

PHÂN LẬP VI KHUẨN NỘI SINH CÓ TÍNH KHÁNG KHUẨN TRONG CÂY CỎ HÔI (*Ageratum conyzoides* L.) Ở TỈNH SÓC TRĂNG

Nguyễn Phúc Huy¹

TÓM TẮT

Title: Isolation of antimicrobial endophytic bacteria in billygoat weed (*Ageratum conyzoides* L.) collected in Soc Trang province

Từ khóa: *Ageratum conyzoides*, *Bacillus amyloliquefaciens*, kháng khuẩn, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas oryzihabitans*, vi khuẩn nội sinh.

Keywords: *Ageratum conyzoides*, antimicrobial, *Bacillus amyloliquefaciens*, endophytic bacteria, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas oryzihabitans*.

Lịch sử bài báo:

Ngày nhận bài:

10/11/2019;

Ngày nhận kết quả

biên duyệt:

03/12/2019;

Ngày chấp nhận đăng

bài: 15/12/2019.

Tác giả:

1Trường đại học Kỹ thuật
– Công nghệ Cần Thơ

Email:

nphuy@ctu.edu.vn

Cỏ hôi (*Ageratum conyzoides* L.) thuộc họ Cúc (*Asteraceae*) được biết đến như một loại dược liệu quý có tính kháng khuẩn mạnh, nhưng các nghiên cứu trước đây chỉ sử dụng dịch trích mà chưa quan tâm nhiều đến tập đoàn vi khuẩn nội sinh trong cây. Việc tìm nguồn kháng sinh tự nhiên mới thay thế kháng sinh tổng hợp trở nên cấp bách hơn bao giờ hết, khi nhiều loại kháng sinh tổng hợp tạo ra vi khuẩn kháng sinh. Chính vì vậy, việc phân lập các dòng vi khuẩn nội sinh có tính kháng khuẩn trong cây cỏ hôi được thực hiện. Từ năm mẫu cỏ hôi thu tại tỉnh Sóc Trăng đã phân lập được 45 dòng vi khuẩn trên môi trường PDA đặc. Phần lớn các dòng vi khuẩn đều có dạng hình que, Gram âm và có khả năng di động. Khảo sát khả năng kháng với 3 loài vi khuẩn gây bệnh bằng phương pháp khuếch tán qua giấy lọc. Kết quả có 31 dòng kháng *E. coli*, 29 dòng kháng *Aeromonas hydrophila* và 30 dòng kháng *Staphylococcus aureus*. Điều đáng ngạc nhiên là, có đến 20 dòng kháng được cả ba loài vi khuẩn gây bệnh và 12 dòng kháng được hai trong số ba loài gây bệnh được khảo sát. Qua nghiên cứu cũng xác định mật số kháng khuẩn hiệu quả của một số loài triển vọng. Tuyển chọn ba dòng HR10, HT18 và HL1 có hiệu quả kháng khuẩn tốt nhất, kết hợp với các đặc tính sinh hóa tiến hành định danh bằng kỹ thuật sinh học phân tử. Ba dòng HR10, HT18 và HL1 được nhận diện lần lượt là *Bacillus amyloliquefaciens* strain NBRC 15535, *Pseudomonas oryzihabitans* strain NBRC 102199 và *Pseudomonas aeruginosa* strain DSM 50071 với độ tương đồng tương ứng 95,19%, 98,39% và 98,56%.

ABSTRACT

Billygoat weed (*Ageratum conyzoides* L.), which belongs to *Asteraceae* species, is known as a rare medicinal plant having high antibacterial activity; however, most of the researchers only concerned oil extraction instead of promising endophytic bacteria inside this weed. Finding new natural antibiotic is becoming more and more urgent as synthetic antibiotics can cause antibiotic resistant bacteria. As a result, the study isolation of antimicrobial endophytic bacteria from billygoat was done. From 5 samples of billy goat in Soc Trang Province, 45 bacterial strains were isolated on solid PDA media. Most of the bacteria were in rod shape, negative gram, and motile. The experiment of testing antimicrobial ability was done with the disk diffusion test method. In brief, 31 bacterial strains were resistant to *E. coli*, 29 bacterial strains were resistant to *Aeromonas hydrophila* and 30 bacterial strains were resistant to *Staphylococcus aureus*. Surprisingly, there were 20 bacterial strains which were resistant to all 3 harmful bacteria and 12 bacterial strains which were resistant to 2 harmful bacteria. Moreover, 3 bacterial strains, including HR10, HT18, and HL1, had the highest resistance to harmful bacteria. By the combination of chemical, biological properties and identification by molecular biology technique, 3 bacterial strains including HR10, HT18, and HL1 were identified as *Bacillus amyloliquefaciens* strain NBRC 15535, *Pseudomonas oryzihabitans* strain NBRC 102199, *Pseudomonas aeruginosa* strain DSM 50071 with the identity of 95,19%, 98,39%, and 98,56% respectively.

1. Mở đầu

Cỏ hôi (*Ageratum conyzoides*) trong dân gian thường gọi là cỏ cứt lợn. Đây là loại cây thân thảo, mọc hoang nhiều nơi ở nước ta đặc biệt là vùng đồng bằng sông Cửu Long. Cỏ hôi có tác dụng thanh nhiệt, giải độc, sát trùng, tiêu thũng,... Dùng chữa cảm mạo phát sốt, các chứng bệnh vết hầu sưng đau, ung thũng, mụn nhọt,... Gần đây, Tây y cũng phát hiện ra nhiều tác dụng quý của nó như khả năng kháng khuẩn, tiêu diệt ký sinh trùng, chống ung thư.

Nhiều nghiên cứu cho thấy, các hợp chất có khả năng trực tiếp ức chế một số bệnh cho cây trồng hoặc kích thích cây trồng sản xuất các hợp chất biến dưỡng thứ cấp giúp cây chống lại các tác nhân gây bệnh cho cây. Tập đoàn vi sinh vật nội sinh hoặc sống ở vùng rễ cây trong đó có cây dược liệu có khả năng giúp cây tăng trưởng và đồng hóa tốt. Ngoài ra, chúng còn có khả năng sản xuất trực tiếp các hợp chất kháng khuẩn tự nhiên. Bên cạnh đó, vi khuẩn nội sinh cũng có khả năng kích thích cây chủ sản xuất ra các hợp chất biến dưỡng trung gian như ở nhóm cây dược liệu, chúng có thể sản xuất ra các hợp chất có tính kháng khuẩn rất tốt (Hardoim *et al.*, 2008). Chính vì vậy, trong nghiên cứu này việc phân lập, tuyển chọn và định danh được một số dòng vi khuẩn nội sinh trong cây cỏ hôi (*Ageratum conyzoides* L.) ở tỉnh Sóc Trăng có hoạt tính kháng khuẩn cao được thực hiện.

2. Nguyên liệu và phương pháp

2.1. Vật liệu

Toàn bộ rễ, thân và lá của cây cỏ hôi thu tại 5 địa điểm thuộc tỉnh Sóc Trăng gồm Thành phố Sóc Trăng, huyện Kế Sách, huyện Cù Lao Dung, huyện Thạnh Trị và thị xã Vĩnh Châu. Mẫu được thu vào buổi sáng sớm và chiều mát, thu luôn phần đất xung quanh gốc cây với độ sâu khoảng 4-5 cm, bảo quản

mẫu thu được trong túi nylon sạch sau đó mang về để tiến hành xử lý mẫu và phân lập tại Phòng thí nghiệm Vi sinh vật thuộc Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.

Vi khuẩn *E. coli*, *S. aureus* được cung cấp từ phòng thí nghiệm Sinh Học Phân Tử, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ sinh học, Trường Đại học Cần Thơ. Vi khuẩn *A. hydrophila* được cung cấp từ bộ môn Bệnh cá, Khoa Thủy Sản, trường Đại học Cần Thơ. Môi trường phân lập vi khuẩn nội sinh và khảo sát khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh là môi trường PDA.

2.2. Phương pháp

Phân lập vi khuẩn nội sinh: Mẫu được rửa sạch dưới vòi nước để loại bỏ phần đất bám vào rồi tách rời từng bộ phận rễ, thân và lá. Phần đất thu được xung quanh vùng rễ cũng được đưa về phòng thí nghiệm để đo pH. Sau đó, mẫu được rửa sạch bằng nước cất vô trùng và cắt thành đoạn ngắn dài khoảng 2-3 cm rồi làm khô mẫu bằng giấy hút ẩm, khử trùng bề mặt mẫu (rễ, thân, lá) bằng Ethanol 70% trong thời gian 2 phút, tiếp tục khử trùng bằng H₂O₂ 3% trong thời gian 5 phút. Cuối cùng, rửa mẫu bằng nước cất vô trùng 4 lần rồi làm khô mẫu bằng giấy thấm vô trùng. Kiểm tra vi sinh vật còn sót lại trên bề mặt mẫu: Dùng micropipette hút 50 μ L nước rửa mẫu lần cuối trải lên đĩa môi trường PDA đặc (Atlas, 2010): (g/L): khoai tây, 200; dextrose, 20; agar, 18; pH=6,5, ủ ở 30°C trong thời gian 24 giờ nhằm kiểm tra có vi sinh vật nào xuất hiện hay không. Nếu không có vi sinh vật nào phát triển chứng tỏ mẫu đã được xử lý đạt yêu cầu. Vi khuẩn được phân lập sau này sẽ là vi khuẩn nội sinh. Các mẫu sau khi được khử trùng bề mặt được cắt thành miếng nhỏ cho vào cối đã khử trùng, giã. Sau đó, cho vào thêm 2 mL nước cất vô trùng,

trộn đều và để yên 15 phút cho lắng phần cặn rồi dùng micropipette hút lấy phần dịch trích trong bên trên và cho vào tube eppendorf. Hút lấy 100 μ L phần dịch trích trong cho vào ống nghiệm chứa 5 mL môi trường PDA bán đặc đã được chuẩn bị sẵn, đem ủ ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 24 giờ. Nếu quan sát thấy xuất hiện một lớp màng mỏng trắng đục (vòng pellicle) bên dưới, cách bề mặt môi trường PDA bán đặc trong ống nghiệm khoảng 2-5 mm, đó là dấu hiệu chứng tỏ có sự hiện diện của vi khuẩn nội sinh. Hút lấy 50 μ L phần dịch từ vòng pellicle, trải lên đĩa Petri có chứa môi trường PDA đặc để phân lập cho đến khi rỗng. Tiến hành quan sát và ghi nhận đặc điểm khuẩn lạc (hình dạng, màu sắc, dạng bìa, độ nổi, kích thước). Kiểm tra độ rỗng (độ thuần) của vi khuẩn bằng phương pháp giọt ép dưới kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 400 lần. Khi vi khuẩn đã rỗng, tiến hành nhuộm Gram và cấy chuyển từng dòng vi khuẩn sang ống nghiệm chứa môi trường PDA đặc tương ứng để trừ ở 4°C.

Khảo sát khả năng kháng khuẩn của những dòng vi khuẩn phân lập được: Vi khuẩn được tăng sinh trong môi trường dinh dưỡng PDA lỏng có bổ sung yeast (đạt mật số 10^9 CFU/mL), dùng giấy thấm có đường kính 6 mm đã được khử trùng nhúng vào phần dịch vi khuẩn. Sau đó, đặt giấy thấm lên bề mặt môi trường dinh dưỡng PDA đặc đã trải vi khuẩn gây bệnh từng dòng riêng biệt (*E. coli*, *A. hydrophila*, *S. aureus*), đem ủ ở 30°C. Tiến hành quan sát và đo đường kính vòng vô khuẩn sau 24, 48 và 72 giờ. Trong đó, đường kính vòng vô khuẩn = đường kính vòng sáng - đường kính giấy thấm (Bauer et al., 1966).

Khảo sát khả năng kháng khuẩn ở các mật số khác nhau của một số dòng triển

vọng: Vi khuẩn được tăng sinh trong môi trường dinh dưỡng PDA lỏng có bổ sung yeast (đạt mật số 10^9 CFU/mL), xác định mật số bằng phương pháp đếm sống nhỏ giọt dựa trên sự tạo thành khuẩn lạc trong 1ml canh khuẩn, mẫu phải được pha loãng theo thang bậc 10 (pha loãng ra dãy mật số 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 CFU/mL). Dùng giấy thấm có đường kính 6 mm đã được khử trùng nhúng vào phần dịch vi khuẩn. Sau đó, đặt giấy thấm lên bề mặt môi trường dinh dưỡng PDA đặc đã trải vi khuẩn gây bệnh từng dòng riêng biệt (*E. coli*, *A. hydrophila*, *S. aureus*), đem ủ ở 30°C. Tiến hành quan sát và đo đường kính vòng vô khuẩn sau 24, 48 và 72 giờ. Trong đó, đường kính vòng vô khuẩn = đường kính vòng sáng - đường kính giấy thấm (Bauer et al., 1966).

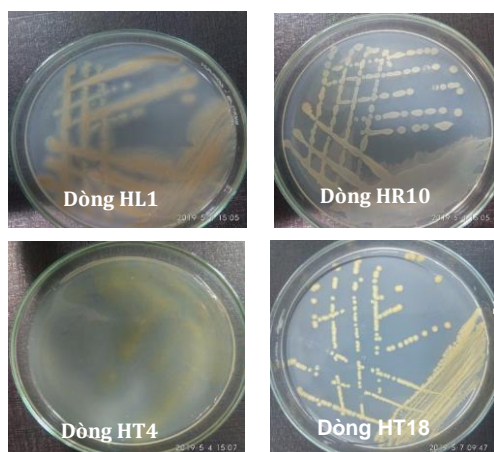
Nhận diện các dòng vi khuẩn triển vọng bằng kỹ thuật Sinh học phân tử: Tiến hành chiết tách DNA, sau đó tiến hành phản ứng PCR vùng gene 16S-rRNA bằng cặp mồi 27F và 1492R (Lane, 1991) với trình tự như sau: 27F (5'- AGAGTTTGATCCTGGCTC-3'); 1492R (5'- TACGGTTACCTGTTACGACT-3'). Sản phẩm PCR được tinh sạch và giải trình tự bằng hệ thống máy giải trình tự tự động của Công ty Macrogen (Hàn Quốc). Sử dụng công cụ BLAST N để so sánh trình tự DNA của các dòng vi khuẩn triển vọng với trình tự DNA của bộ gene các loài vi khuẩn trong ngân hàng dữ liệu NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) để nhận diện vi khuẩn đến cấp loài, có kết hợp với các đặc điểm về mặt hình thái, sinh lý, sinh hóa đã được xác định.

Số liệu trong nghiên cứu được xử lý bằng chương trình Microsoft Excel 2010, phân tích Anova và kiểm định Fisher bằng phần mềm thống kê Minitab 17.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Kết quả phân lập vi khuẩn

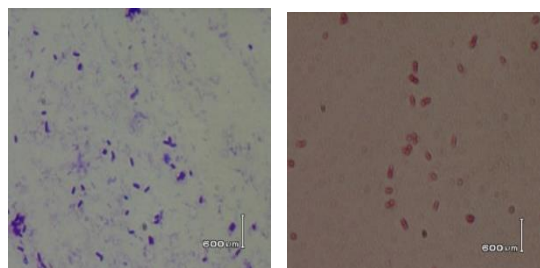
Bốn mươi lăm dòng vi khuẩn nội sinh đã được phân lập trên môi trường PDA đặc. Các dòng vi khuẩn này phân bố ở cả trong rễ, thân và lá của cây cỏ hôi. Trong 45 dòng vi khuẩn đã được phân lập, trong đó 10 dòng từ rễ, 18 dòng từ thân và 17 dòng từ lá. Các dòng được ký hiệu là HRx, HTx, HLx với HR, HT, HL lần lượt là các dòng vi khuẩn phân lập được từ rễ, thân, lá và x là số thứ tự từng dòng vi khuẩn. Chúng có chung đặc tính là sinh trưởng và phát triển trong điều kiện vi hiếu khí. Khi được cấy trong môi trường PDA bán đặc, vi khuẩn phát triển thành vòng pellicle (vòng sáng màu trắng đục) cách bề mặt môi trường từ 2-5 mm. Các dòng vi khuẩn đều phát triển rất nhanh, thời gian quan sát được khuẩn lạc là 12 giờ, chậm nhất là 24 giờ; phần lớn các vi khuẩn phân lập được đều có khuẩn lạc dạng tròn, bìa nguyên, độ nổi mô, màu trắng đục, một số ít khuẩn lạc có dạng không đều, bìa răng cưa, độ nổi lồi, độ nổi phẳng, màu trắng trong, nâu đỏ và vàng. Đường kính khuẩn lạc của các dòng vi khuẩn phân lập được có kích thước dao động từ 0,5 - 8 mm sau khi cấy trên môi trường PDA đặc và ủ ở 30°C khoảng từ 12 - 24 giờ.



Hình 1. Một số dạng khuẩn lạc vi khuẩn nội sinh phân lập được

3.2. Đặc điểm tế bào vi khuẩn

Phần lớn các dòng vi khuẩn phân lập đều có dạng hình que và có khả năng chuyển động, Một số dòng có dạng hình cầu. Chiều dài vi khuẩn dao động trong khoảng 1,40-3,70 μm , chiều rộng khoảng 0,50-1,61 μm . Kết quả nhuộm gram có 34/45 dòng vi khuẩn Gram âm chiếm 75,56%, 11/45 dòng vi khuẩn Gram dương, chiếm 24,44%.



Hình 2. Kết quả nhuộm Gram chụp ở vật kính X100

A: Dòng HR10 Gram dương

B: Dòng HL1 Gram âm

3.3. Khả năng kháng khuẩn

Từ 45 dòng vi khuẩn nội sinh phân lập được, qua kết quả khảo sát khả năng kháng khuẩn cho thấy có 31/45 dòng vi khuẩn kháng vi khuẩn *Escherichia coli* gây bệnh tiêu chảy ở người và động vật, dòng HT18 có đường kính vòng vô khuẩn kháng *E. coli* lớn nhất (18,67 mm). Có 30/45 dòng vi khuẩn kháng vi khuẩn *Staphylococcus aureus* gây bệnh viêm da, trong đó dòng HR10 có đường kính vòng vô khuẩn lớn nhất là 9,00 mm và 29/45 dòng vi khuẩn kháng được với vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* gây bệnh đốm đỏ ở cá, dòng HL2 và dòng HL1 có đường kính vòng vô khuẩn lớn nhất đạt lần lượt là 22,67 mm và 16,67 mm (Bảng 1, 2 và 3).

Bảng 1. So sánh khả năng kháng A. hydrophila của các dòng vi khuẩn nội sinh triển vọng

STT	Dòng vi khuẩn	Thời gian ủ		
		24 giờ	48 giờ	72 giờ
		Vòng vô khuẩn (mm)	Vòng vô khuẩn (mm)	Vòng vô khuẩn (mm)
1	HR7	11,67 ^b	16,00 ^a	11,00 ^b
2	HT18	12,33 ^b	13,33 ^{ab}	11,67 ^b
3	HL1	11,00 ^b	12,67 ^{ab}	16,67 ^a
4	HL2	22,67 ^a	6,00 ^c	4,00 ^d
5	HL5	14,33 ^b	10,67 ^b	7,33 ^c
6	HL11	10,67 ^b	13,67 ^{ab}	10,33 ^b
7	HL13	11,67 ^b	14,67 ^a	10,00 ^b
CV(%)		9,15	13,07	12,53

Ghi chú: Các giá trị trung bình trong cùng một cột có các mẫu tự theo sau giống nhau biểu thị sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê theo phép thử Fisher ở mức ý nghĩa 5%.

Bảng 2. So sánh khả năng kháng E. coli của các dòng vi khuẩn nội sinh triển vọng

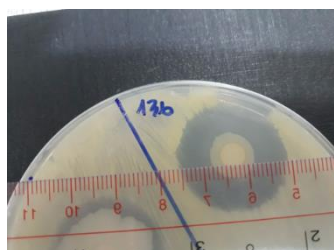
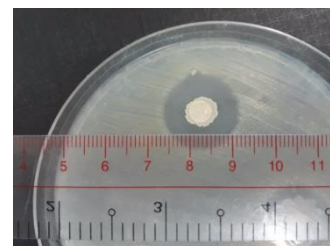
STT	Dòng vi khuẩn	Thời gian ủ		
		24 giờ	48 giờ	72 giờ
		Vòng vô khuẩn (mm)	Vòng vô khuẩn (mm)	Vòng vô khuẩn (mm)
1	HR7	10,33 ^b	7,33 ^c	0,00 ^e
2	HR10	10,00 ^{bc}	10,67 ^b	10,33 ^b
3	HT18	13,67 ^a	18,67 ^a	14,00 ^a
4	HL1	14,67 ^a	10,67 ^b	10,67 ^b
5	HL5	11,00 ^b	8,00 ^c	5,00 ^d
6	HL11	11,00 ^b	11,67 ^b	9,00 ^{bc}
7	HL14	8,67 ^c	11,67 ^b	7,33 ^c
CV(%)		8,34	13,43	12,42

Ghi chú: các giá trị trung bình trong cùng một cột có các mẫu tự theo sau giống nhau biểu thị sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê theo phép thử Fisher ở mức ý nghĩa 5%.

Bảng 3. So sánh khả năng kháng *S. aureus* của các dòng vi khuẩn nội sinh triển vọng

STT	Dòng vi khuẩn	Thời gian ủ		
		24 giờ	48 giờ	72 giờ
		Vòng vô khuẩn (mm)	Vòng vô khuẩn (mm)	Vòng vô khuẩn (mm)
1	HR2	6,33 ^{ef}	6,67 ^c	5,67 ^c
2	HR10	9,00 ^a	8,00 ^{abc}	7,33 ^{ab}
3	HT5	7,67 ^{bcd}	7,33 ^{bc}	6,67 ^{abc}
4	HT18	8,67 ^{ab}	8,33 ^{ab}	7,67 ^a
5	HL1	7,33 ^{cde}	6,67 ^c	6,00 ^c
6	HL5	8,00 ^{abc}	8,67 ^a	7,67 ^a
7	HL6	8,67 ^{ab}	4,67 ^d	3,67 ^d
CV(%)		8,78	11,31	9,61

Ghi chú: Các giá trị trung bình trong cùng một cột có các mẫu tự theo sau giống nhau biểu thị sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê theo phép thử Fisher ở mức ý nghĩa 5%.

HL1 kháng *A. hydrophila*HT18 kháng *E. coli*HR10 kháng *S. aureus*

Hình 3. Vòng vô khuẩn của ba dòng HL1, HT18 và HR10

Qua kết quả nghiên cứu trên cho thấy dòng HT18 có hiệu quả kháng *E. coli* tốt nhất đạt 18,67 mm, dòng HR10 kháng *S. aureus* cao nhất đạt 9,00 mm. Dòng LH2 có hiệu quả kháng *A. hydrophila* cao nhất đạt 22,00 mm, tuy nhiên ở dòng này khả năng duy trì vòng kháng rất yếu giảm mạnh theo thời gian. Trong khi đó dòng HL1 hiệu quả kháng *A. hydrophila* tăng liên tục theo thời gian đạt 16,67 mm.

Nghiên cứu của Lê Minh Học và Nguyễn Hữu Hiệp (2017) phát hiện vòng vô khuẩn cao nhất của các dòng vi khuẩn nội sinh phân lập từ cây cỏ hôi ở tỉnh Bạc Liêu đối với vi khuẩn *A. hydrophila*, *E. coli* và *S. aureus* theo thứ tự lần lượt là 15,7 mm, 15 mm và 25,3 mm. Ngoài ra, một nghiên cứu khác của Fitriani et al. (2015) vi khuẩn nội sinh trong cỏ hôi được chứng minh là có khả năng kháng *E. coli* với vòng vô khuẩn cao nhất là 11,92 mm.

3.4. Khảo sát khả năng kháng khuẩn ở các mật số khác nhau của một số dòng triển vọng

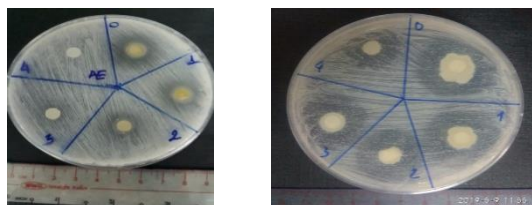
Qua 3 ngày ủ với *A. hydrophila*, *E. coli* và *S. aureus* (mật số 10^7 CFU/mL) đường kính vòng kháng khuẩn biến thiên phụ thuộc vào mật số của vi khuẩn nội sinh. Mật số càng cao thì đường kính vòng vô khuẩn càng lớn và đường kính vòng vô khuẩn giảm dần khi mật số vi khuẩn nội sinh giảm dần từ mật số 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 CFU/mL. Điều này làm cho đường kính vòng kháng khuẩn có sự chênh lệch gần như tỷ lệ thuận với mật số vi khuẩn.

Khi khảo sát khả năng kháng ở các mật số khác nhau với *A. hydrophila* cho thấy tất cả 7 dòng triển vọng đều kháng tốt ở mật số 10^7 trở lên. Có 5/7 dòng (HR7, HT18, HL2, HL5 và HL11) kháng tốt ở mật số 10^5 , trong đó dòng HL2 có vòng kháng cực đại 10,33 mm sau 24 giờ ở mật số 10^5 (Bảng 4 và Hình 4).

Bảng 4. So sánh khả năng kháng khuẩn ở các mật số khác nhau với *A. hydrophila*

STT	Dòng vi khuẩn	Thời gian ủ		
		24 giờ	48 giờ	72 giờ
		Vòng vô khuẩn (mm)	Vòng vô khuẩn (mm)	Vòng vô khuẩn (mm)
1	HR7-9	11,33 ^{de}	15,67 ^a	11,00 ^{bc}
	HR7-8	9,67 ^{fghi}	10,67 ^{de}	6,67 ^{de}
	HR7-7	9,33 ^{ghij}	10,00 ^{ef}	4,00 ^{ghi}
	HR7-6	7,33 ^{lmno}	8,00 ^{gh}	3,33 ^{hij}
	HR7-5	4,33 ^{qr}	5,00 ^{ijkl}	2,33 ^j
	HT18-9	12,33 ^{cd}	13,33 ^b	12,00 ^b
	HT18-8	11,00 ^{def}	11,67 ^{cd}	8,00 ^d
2	HT18-7	10,33 ^{efgh}	10,67 ^{de}	6,00 ^{ef}
	HT18-6	7,00 ^{mno}	8,67 ^{fg}	4,67 ^{fgh}
	HT18-5	6,33 ^{nop}	7,00 ^{hi}	2,33 ^j
	HL1-9	10,67 ^{efg}	12,33 ^{bc}	16,33 ^a
	HL1-8	9,33 ^{ghij}	10,00 ^{ef}	11,00 ^{bc}
3	HL1-7	8,00 ^{iklm}	8,33 ^{gh}	4,67 ^{fgh}
	HL1-6	3,67 ^r	4,00 ^{kl}	0,00 ^k
	HL1-5	0,00 ^s	0,00 ^m	0,00 ^k
	HL2-9	22,33 ^a	6,00 ^{ij}	3,67 ^{ghij}
	HL2-8	17,33 ^b	5,33 ^{jk}	3,00 ^{ij}
4	HL2-7	16,00 ^b	5,00 ^{ijkl}	3,00 ^{ij}
	HL2-6	12,33 ^{cd}	4,33 ^{kl}	2,67 ^{ij}
	HL2-5	10,33 ^{efgh}	3,67 ^l	2,33 ^j
	HL5-9	13,67 ^c	11,33 ^{cde}	7,33 ^{de}
	HL5-8	11,00 ^{def}	10,33 ^{de}	6,67 ^{de}
5	HL5-7	10,33 ^{efgh}	6,33 ^{ij}	6,00 ^{ef}
	HL5-6	9,67 ^{fghi}	7,00 ^{hi}	5,00 ^{fg}
	HL5-5	8,67 ^{ijkl}	7,33 ^{ghi}	3,33 ^{ij}
	HL11-9	11,67 ^{de}	13,67 ^b	10,00 ^c
	HL11-8	9,00 ^{hijk}	10,00 ^{ef}	0,00 ^k
6	HL11-7	7,67 ^{klmn}	8,33 ^{gh}	0,00 ^k
	HL11-6	6,00 ^{op}	7,00 ^{hi}	0,00 ^k
	HL11-5	5,33 ^{pq}	6,33 ^{ij}	0,00 ^k
	HL13-9	11,33 ^{de}	13,33 ^b	10,33 ^c
	HL13-8	9,33 ^{ghij}	10,33 ^{de}	0,00 ^k
7	HL13-7	7,33 ^{lmno}	8,00 ^{gh}	0,00 ^k
	HL13-6	0,00 ^s	0,00 ^m	0,00 ^k
	HL13-5	0,00 ^s	0,00 ^m	0,00 ^k
CV(%)		9,84	13,37	20,61

Ghi chú: Các giá trị là trung bình của 3 lần lặp lại, các giá trị trong cùng một ngày có mẫu tự theo sau giống nhau biểu thị sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê theo phép thử Fisher ở mức ý nghĩa 5%.



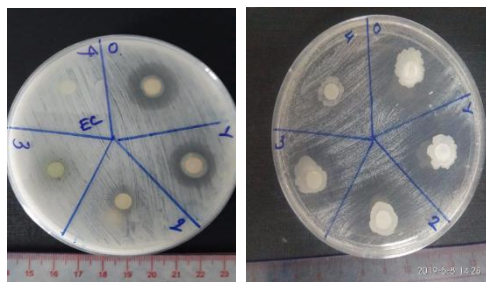
Hình 4. Vòng kháng *A. hydrophila* ở các mật số khác nhau

Mật số vi khuẩn nội sinh giảm dần từ 10^9 đến 10^5

Bảng 5. So sánh khả năng kháng khuẩn ở các mật số khác nhau với *Escherichia coli*

STT	Dòng vi khuẩn	Thời gian ủ		
		24 giờ	48 giờ	72 giờ
		Vòng vô khuẩn (mm)	Vòng vô khuẩn (mm)	Vòng vô khuẩn (mm)
1	HR7-9	11,00 ^{cd}	6,67 ^{ij}	0,00 ^h
	HR7-8	8,00 ^{fghi}	0,00 ^m	0,00 ^h
	HR7-7	6,33 ^{klm}	0,00 ^m	0,00 ^h
	HR7-6	0,00 ^o	0,00 ^m	0,00 ^h
	HR7-5	0,00 ^o	0,00 ^m	0,00 ^h
	HR10-9	9,67 ^{de}	11,00 ^b	9,67 ^{ab}
	HR10-8	6,67 ^{ijkl}	7,33 ^{hi}	6,00 ^{cd}
2	HR10-7	5,67 ^{klmn}	6,00 ^{jk}	4,33 ^{ef}
	HR10-6	4,67 ⁿ	5,00 ^l	3,33 ^{fg}
	HR10-5	0,00 ^o	0,00 ^m	0,00 ^h
	HT18-9	13,67 ^a	9,33 ^{de}	9,00 ^b
	HT18-8	11,33 ^c	8,33 ^{fg}	7,00 ^c
3	HT18-7	5,33 ^{lmn}	0,00 ^m	0,00 ^h
	HT18-6	4,67 ⁿ	0,00 ^m	0,00 ^h
	HT18-5	0,00 ^o	0,00 ^m	0,00 ^h
	HL1-9	13,00 ^{ab}	15,33 ^a	10,67 ^a
	HL1-8	11,67 ^{bc}	5,67 ^{kl}	2,67 ^g
4	HL1-7	8,33 ^{efgh}	0,00 ^m	0,00 ^h
	HL1-6	0,00 ^o	0,00 ^m	0,00 ^h
	HL1-5	0,00 ^o	0,00 ^m	0,00 ^h
	HL5-9	11,67 ^{bc}	8,67 ^{ef}	5,00 ^{de}
	HL5-8	8,33 ^{efgh}	0,00 ^m	0,00 ^h
5	HL5-7	7,67 ^{ghij}	0,00 ^m	0,00 ^h
	HL5-6	7,33 ^{ghij}	0,00 ^m	0,00 ^h
	HL5-5	5,00 ^{mn}	0,00 ^m	0,00 ^h
	HL11-9	9,33 ^{ef}	10,00 ^{cd}	6,33 ^c
	HL11-8	7,33 ^{ghij}	7,67 ^{gh}	0,00 ^h
6	HL11-7	0,00 ^o	0,00 ^m	0,00 ^h
	HL11-6	0,00 ^o	0,00 ^m	0,00 ^h
	HL11-5	0,00 ^o	0,00 ^m	0,00 ^h
	HL14-9	8,67 ^{efg}	10,33 ^{bc}	7,00 ^c
	HL14-8	7,00 ^{hijk}	7,67 ^{gh}	0,00 ^h
7	HL14-7	6,67 ^{ijkl}	0,00 ^m	0,00 ^h
	HL14-6	6,33 ^{klm}	0,00 ^m	0,00 ^h
	HL14-5	0,00 ^o	0,00 ^m	0,00 ^h
CV(%)		15,27	16,93	33,30

Ghi chú: Các giá trị là trung bình của 3 lần lặp lại, các giá trị trong cùng một ngày có mẫu tự theo sau giống nhau biểu thị sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê theo phép thử Fisher ở mức ý nghĩa 5%.



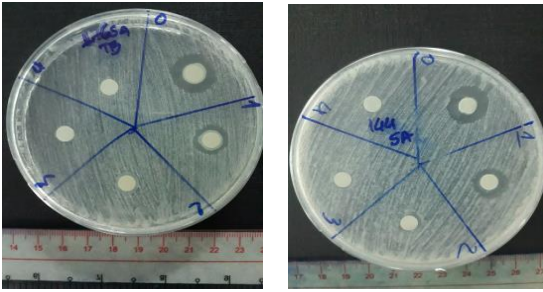
Hình 5. Vòng kháng *E. coli* ở các mật số khác nhau
Mật số vi khuẩn nội sinh giảm dần từ 10^9 đến 10^5

Khi khảo sát khả năng kháng ở các mật số khác nhau với *E. coli*, phần lớn dòng triển vọng đều kháng tốt ở mật số 10^7 trở lên (trừ dòng HL11 chỉ xuất hiện vòng kháng từ mật số 10^8). Duy nhất dòng HL5 kháng tốt ở mật số 10^5 có vòng kháng cực đại 5,00 mm sau 24 giờ khảo sát (Bảng 5 và hình 5).

Bảng 6. So sánh khả năng kháng khuẩn ở các mật số khác nhau với *S. aureus*

STT	Dòng vi khuẩn	Thời gian ủ		
		24 giờ	48 giờ	72 giờ
		Vòng vô khuẩn (mm)	Vòng vô khuẩn (mm)	Vòng vô khuẩn (mm)
1	HR2-9	6,00 ^d	7,67 ^b	5,33 ^{cd}
	HR2-8	0,00 ^f	0,00 ^g	0,00 ^f
	HR2-7	0,00 ^f	0,00 ^g	0,00 ^f
	HR2-6	0,00 ^f	0,00 ^g	0,00 ^f
	HR2-5	0,00 ^f	0,00 ^g	0,00 ^f
	HR10-9	9,33 ^a	7,33 ^b	6,33 ^b
2	HR10-8	4,00 ^e	4,33 ^e	0,00 ^f
	HR10-7	0,00 ^f	0,00 ^g	0,00 ^f
	HR10-6	0,00 ^f	0,00 ^g	0,00 ^f
	HR10-5	0,00 ^f	0,00 ^g	0,00 ^f
3	HT5-9	8,67 ^b	7,33 ^b	6,33 ^b
	HT5-8	0,00 ^f	0,00 ^g	0,00 ^f
	HT5-7	0,00 ^f	0,00 ^g	0,00 ^f
	HT5-6	0,00 ^f	0,00 ^g	0,00 ^f
4	HT18-9	8,33 ^b	9,33 ^a	7,67 ^a
	HT18-8	0,00 ^f	0,00 ^g	0,00 ^f
	HT18-7	0,00 ^f	0,00 ^h	0,00 ^f
5	HT18-6	0,00 ^f	0,00 ^g	0,00 ^f
	HT18-5	0,00 ^f	0,00 ^g	0,00 ^f
	HL1-9	6,00 ^d	7,67 ^b	5,33 ^{cd}
	HL1-8	0,00 ^f	0,00 ^g	0,00 ^f
6	HL1-7	0,00 ^f	0,00 ^g	0,00 ^f
	HL1-6	0,00 ^f	0,00 ^g	0,00 ^f
	HL1-5	0,00 ^f	0,00 ^g	0,00 ^f
	HL5-9	7,67 ^c	8,33 ^a	6,67 ^b
	HL5-8	4,33 ^e	5,67 ^d	2,67 ^e
7	HL5-7	0,00 ^f	0,00 ^g	0,00 ^f
	HL5-6	0,00 ^f	0,00 ^g	0,00 ^f
	HL5-5	0,00 ^f	0,00 ^g	0,00 ^f
	HL6-9	7,67 ^c	6,67 ^c	5,00 ^d
	HL6-8	4,33 ^e	3,67 ^f	2,67 ^e
7	HL6-7	0,00 ^f	0,00 ^g	0,00 ^f
	HL6-6	0,00 ^f	0,00 ^g	0,00 ^f
	HL6-5	0,00 ^f	0,00 ^g	0,00 ^f
CV(%)		20,72	18,11	27,86

Ghi chú: Các giá trị là trung bình của 3 lần lặp lại, các giá trị trong cùng một ngày có mẫu tự theo sau giống nhau biểu thị sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê theo phép thử Fisher ở mức ý nghĩa 5%.



Hình 6. Vòng kháng *S. aureus* ở các mật số khác nhau (Mật số vi khuẩn nội sinh giảm dần từ 10^9 đến 10^5)

Khi khảo sát khả năng kháng ở các mật số khác nhau với *S. aureus* cho thấy tất cả 7 dòng triển vọng đều kháng tốt ở nồng độ gốc (mật số 10^9). Chỉ có 3/7 dòng (HR10, HL5 và HL6) có tính kháng ở mật số 10^8 , trong đó dòng HL5 có vòng kháng cực đại ở 48 giờ đạt 5,67 mm (Bảng 6 và hình 6). Qua nghiên cứu này, cho thấy vi khuẩn *S. aureus* khá mạnh nên muốn kháng tốt phải sử dụng vi khuẩn nội sinh ở mật số cao khoảng 10^9 CFU/ml.

3.5. Định danh các dòng vi khuẩn có tính kháng khuẩn triển vọng

Từ kết quả nghiên cứu trên, 3 dòng vi khuẩn kháng khuẩn triển vọng được chọn để thực hiện phản ứng PCR với cặp mồi là 27F và 1495R. Ba dòng HR10, HT18 và HL1 được giải trình tự sản phẩm PCR vùng gen mã hóa 16S-rRNA và so sánh trên ngân hàng dữ liệu gen NCBI kết hợp một số test sinh hóa như nhuộm Gram, khả năng kháng khuẩn,... quan sát mô tả đặc điểm khuẩn lạc nên cho kết quả định danh như sau: Dòng HR10 có tổng cộng 1451 nucleotides của vùng gene 16S rDNA được giải trình tự 1451bp có độ đồng hình 95,19% với trình tự DNA của là *Bacillus amyloliquefaciens* strain NBRC 15535, dòng HT18 có tổng cộng 1442 nucleotides của vùng gene

16SrDNA được giải trình tự 1442bp có độ đồng hình 98,39% với trình tự DNA của *Pseudomonas oryzihabitans* strain NBRC 102199 và dòng HL1 có tổng cộng 1434 nucleotides của vùng gene 16SrDNA được giải trình tự 1434bp có độ đồng hình 98,56% với trình tự DNA của *Pseudomonas aeruginosa* strain DSM 50071.

Kết quả định danh dòng HR10 cũng phù hợp với những mô tả của Trịnh Thành Trung và đồng tác giả (2013) về *B. amyloliquefaciens* được phân lập ở rễ thực vật. Chúng có khả năng sinh chất kháng sinh kháng lại các loại vi khuẩn Gram dương và Gram âm gây bệnh trên người như *S. aureus*, *E. coli* và *Shigella* sp. hoặc nấm gây bệnh cây là *F. oxysporum*. Nhiều chất kháng sinh có bản chất peptide tổng hợp không qua ribosome cũng đã được công bố từ loài *B. amyloliquefaciens* như bacylisin, lipopeptide (surfactin, fengycin, iturin và bacillomycin) và polyketide (Alvarez et al., 2012).

Kết quả định danh dòng HT18 cũng phù hợp với những mô tả của Veselova et al. (2008). Các dẫn xuất thường được xác định nhất được sản xuất bởi *Pseudomonas* spp. như *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas oryzihabitans*,... là pyocyanin, PCA và một số phenazine. Các hợp chất này cũng có hoạt tính kháng khuẩn nhưng không ức chế nấm men. Theo Lee et al. (2003) Tubermycin B ức chế hiệu quả sự phát triển của *Bacillus cereus* *Micrococcus luteus*, *A. hydrophila*, *E. coli* và *Staphylococcus aureus*.

Kết quả định danh của dòng HL1 cũng phù hợp với những mô tả trước đây của Zahir et al. (2014), đã tìm thấy

Pseudomonas aeruginosa có tác dụng kháng khuẩn. Hoạt chất Pyocyanin tiết ra từ *Pseudomonas aeruginosa* được biết đến như chất ức chế nhiều loài vi khuẩn. Ngoài pyocyanin còn có một số các hợp chất như: pseudomonic acid, 1-hydroxyphenazine, PCA và PCN được tiết ra từ *Pseudomonas aeruginosa* cũng có khả năng kháng *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Clostridium botulinum*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* và cả kháng nấm.

4. Kết luận

Bốn mươi lăm dòng vi khuẩn nội sinh đã được phân lập từ rễ, thân và lá của cây cỏ hôi ở tỉnh Sóc Trăng trên môi trường dinh dưỡng PDA đặc (pH=6,5). Kết quả có 31 dòng kháng *E. coli*, 29 dòng kháng *Aeromonas hydrophila* và 30 dòng kháng

Staphylococcus aureus. Điều đáng ngạc nhiên là, có đến 20 dòng kháng được cả ba loài vi khuẩn gây bệnh và 12 dòng kháng được hai trong số ba loài gây bệnh được khảo sát. Qua nghiên cứu cũng xác định mật số kháng khuẩn hiệu quả của một số loài triển vọng. Ba dòng HR10, HT18, HL1 có hiệu quả kháng khuẩn tốt nhất, kết hợp với các đặc tính sinh hóa tiến hành định danh bằng kỹ thuật sinh học phân tử. Ba dòng HR10, HT18 và HL1 được nhận diện lần lượt là *Bacillus amyloliquefaciens* strain NBRC 15535, *Pseudomonas oryzihabitans* strain NBRC 102199 và *Pseudomonas aeruginosa* strain DSM 50071 với độ tương đồng tương ứng 95,19%, 98,39% và 98,56%.

Các dòng vi khuẩn có tính kháng khuẩn triển vọng này cần được tiếp tục khảo sát thêm khả năng kháng khuẩn đối với một số loài vi khuẩn và nấm gây bệnh khác.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Atlas RM (2010). Handbook of Microbiological Media. 4th edition. CRC Press. 1953 pages. New York, USA.
- Alvarez F, Castro M, Principe A, Borioli G, Fischer S, Mori G, Jofre E (2012). The plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* strains MEP2 18 and ARP2 3 capable of producing the cyclic lipopeptides iturin or surfactin and fengycin are effective in biocontrol of sclerotinia stem rot disease. *J Appl Microbiol*, 112:159-174
- Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Amer. J. Clin. Pathol.*, 45: 493-496.
- Fitriani A, Ihsan F, Hamdiyati Y, Maemunah (2015). Antibacterial Activity of *Shewanella* and *Pseudomonas* as Endophytic Bacteria from the Root of *Ageratum conyzoides* L. *Asian Journal of Applied Sciences*. 3(3).
- Hardoim PR, Van Overbeek LS, Van Elsas JD (2008). Properties of bacterial

- endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*, 16: 463-471.
- Krishnan HB, Kang BR, Krishnan AM, Kim KY, Kim YC (2007). *Rhizobium elti* USDA9032 engineered to produce a phenazine antibiotic inhibits the growth of fungal pathogens but is impaired in symbiotic performance. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(1):327-30.
- Lane DJ (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Stackebrandt, E. and Goodfellow, M., (Eds). *John Wiley and Sons*, New York, NY: pp.115-175.
- Lê Minh Học, Nguyễn Hữu Hiệp (2017). Phân lập, tuyển chọn và định danh được một số dòng vi khuẩn sống nội sinh trong cây cỏ hôi (*Ageratum conyzoides* L.) có khả năng kháng khuẩn tại tỉnh Bạc Liêu. Luận văn Đại học. Trường Đại học Cần Thơ. Thành phố Cần Thơ.
- Lee JY, Moon SS, Hwang BK (2003). Isolation and in vitro and in vivo activity against *Phytophthora capsici* and *Colletotrichum orbiculare* of Phenazine-1-carboxylic acid from *Pseudomonas aeruginosa* strain GC-B26. *J Pest Manage. Sci.* 59:872-82.
- Trịnh Thành Trung, Phan Lạc Dũng, Trần Thị Lệ Quyên, Dương Văn Hợp, Đào Thị Lương, (2013). Đặc điểm sinh học và tiềm năng ứng dụng của chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* sp 1901 phân lập tại Rừng Quốc gia Hoàng Liên. *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ*, 29 (3):59-70.
- Veselova A, Klein SH, Bass IA, Lipasova VA, Metlitskaya AZ, Ovadis MI, Chernin LS, Khmel IA (2008). Quorum Sensing Systems of Regulation, Synthesis of Phenazine Antibiotics, and Antifungal Activity in Rhizospheric Bacterium *Pseudomonas chlororaphis* 449. *Rus. J. Genetics*.44:1400-8.
- Zahir I, Houari A, Saad IK (2016). Antibacterial Effect of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a Moroccan hot spring discharge and partial purification of its extract. *British Biotechnology Journal*. 4(10): 1123-1140.