

ISOLATION AND EVALUATION OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ENDOPHYTIC BACTERIAL STRAINS IN *Pouzolzia zeylanica* L.

Pham Khanh Nguyen Huan*, Tran Chi Linh, Vo Hoang Long, Dai Thi Xuan Trang
Can Tho University

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p>Received: 05/9/2022</p> <p>Revised: 19/10/2022</p> <p>Published: 21/10/2022</p>	<p>In recent years, many studies have shown that endophytic bacteria in plants are essential in agriculture, medicine and have great potential for applications. Therefore, the aim of this study is isolating endophytic bacteria in <i>Pouzolzia zeylanica</i> L.. Root, stem and leaf samples of <i>P. zeylanica</i> in a local area in Can Tho city were used as raw materials for isolating endophytic bacteria. 26 endophytic bacterial strains were isolated, showing the ability to culture <i>in vitro</i>. The antibacterial activity of those bacteria was investigated by the agar well diffusion method for intracellular, extracellular and the mixture of culture media and bacteria cells. 17 strains showed antibacterial activity against <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, <i>Listeria innocua</i>, <i>Vibrio parahaemolyticus</i> and <i>Staphylococcus aureus</i>. The mixture and extracellular fluid have high antibacterial ability, while intracellular fluid does not. This study gives a hint for applying endophytic bacteria as a biocontrol resource.</p>
<p>KEYWORDS</p> <p><i>Pouzolzia zeylanica</i> L. Endophytic Bacteria Antibacterial activity <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Vibrio parahaemolyticus</i></p>	

PHÂN LẬP VÀ KHẢO SÁT KHẢ NĂNG ĐỐI KHÁNG CỦA CÁC CHỦNG VI KHUẨN NỘI SINH TRONG CÂY BỘ MẮM (*Pouzolzia zeylanica* L.) CHỐNG LẠI MỘT SỐ VI KHUẨN GÂY BỆNH

Phạm Khánh Nguyên Huân*, Trần Chí Linh, Võ Hoàng Long, Đái Thị Xuân Trang
Trường Đại học Cần Thơ

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
<p>Ngày nhận bài: 05/9/2022</p> <p>Ngày hoàn thiện: 19/10/2022</p> <p>Ngày đăng: 21/10/2022</p>	<p>Trong những năm gần đây, nhiều nghiên cứu cho thấy vi khuẩn nội sinh trong thực vật có vai trò quan trọng trong nông nghiệp, được liệu, và có tiềm năng ứng dụng rất lớn. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá khả năng mang các vi khuẩn nội sinh trong cây bộ mắm (<i>Pouzolzia zeylanica</i> L.). Các thí nghiệm đã được bố trí để phân lập, nuôi cấy <i>in vitro</i> các vi khuẩn nội sinh từ các mẫu rễ, thân và lá của cây thu thập ở một địa phương tại thành phố Cần Thơ. Kết quả phân lập được 26 chủng vi khuẩn nội sinh có thể nuôi cấy <i>in vitro</i>. Các vi khuẩn này được tăng sinh và thu dịch nội bào, dịch ngoại bào, dịch hỗn hợp để thử hoạt tính đối kháng chống lại khuẩn gây hại. Kết quả cho thấy có 17 chủng vi khuẩn nội sinh có khả năng kháng các vi khuẩn như <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, <i>Listeria innocua</i>, <i>Vibrio parahaemolyticus</i> và <i>Staphylococcus aureus</i>. Nghiên cứu cho thấy cây bộ mắm có chứa các vi khuẩn nội sinh có thể phân lập khỏi cây chủ và nuôi cấy trong điều kiện phòng thí nghiệm. Các vi khuẩn đã phân lập thể hiện khả năng kháng khuẩn tốt đối với một số vi khuẩn gây hại và có tiềm năng tiếp tục nghiên cứu phát triển như là một tác nhân kháng khuẩn tự nhiên.</p>
<p>TỪ KHÓA</p> <p><i>Pouzolzia zeylanica</i> L. Vi khuẩn nội sinh Kháng khuẩn <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Vibrio parahaemolyticus</i></p>	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.6421>

* Corresponding author. Email: pknhuan@ctu.edu.vn

1. Giới thiệu

Trong những năm gần đây, nhiều nghiên cứu đã tìm hiểu sự tương tác giữa vi khuẩn và thực vật, đặc biệt là các vi khuẩn nội sinh, cho thấy được tầm quan trọng và vai trò của vi khuẩn nội sinh trong nông nghiệp, dược liệu và y học [1]. Vi khuẩn nội sinh là một nhóm vi sinh vật nội cộng sinh phổ biến trong các loài thực vật, chúng sống trong các khoảng gian bào và nội bào của thực vật nhưng không gây hại cho cây chủ [2]. Một số vi khuẩn nội sinh còn đóng vai trò quan trọng trong việc tăng cường sức sống, thúc đẩy tăng trưởng cho cây trồng, giúp tăng sức chống chịu điều kiện bất lợi, chống stress và nâng cao năng suất của cây trồng. Do đó, vi khuẩn nội sinh ngày càng nhận được sự quan tâm nghiên cứu khoa học lẫn tiềm năng thương mại hóa [3]. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh những tác động tích cực của vi khuẩn nội sinh đến cây chủ như sản sinh các hợp chất kháng bệnh, kháng stress, giữ nước và tổng hợp các hormone thúc đẩy tăng trưởng thực vật [4], [5]. Vi khuẩn nội sinh tạo ra nhiều chất chuyển hóa thứ cấp mới và có hoạt tính sinh học không chỉ có lợi cho cây chủ mà còn có thể ứng dụng trong các ngành dược phẩm, nông nghiệp và thực phẩm [6], [7]. Các nghiên cứu gần đây đã bắt đầu khám phá ra tầm quan trọng của vi khuẩn nội sinh đối với các loài cây dược liệu như gia tăng dược tính của cây, kháng stress [8], [9]. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng, hàm lượng các chất chuyển hóa thứ cấp từ cùng một loài dược liệu có thể khác nhau tùy thuộc vào vị trí địa lý, điều kiện khí hậu và cả hệ vi sinh vật khu trú cũng như vi khuẩn nội sinh [10]. Những nghiên cứu chuyên sâu vào vi khuẩn nội sinh cũng chỉ ra được bản thân những vi khuẩn này sở hữu những khả năng đối kháng sinh học chống lại vi khuẩn, nấm... gây hại [4], [9], [11]. Những vi khuẩn nội sinh này có nhiều tiềm năng ứng dụng, bên cạnh việc phối hợp với cây dược liệu, chúng còn có thể sử dụng như một phương pháp kiểm soát sinh học hoặc là nguồn nguyên liệu tìm ra các chất thuốc mới [12].

Theo kinh nghiệm dân gian, cây bọ mả (*Pouzolzia zeylanica* L.) là một loại thảo dược thường được dùng để điều trị các chứng tiêu chảy, khó tiêu, ho... Hiện nay, các nghiên cứu về hoạt tính sinh học và thành phần hóa học ở cây bọ mả chỉ tập trung trên cao chiết, chất chiết [13]-[16]. Tuy nhiên, việc sử dụng trực tiếp thực vật như một chất kháng khuẩn có thể làm gia tăng chi phí hoặc gây khó khăn trong việc chiết suất với quy mô lớn. Trong khi đó, các nghiên cứu về vi khuẩn nội sinh trong cây bọ mả vẫn chưa được quan tâm thực hiện nhiều. Nghiên cứu này nhằm xác định những chủng vi khuẩn nội sinh trong cây bọ mả có thể nuôi cấy trong điều kiện phòng thí nghiệm độc lập khỏi cây chủ. Đồng thời, nghiên cứu cũng khảo sát khả năng ức chế một số vi khuẩn gây bệnh của các vi khuẩn nội sinh đã nhân nuôi *in vitro*.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Cây bọ mả được thu ở một số khu vực tại thành phố Cần Thơ. Môi trường potato dextrose thành phần gồm 200 g khoai tây (dạng nước hầm), 20 g dextrose cho 1 L môi trường [17], [18] (Himedia, Ấn Độ) được sử dụng để nuôi cấy và phân lập vi khuẩn nội sinh. Môi trường potato dextrose dạng lỏng (PDB), đặc (PDA - bổ sung 1,5% agar) và môi trường PDA bán đặc (bổ sung 0,15% agar) được sử dụng cho các thí nghiệm thích hợp. Các dòng vi khuẩn gây bệnh gồm *Listeria innocua* ATCC33090, *Bacillus cereus* ATCC ® 10876TM, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27855, *Escherichia coli* ATCC ® 25922TM, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC ® 13311TM và *Vibrio parahaemolyticus* ATCC ® 14802TM được cung cấp bởi Bộ môn Sinh học, khoa Khoa học Tự nhiên, trường Đại học Cần Thơ. Các chủng vi khuẩn gây bệnh được nuôi cấy và khảo sát hoạt tính kháng khuẩn trên môi trường Luria Bertani (LB) broth và LB agar (Himedia, Ấn Độ). Kháng sinh vancomycin (dưới dạng vancomycin hydroclorid) 500 mg và kháng sinh azithromycin (dưới dạng azithromycin dihydrate) được sử dụng làm đối chứng trong các thí nghiệm kháng khuẩn.

2.2. Phân lập và nuôi cấy *in vitro* vi khuẩn nội sinh từ cây bọ mả

Cây bọ mấu thu về được tách riêng các bộ phận rễ, thân, lá và rửa sạch nhiều lần với nước. Mẫu được rửa lại bằng nước cất vô trùng và cắt thành các đoạn ngắn 3-4 cm. Mẫu tiếp tục được khử trùng bề mặt bằng ethanol 70% trong 30 giây, rửa lại bằng nước cất vô trùng 3-4 lần. Cuối cùng, mẫu được khử trùng bằng hydrogen peroxide 3% (H_2O_2) trong thời gian 3 phút và rửa lại với nước cất vô trùng 4-5 lần để loại bỏ các hóa chất còn tồn tại. Các mẫu sau khi khử trùng được giã nhuyễn và cho thêm 2-3 mL nước cất, trộn đều và để lắng trong 10-12 phút trong tủ cây vô trùng. Lấy 100 μ L phần dịch bên trên cho vào ống nghiệm chứa 10 mL môi trường PDA bán đặc đã được chuẩn bị trước đó, ủ trong 24-48 giờ ở nhiệt độ thích hợp. Theo dõi sự xuất hiện của vòng trắng đục (vòng pellicle) bên dưới, cách bề mặt môi trường 2-4 mm, thể hiện sự phát triển của vi khuẩn nội sinh. Thu vi khuẩn từ vòng trắng đục, nuôi cấy và tách riêng các vi khuẩn đó cho đến khi thuần. Tiến hành quan sát và ghi nhận đặc điểm khuẩn lạc (hình dạng, kích thước, màu sắc, dạng bia, độ nổi). Bộ thuốc nhuộm Gram (Công ty TNHH Dịch vụ & Thương mại (DV&TM) Nam Khoa) được sử dụng để xác định Gram của các chủng vi khuẩn theo hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất.

2.3. Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của các chủng vi khuẩn nuôi cấy *in vitro*

Các chủng vi khuẩn nội sinh, sau khi tách dòng, được nuôi tăng sinh trong môi trường PD: chủng 300 μ L dịch vi khuẩn ở $OD_{600}=0,5$ vào 2700 μ L môi trường PDB. Sau đó, nuôi tăng sinh 24 giờ ở nhiệt độ thích hợp trên máy lắc ngang 150 vòng/phút. Sau 24 giờ, dịch nuôi tăng sinh được thu thành 3 phần:

Phần 1 – dịch ngoại bào: Dịch tăng sinh (1 mL) được ly tâm 3000 vòng/phút trong 15 phút, loại bỏ tế bào vi khuẩn thu được dịch ngoại bào.

Phần 2 – dịch nội bào: Dịch tăng sinh (1 mL) được ly tâm 3000 vòng/phút trong 15 phút, thu lấy phần tế bào bên dưới. Sau đó, tế bào được hòa vào 1 mL nước muối sinh lý và tiến hành đánh siêu âm ở nhiệt độ 30°C trong 30 phút, với tần suất 40 kHz để phá vỡ tế bào vi khuẩn. Tiếp tục ly tâm loại bỏ phần xác tế bào và thu lấy phần dịch nội bào.

Phần 3 – dịch hỗn hợp: Dịch tăng sinh (1 mL) bao gồm cả dịch nuôi và tế bào vi khuẩn được đánh siêu âm ở nhiệt độ 30°C trong 30 phút với tần suất 40 kHz nhằm làm vỡ tế bào vi khuẩn. Sau khi lắc đều thì ly tâm loại bỏ phần xác, mảnh vỡ tế bào và thu lấy phần dịch hỗn hợp.

Các dịch thu được tiến hành khảo sát hoạt tính kháng khuẩn dựa theo phương pháp khuếch tán giếng thạch như mô tả của Bauer có hiệu chỉnh [19], tóm tắt như sau: Các chủng vi khuẩn gây bệnh (100 μ L, mật số tương đương 10^6 tế bào vi khuẩn/mL) được trải lên bề mặt môi trường LB agar. Sau đó, tạo các giếng trên đĩa agar và nhỏ lần lượt 50 μ L 3 phần dịch bên trên vào các giếng thạch. Các đĩa thạch được ủ ở 30°C trong 24 giờ và tiến hành đo đường kính vòng kháng khuẩn.

So sánh tuyển chọn các chủng vi khuẩn nội sinh tiềm năng thông qua đường kính vòng kháng khuẩn và số vi khuẩn gây hại bị ức chế [20]. Bên cạnh đó, môi trường PDB được sử dụng làm đối chứng âm, vancomycin (liều 160 μ g/mL) được sử dụng làm đối chứng dương cho vi khuẩn Gram dương *S. aureus*, *L. innocua* và azithromycin (liều 160 μ g/mL) được sử dụng làm đối chứng dương cho vi khuẩn Gram âm *P. aeruginosa* và *V. parahaemolyticus*.

Mức độ kháng khuẩn được sắp xếp dựa vào đường kính vòng kháng khuẩn theo đề xuất của Galindo [20]: có tính kháng mạnh (>20 mm), có tính kháng trung bình (từ 6 đến 20 mm), tính kháng yếu (dưới 6 mm) và khi không tạo được vòng kháng khuẩn thì được ghi nhận là không có tính kháng.

2.4. Định danh vi khuẩn

Một số dòng vi khuẩn nội sinh tiềm năng, có khả năng phát triển ổn định và phổ kháng khuẩn rộng sẽ được lựa chọn để định danh bằng cách áp dụng kỹ thuật giải trình tự gene 16S rRNA. Kết hợp với các đặc điểm hình thái khuẩn lạc, so sánh với cơ sở dữ liệu 16S RNA trên ngân hàng gen (Genbank) nhằm xác định chi vi khuẩn. Các chủng vi khuẩn nội sinh được ly trích DNA và giải trình tự gene 16S rRNA tại Công ty TNHH DV và TM Nam Khoa (Địa chỉ: 793/58, Trần Xuân Soạn, P. Tân Hưng, Q. 7, TP. Hồ Chí Minh).

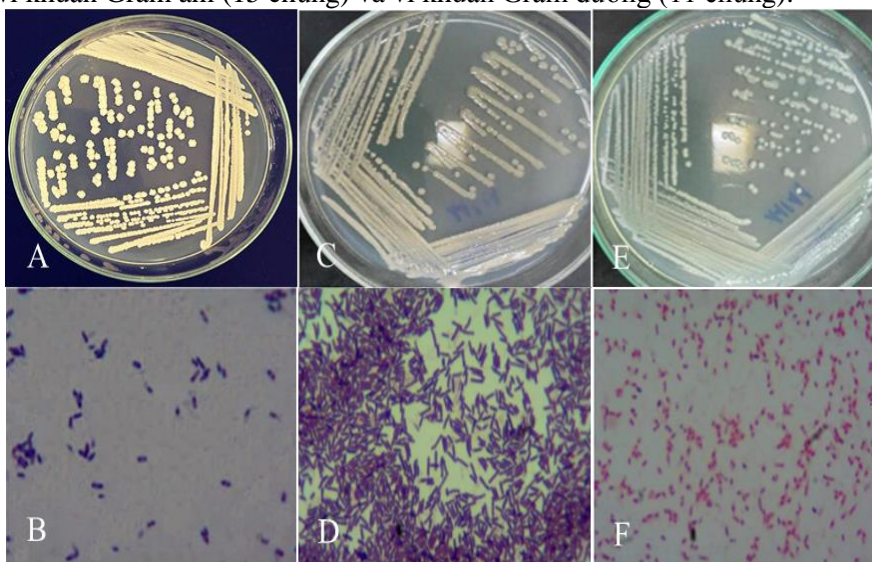
Các số liệu được phân tích và xử lý thống kê bằng phần mềm Minitab 16 (ANOVA, Tukey's Test).

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Phân lập và nuôi cấy *in vitro* vi khuẩn nội sinh cây bọ mắm

Quá trình phân lập, cấy tách dòng và nuôi cấy *in vitro* vi khuẩn nội sinh từ các bộ phận khác nhau của cây bọ mắm đã thu được 26 chủng vi khuẩn. Trong đó, từ rễ đã phân lập được 14 chủng vi khuẩn, từ lá phân lập được 9 chủng vi khuẩn và 3 chủng vi khuẩn nội sinh từ thân bọ mắm. Các chủng vi khuẩn này được ký hiệu như sau: LBMx, TBMx, RBMx với L: lá, T: thân, R: rễ, BM: bọ mắm, x: số thứ tự dòng vi khuẩn phân lập.

Quá trình nhân nuôi cho thấy các vi khuẩn này có thể phát triển với môi trường PDA, PDB ở nhiệt độ 30°C. Các chủng vi khuẩn đã phân lập tạo khuẩn lạc có hình tròn, màu trắng đục hoặc trắng ngà, độ nổi mô, bìa nguyên, đường kính dao động từ 1 đến 3 mm (Hình 1, Bảng 1). Tiến hành nhuộm Gram và quan sát dưới kính hiển vi cho thấy các chủng phân lập được đều có hình que, có cả vi khuẩn Gram âm (15 chủng) và vi khuẩn Gram dương (11 chủng).



Hình 1. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào của một số chủng vi khuẩn nội sinh. A, B: chủng RBM1; C, D: chủng LBM9; E, F: chủng LBM5. B, D, F: độ phóng đại 600X.

Bảng 1. Đặc điểm khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn nội sinh

Mô tả	Đặc điểm	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Hình dạng khuẩn lạc	Tròn nhỏ (<2 mm)	14	53,84
	Tròn lớn (≥2 mm)	12	46,16
Hình dạng tế bào	Que	26	100
Gram	Gram âm	15	57,69
	Gram dương	11	42,31
Màu sắc	Trắng ngà	17	65,38
	Trắng đục	9	34,62
Độ nổi	Mô	26	100
Dạng bìa	Nguyên	26	100

3.2. Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của các chủng vi khuẩn nội sinh

Các nghiên cứu bước đầu đã khảo sát các chủng vi khuẩn nội sinh phân lập được từ cây bọ mắm đối kháng với các chủng vi khuẩn thường gây bệnh gồm *L. innocua*, *S. aureus*, *B. cereus*, *P. aeruginosa*, *V. parahaemolyticus*, *E. coli* và *S. enterica*. Theo đó, dịch hỗn hợp và dịch ngoại bào của các chủng vi khuẩn nội sinh trong cây bọ mắm có khả năng ức chế được bốn chủng vi khuẩn gây bệnh là *L. innocua*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* và *V. parahaemolyticus*. Dịch nội bào của các

chủng vi khuẩn nội sinh không thể hiện khả năng ức chế các dòng vi khuẩn đã khảo sát. Các chủng vi khuẩn nội sinh không thể hiện khả năng ức chế vi khuẩn *B. cereus*, *E. coli* và *S. enterica*. Do đó, các thí nghiệm tiếp theo được bố trí để đánh giá khả năng ức chế 2 chủng vi khuẩn Gram dương là *L. innocua*, *S. aureus* và 2 chủng vi khuẩn Gram âm là *P. aeruginosa* và *V. parahaemolyticus* của dịch hỗn hợp và dịch ngoại bào.

3.2.1. Khả năng đối kháng vi khuẩn Gram dương *S. aureus* và *L. innocua*

Nghiên cứu đã tiến hành đánh giá hoạt tính đối kháng sinh học giữa các chủng vi khuẩn nội sinh với hai chủng vi khuẩn gây bệnh Gram dương là *S. aureus*, *L. innocua* bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch, sau 24 giờ ủ ở 37°C. Kết quả trình bày trong Bảng 2 cho thấy, hầu hết các chủng vi khuẩn nội sinh đều thể hiện hoạt tính kháng vi khuẩn Gram dương là *S. aureus* và *L. innocua* tạo ra vòng kháng khuẩn sau 24 giờ (Hình 2). Trong 26 chủng vi khuẩn nội sinh được khảo sát, có 17 chủng vi khuẩn có thể đồng thời ức chế được sự phát triển của 2 chủng vi khuẩn trên. Các chủng vi khuẩn nội sinh được phân lập từ lá và thân đều có khả năng ức chế vi khuẩn *S. aureus* và *L. innocua*. Trong khi ở rễ cây bộ mầm phân lập được nhiều chủng vi khuẩn nhất (14) nhưng chỉ có 4 chủng vi khuẩn cho thấy khả năng ức chế vi khuẩn *S. aureus* và *L. innocua*. Các chủng LBM5, LBM9 và RBM1 cho thấy khả năng ức chế vi khuẩn hiệu quả và ổn định so với các chủng vi khuẩn nội sinh còn lại. Cụ thể, khả năng ức chế đối chủng vi khuẩn *S. aureus* tốt nhất được tìm thấy ở LBM6, ở khoảng 15 mm. Các vi khuẩn LBM5, LBM9 và RBM1 cho đường kính vòng kháng khuẩn trung bình dao động từ 11,96±0,15 mm đến 13,10±0,36 mm. Đối với khả năng kháng *L. innocua*, dịch hỗn hợp và dịch ngoại bào từ chủng LBM5, LBM9 và RBM1 tạo vòng kháng khuẩn với đường kính dao động từ 9,00±0,30 mm đến 17,06±0,20 mm. Trong đó, dịch hỗn hợp của chủng LBM9 có kết quả kháng khuẩn tốt hơn cả đối chủng kháng sinh (Hình 2A giống 3). Chủng LBM6 có hiệu quả ức chế rất tốt đối với *S. aureus*, với đường kính vòng kháng khuẩn khoảng 15 mm, nhưng lại thể hiện khả năng ức chế rất kém đối với *L. innocua*.

Bảng 2. Khả năng kháng vi khuẩn *S. aureus* và *L. innocua* của các chủng vi khuẩn nội sinh

STT	Vi khuẩn nội sinh	Đường kính (mm) vòng kháng khuẩn					
		<i>S. aureus</i>			<i>L. innocua</i>		
		Dịch hỗn hợp	Dịch ngoại bào	Dịch nội bào	Dịch hỗn hợp	Dịch ngoại bào	Dịch nội bào
1	LBM1	12,93±0,30 ^d	12,96±0,15 ^d	-	7,06±0,40 ⁱ	6,86±0,32 ^h	-
2	LBM2	9,00±0,10 ^f	8,96±0,25 ^f	-	8,00±0,40 ^h	7,06±0,30 ^h	-
3	LBM3	11,93±0,30 ^e	11,96±0,25 ^e	-	8,00±0,00 ^h	7,90±0,26 ^g	-
4	LBM4	11,93±0,11 ^e	11,93±0,11 ^e	-	13,03±0,25 ^e	13,00±0,20 ^c	-
5	LBM5	12,10±0,26 ^c	11,96±0,15 ^e	-	15,03±0,35 ^c	14,06±0,20 ^b	-
6	LBM6	15,13±0,32 ^b	14,96±0,35 ^b	-	6,96±0,05 ⁱ	7,06±0,12 ^h	-
7	LBM7	13,86±0,23 ^c	14,06±0,40 ^c	-	6,96±0,15 ⁱ	6,90±0,26 ^h	-
8	LBM8	12,16±0,28 ^e	12,10±0,17 ^e	-	11,06±0,11 ^g	10,93±0,40 ^e	-
9	LBM9	13,10±0,36 ^d	12,10±0,26 ^e	-	17,06±0,20 ^a	12,90±0,36 ^c	-
10	RBM1	12,93±0,11 ^d	13,03±0,05 ^d	-	12,93±0,20 ^e	9,00±0,30 ^f	-
11	RBM2	13,10±0,17 ^d	13,00±0,30 ^d	-	12,96±0,15 ^e	12,93±0,11 ^c	-
12	RBM3	12,93±0,20 ^d	12,03±0,15 ^e	-	8,03±0,25 ^h	5,93±0,40 ⁱ	-
13	RBM4	6,00±0,30 ^h	5,13±0,23 ^h	-	6,00±0,10 ^j	5,86±0,32 ⁱ	-
14	RBM5	13,10±0,26 ^d	11,90±0,17 ^e	-	12,93±0,11 ^e	13,03±0,15 ^c	-
15-23	RBM6-RBM14	-	-	-	-	-	-
24	TBM1	13,10±0,17 ^d	12,90±0,26 ^d	-	12,00±0,30 ^f	11,93±0,20 ^d	-
25	TBM2	6,16±0,28 ^h	6,06±0,20 ^g	-	6,93±0,20 ⁱ	6,96±0,05 ^h	-
26	TBM3	7,03±0,35 ^g	5,96±0,35 ^g	-	13,93±0,30 ^d	13,90±0,36 ^b	-
ĐC	Vancomycin	18,10±0,17 ^a	18,10±0,17 ^a	18,10±0,17	15,96±0,35 ^b	15,96±0,35 ^a	15,96±0,35
ĐC	PDB	-	-	-	-	-	-

Ghi chú: Các ký tự theo sau trong cùng một cột giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa ở mức 5% ($p > 0,05$); (-) không ức chế

So với nghiên cứu của Duy và cộng sự (2020) [21], các chủng vi khuẩn nội sinh được phân lập từ cây thù lù cạnh (*Physalis angulata* L.) tạo được đường kính vòng kháng khuẩn lớn nhất với chủng vi khuẩn *S. aureus* là 11 mm. Trong thí nghiệm này, 13 chủng vi khuẩn nội sinh từ cây bọ mắm tạo được đường kính vòng kháng khuẩn đối với *S. aureus* lớn hơn 11 mm, cho thấy khả năng ức chế mạnh đối với chủng vi khuẩn này.

3.2.2. Khả năng đối kháng vi khuẩn Gram âm *P. aeruginosa* và *V. parahaemolyticus*

Kết quả khảo sát khả năng ức chế của các chủng vi khuẩn nội sinh đối với *P. aeruginosa* và *V. parahaemolyticus* được trình bày trong Bảng 3. Số liệu ở bảng 3 cho thấy, chỉ có 17 trong tổng số 26 chủng vi khuẩn nội sinh ghi nhận hoạt tính, trong đó có 9 chủng được phân lập từ lá, 5 chủng từ rễ và 3 chủng từ thân. Đa số các chủng vi khuẩn nội sinh có khả năng kháng khuẩn cao tập trung ở lá cây. Các chủng vi khuẩn nội sinh trong cây bọ mắm tạo được đường kính vòng kháng khuẩn với chủng *P. aeruginosa* dao động từ 17,93±0,30 mm đến 23,96±0,02 mm. Chủng LBM3 thể hiện hiệu quả kháng *P. aeruginosa* ở cả nghiệm thức dịch hỗn hợp và dịch ngoại bào. So về khả năng kháng *V. parahaemolyticus*, các chủng vi khuẩn nội sinh tạo được đường kính vòng kháng khuẩn dao động từ 15,96±0,35 mm đến 20,13±0,23 mm, trong đó chủng LBM6 thể hiện khả năng ức chế tốt nhất. Các chủng vi khuẩn LBM5, LBM9 và RBM1 đều thể hiện khả năng kháng cả 2 vi khuẩn *P. aeruginosa* và *V. parahaemolyticus*.

Bảng 3. Khả năng kháng vi khuẩn *P. aeruginosa* và *V. parahaemolyticus* của các chủng vi khuẩn nội sinh

STT	Vi khuẩn nội sinh	Đường kính (mm) vòng kháng khuẩn					Dịch nội bào
		<i>P. aeruginosa</i>			<i>V. parahaemolyticus</i>		
		Dịch hỗn hợp	Dịch ngoại bào	Dịch nội bào	Dịch hỗn hợp	Dịch ngoại bào	
1	LBM1	19,13±0,02 ^d	19,06±0,11 ^e	-	18,10±0,36 ^{cde}	17,86±0,23 ^d	-
2	LBM2	20,00±0,00 ^c	19,00±0,00 ^e	-	19,00±0,10 ^{abc}	19,06±0,30 ^b	-
3	LBM3	23,96±0,02 ^a	22,93±0,11 ^a	-	18,00±0,40 ^e	17,96±0,45 ^d	-
4	LBM4	21,00±0,00 ^b	21,10±0,17 ^b	-	17,96±0,15 ^e	18,03±0,55 ^{cd}	-
5	LBM5	21,10±0,01 ^b	20,96±0,15 ^b	-	18,10±0,45 ^{cde}	18,06±0,11 ^{cd}	-
6	LBM6	19,00±0,03 ^d	19,06±0,30 ^e	-	19,86±0,23 ^a	20,13±0,23 ^a	-
7	LBM7	18,03±0,03 ^e	17,93±0,30 ^f	-	19,10±0,17 ^{ab}	18,93±0,11 ^{bc}	-
8	LBM8	21,10±0,01 ^b	20,90±0,17 ^b	-	18,93±0,20 ^{bcd}	18,93±0,50 ^{bc}	-
9	LBM9	20,00±0,00 ^c	20,00±0,00 ^{cd}	-	18,13±0,32 ^{cde}	17,96±0,35 ^d	-
10	RBM1	19,96±0,03 ^c	19,90±0,17 ^{cd}	-	18,03±0,25 ^{de}	17,93±0,20 ^d	-
11	RBM2	19,00±0,00 ^d	19,00±0,00 ^e	-	17,96±0,15 ^e	18,00±0,00 ^{cd}	-
12	RBM3	21,03±0,00 ^b	18,93±0,20 ^e	-	17,03±0,05 ^f	15,96±0,35 ^e	-
13	RBM4	18,93±0,04 ^d	18,96±0,35 ^e	-	17,90±0,36 ^{ef}	18,03±0,15 ^{cd}	-
14	RBM5	19,00±0,00 ^d	18,00±0,00 ^f	-	18,00±0,10 ^e	17,96±0,15 ^d	-
15-23	RBM6-BM14	-	-	-	-	-	-
24	TBM1	20,00±0,00 ^c	20,33±0,57 ^{bc}	-	18,03±0,45 ^{de}	18,03±0,15 ^{cd}	-
25	TBM2	18,90±0,01 ^d	17,93±0,11 ^f	-	17,93±0,30 ^{ef}	18,03±0,05 ^{cd}	-
26	TBM3	19,03±0,02 ^d	19,00±0,10 ^e	-	19,00±0,40 ^{abc}	18,93±0,40 ^{bc}	-
ĐC	Azithromycin	19,50±0,50 ^{cd}	19,50±0,50 ^{de}	19,50±0,5	17,67±0,29 ^{ef}	17,67±0,29 ^d	17,67±0,29
ĐC	PDB	-	-	-	-	-	-

Ghi chú: Các ký tự theo sau trong cùng một cột giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa ở mức 5% ($p>0,05$); (-) không ức chế

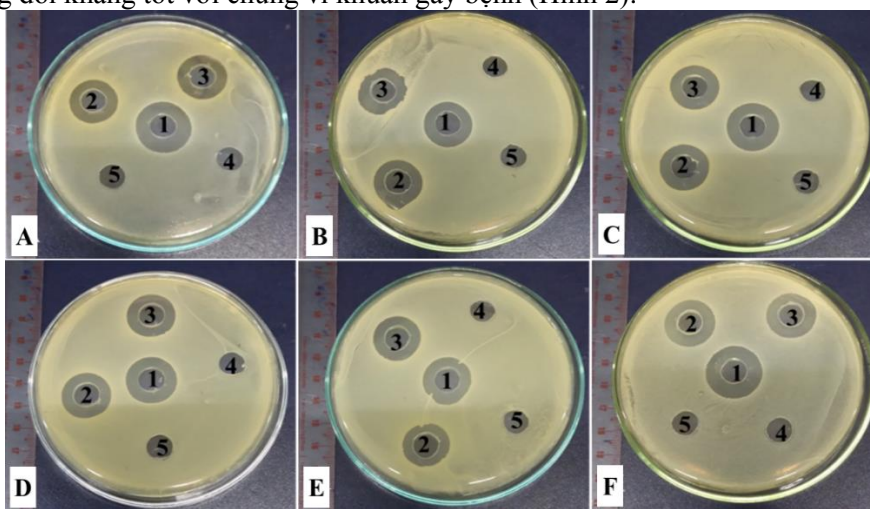
Khả năng kháng khuẩn được sắp xếp mức độ hiệu quả dựa vào đường kính vòng kháng khuẩn: >20 mm có tính kháng mạnh, 6 đến 20 mm được xem là có tính kháng trung bình, dưới 6 mm được xem là có tính kháng yếu và khi không tạo được vòng kháng khuẩn thì được đánh giá là không có tính kháng [20]. Dựa vào số chủng đã được phân lập, số chủng có khả năng kháng khuẩn và đường kính vòng kháng khuẩn đối với từng chủng vi khuẩn gây hại, bảng tổng hợp khả năng kháng khuẩn của vi khuẩn nội sinh trong cây bọ mắm được xây dựng (Bảng 4). Kết quả cho

thấy, các chủng vi khuẩn nội sinh trong cây bọ mắm có khả năng ức chế mạnh chủng vi khuẩn *P. aeruginosa* với tỷ lệ kháng mạnh của dịch hỗn hợp và dịch ngoại bào lần lượt là 30,76% và 23,07%. Các chủng vi khuẩn nội sinh trong cây bọ mắm có hoạt tính đối kháng với nhóm vi khuẩn Gram âm mạnh hơn nhóm vi khuẩn Gram dương.

Bảng 4. Tổng hợp khả năng kháng khuẩn của các chủng vi khuẩn nội sinh phân lập từ cây bọ mắm

Chủng vi khuẩn	Mẫu thử	Tỷ lệ (%) số chủng vi khuẩn nội sinh đã phân lập			
		Không kháng	Yếu	Trung bình	Mạnh
<i>S. aureus</i>	Dịch hỗn hợp	34,62	0	65,38	0
	Dịch ngoại bào	34,62	3,85	61,53	0
<i>L. innocua</i>	Dịch hỗn hợp	34,62	0	65,38	0
	Dịch ngoại bào	34,62	7,69	57,69	0
<i>P. aeruginosa</i>	Dịch hỗn hợp	34,62	0	34,62	30,76
	Dịch ngoại bào	34,62	0	42,31	23,07
<i>V. parahaemolyticus</i>	Dịch hỗn hợp	34,62	0	65,38	0
	Dịch ngoại bào	34,62	0	61,53	3,85

Qua quá trình phân tích khả năng đối kháng sinh học của các chủng vi khuẩn nội sinh trong cây bọ mắm với vi khuẩn gây bệnh, chủng vi khuẩn LBM5, LBM9 và RBM1 thể hiện hoạt tính đối kháng hiệu quả đối với cả bốn chủng vi khuẩn *S. aureus*, *L. innocua*, *P. aeruginosa* và *V. parahaemolyticus* và quá trình sinh trưởng ổn định hơn so với các chủng vi khuẩn nội sinh còn lại. Dịch hỗn hợp và dịch ngoại bào của ba chủng vi khuẩn nội sinh LBM5, LBM9 và RBM1 đều có khả năng đối kháng tốt với chủng vi khuẩn gây bệnh (Hình 2).



Hình 2. Khả năng kháng khuẩn của một số chủng vi khuẩn nội sinh trong cây bọ mắm.

A, B, C: đường kính vòng kháng *L. innocua* lần lượt của LBM9, RBM1 và LBM5;

D, E, F: đường kính vòng kháng *S. aureus* lần lượt của LBM9, RBM1 và LBM5.

1-kháng sinh vancomycin; 2-dịch ngoại bào của vi khuẩn nội sinh; 3-dịch hỗn hợp của vi khuẩn nội sinh;

4-môi trường potato dextrose broth; 5-dịch nội bào của vi khuẩn nội sinh

3.3. Kết quả định danh một số chủng vi khuẩn nội sinh trong cây bọ mắm

Có 3 chủng vi khuẩn LBM5, LBM9 và RBM1 thể hiện hoạt tính kháng đối với nhiều chủng vi khuẩn đã được chọn để trích DNA và giải trình tự đoạn gene 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 gene 16S rRNA, xác định chủng vi khuẩn LBM5 thuộc chi *Enterobacter*, LBM09 và RBM1 thuộc chi *Bacillus* (Hình 1, Bảng 5).

Bảng 5. Kết quả định danh các chủng vi khuẩn được tuyển chọn

Chủng vi khuẩn	Loài tương đồng	Độ dài đoạn gene	Độ phủ (%)	Mức độ tương đồng (%)	Accession number
LBM5	<i>Enterobacter</i> sp. E20	1443	100	99,65	CP012999.1
LBM9	<i>Bacillus safensis</i> strain U17-1	1454	100	100	CP015611.1
RBM1	<i>Bacillus safensis</i> strain BRM1	1440	100	99,93	CP018100.1

4. Kết luận

Nghiên cứu về vi khuẩn nội sinh từ cây bọ mắm đã phân lập được 26 chủng vi khuẩn khỏi cây chủ. Các chủng được nuôi cấy *in vitro* cho khuẩn lạc dạng hình tròn, tế bào hình que, màu trắng với 2 sắc thái ngà và đục, có cả vi khuẩn Gram âm và Gram dương. Quá trình khảo sát cho thấy, dịch hỗn hợp và dịch ngoại bào của 17 dòng vi khuẩn thể hiện tính kháng với các chủng vi khuẩn *S. aureus*, *L. innocua*, *P. aeruginosa* và *V. parahaemolyticus*. Các chủng vi khuẩn LBM9, RBM1 là vi khuẩn Gram dương thuộc chi *Bacillus* và LBM5 là vi khuẩn Gram âm thuộc chi *Enterobacter* có khả năng đối kháng tương đối mạnh và ổn định. Từ các kết quả trên khẳng định, cây bọ mắm mang các vi khuẩn nội sinh có thể phân lập và nuôi cấy trong điều kiện *in vitro*. Dịch ngoại bào và dịch hỗn hợp sau quá trình nuôi cấy thể hiện hoạt tính, từ đó gợi ý các vi khuẩn nội sinh này có thể sản sinh ra các hoạt chất ngoại bào để ức chế các vi khuẩn gây hại. Nghiên cứu này cung cấp thêm dữ liệu về tiềm năng ứng dụng của nhóm vi khuẩn nội sinh như một yếu tố kháng khuẩn hoặc có thể nhân nuôi ngoài cơ thể cây chủ để thu nhận các hợp chất ức chế các vi khuẩn gây hại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] H. Liu *et al.*, "Inner plant values: Diversity, colonization and benefits from endophytic bacteria," *Frontiers in Microbiology*, vol. 8, p. 2552, 2017, doi: 10.3389/fmicb.2017.02552.
- [2] I. Miliute, O. Buzaitė, D. Baniulis, and V. Stanys, "Bacterial endophytes in agricultural crops and their role in stress tolerance: a review," *Zemdirbyste-Agriculture*, vol. 102, no. 4, pp. 465-478, 2015, doi: 10.13080/z-a.2015.102.060.
- [3] T. R. Turner, E. K. James, and P. S. Poole, "The plant microbiome," *Genome Biology*, vol. 14, no. 6, pp. 1-10, Jun. 25, 2013, doi: 10.1186/gb-2013-14-6-209.
- [4] W. Huang, C. Long, and E. Lam, "Roles of plant-associated microbiota in traditional herbal medicine," *Trends in Plant Science*, vol. 23, no. 7, pp. 559-562, 2018, doi: 10.1016/j.tplants.2018.05.003.
- [5] G. Strobel and B. Daisy, "Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 67, no. 4, pp. 491-502, 2003, doi: 10.1128/MMBR.67.4.491-502.2003.
- [6] R. M. P. Gutierrez, A. M. N. Gonzalez, and A. M. Ramirez, "Compounds derived from endophytes: A review of phytochemistry and pharmacology," *Curr. Med. Chem.*, vol. 19, no. 18, pp. 2992-3030, 2012, doi: 10.2174/092986712800672111.
- [7] G. A. Strobel, "Endophytes as sources of bioactive products," *Microbes and Infection*, vol. 5, no. 6, pp. 535-544, 2003, doi: 10.1016/S1286-4579(03)00073-X.
- [8] S. Gouda, G. Das, S. K. Sen, H. S. Shin, and J. K. Patra, "Endophytes: A treasure house of bioactive compounds of medicinal importance," *Frontiers in Microbiology*, vol. 7, p. 1538, 2016, doi: 10.3389/fmicb.2016.01538.
- [9] O. A. A. Mohamad *et al.*, "Evaluation of the antimicrobial activity of endophytic bacterial populations from Chinese traditional medicinal plant licorice and characterization of the bioactive secondary metabolites produced by *Bacillus atrophaeus* against *Verticillium dahliae*," *Front. Microbiol.*, vol. 9, 2018, doi: 10.3389/fmicb.2018.00924.
- [10] I. Afzal, Z. K. Shinwari, S. Sikandar, and S. Shahzad, "Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants," *Microbiological Research*, Urban & Fischer, vol. 221, pp. 36-49, 2019, doi: 10.1016/j.micres.2019.02.001.
- [11] D. Egamberdieva, S. Wirth, U. Behrendt, P. Ahmad, and G. Berg, "Antimicrobial activity of medicinal plants correlates with the proportion of antagonistic endophytes," *Front. Microbiol.*, vol. 8, p. 199, 2017, doi: 10.3389/fmicb.2017.00199.
- [12] G. Brader, S. Compant, B. Mitter, F. Trognitz, and A. Sessitsch, "Metabolic potential of endophytic

- bacteria,” *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 27, no. 100, pp. 30-37, 2014, doi: 10.1016/j.copbio.2013.09.012.
- [13] T. T. A. Vo, C. L. Tran, T. T. T. Tran, and P. Q. Do, “Evaluating anti-bacterial and antioxidant activities of extracts from *Pouzolzia zeylanica* L. leaves and stems” (in Vietnamese), *Can Tho Univ. J. Sci.*, vol. 52, no. 52, p. 29, 2017, doi: 10.22144/ctu.jvn.2017.107.
- [14] Z. H. Chen, H. Zhang, S. H. Tao, Z. Luo, C. Q. Zhong, and L. B. Guo, “Norlignans from *Pouzolzia zeylanica* var. *microphylla* and their nitric oxide inhibitory activity,” *J. Asian Nat. Prod. Res.*, vol. 17, no. 10, pp. 959-966, Jun. 2015, doi: 10.1080/10286020.2015.1048685.
- [15] M. S. Hossain *et al.*, “Ethnopharmacological investigations of methanolic extract of *Pouzolzia zeylanica* (L.) Benn,” *Clin. Phytoscience*, vol. 2, no. 1, 2017, doi: 10.1186/s40816-016-0022-7.
- [16] P. Li *et al.*, “Free radical-scavenging capacity, antioxidant activity and phenolic content of *Pouzolzia zeylanica*,” *J. Serbian Chem. Soc.*, vol. 76, no. 5, pp. 709-717, 2011, doi: 10.2298/JSC100818063L.
- [17] U.S. Food and Drug Administration, “BAM Media M127: Potato Dextrose Agar | FDA,” 1998. [Online]. Available: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-media-m127-potato-dextrose-agar>. [Accessed Sep. 26, 2022].
- [18] B. El-Deeb, K. Fayez, and Y. Gherbawy, “Isolation and characterization of endophytic bacteria from *Plectranthus tenuiflorus* medicinal plant in Saudi Arabia desert and their antimicrobial activities,” *J. Plant Interact.*, vol. 8, no. 1, pp. 56-64, 2012, doi: 10.1080/17429145.2012.680077.
- [19] A. W. Bauer, W. M. Kirby, J. C. Sherris, and M. Turck, “Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method,” *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 45, no. 4, pp. 493-496, 1966, doi: 10.1093/ajcp/45.4_ts.493.
- [20] A. B. Galindo, *Lactobacillus plantarum 44A as a live feed supplement for freshwater fish*, Wageningen Universiteit, 2004.
- [21] T. T. D. Nguyen, H. H. Nguyen, T. T. H. Dinh, and T. N. Do, “Isolation and selection of antibacterial endophytic bacteria from *Physalis angulata* L. in Can Tho City,” (in Vietnamese), *Can Tho Univ. J. Sci.*, vol. 55, no. 4, p. 10, 2019, doi: 10.22144/ctu.jvn.2019.103.