather, M. Stetskiv, D. E. Garrison, J. R. Meade, T. I. Peace, and T. Zhou, "Inflammation and oxidative stress in human diseases: From molecular mechanisms to novel treatments," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, no. 18, p. 4472, 2019.
- [4] E. Scarian, C. Viola, F. Dragoni, R. D. Gerlando, B. Rizzo, L. Diamanti, S. Gagliardi, M. Bordoni, and O. Pansarasa, "New Insights into oxidative stress and inflammatory response in neurodegenerative diseases," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 25, p. 2698, 2024.
- [5] M. E. Pyne, L. Narcross, and V. J. Martin, "Engineering plant secondary metabolism in microbial systems," *Plant Physiology*, vol. 179, pp. 844-861, 2019.
- [6] A. A. Ogbe, J. F. Finnie, and J. V. Staden, "The role of endophytes in secondary metabolites accumulation in medicinal plants under abiotic stress," *South African Journal of Botany*, vol. 134, pp. 126-134, 2020.
- [7] C. D. Wu, Y. B. Fan, X. Chen, J. W. Cao, J. Y. Ye, M. L. Feng, X. X. Liu, W. J. Sun, R. N. Liu, and A. Y. Wang, "Analysis of endophytic bacterial diversity in seeds of different genotypes of cotton and the suppression of *Verticillium* wilt pathogen infection by a synthetic microbial community," *BMC Plant Biology*, vol. 24, no. 1, p. 263, 2024.
- [8] S. Rajashekara, D. Reena, and M. V. Mainavi, "Biological isolation and characterization of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don methanolic leaves extracts and their assessment for antimicrobial, cytotoxic, and apoptotic activities," *BMC Complementary Medicine and Therapies*, vol. 22, p. 328, 2022.
- [9] D. Neglo, F. Adzaho, I. A. Agbo, R. Arthur, D. Sedohia, C. O. Tettey, and S. D. Waikhom, "Antibiofilm activity of *Azadirachta indica* and *Catharanthus roseus* and their synergistic effects in combination with antimicrobial agents against fluconazole-resistant *Candida albicans* strains and MRSA," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2022, p. 9373524, 2022.
- [10] Q. M. S. Jamal and V. Ahmad, "Identification of metabolites from *Catharanthus roseus* leaves and stem extract, and *in vitro* and *in silico* antibacterial activity against food pathogens," *Pharmaceuticals*, vol. 17, p. 450, 2024.
- [11] T. T. X. Dai, T. T. Chau, T. P. T. Truong, C. L. Tran, and N. T. K. Nguyen, "Isolating *Miliusa velutina* endophytic bacteria to generate antioxidants and optimizing culture conditions for antioxidant production," *South African Journal of Botany*, vol. 166, pp. 561-570, 2024.
- [12] C. L. Tran, T. X. D. Dai, K. N. H. Pham, T. T. A. Vo, T. D. Luu, and T. M. Tran, "Biological activities of extract from root of *Miliusa velutina*," *National Biotechnology Conference*, vol. 2020, pp. 225-231, 2020.
- [13] R. Aravind, A. Kumar, S. J. Eapen, and K.V. Ramana, "Endophytic bacterial flora in root and stem tissues of black pepper (*Piper nigrum* L.) genotype: Isolation, identification and evaluation against *Phytophthora capsici*," *Letters in Applied Microbiology*, vol. 48, no. 1, pp. 58-64, 2009.
- [14] W. Ansar and S. Ghosh, "Inflammation and inflammatory diseases, markers, and mediators: Role of CRP in some inflammatory diseases," *Biology of C Reactive Protein in Health and Disease*, vol. 24, pp. 67-107, 2016.