



DOI:10.22144/ctujos.2024.363

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN NỘI SINH TRONG CÂY BÍ KỲ NAM (*Hydnophytum formicarum*) CÓ KHẢ NĂNG CHỐNG OXY HOÁ *in vitro*

Nguyễn Thị Kim Ngân¹, Trần Chí Linh³, Võ Vy Anh², Tô Hoàng Duy², Võ Hoàng Long¹, Trần Nguyễn Kim Ngân¹ và Đái Thị Xuân Trang^{2*}

¹Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ

²Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

³Khoa Y, Trường Đại học Nam Cần Thơ

*Tác giả liên hệ (Corresponding author): dtxtrang@ctu.edu.vn

Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received): 24/04/2024

Sửa bài (Revised): 20/06/2024

Duyệt đăng (Accepted): 24/07/2024

Title: Isolating *Hydnophytum formicarum* endophytic bacteria to generate antioxidants

Author(s): Nguyen Thi Kim Ngan¹, Tran Chi Linh³, Vo Vy Anh², To Hoang Duy², Vo Hoang Long¹, Tran Nguyen Kim Ngan¹ and Dai Thi Xuan Trang^{2*}

Affiliation(s): ^{1,2}Can Tho University, ³Nam Can Tho University

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm phân lập vi khuẩn nội sinh trong cây bí kỳ nam (*Hydnophytum formicarum*) có khả năng tạo ra chất chống oxy hoá (hàm lượng flavonoid tổng (TFC), chống oxy hoá tổng (TAC) và khả năng khử sắt (RP)). Ngoài ra, các dòng vi khuẩn có khả năng chống oxy hoá cao được định danh qua việc quan sát hình thái học, 16s rRNA. Các mẫu rễ, thân và lá của cây bí kỳ nam ở thành phố Phú Quốc, tỉnh Kiên Giang được dùng làm nguyên liệu để phân lập vi khuẩn. Kết quả cho thấy tổng cộng 25 dòng vi khuẩn nội sinh được phân lập từ các bộ phận khác nhau của cây Bí kỳ nam đều có hoạt tính chống oxy hoá. Trong đó, 3 dòng vi khuẩn HF-L5, HF-T11 và HF-R6 được chọn để tiến hành định danh. Kết quả cho thấy các dòng vi khuẩn này thuộc chi *Bacillus* (dòng HF-L5 và HF-T11) và *Pantoea* (dòng HF-R6).

Từ khóa: Vi khuẩn nội sinh, flavonoid, phosphomolybdenum, năng lực khử sắt

ABSTRACT

The study aims to find the bacteria *Hydnophytum formicarum* endophytic bacteria that have the ability to produce antioxidants (total flavonoid content (TFC), total antioxidant capacity (TAC), and reducing power (RP)). In addition, promising bacterial strains were identified through observing morphology, and 16s rRNA. Samples of roots, stems and leaves of *Hydnophytum formicarum* plant in Phu Quoc city, Kien Giang province were used as raw materials to isolate bacteria. The results showed that a total of 25 endophytic bacterial strains isolated from different parts *Hydnophytum formicarum* had potential antioxidant activity. Among them, three bacterial strains HF-L5, HF-T11 and HF-R6 were selected for identification. The results showed that these bacterial strains belong to the *Bacillus* genera (strains HF-L5 and HF-T11) and *Pantoea* (strain HF-R6).

Keywords: Endophytic bacteria, flavonoid, phosphomolybdenum, reducing power

1. GIỚI THIỆU

Theo Sách Đỏ Việt Nam (2007), bí kỳ nam (*Hydnophytum formicarum*) là một trong số 3 loài thực vật thuộc Vườn Quốc gia Phú Quốc đang có nguy cơ tuyệt chủng và xếp ở thứ hạng nguy cấp (EN) (Anh et al., 2007; Sâm et al., 2017). Cây bí kỳ nam (*Hydnophytum formicarum*) thuộc họ cà phê (Rubiaceae), bộ long đóm (Gentianales), là loài vừa sống phụ sinh với thân cây chủ (cây gỗ lớn) vừa sống cộng sinh với kiến (Huxley et al., 1991). Người ta cho rằng thân củ của cây bí kỳ nam có thể được sử dụng làm thuốc điều trị bệnh tiểu đường, cao huyết áp, nhức đầu, sốt, nổi mẩn da và ung thư. Trước đó, nghiên cứu cho thấy thân củ cây bí kỳ nam chứa các hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học như aldehyd/xeton, terpenoid, phenol, flavonoid và tannin,... (Darwis et al., 2014). Ngoài ra, bí kỳ nam còn có khả năng ức chế xanthine oxidase (Nguyen et al., 2004). Do cây bí kỳ nam chứa nhiều chất có hoạt tính sinh học quý, đồng thời thân củ với hình dáng đặc biệt có thể làm cây cảnh, nên nhu cầu sử dụng về cây lớn và bị khai thác quá mức, khiến cây đang lâm vào tình trạng có nguy cơ tuyệt chủng.

Vi khuẩn nội sinh thực vật là các vi sinh vật cư trú bên trong các mô, cơ quan, đa số sẽ không có bất kỳ dấu hiệu nhiễm trùng bên ngoài nào hoặc tác động bất lợi lên vật chủ của chúng (Ryan et al., 2008). Có bằng chứng thuyết phục ủng hộ quan điểm cho rằng vi sinh vật nội sinh sở hữu các đặc tính có lợi cho cây chủ tương ứng của chúng, bao gồm hỗ trợ tăng trưởng, kháng côn trùng và sâu bệnh, có tác dụng kháng khuẩn chống lại mầm bệnh thực vật (Liu et al., 2016). Các hợp chất tự nhiên từ vi khuẩn nội sinh thể hiện hoạt động như thuốc chống vi trùng, thuốc chống nấm, chất chống ung thư, thuốc ức chế miễn dịch hoặc chất chống oxy hóa (Santoyo et al., 2016). Vi khuẩn nội sinh hiện được công nhận là một kho lưu trữ đặc biệt các hợp chất chuyên hoá thứ cấp có hoạt tính sinh học như polyphenol, flavonoid, terpenoid, alkaloid,... (Tan et al., 2018).

Mặc dù trước đây đã có nhiều công trình nghiên cứu về cây bí kỳ nam, nhưng đa số những nghiên cứu này chỉ tập trung nghiên cứu các hợp chất có hoạt tính sinh học trong cây, trong khi các nghiên cứu về vi khuẩn nội sinh có khả năng chống oxy hoá trong cây bí kỳ nam vẫn còn rất hạn chế. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục tiêu phân lập và tuyển chọn vi khuẩn nội sinh trong cây bí kỳ nam có khả năng chống oxy hoá. Kết quả của nghiên cứu mở ra hướng mới về nguồn hợp chất tự nhiên có

hoạt tính sinh học, ứng dụng hỗ trợ điều trị bệnh, chăm sóc sức khỏe cho người dân.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nguyên cứu

2.1.1. Thu thập và xử lý mẫu

Cây bí kỳ nam được thu thập tại thành phố Phú Quốc, tỉnh Kiên Giang. Cây được tách thành rễ, thân (phần phình to do cộng sinh với kiến), lá và sử dụng phương pháp phân lập vi khuẩn nội sinh. Mẫu được rửa thật sạch dưới vòi nước mạnh để loại bỏ đất, bụi bẩn, để ráo tự nhiên. Mẫu được cắt thành từng đoạn ngắn (2 - 3 cm), để riêng từng loại mẫu trong từng ống Falcon có ghi nhãn. Dung dịch ethanol 70°C được cho vào bình tam giác vừa ngập mẫu, lắc nhẹ trong thời gian 10 phút. Mẫu được rửa sạch lại bằng nước cất vô trùng 3 lần (5 phút/lần). Hợp chất calcium hypochloride 2% được cho vào bình tam giác và lắc nhẹ trong 10 phút. Mẫu được rửa sạch bằng nước cất vô trùng 4 lần (5 phút/lần). Việc không hình thành khuẩn lạc được sử dụng để xác định hiệu quả khử trùng bề mặt của nước rửa cuối cùng bằng cách nhỏ một vài giọt lên đĩa thạch và ủ ở 37°C trong 48 giờ.

2.1.2. Phân lập các dòng vi khuẩn nội sinh

Vi khuẩn nội sinh của lá, thân và rễ cây bí kỳ nam được phân lập trên môi trường PDA (potato - dextrose - agar). Mẫu đã khử trùng được cho vào cối chày vô trùng, giã nhuyễn, cho thêm 1 mL nước cất vô trùng vào cối, khuấy đều và để yên. Phần dịch trích bên trên được cho 100 µL vào các ống nghiệm chứa môi trường PDA bán đặc (mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần). Các ống nghiệm được ủ ở 30°C từ 2 - 4 ngày. Các ống nghiệm được quan sát nếu thấy có một lớp màng mỏng (pellicle) gần bề mặt môi trường thì chứng tỏ có sự hiện diện của vi khuẩn nội sinh. Kim cây đã khử trùng được dùng đâm xuyên qua màng pellicle và cấy vào đĩa môi trường đặc tương ứng, ủ ở 30°C. Sau 24 - 48 giờ, các khuẩn lạc khác nhau mọc trên bề mặt môi trường được tiếp tục cấy chuyển sang các đĩa môi trường PDA mới vài lần đến khi các khuẩn lạc xuất hiện trên đường cấy rời nhau và hình thái khuẩn lạc thuần nhất. Khi thấy vi khuẩn đã thật sự ròn (thuần nhất) thì cấy chuyển sang ống nghiệm chứa môi trường PDA để trữ ở 4°C (Cao Ngọc Diệp, 2011).

Quan sát và mô tả hình thái khuẩn lạc vi khuẩn gồm hình dạng, màu sắc, độ nổi khuẩn lạc và sau đó tiến hành nhuộm Gram vi khuẩn.

2.2. Phương pháp thu nhận dịch ngoại bào của vi khuẩn nội sinh

Vi khuẩn nội sinh được nuôi cấy trong môi trường PDB (potato dextrose broth), lắc và ủ ở 30°C với tốc độ 200 vòng/phút trong 24 giờ. Mật độ tế bào được điều chỉnh mật độ quang ở bước sóng 600 nm ($OD_{600} = 0,5$). Tiếp tục cho 200 mL dịch tế bào vừa đo được thêm vào 9,8 mL môi trường PDB và ủ trong 48 giờ. Sau đó, môi trường nuôi cấy được ly tâm ở tốc độ 3000 vòng/phút ở 4°C trong 10 phút và chất nổi phía trên không có tế bào được sử dụng cho thí nghiệm tiếp theo.

2.3. Xác định hàm lượng flavonoid tổng

Tổng hàm lượng flavonoid của dịch ngoại bào vi khuẩn nội sinh được xác định bằng cách sử dụng quercetin làm tiêu chuẩn (Matic et al., 2017). Trộn 10 mL Na_2NO_2 5% với 100 mL dung dịch chứa 50 mL dịch ngoại bào từ vi khuẩn nội sinh. Sau 5 phút, thêm 10 mL $AlCl_3$ 10% vào hỗn hợp và ủ trong 6 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó, thêm 100 mL NaOH 1 M vào hỗn hợp dung dịch đã ủ. Sau đó, độ hấp thụ của dung dịch đo ở bước sóng 510 nm bằng phương pháp đo quang phổ. Hàm lượng flavonoid toàn phần chứa trong dịch ngoại bào của vi khuẩn nội sinh cây bí kỳ nam được đo lường bằng hàm lượng quercetin đương lượng (QE).

2.4. Khảo sát hoạt tính chống oxy hoá tổng

Khả năng kháng oxy hóa tổng (total antioxidant capacity, TAC) của các dòng vi khuẩn nội sinh trong cây bí kỳ nam được đánh giá bằng phương pháp phosphomolybdenum (Prieto et al., 1999; Aliyu et al., 2013) có hiệu chỉnh. Dịch ngoại bào của vi khuẩn phản ứng với phosphomolybdenum với tỷ lệ 1:3 (v/v). Hỗn hợp phản ứng được ủ ở 95°C trong 90 phút. Sau đó, làm mát đến nhiệt độ phòng, độ hấp thụ quang phổ của hỗn hợp được đo ở bước sóng 695 nm. Dung dịch tham chiếu acid ascorbic 500 µg/ml được pha thành dãy nồng độ 30, 25, 20, 15, 10 (µg/ml).

2.5. Khảo sát khả năng chống oxy hoá bằng năng lực khử

Năng lực khử (reducing power) của dịch ngoại bào từ vi khuẩn nội sinh trong cây bí kỳ nam được thực hiện theo phương pháp của Oyaizu (1986). Hỗn hợp phản ứng lần lượt gồm dịch ngoại bào của vi khuẩn, đệm phosphate (0,2M, pH 6,6) và $K_3Fe(CN)_6$ 1% với cùng tỷ lệ thể tích được ủ 50°C trong 20 phút, thêm TCA 10% với thể tích bằng với thể tích của dịch ngoại bào cho vào phản ứng. Sau đó, hỗn hợp phản ứng được ly tâm 3000 vòng/phút trong 10 phút. Phần dịch sau khi ly tâm được rút 500 µL cho

vào 100 µL $FeCl_3$ 0,1%, lắc đều. Độ hấp thụ quang phổ của hỗn hợp phản ứng được đo ở bước sóng 700 nm. Acid ascorbic được sử dụng làm chất đối chứng dương.

2.6. Định danh vi khuẩn

2.6.1. Nhận dạng hình thái và sinh lý

Quan sát đặc điểm hình thái của tế bào vi khuẩn bằng cách sử dụng kính hiển vi quang học (Olympus, Nhật Bản) và kính hiển vi điện tử quét (Carl Zeiss, Đức). Vi khuẩn được xác định Gram bằng cách nhuộm với crystal violet, cố định bằng iod và nhuộm bằng safranin. Sau mỗi bước nhuộm, tế bào vi khuẩn được rửa bằng nước. Sau khi nhuộm, tế bào vi khuẩn có màu hồng biểu thị Gram âm, trong khi màu xanh tím biểu thị các tế bào Gram dương.

Hình thái của vi khuẩn nội sinh trong cây bí kỳ nam được đo bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM) (Fouad et al., 2017).

2.6.2. Nhận dạng bằng phương pháp sinh học phân tử

Các khuẩn lạc đơn lẻ được chọn lọc và nuôi cấy trong môi trường PDB ở 30°C trên máy lắc ở tốc độ 200 vòng/phút trong 16 đến 24 giờ để thu được huyền phù vi khuẩn. DNA bộ gen được chiết xuất theo phương pháp của Neumann et al., 1992. Trình tự gen *16S rRNA* được khuếch đại bằng phản ứng chuỗi polymerase (PCR) theo phương pháp của Aravind (Aravind et al., 2009). Trình tự *16S rRNA* của chủng vi khuẩn được khuếch đại bằng cách sử dụng các đoạn mồi 27F (50-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-30) và 1492R (50-TACGGT-TACCTTGTTACGACTT-30). 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). Trình sắp xếp chuỗi Macrogen (Macrogen, Inc. Seoul, Hàn Quốc) đã được sử dụng để giải trình tự các sản phẩm PCR của gen *16S rRNA*. Các so sánh BLAST được thực hiện tại Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia (NCBI) để chọn ra các chủng có độ tương tự cao.

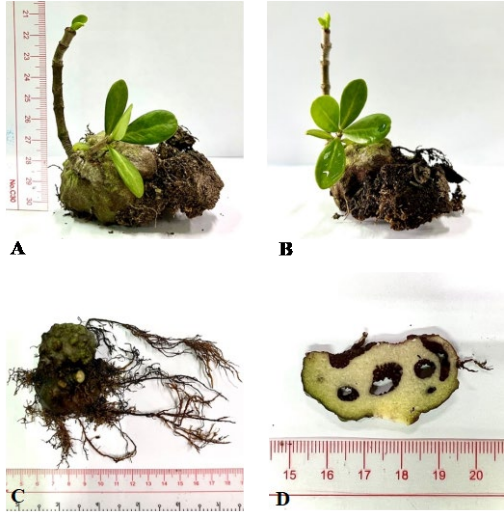
2.7. Xử lý số liệu

Tất cả các phép thử nghiệm được thực hiện ba lần và kết quả được biểu thị bằng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. Các kết quả được phân tích ANOVA (Tukey test) sử dụng phần mềm Minitab 16.0. Kết quả được coi là có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập vi khuẩn nội sinh

Kết quả phân lập vi khuẩn nội sinh từ các bộ phận khác nhau của cây bí kỳ nam đã thu được 25 dòng vi khuẩn nội sinh. Trong đó 7 dòng được phân lập từ rễ (28%), 7 dòng được phân lập từ lá (28%) và 11 dòng (44%) được phân lập từ thân cây bí kỳ nam.



Hình 1. Các bộ phận cây Bí kỳ nam

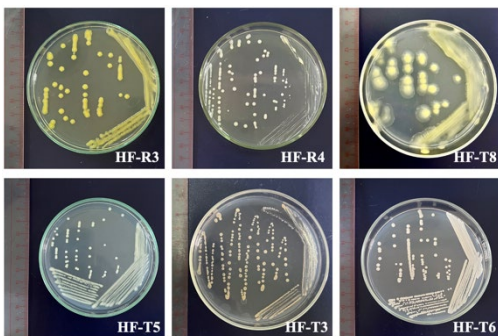
A, B: Cây bí kỳ nam với đầy đủ bộ phận

C: Bộ phận rễ cây bí kỳ nam

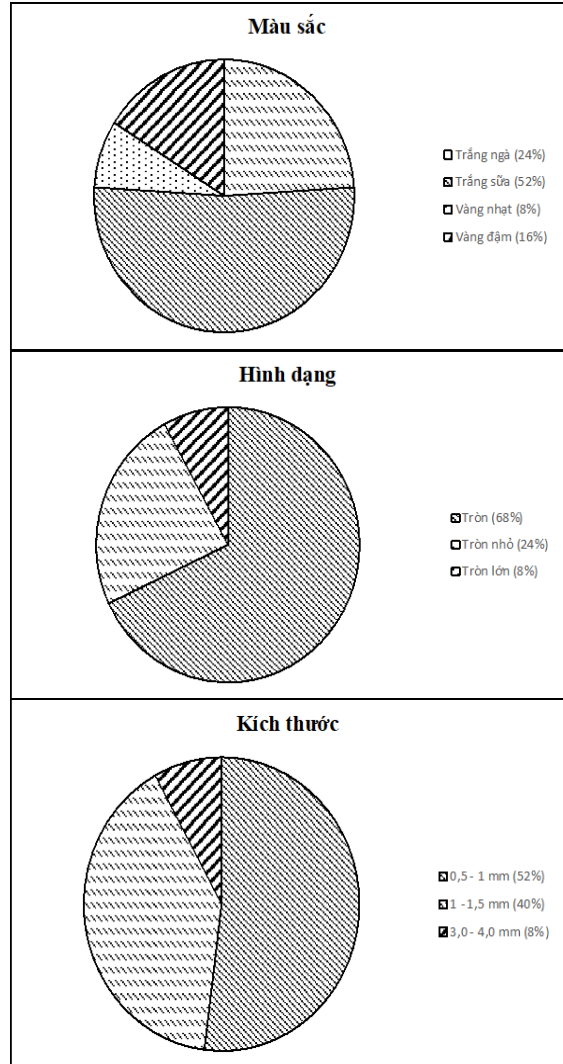
D: Bộ phận thân (củ) cây Bí kỳ nam

Các dòng vi khuẩn nội sinh được phân lập từ cây bí kỳ nam được kí hiệu là HF-R, HF-L, HF-T tương ứng với roots (rễ), leaves (lá) và tuber (thân củ).

Khuẩn lạc của các dòng vi khuẩn nội sinh được phân lập từ cây bí kỳ nam đa dạng về hình dạng, màu sắc và kích thước (Hình 2). Đa số các dòng vi khuẩn đều có bìa nguyên, chỉ có duy nhất dòng HF-T11 có bìa răng cưa.



Hình 2. Hình thái khuẩn lạc của một số dòng vi khuẩn nội sinh



Hình 3. Đặc điểm khuẩn lạc của các dòng vi khuẩn nội sinh cây Bí kỳ nam

Vi khuẩn nội sinh trong cây bí kỳ nam đa phần có màu trắng sữa, hình tròn đều và kích thước dao động trong khoảng 0,5 – 1 mm là chủ yếu. Chỉ có 2 dòng HF-T11 và HF-T8 có kích thước lớn (3 – 4mm).

3.2. Hoạt tính chống oxy hoá của vi khuẩn nội sinh cây bí kỳ nam

Kết quả khảo sát hoạt tính chống oxy hoá của dịch ngoại bào của các dòng vi khuẩn cho thấy, 25 dòng vi khuẩn đều có thể tạo ra các hợp chất kháng oxy hóa (Bảng 1). Hàm lượng TFC dao động từ 7,39 ± 0,545 đến 132,23 ± 1,441 mg QE/mL.

Bảng 1. Hoạt tính chống oxy hoá của dịch ngoại bào vi khuẩn nội sinh trong cây Bí kỳ nam

STT	Dòng VK	TFC	TAC	RP
		mg QE/mL	mg acid ascorbic/mL	
1	HF-R1	21,23 ± 0,943 ^{jk}	109,04 ± 1,271 ^u	222,66 ± 0,49 ⁿ
2	HF-R2	22,80 ± 0,545 ⁱ	246,25 ± 0,655 ^k	283,45 ± 2,52 ^{jk}
3	HF-R3	21,86 ± 0,545 ^{jk}	201,59 ± 0,182 ^p	182,32 ± 2,95 ^o
4	HF-R4	7,39 ± 0,545 ⁿ	180,21 ± 0,182 ^s	7,54 ± 1,75 ^u
5	HF-R5	22,17 ± 0,943 ^j	205,05 ± 0,480 ^o	180,92 ± 2,22 ^o
6	HF-R6	93,87 ± 0,943 ^d	366,27 ± 0,480 ^c	474,76 ± 0,97 ^g
7	HF-R7	9,91 ± 0,943 ^{mm}	208,19 ± 0,480 ⁿ	247,87 ± 1,28 ^m
8	HF-L1	30,66 ± 0,943 ⁱ	252,12 ± 0,480 ^j	288,77 ± 0,49 ^j
9	HF-L2	50,16 ± 1,441 ^g	350,86 ± 0,480 ^c	524,62 ± 0,84 ^e
10	HF-L3	102,36 ± 0,943 ^b	360,61 ± 0,480 ^d	543,11 ± 0,84 ^c
11	HF-L4	18,08 ± 0,545 ^l	183,56 ± 0,791 ^r	97,45 ± 0,97 ^s
12	HF-L5	68,40 ± 0,943 ^f	298,40 ± 0,961 ^h	442,27 ± 0,84 ^h
13	HF-L6	78,77 ± 0,943 ^e	382,52 ± 0,832 ^b	534,43 ± 3,18 ^d
14	HF-L7	39,15 ± 0,943 ^h	343,52 ± 0,314 ^g	504,17 ± 0,49 ^f
15	HF-T1	12,42 ± 1,441 ^m	215,95 ± 0,182 ^l	122,94 ± 8,53 ^q
16	HF-T2	19,03 ± 1,441 ^{kl}	199,81 ± 0,629 ^p	175,88 ± 0,84 ^o
17	HF-T3	98,59 ± 0,943 ^e	347,29 ± 3,328 ^f	637,51 ± 1,75 ^a
18	HF-T4	17,45 ± 0,943 ^l	123,19 ± 1,104 ^t	112,86 ± 0,84 ^r
19	HF-T5	19,03 ± 0,545 ^{kl}	189,33 ± 0,480 ^q	150,11 ± 1,28 ^p
20	HF-T6	32,55 ± 0,943 ⁱ	267,74 ± 0,314 ⁱ	297,17 ± 0,49 ⁱ
21	HF-T7	10,85 ± 0,943 ^m	212,18 ± 0,182 ^m	281,20 ± 0,49 ^k
22	HF-T8	10,85 ± 0,943 ^m	208,83 ± 0,655 ⁿ	264,12 ± 0,84 ^l
23	HF-T9	31,60 ± 0,943 ⁱ	348,24 ± 0,314 ^{ef}	504,17 ± 1,28 ^f
24	HF-T10	17,45 ± 0,943 ^l	91,01 ± 1,441 ^v	48,99 ± 0,84 ^t
25	HF-T11	132,23 ± 1,441 ^a	407,67 ± 0,314 ^a	613,7 ± 0,84 ^b

Ghi chú: Các chữ cái giống nhau trên cùng một cột biểu diễn sự khác biệt không ý nghĩa 5% bằng phép thử Tukey. TFC: Hàm lượng flavonoid tổng số; TAC: Chống oxy hoá tổng; RP: Chống oxy hoá bằng phương pháp khảo sát năng lực khử sắt

Nhiều nghiên cứu chứng minh rằng flavonoid có hoạt tính chống oxy hóa, chống lão hóa và có nhiều hoạt tính chữa bệnh trên người. Williams et al. (2004) cho rằng nhiều chất thuộc nhóm flavonoid có khả năng ức chế các quá trình oxy hóa và được phân loại là các chất chống oxy hóa. Kết quả định lượng ghi nhận trong dịch ngoại bào của các dòng vi khuẩn nội sinh được phân lập từ cây bí kỳ nam có sự hiện diện của flavonoid. Trong đó dòng vi khuẩn HF-T11 cho thấy có khả năng sản sinh flavonoid tốt nhất là 132,23 ± 1,441 mg QE/mL dịch ngoại bào, điều này chứng minh dòng vi khuẩn này có hoạt tính chống oxy hóa tốt. Các hợp chất flavonoid thường được biết đến là chất chuyên hóa thứ cấp thực vật có vòng thơm chứa ít nhất một nhóm hydroxyl.

Các dòng vi khuẩn nội sinh trong cây bí kỳ nam được sàng lọc dựa trên tổng khả năng chống oxy hóa (TAC) của chúng. Hoạt tính chống oxy hóa tổng của các dòng vi khuẩn nội sinh được xác định dựa trên việc khử Mo (VI) thành Mo (V) bằng các hợp chất kháng oxy hóa và hình thành phức hợp photphat/Mo

(V) màu xanh trong phương pháp phosphomolybdenum. TAC được xác định bằng cách sử dụng đường chuẩn axit ascorbic. Nhìn chung, dòng vi khuẩn có hàm lượng chất chống oxy hóa cao nhất trong tổng cộng 25 dòng vi khuẩn nội sinh phân lập từ cây bí kỳ nam là dòng HF-T11 (407,67 ± 0,314 mg AAE/mL dịch ngoại bào), tiếp theo là dòng HF-L6 và HF-L3 với hàm lượng chất chống oxy hóa lần lượt là 382,52 ± 0,832 và 360,61 ± 0,480 mg AAE/mL dịch ngoại bào (Bảng 1).

Các chất kháng oxy hóa có thể ức chế hoạt động của các chất gây stress oxy hóa thông qua khả năng khử Fe³⁺ thành Fe²⁺ (Öztaşkın et al., 2015). Chiết xuất ethyl acetate từ thân rễ của cây bí kỳ nam có hoạt tính chống oxy hóa mạnh (Senawong et al., 2013). Hầu như chưa có nghiên cứu nào nói về khả năng chống oxy hóa của các dòng vi khuẩn nội sinh trong cây bí kỳ nam. Kết quả cho thấy dòng HF-T11 và HF-T3 có khả năng chống oxy hóa mạnh mẽ (613,7 ± 0,84 và tương ứng là 637,51 ± 1,75 mg AAE/mL dịch ngoại bào). Qua đó có thể thấy đối

với phương pháp này, các dòng vi khuẩn nội sinh được phân lập từ thân cây bí kỳ nam có khả năng khử Fe³⁺ thành Fe²⁺ mạnh mẽ.

Vi khuẩn nội sinh phân lập từ dược liệu đã được chứng minh là có hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm (Tejesvi et al., 2008; Ohike et al., 2013; Rovna et al., 2020). Chúng cũng tạo ra các chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính sinh học (Photolo et al., 2020; Almuhayawi et al., 2021; Urumbil and Anilkumar, 2021). Tuy nhiên, các nghiên cứu về vi khuẩn nội sinh liên quan đến cây bí kỳ nam còn khan hiếm. Đây là một trong những nghiên cứu đầu tiên tìm thấy vi khuẩn nội sinh của cây bí kỳ nam ở Việt Nam.

3.3. Kết quả giải trình tự DNA của một số dòng vi khuẩn

Sản phẩm PCR (với cặp mồi 27F (50-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-30) và 1492R (50-TACGGT-TACCTTGTACGACTT-30)) của 3 dòng vi khuẩn tuyển chọn được sử dụng để giải trình tự 16s rRNA và sử dụng phần mềm Blast N để so sánh với trình tự 16s rRNA của các dòng vi khuẩn

có trong ngân hàng dữ liệu NCBI. Kết quả cho thấy trình tự các dòng vi khuẩn có độ tương đồng với trình tự gen của dòng vi khuẩn trên ngân hàng dữ liệu rất cao, khoảng 99% (Bảng 2).

Bảng 2. Kết quả so sánh trình tự DNA của các dòng vi khuẩn trên NCBI

Dòng vi khuẩn	Chiều dài (bp)	Các loài quan hệ	Độ tương đồng (%)
HF-L5	1404	<i>Bacillus safensis</i> strain NS3	99,72
HF-R6	1386	<i>Pantoea dispersa</i> strain SR348	100
HF-T11	1417	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain FDAARGOS 794	99,79

Kết quả nhận diện đặc điểm hình thái, đặc điểm tế bào và kết quả test sinh hoá của các dòng vi khuẩn nội sinh trong cây bí kỳ nam đều phù hợp với kết quả định danh bằng phương pháp sinh học phân tử, cụ thể được trình bày trong Bảng 3.

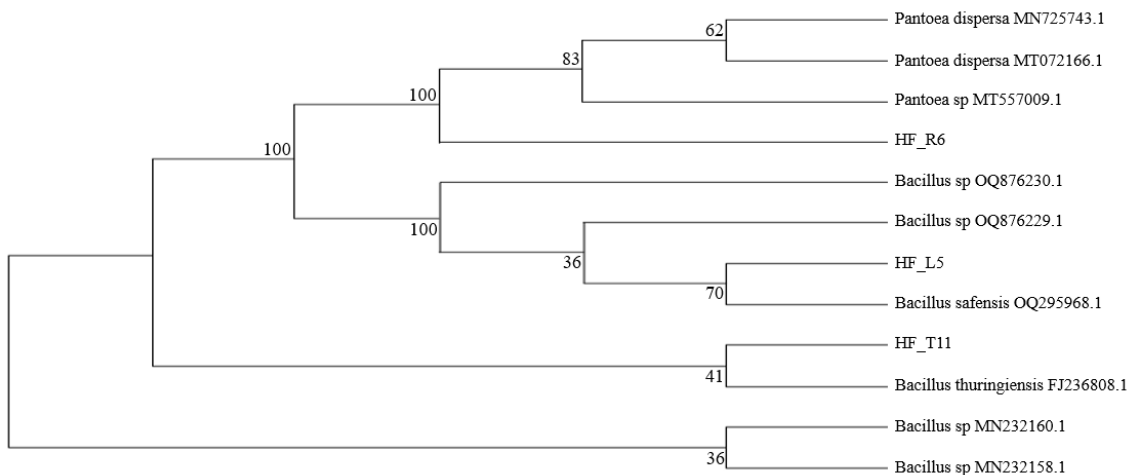
Bảng 3. Đặc điểm hình thái của các dòng vi khuẩn

Dòng vi khuẩn	Hình ảnh khuẩn lạc	Gram	SEM
HF-L5			
HF-R6			
HF-T11			

Trong đó, hình dạng khuẩn lạc được cấy trong đĩa petri có đường kính 10 cm ở điều kiện bình thường. Hình ảnh nhuộm Gram được quan sát dưới kính hiển vi ở vật kính 40x và đo kích thước vi khuẩn trong SEM. Hình ảnh đặc điểm khuẩn lạc và nhuộm Gram được chụp ở điều kiện bình thường. Kết quả đã chỉ ra rằng 2 dòng vi khuẩn HF-L5 và HF-T11 là 2/25 dòng vi khuẩn nội sinh cây bí kỳ nam cho kết quả Gram dương (8%).

Kết quả định danh dòng vi khuẩn HF-R6 phù hợp với mô tả của Trang et al. (2024), đã tìm thấy dòng vi khuẩn *Pantoea* sp. trong cây Cò sen có khả năng sản sinh các hợp chất thứ cấp có hoạt tính chống oxy hoá. Các dòng vi khuẩn thuộc chi *Pantoea* có thể tạo ra các chất thúc đẩy sự phát triển của thực vật và khả năng cố định đạm sinh học (Dastager et al., 2009; Chen et al., 2017). Ngoài ra, *Pantoea* spp. có thể sản xuất chất kháng oxy hóa và kháng sinh (Sulja et al., 2022; Essghaier et al., 2023). Nghiên cứu này chứng minh rằng *Pantoea* sp. là vi khuẩn nội sinh phát triển trong cây bí kỳ nam, sản sinh ra các chất có lợi. Ngoài ra, các dòng vi khuẩn nội sinh thuộc chi *Bacillus* cũng đã được chứng minh rằng có khả năng chống oxy hoá mạnh mẽ như nghiên cứu của Zheng et al. (2016). Chất kháng oxy hóa rất quan trọng đối với các ứng dụng điều trị bệnh vì khả năng vô hiệu hóa các oxy hoạt động (Reactive Oxygen Species, ROS) ở những bệnh nhân đang chống lại các bệnh liên quan đến tác nhân truyền nhiễm hoặc rối loạn chuyển hóa (Elswaifi et al., 2009; Pellegrino, 2016). Nghiên cứu

này sử dụng 3 phương pháp khảo sát hoạt tính chống oxy hóa, bao gồm TFC, TAC và RP để đánh giá hoạt động kháng oxy hóa của các chất chuyển hóa nội sinh. Kết quả cho thấy HF-T11 thể hiện hoạt tính chống oxy hóa tốt nhất. Chúng HF-T11 được xác định là *Bacillus* sp. HF-T11. Trong nghiên cứu phân lập và xác định vi khuẩn nội sinh từ loài *Berberis lycium* (Nisa et al., 2022), kết quả định danh đã chỉ ra rằng các dòng vi khuẩn được định danh lần lượt là *Bacillus cereus* (LBL6), *Bacillus thuringiensis* (SBL3) và *Bacillus anthracis* (SBL4) trên cơ sở giải trình tự vùng gene 16S *rRNA* và sử dụng môi trường tự như giải trình tự vi khuẩn nội sinh cây bí kỳ nam (với cặp mồi 27F (50-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-30) và 1492R (50-TACGGT-TACCTTGTTACGACTT-30)). Ngoài ra, phân tích GCMS của chiết xuất từ vi khuẩn nội sinh thuộc chi *Bacillus* trong *Berberis lycium* cho thấy sự hiện diện của 12 chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính sinh học tương ứng với các hoạt động kháng khuẩn, kháng nấm, chống oxy hóa, chống khối u và chống ung thư. Điều này cho thấy 2 dòng vi khuẩn HF-T11 và HF-L5 thuộc *Bacillus* sp. là những vi khuẩn nội sinh thường hay xuất hiện ở các loại cây dược liệu. Ngoài ra, vi khuẩn nội sinh trong cây bí kỳ nam có thể có khả năng kháng nấm và kháng khuẩn nếu được nghiên cứu chuyên sâu hơn. Kết quả thu được trong nghiên cứu này cũng phù hợp với kết quả được công bố trước đó của Akinsanya et al. (2015) và Essghaier et al. (2023). Cây phát sinh loài của các dòng vi khuẩn HF-L5, HF-R6 và HF-T11 được vẽ dựa trên trình tự gen 16S *rRNA* (Hình 4).



Hình 4. Sơ đồ phả hệ của các dòng vi khuẩn

Kết quả phân tích mối quan hệ di truyền của các dòng vi khuẩn nội sinh trong cây bí kỳ nam được thể hiện qua Hình 4. Trong đó, phân tích phát sinh loài được đánh giá bằng Neighbor-Joining với 1,000 lần

phân tích bootstrap. Kết quả đã chỉ ra rằng các dòng vi khuẩn nội sinh cây bí kỳ nam được định danh lần lượt là *Bacillus* sp. HF-T11, *Bacillus* sp. HF-L511 và *Pantoea* sp. HF-R6. Qua đó có thể thấy được rằng

cây phá hệ có mối liên kết giữa các dòng vi khuẩn dựa vào trình tự 16s rRNA được vẽ bằng phần mềm Mega11.

4. KẾT LUẬN

Hai mươi lăm dòng vi khuẩn nội sinh đã được phân lập từ rễ, thân và lá cây bí ký nam trên môi trường dinh dưỡng PDA (pH=6,5). Tất cả hai mươi lăm dòng vi khuẩn được phân lập đều có khả năng

chống oxy hoá, đặc biệt là có tính chống oxy hoá mạnh được định danh lần lượt là *Bacillus* sp. HF-T11, *Bacillus* sp. HF-L511 và *Pantoea* sp. HF-R6.

LỜI CẢM ƠN

Các tác giả cảm ơn Bộ Giáo dục và Đào tạo Việt Nam đã hỗ trợ một phần kinh phí thực hiện nghiên cứu thông qua đề tài mã số B2023-TCT-02.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Akinsanya, M. A., Goh, J. K., Lim, S. P., & Ting, A. S. Y. (2015). Diversity, antimicrobial and antioxidant activities of culturable bacterial endophyte communities in *Aloe vera*. *FEMS microbiology letters*, 362(23), fnv184. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv184>
- Aliyu, A. B., Ibrahim, M. A., Musa, A. M., Musa, A. O., Kiplimo, J. J., & Oyewale, A. O. (2013). Free radical scavenging and total antioxidant capacity of root extracts of *Anchomanes difformis* Engl.(Araceae). *Acta Pol Pharm*, 70(1), 115-121.
- Almuhayawi, M. S., Abdel-Mawgoud, M., Al Jaouni, S. K., Almuhayawi, S. M., Alruhaili, M. H., Selim, S., & AbdElgawad, H. (2021). Bacterial endophytes as a promising approach to enhance the growth and accumulation of bioactive metabolites of three species of *Chenopodium Sprouts*. *Plants*, 10(12), 2745. <https://doi.org/10.3390/plants10122745>
- Aravind, R., Kumar, A., Eapen, S. J., & Ramana, K. V. (2009). 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*, 48(1), 58-64. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02486.x>
- Chen, M., Zhao, Z., Meng, H., & Yu, S. (2017). The antibiotic activity and mechanisms of sugar beet (*Beta vulgaris*) molasses polyphenols against selected food-borne pathogens. *LWT-food Science and Technology*, 82, 354-360. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.04.063>
- Darwis, D., Hertiani, T., & Samito, E. (2014). The effects of *Hydnophytum formicarum* ethanolic extract towards lymphocyte, vero and T47d cells proliferation in vitro. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 4(6), 103-109. <https://dx.doi.org/10.7324/JAPS.2014.40616>
- Dastager, S. G., Deepa, C. K., Puneet, S. C., Nautiyal, C. S., & Pandey, A. (2009). Isolation and characterization of plant growth-promoting strain *Pantoea* NII-186. *From Western Ghat Forest soil, India. Letters in Applied Microbiology*, 49(1), 20-25. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02616.x>
- Elswaifi, S. F., Palmieri, J. R., Hockey, K. S., & Rzigalinski, B. A. (2009). Antioxidant nanoparticles for control of infectious disease. *Infectious Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Infectious Disorders)*, 9(4), 445-452. <https://doi.org/10.2174/187152609788922528>
- Essghaier, B., Mallat, N., Khwaldia, K., Mottola, F., Rocco, L., & Hannachi, H. (2023). Production and characterization of new biosurfactants/bioemulsifiers from *Pantoea alhagi* and their antioxidant, antimicrobial and anti-biofilm potentiality evaluations. *Molecules*, 28(4), 1912. <https://doi.org/10.3390/molecules28041912>
- Fouad, H., Hongjie, L., Yanmei, D., Baoting, Y., El-Shakh, A., Abbas, G., & Jianchu, M. (2017). Synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis* to control filarial vector *Culex pipiens pallens* and its antimicrobial activity. *Artificial cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 45(7), 1369-1378. <https://doi.org/10.1080/21691401.2016.1241793>
- Hiệp, L. T. H., & Diệp, C. N. (2011). Phân lập và nhận diện vi khuẩn nội sinh trong cây cúc xuyên chi (*Wedelia trilobata* (L.) Hitchc.) Bằng kỹ thuật PCR. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, (18a), 168-176.
- Huyut, Z., Beydemir, Ş., & Gülçin, İ. (2017). Antioxidant and antiradical properties of selected flavonoids and phenolic compounds. *Biochemistry research international*, 2017(1), 7616791. <https://doi.org/10.1155/2017/7616791>
- Huxley, C. R., & Jebb, M. (1991). The tuberous epiphytes of the Rubiaceae 1: A new subtribe—The Hydnophytinae. *Blumea: Biodiversity, Evolution and Biogeography of Plants*, 36(1), 1-20.
- Ilhami, G., Malahat, A., Taslimi, P., Zubeyir, H., Leyla, S., Afsun, S., ... & Claudiu T, S. (2017). Synthesis and biological evaluation of aminomethyl and alkoxyethyl derivatives as carbonic anhydrase, acetylcholinesterase and

- butyrylcholinesterase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32(1), 1174-1182.
<https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1368019>
- Kudo-Saito, C., Shirako, H., Ohike, M., Tsukamoto, N., & Kawakami, Y. (2013). CCL2 is critical for immunosuppression to promote cancer metastasis. *Clinical & Experimental Metastasis*, 30, 393-405. <https://doi.org/10.1007/s10585-012-9545-6>
- Liu, Y. H., Guo, J. W., Salam, N., Li, L., Zhang, Y. G., Han, J., Mohamad, O. A., & Li, W. J. (2016). Culturable endophytic bacteria associated with medicinal plant *Ferula songorica*: molecular phylogeny, distribution and screening for industrially important traits. 3 *Biotech*, 6, 1-9. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0522-7>
- Matic, P., Sabljic, M., & Jakobek, L. (2017). Validation of spectrophotometric methods for the determination of total polyphenol and total flavonoid content. *Journal of AOAC International*, 100(6), 1795-1803. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0066>
- Neumann, B., Pospiech, A., & Schairer, H. U. (1992). Rapid isolation of genomic DNA from Gram-negative bacteria. *Trends in Genetics*, 8(10), 332-333. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(92\)90269-A](https://doi.org/10.1016/0168-9525(92)90269-A)
- Nguyen, M. T. T., Awale, S., Tezuka, Y., Le Tran, Q., Watanabe, H., & Kadota, S. (2004). Xanthine oxidase inhibitory activity of Vietnamese medicinal plants. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27(9), 1414-1421. <https://doi.org/10.1248/bpb.27.1414>
- Nisa, S., Shoukat, M., Bibi, Y., Al Ayoubi, S., Shah, W., Masood, S., Sabir, M., Bano, S. A., & Qayyum, A. (2022). Therapeutic prospects of endophytic *Bacillus* species from *Berberis lycium* against oxidative stress and microbial pathogens. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(1), 287-295. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.08.099>
- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese journal of nutrition and dietetics*, 44(6), 307-315. <https://doi.org/10.5264/eiyogakuzashi.44.307>
- Öztaşkın, N., Çetinkaya, Y., Taslimi, P., Göksu, S., & Gülçin, İ. (2015). Antioxidant and acetylcholinesterase inhibition properties of novel bromophenol derivatives. *Bioorganic chemistry*, 60, 49-57. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2015.04.006>
- Pellegrino, D. (2016). Antioxidants and cardiovascular risk factors. *Diseases*, 4(1), 11. <https://doi.org/10.3390/diseases4010011>
- Photolo, M. M., Mavumengwana, V., Sitole, L., & Tlou, M. G. (2020). Antimicrobial and antioxidant properties of a bacterial endophyte, *Methylobacterium radiotolerans* MAMP 4754, isolated from *Combretum erythrophyllum* seeds. *International Journal of Microbiology*, 2020, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2020/9483670>
- Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269(2), 337-341. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4019>
- Rachpirom, M., Barrows, L. R., Thengyai, S., Ovatlarnporn, C., Sontimuang, C., Thiantongin, P., & Puttarak, P. (2022). Antidiabetic Activities of Medicinal Plants in Traditional Recipes and Candidate Antidiabetic Compounds from *Hydnophytum formicarum* Jack. Tubers. *Pharmacognosy Research*, 14(1), 89-99. [10.5530/pres.14.1.13](https://doi.org/10.5530/pres.14.1.13)
- Rovná, K., Ivanišová, E., Žiarovská, J., Ferus, P., Terentjeva, M., Kowalczewski, P. Ł., & Kačániová, M. (2020). Characterization of *Rosa canina* fruits collected in urban areas of Slovakia. Genome size, iPBS profiles and antioxidant and antimicrobial activities. *Molecules*, 25(8), 1888. <https://doi.org/10.3390/molecules25081888>
- Ryan, R. P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D. J., & Dowling, D. N. (2008). Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiology Letters*, 278(1), 1-9. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00918.x>
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., & Glick, B. R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological research*, 183, 92-99. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.008>
- Senawong, T., Misuna, S., Khaopha, S., Nuchadomrong, S., Sawatsitang, P., Phaosiri, C., Surapaitoon, A., & Sripa, B. (2013). Histone deacetylase (HDAC) inhibitory and antiproliferative activities of phenolic-rich extracts derived from the rhizome of *Hydnophytum formicarum* Jack.: sinapinic acid acts as HDAC inhibitor. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13, 1-11. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-232>
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, 299, 152-178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)

- Sulja, A., Pothier, J. F., Blom, J., Moretti, C., Buonauro, R., Rezzonico, F., & Smits, T. H. (2022). Comparative genomics to examine the endophytic potential of *Pantoea agglomerans* DAPP-PG 734. *BMC genomics*, *23*(1), 742. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08966-y>
- Tan, X. M., Zhou, Y. Q., Zhou, X. L., Xia, X. H., Wei, Y., He, L. L., Tang, H. Z., & Yu, L. Y. (2018). Diversity and bioactive potential of culturable fungal endophytes of *Dysosma versipellis*; a rare medicinal plant endemic to China. *Scientific Reports*, *8*(1), 5929. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24313-2>
- Tejesvi, M. V., Kini, K. R., Prakash, H. S., Subbiah, V., & Shetty, H. S. (2008). Antioxidant, antihypertensive, and antibacterial properties of endophytic *Pestalotiopsis* species from medicinal plants. *Canadian journal of microbiology*, *54*(9), 769-780. <https://doi.org/10.1139/W08-070>
- Trac, D., Maxwell, J. T., Brown, M. E., Xu, C., & Davis, M. E. (2019). Aggregation of child cardiac progenitor cells into spheres activates notch signaling and improves treatment of right ventricular heart failure. *Circulation Research*, *124*(4), 526-538. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.313845>
- Urumbil, S. K., & Anilkumar, M. N. (2021). Anti-inflammatory activity of endophytic bacterial isolates from *Emilia sonchifolia* (Linn.) DC. *Journal of Ethnopharmacology*, *281*, 114517. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114517>