

DOI:10.22144/ctujos.2024.356

## KHẢO SÁT KHẢ NĂNG CHỐNG OXY HÓA CỦA VI KHUẨN NỘI SINH CÂY LAN GẤM (*Anoectochilus setaceus*)

Trần Nguyễn Kim Ngân<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Kim Ngân<sup>1</sup>, Võ Hoàng Long<sup>1</sup>, Trần Chí Linh<sup>3</sup> và Đái Thị Xuân Trang<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup>Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>3</sup>Khoa 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): 07/04/2024

Sửa bài (Revised): 25/06/2024

Duyệt đăng (Accepted): 26/07/2024

**Title:** Investigating endophytic bacteria from *Anoectochilus setaceus* for antioxidant production

**Author(s):** Tran Nguyen Kim Ngan<sup>1</sup>, Nguyen Thi Kim Ngan<sup>1</sup>, Vo Hoang Long<sup>1</sup>, Tran Chi Linh<sup>3</sup> and Dai Thi Xuan Trang<sup>2\*</sup>

**Affiliation(s):** <sup>1,2</sup>Can Tho University  
<sup>3</sup>Nam Can Tho University

### TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu là đánh giá khả năng chống oxy hóa của vi khuẩn nội sinh phân lập từ cây Lan gấm (*Anoectochilus setaceus*). Kết quả cho thấy từ các bộ phận thân, lá và rễ của cây Lan gấm phân lập được 20 dòng vi khuẩn nội sinh. Khả năng chống oxy hoá được đánh giá bằng phương pháp định lượng polyphenol, flavonoid, chống oxy hóa tổng số (TAC) và năng lực khử (Reducing power-RP). Tất cả các dòng vi khuẩn phân lập được đều có khả năng chống oxy hóa, trong đó 3 dòng vi khuẩn AS-T4, AS-R2, AS-L3 có khả năng chống oxy hóa mạnh nhất. Hàm lượng polyphenol của ba dòng vi khuẩn AS-T4, AS-R2, AS-L3 lần lượt là: 642,5; 731,4; 1400 (mg GAE/mL); hàm lượng flavonoid lần lượt là 118,6; 134,3; 192,1 (mg QE/mL). Kết quả chống oxy hóa của phương pháp TAC lần lượt là: 846,3; 1402,6; 1195,0 mg (AAE/mL); RP là 841,5; 872,0; 946,0 (mg AAE/mL). Kết quả định danh ba dòng vi khuẩn AS-T4, AS-R2 và AS-L3 là *Enterobacter quasiroggenkampii* AS-T4, *Enterobacter hormaechei* AS-R2, *Bacillus velezensis* AS-L3.

**Từ khóa:** Flavonoid, Lan gấm, phosphomolybdenum, polyphenol, năng lực khử, vi khuẩn nội sinh

### ABSTRACT

The study aimed to identify endophytic bacterial strains in *Anoectochilus setaceus* with antioxidant properties in vitro. Antioxidant capacity was evaluated by measuring polyphenols, flavonoids, total antioxidant (TAC) and reducing power (RP). The study found 20 strains of endophytic bacteria isolated from trunks, leaves and roots of *A. setaceus*. All isolated endophytic bacteria could generate antioxidants. Three bacterial strains exhibited the highest antioxidant capacity: AS-T4, AS-R2, AS-L3. The AS-T4, AS-R2, and AS-L3 strains showed the highest TPC at 642,5; 731,4; 1400 (mg GAE/mL), respectively. The TFC for three bacteria strains were 118,6; 134,3; 192,1 (mg QE/mL), respectively. The antioxidant values for the TAC method were 846,3; 1402,6; 1195,0 (mg AAE/mL), while RP yielded 841,5; 872,0; 946,0 (mg AAE/mL), respectively. The results revealed that the AS-T4, AS-R2, and AS-L3 belong to *Enterobacter quasiroggenkampii* AS-T4, *Enterobacter hormaechei* AS-R2, and *Bacillus velezensis* AS-L3, respectively.

**Keywords:** Flavonoid, *Anoectochilus setaceus*, phosphomolybdenum, polyphenol, reducing power, endophytic bacteria

## 1. GIỚI THIỆU

Các hợp chất có hoạt tính sinh học ngày càng được quan tâm trong dược phẩm và liệu pháp tự nhiên. Các hợp chất này chủ yếu được sản xuất bởi thực vật và vi khuẩn và có nhiều đặc tính dược phẩm bao gồm chống ung thư, tim mạch, chống rối loạn lipid huyết, chống cao huyết áp, chống tăng glucose huyết, chống huyết khối và chống xơ vữa động mạch (Puri et al., 2005; Chang et al., 2013; Atanasov et al., 2015; Villaescusa et al., 2015). Các hợp chất thiên nhiên có hoạt tính sinh học được sử dụng làm thuốc cho các bệnh khác nhau với rất ít tác dụng phụ (Chang et al., 2013). Các loại vi sinh vật nội sinh, vi khuẩn và xạ khuẩn đóng một vai trò quan trọng trong việc sản xuất các hợp chất có hoạt tính sinh học như alkaloid, steroid, terpenoid, peptide, polyketone, flavonoid, quinol và phenol được sản xuất bởi vi khuẩn nội sinh (Li et al., 2008; Kusari et al., 2012; Molina et al., 2012) có lợi cho ứng dụng công nghiệp và y tế (Kobayashi & Palumbo, 2000; Zinniel et al., 2002). Các vi khuẩn nội sinh dành phần lớn vòng đời trong các mô thực vật mà không gây hại cho cây. Nhiều vi sinh vật nội sinh cũng tiết ra các chất chuyển hóa chuyên biệt hoặc các hợp chất có hoạt tính sinh học (Liarzi et al., 2016). Vi khuẩn nội sinh cũng có tiềm năng nhờ khả năng sản xuất hormone tăng trưởng thực vật, hòa tan phosphate, thu nhận chất dinh dưỡng và cố định nitơ (Glick, 2012). Các nghiên cứu về vi khuẩn nội sinh trong cây được liệu có khả năng sản sinh các chất chuyển hóa thứ cấp có tiềm năng điều trị bệnh tương tự như cây dược liệu vẫn chưa có nhiều nghiên cứu và ứng dụng. Do đó, việc tìm kiếm các dòng vi khuẩn nội sinh có khả năng sản sinh các hợp chất thiên nhiên trong thực vật có tác dụng chống oxy hóa, ngăn chặn các bệnh do quá trình oxy hóa gây ra. Đồng thời các hợp chất thiên nhiên trong thực vật mang tính an toàn và không gây ra tác dụng phụ so với các chất chống oxy hóa tổng hợp đang là vấn đề tiềm năng và thu hút sự chú ý trong những năm gần đây.

Cây Lan gấm (*Anoectochilus setaceus*) xuất hiện ở rất nhiều nơi như Ấn Độ, Nhật Bản, Malaysia, Srilanka, Nam Trung Quốc, ... Ở Việt Nam, Lan gấm chủ yếu phân bố tại Lào Cai, Tam Đảo, Kon Tum, Gia Lai, Sơn La, Yên Bái, ... Theo y học dân gian, cây Lan gấm (Lan kim tuyến, Kim tuyến liên) có tác dụng tăng cường sức khỏe, bồi bổ khí huyết. Ngoài ra, Lan gấm còn có tính kháng khuẩn, ứng dụng trong các bài thuốc phòng ngừa ung thư, hỗ trợ điều trị bệnh gan, bình ổn huyết áp vô cùng hiệu quả. Đặc biệt, cây Lan gấm có chứa các hợp chất chống oxy hóa khá tốt. Tuy nhiên, Lan gấm rất khó tìm, vì

cây mọc trong rừng sâu, khe đá, ở độ cao 700 - 1.000 m. Cây thường mọc trên vùng đất ẩm thấp, dưới tán rừng già. Nên việc khai thác các hợp chất thiên nhiên từ cây Lan gấm bị hạn chế do thiếu nguồn nguyên liệu. Chính vì vậy, việc phân lập vi khuẩn nội sinh trong cây Lan gấm là cần thiết để phát triển nguồn hợp chất thiên nhiên có hoạt tính có lợi để chăm sóc sức khỏe người dân.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Thu mẫu và xử lý mẫu

Mẫu được thu tại Vĩnh Long. Thu toàn bộ cây, rửa thật sạch đất bám ở rễ, thân và lá; tách rời các bộ phận rễ, thân và lá. Các bộ phận rễ, thân và lá sau khi được tách riêng được rửa sạch với nước. Mẫu sau khi rửa sạch bằng nước cất vô trùng được cắt thành các đoạn ngắn 3-4 cm. Sau đó các mẫu được tiếp tục khử trùng bằng ethanol 70% trong 30 giây, rửa lại bằng nước cất vô trùng 3-4 lần. Cuối cùng các mẫu vật được ngâm trong hydrogen peroxide 3% trong 3 phút và rửa lại với nước cất vô trùng 4-5 lần để loại bỏ các hóa chất còn dư. Các bộ phận sau khi khử trùng được giã nhuyễn và cho thêm 2-3 mL nước cất, trộn đều và để lắng trong 10-12 phút. Rút lấy 100  $\mu$ L phần dịch bên trên cho vào ống nghiệm chứa 900  $\mu$ L môi trường PDA (potato dextrose agar) đã được chuẩn bị trước đó. Sau đó các ống nghiệm được ủ 24 giờ ở 30°C. Theo dõi sự xuất hiện của màng mỏng trắng đục (vòng pellicle) bên dưới cách mặt môi trường 2-4 mm (thể hiện sự phát triển của vi khuẩn nội sinh). Dùng micropipette hút 50  $\mu$ L dịch vi khuẩn tại vị trí vòng pellicle xuất hiện và trải đều lên đĩa petri có môi trường PDA đã chuẩn bị sẵn. hong khô vành đĩa trên ngọn lửa đèn cồn để tránh sự xâm nhập của các vi sinh vật trong môi trường, sau đó ủ đĩa ở nhiệt độ 30°C và theo dõi 24-48 giờ. Sau 24-48 giờ, khuẩn lạc xuất hiện và được tiến hành cấy chuyển từng dạng khuẩn lạc nhiều lần cho đến khi xuất hiện những khuẩn lạc rời rạc. Vi khuẩn được quan sát dưới kính hiển vi để xem đã rỗng hay chưa. Nếu đã rỗng thì mẫu vi khuẩn được tiến hành cấy chuyển vào ống nghiệm môi trường PDA nghiêng để trữ tủ lạnh 5°C. Khuẩn lạc được tiến hành quan sát và ghi nhận đặc điểm (hình dạng, kích thước, màu sắc, dạng bìa, độ nổi).

### 2.2. Nhuộm Gram vi khuẩn

Phương pháp nhuộm Gram do nhà vi khuẩn học người Đan Mạch là Christian Gram phát minh vào năm 1888, và phương pháp này dùng để nhuộm vi khuẩn để phân biệt vi khuẩn Gram dương (bắt màu tím xanh của crystal violet) hay Gram âm (bắt màu đỏ của Fuchsin hay Safranin). Để thực hiện nhuộm

Gram cho ra kết quả chính xác cần phải sử dụng mẫu vi khuẩn được cấy trong 24 giờ.

Trình tự nhuộm Gram được thực hiện như sau: Một giọt nước cất vô trùng được nhỏ lên giữa kính mang vật (lame). Que cấy đã khử trùng được dùng trên ngọn lửa đèn cồn, một ít vi khuẩn được lấy rồi trải mỏng trên kính mang vật. Lame có giọt nước cất vô trùng chứa mẫu vi khuẩn được hơ trên ngọn lửa đèn cồn nhằm cố định mẫu. 1-2 giọt crystal violet được nhỏ đều lên mẫu đã cố định, để yên 1 phút. Lame được rửa lại bằng nước cất vô trùng và được chậm nhẹ cho khô bằng giấy sạch. 1-2 giọt dung dịch lugol được nhỏ từ từ, để yên 1 phút. Mẫu được rửa lại bằng nước cất vô trùng và được chậm nhẹ cho khô bằng giấy sạch. Mẫu được rửa thật nhanh bằng cồn để tẩy màu từ đầu đến cuối lame sao cho đến khi giọt cồn cuối cùng không còn màu tím nữa. Mẫu được rửa lại bằng nước cất vô trùng, được chậm nhẹ cho khô bằng giấy sạch. Dung dịch safranin được nhỏ lên mẫu vật, để trong khoảng 1 phút và được rửa lại bằng nước cất vô trùng, được chậm nhẹ cho khô bằng giấy sạch. Sau cùng mẫu được quan sát trên kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 400 lần và được ghi nhận Gram của vi khuẩn.

### 2.3. Phương pháp chiết dịch ngoại bào vi khuẩn

Dòng vi khuẩn sau khi tách rỗng được tiến hành nuôi tăng sinh trên môi trường PDB ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ, sau đó huyền phù được điều chỉnh bằng môi trường PDB sao cho OD<sub>600</sub> bằng 0,5. Dòng vi khuẩn nội sinh được chủng 1 mL vào 9 mL chứa môi trường PDB. Sau 24 giờ nuôi tăng sinh ở nhiệt độ phòng trên máy lắc ngang 200 vòng/phút. Dịch ngoại bào được thu lại và tế bào vi khuẩn được loại bỏ bằng phương pháp ly tâm ở tốc độ 3000 vòng/phút trong 10 phút. Phần dịch nổi được bảo quản ở nhiệt độ 2-8°C và sử dụng cho các thí nghiệm khảo sát tiếp theo.

### 2.4. Phương pháp định lượng polyphenol tổng

Phản ứng gồm các thành phần với tỷ lệ thể tích bằng nhau như sau: dịch ngoại bào, thuốc thử Folin-ciocalteu, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10%, được lắc đều và ủ 30 phút ở 40°C trong bể điều nhiệt. Độ hấp thụ quang phổ của hỗn hợp phản ứng được đo ở bước sóng 765 nm. Gallic acid được sử dụng như chất đối chứng dương. Hàm lượng polyphenol trong mẫu thử được xác định dựa vào phương trình đường chuẩn gallic acid (Singleton et al., 1999).

### 2.5. Phương pháp định lượng flavonoid tổng

Dịch ngoại bào gồm 200 µL được pha với 200 µL nước và lắc đều. Sau đó, 40 µL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5% được cho vào phản ứng, để yên 5 phút, và 40 µL AlCl<sub>3</sub> 10% tiếp tục được thêm, lắc đều và ủ 6 phút. Phản ứng được kết thúc bằng cách thêm 400 µL NaOH 1 M và 120 µL nước. Độ hấp thụ quang phổ của phản ứng được đo ở bước sóng 510 nm. Quercetin được sử dụng như chất đối chứng dương. Hàm lượng flavonoid trong mẫu thử được xác định dựa vào phương trình đường chuẩn quercetin (Bag et al., 2015).

### 2.6. Khảo sát khả năng chống oxy hóa tổng

Khả năng chống oxy hóa tổng (total antioxidant capacity, TAC) được đánh giá bằng phương pháp phosphomolybdenum (Prieto et al., 1999; Aliyu et al., 2013), có hiệu chỉnh. Dịch ngoại bào và thuốc thử phosphomolybdenum được trộn với nhau theo tỷ lệ 1:3 (v/v) và ủ ở 95°C trong 90 phút, sau đó được làm mát ở nhiệt độ phòng và xác định độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 695 nm.

### 2.7. Khảo sát khả năng chống oxy hóa bằng phương pháp năng lực khử

Năng lực khử (reducing power, RP) xác định dựa trên khả năng khử Fe<sup>3+</sup> trong phức Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-</sup> thành Fe<sup>2+</sup> trong phức Fe(CN)<sub>6</sub><sup>4-</sup> khi có mặt của chất chống oxy hóa, sau đó phức Fe(CN)<sub>6</sub><sup>4-</sup> tiếp tục phản ứng với Fe<sup>3+</sup> trong FeCl<sub>3</sub> để tạo thành phức Fe[Fe(CN)<sub>6</sub>] có màu xanh được đo ở bước sóng 700 nm. Các thành phần tham gia phản ứng với tỷ lệ thể tích bằng nhau gồm: dịch ngoại bào, đệm phosphate (0,2 M, pH 6,6), K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 1% và để phản ứng xảy ra trong 20 phút ở 50°C. Phản ứng được kết thúc bằng cách thêm 500 µL TCA 10%, ly tâm 3000 vòng/phút trong 10 phút. Phần dịch sau khi ly tâm được rút 500 µL cho vào 100 µL FeCl<sub>3</sub> 0,1%, lắc đều. Độ hấp thụ quang phổ của hỗn hợp phản ứng được đo ở bước sóng 700 nm (Oyaizu, 1986).

### 2.8. Định danh vi khuẩn

Để nhận diện vi khuẩn nội sinh sống trong cây, sử dụng các đoạn mồi 27F, 1492R (Lane, 1991) được thiết kế với trình tự sau:

27F: 5'- AGAGTTTGATCMTGGCTC - 3'  
1492R: 5'- TACGGYTACCTTGTTACGACT - 3'

Đoạn mồi này được sử dụng rộng rãi trong định danh vi khuẩn và được thiết kế để nhắm mục tiêu vào các vùng được bảo tồn của gen *16S rRNA*, cho phép khuếch đại và giải trình tự DNA của vi khuẩn. Sử dụng chương trình BLAST N để so sánh trình tự các đoạn DNA của dòng vi khuẩn cần định danh với

trình tự DNA của bộ gen ở các loài vi khuẩn có trong ngân hàng gen (NCBI).

**2.9. Khảo sát khả năng sản sinh enzyme catalase và oxidase**

**2.9.1. Khảo sát khả năng sản sinh enzyme catalase**

Que cấy đã khử trùng trên ngọn lửa đèn cồn được dùng để lấy một ít vi khuẩn rồi trải mỏng trên kính mang vật. Vi khuẩn sử dụng phải được nuôi cấy trong khoảng từ 18-24 giờ. Sau đó 1 giọt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% được nhỏ lên lame kính và quan sát kết quả phản ứng. Khả năng sản sinh enzyme catalase được xác định dựa trên khả năng tạo bọt hay không tạo bọt của các dòng vi khuẩn khi cho khuẩn lạc vào dung dịch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%. Vi khuẩn dương tính với catalase khi tạo bọt và ngược lại âm tính với catalase sẽ không tạo bọt (Karen, 2010).

**2.9.2. Khảo sát khả năng sản sinh enzyme oxidase**

Trình tự khảo sát được tiến hành như sau: đầu tiên một mảnh giấy lọc nhỏ được ngâm vào thuốc thử Kovács oxidase 1% và để khô ráo. Que cấy đã khử trùng trên ngọn lửa đèn cồn được sử dụng để lấy một lượng vi khuẩn đặt lên giấy lọc đã được xử lý. Quan sát sự thay đổi màu sắc. Vi khuẩn dương tính với oxidase khi màu chuyển sang màu tím đậm trong vòng 5 đến 10 giây. Vi khuẩn tri hoãn oxidase khi màu chuyển sang màu tím trong vòng 60 đến 90 giây. Vi khuẩn âm tính với oxidase nếu màu không thay đổi hoặc mất hơn 2 phút (Patricia and Laura, 2010).

**2.10. Phân tích và xử lý số liệu**

Dữ liệu thu được xử lý bằng phần mềm Excel và xử lý thống kê bằng phần mềm Minitab 16 (kiểm định Tukey). Số liệu được trình bày dưới dạng trung bình (MEAN) ± sai số chuẩn (SE).

**3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**3.1. Kết quả phân lập vi khuẩn nội sinh**

Kết quả phân lập được 20 dòng vi khuẩn từ các bộ phận khác nhau của cây Lan gấm. Kết quả cho

thấy có 5 dòng vi khuẩn được phân lập từ bộ phận thân, 9 dòng vi khuẩn được phân lập từ bộ phận rễ và 6 dòng vi khuẩn được phân lập từ bộ phận lá. Theo đó, các dòng vi khuẩn được ký hiệu là AS-Tx, AS-Rx và AS-Lx với AS-T là thân Lan gấm, AS-R là rễ Lan gấm, AS-L là lá Lan gấm và x là thứ tự phân lập các dòng vi khuẩn.



**Hình 1. Hình thái cây Lan gấm *Anoectochilus setaceus***

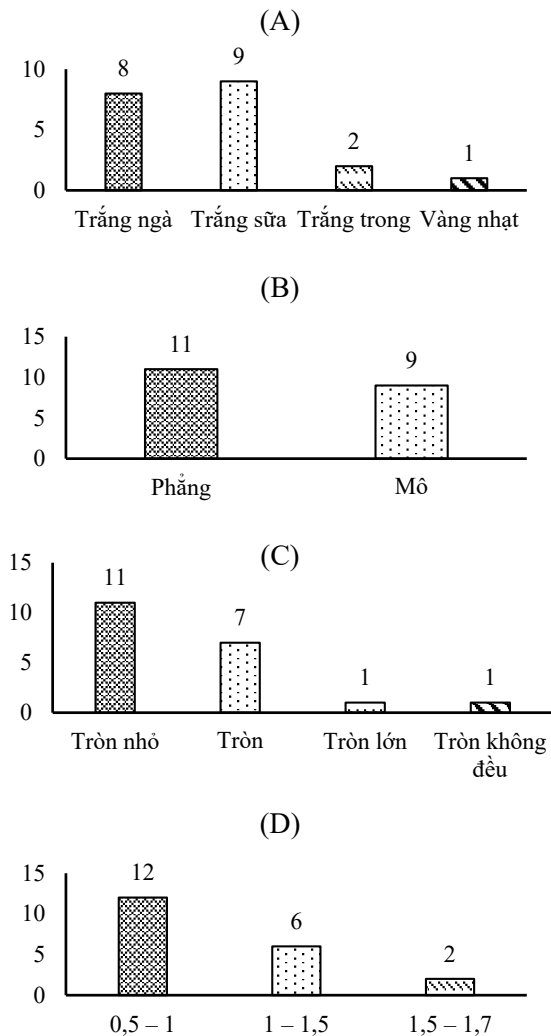
*Chú thích:* (A)&(B): Cây Lan gấm ngoài tự nhiên ; (C): Thân cây Lan gấm; (D): Hoa cây Lan gấm; (E)&(F): Lá cây Lan gấm; (G): Rễ cây Lan gấm.

(Người chụp: Trần Nguyễn Kim Ngân; thời gian: 15/11/2022; địa điểm chụp: Khoa Khoa học Tự nhiên, trường Đại học Cần Thơ).

**Bảng 1. Kết quả phân lập các dòng vi khuẩn**

Bộ phận	Kí hiệu	Số lượng	Tỷ lệ
Thân (trunk)	AS-Tx	5	25%
Rễ (root)	AS-Rx	9	45%
Lá (leaf)	AS-Lx	6	30%

Hầu hết các dòng vi khuẩn có kích thước đường kính trong khoảng 0,5-2 mm, màu trắng ngà (trắng sữa, trắng trong hay vàng nhạt), độ nổi mô (hoặc phẳng), hình dạng tròn (tròn nhỏ, tròn lớn hay tròn không đều) và bia nguyên (Hình 2).



**Hình 2. Đặc điểm khuẩn lạc của các dòng vi khuẩn nội sinh cây Lan gấm (A) màu sắc; (B) độ nổi; (C) hình dạng; (D) kích thước.**

**3.2. Kết quả tuyển chọn các dòng vi khuẩn**

Vi khuẩn nội sinh sau khi tách rông được nuôi tăng sinh và ly tâm thu dịch ngoại bào. Kết quả tổng hợp polyphenol, flavonoid và chống oxy hóa được thể hiện trong Bảng 2. Theo đó, hàm lượng TPC đạt giá trị thấp nhất ở dòng vi khuẩn AS-R9 (412,8±61,7 mg GAE/mL) và cao nhất ở dòng AS-L3 (1400,5±8,6 mg GAE/mL). Hàm lượng TFC đạt giá trị thấp nhất ở dòng AS-R3 là (15,4±7,1 mg QE/mL) và cao nhất ở dòng AS-L3 (192,1±15,8 (mg QE/mL). Hàm lượng chất chống oxy hóa tương đương vitamin C của phương pháp TAC dao động trong khoảng từ 87,2±41,8 (dòng AS-L4) đến 1402,6±111,11 mg/mL (dòng AS-R2). Đối với phương pháp RP cho kết quả thấp nhất ở dòng AS-L2 (275,1±27,0 mg/mL) và cao nhất ở dòng AS-L3 (946±62,5 mg/mL).

Hoạt tính chống oxy hóa tổng của dịch ngoại bào được xác định dựa trên việc khử Mo (VI) thành Mo (V) bằng các hợp chất chống oxy hóa và hình thành phức hợp phosphate/Mo (V) màu xanh trong phương pháp phosphomolybdenum. Có thể thấy dòng vi khuẩn AS-R2, AS-L3 và AS-T4 có hoạt tính chống oxy hóa cao nhất lần lượt là 14026±111,1 mg/mL, 1195,0±100,5 mg/mL và 846,3±82,2 mg/mL. Tương tự phương pháp kháng oxy hóa tổng, có thể thấy 3 dòng vi khuẩn AS-R2, AS-L3 và AS-T4 cho khả năng chống oxy hóa bằng phương pháp khử sắt là 872,0±58,9 mg/mL, 946,0±62,5 mg/mL và 841,5±56,9 mg/mL nổi trội hơn các dòng vi khuẩn còn lại.

Dựa vào kết quả định lượng polyphenol, flavonoid và chống oxy hóa của các dòng vi khuẩn đã tuyển chọn ra được 3 dòng AS-T4, AS-R2 và AS-L3 cho hoạt tính mạnh nhất từ đó làm tiền đề cho các thí nghiệm tiếp theo.

**Bảng 2. Kết quả định lượng polyphenol, flavonoid và chống oxy hóa của các dòng vi khuẩn**

STT	Dòng vi khuẩn	TPC	TFC	TAC	RP
		mg GAE/mL	mg QE/mL	mg/mL vitamin C	mg/mL vitamin C
1	AS-T1	640,0±22,2 <sup>c-e</sup>	45,0±9,3 <sup>gh</sup>	435,6±60,3 <sup>de</sup>	806,2±55,5 <sup>a-c</sup>
2	AS-T2	469,6±29,6 <sup>g-i</sup>	54,4±9,3 <sup>fg</sup>	175,5±46,1 <sup>g-i</sup>	617,1±45,2 <sup>de</sup>
3	AS-T3	464,7±26,0 <sup>hi</sup>	83,3±5,8 <sup>d-f</sup>	169,9±46,1 <sup>hi</sup>	769,2±53,3 <sup>bc</sup>
4	AS-T4	642,5±70,0 <sup>c-e</sup>	118,6±12,6 <sup>bc</sup>	846,3±82,2 <sup>c</sup>	841,5±56,9 <sup>a-c</sup>
5	AS-T5	924,0±60,3 <sup>b</sup>	61,9±9,3 <sup>e-g</sup>	225,9±49,2 <sup>f-i</sup>	763,1±52,8 <sup>b-d</sup>
6	AS-R1	1336,3±48,6 <sup>a</sup>	56,3±9,3 <sup>fg</sup>	205,7±47,8 <sup>f-i</sup>	818,3±56,0 <sup>a-c</sup>
7	AS-R2	731,4±17,1 <sup>c</sup>	134,3±13,6 <sup>b</sup>	1402,6±111,1 <sup>a</sup>	872,0±58,9 <sup>ab</sup>
8	AS-R3	477,0±29,6 <sup>g-i</sup>	15,4±7,1 <sup>h</sup>	334,3±54,9 <sup>e-h</sup>	358,9±31,6 <sup>fg</sup>
9	AS-R4	526,4±11,3 <sup>f-h</sup>	79,6±10,4 <sup>d-f</sup>	171,8±46,1 <sup>g-i</sup>	394,5±33,6 <sup>fg</sup>
10	AS-R5	667,2±11,3 <sup>cd</sup>	42,5±8,2 <sup>gh</sup>	192,2±47,2 <sup>f-i</sup>	714,6±50,4 <sup>c-e</sup>

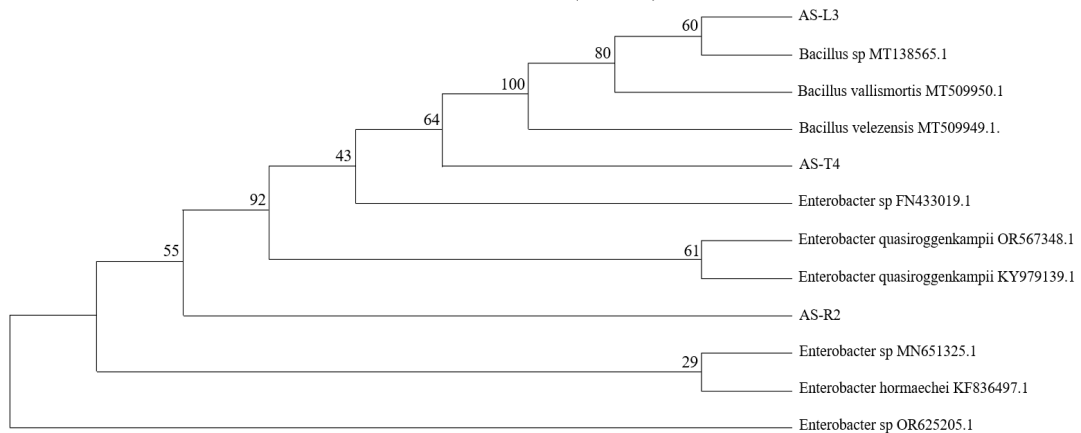
STT	Dòng vi khuẩn	TPC	TFC	TAC	RP
		mg GAE/mL	mg QE/mL	mg/mL vitamin C	mg/mL vitamin C
11	AS-R6	452,3±11,3 <sup>hi</sup>	104,7±11,5 <sup>b-d</sup>	131,8±44,0 <sup>i</sup>	-
12	AS-R7	430,1±8,6 <sup>hi</sup>	77,7±10,4 <sup>d-f</sup>	619,6±70,2 <sup>d</sup>	376,3±32,6 <sup>fg</sup>
13	AS-R8	427,7±22,6 <sup>h-j</sup>	106,6±11,5 <sup>b-d</sup>	196,9±47,2 <sup>f-i</sup>	726,7±50,8 <sup>b-c</sup>
14	AS-R9	412,8±61,7 <sup>i</sup>	79,6±10,4 <sup>d-f</sup>	378,1±57,1 <sup>ef</sup>	782,1±53,7 <sup>bc</sup>
15	AS-L1	622,7±22,6 <sup>d-f</sup>	58,2±9,3 <sup>e-g</sup>	125,2±44,0 <sup>i</sup>	583,5±43,8 <sup>e</sup>
16	AS-L2	469,6±22,2 <sup>g-i</sup>	61,9±9,3 <sup>e-g</sup>	357,6±56,0 <sup>e-g</sup>	275,1±27,0 <sup>g</sup>
17	AS-L3	1400,5±8,6 <sup>a</sup>	192,1±15,8 <sup>a</sup>	1195,0±100,5 <sup>b</sup>	946,0±62,5 <sup>a</sup>
18	AS-L4	472,1±15,4 <sup>g-i</sup>	89,6±11,5 <sup>c-e</sup>	87,2±41,8 <sup>i</sup>	597,3±44,3 <sup>e</sup>
19	AS-L5	519,0±4,3 <sup>gh</sup>	17,3±7,1 <sup>h</sup>	169,9±46,1 <sup>hi</sup>	617,1±45,3 <sup>de</sup>
20	AS-L6	565,9±14,8 <sup>c-g</sup>	-	-	433,4±35,5 <sup>f</sup>

Ghi chú: Các giá trị có chữ cái theo sau trong cùng một cột khác nhau sẽ khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5%.

### 3.3. Kết quả định danh các dòng vi khuẩn nội sinh đã tuyển chọn

Dựa vào những tài liệu tham khảo được về đặc điểm hình thái, kết quả sàng lọc và kết quả sinh hóa, 3 dòng vi khuẩn đã được chọn ra để định danh bằng phương pháp sinh học phân tử. Ba dòng vi khuẩn AS-T4, AS-R2 và AS-L3 được chọn để giải trình tự. Trình tự của ba dòng vi khuẩn này được so sánh với trình tự của vi khuẩn trong ngân hàng gene bằng


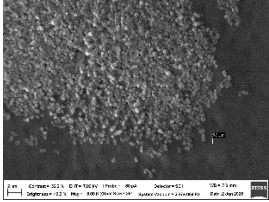

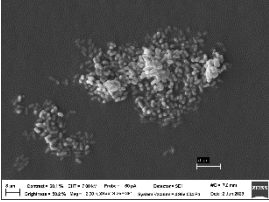
phần mềm BLAST N. Kết quả cho thấy dòng vi khuẩn AS-T4 có mức độ đồng hình với dòng *Enterobacter quasiroegenkampii* strain WCHECL1060 là 99,93%, dòng AS-R2 có mức độ đồng hình với dòng *Enterobacter hormaechei* strain SPP-10 là 99,64% và dòng AS-L3 có mức độ đồng hình với chủng *Bacillus velezensis* strain FZB42 là 99,58% (Bảng 3). Cây phát sinh loài của 3 dòng vi khuẩn được xây dựng dựa trên trình tự *16S rARN* (Hình 3).



Hình 3. Cây phát sinh loài của ba dòng vi khuẩn AS-T4, AS-R2, AS-L3

Bảng 3. Hình dạng, đặc điểm khuẩn lạc và kết quả định danh các dòng vi khuẩn

Dòng vi khuẩn	Hình dạng và đặc điểm khuẩn lạc	SEM	Gram	Catalase	Oxidase
AS-T4			-	+	-

Dòng vi khuẩn	Hình dạng và đặc điểm khuẩn lạc	SEM	Gram	Catalase	Oxidase
AS-R2	Khuẩn lạc tròn, màu trắng ngà, bìa nguyên, độ nổi mô, đường kính 0,5-1 mm 		-	+	-
AS-L3	Khuẩn lạc tròn, màu trắng trong, bìa nguyên, độ nổi mô, đường kính 1,5-1,7mm 		+	+	+

Chú thích: “+”: dương tính; “-”: âm tính.

#### 4. KẾT LUẬN

Kết quả phân lập được 20 dòng vi khuẩn có khả năng sản sinh flavonoid và khả năng chống oxy hóa. Trong đó, dòng vi khuẩn AS-T4, AS-R2 và AS-L3 cho khả năng sản sinh poyphenol, flavonoid và các chất chống oxy hóa cao hơn so với các dòng còn lại. Kết quả định danh được 3 dòng vi khuẩn: *Enterobacter quasiroegenkampii* strain AS-T4, *Enterobacter hormaechei* strain AS-R2, *Bacillus velezensis* strain AS-L3. Kết quả này mở ra hướng

nghiên cứu mới về vi khuẩn nội sinh trong cây Lan gấm có khả năng tổng hợp các hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học, làm tiền đề cho sự phát triển các sản phẩm chăm sóc sức khỏe con người từ những cây dược liệu quý hiếm, đặc biệt là cây Lan gấm.

#### LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được hỗ trợ bởi nguồn kinh phí từ Bộ Giáo dục và Đào tạo Việt Nam. Đề tài nghiên cứu mã số B2023-TCT-02.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Atanasov, A. G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E. M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., ... & Stuppner, H. (2015). Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology Advances*, 33(8), 1582-1614. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.08.001>
- Chac, L. D., Thinh, B. B., Huong, H. T. T., Kiet, N. T., & Huan, L. Q. (2019). Quantification of quercetin, isorhamnetin and ferulic acid in dry extract of *Anoectochilus setaceus* Blume from Vietnam. *International Journal of Botany Studies*, 4(5), 14-18.
- Chang, C. L., Lin, Y., Bartolome, A. P., Chen, Y. C., Chiu, S. C., & Yang, W. C. (2013). Herbal therapies for type 2 diabetes mellitus: chemistry, biology, and potential application of selected plants and compounds. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013(1). <https://doi.org/10.1155/2013/378657>
- Glick, B. R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012(1). <https://doi.org/10.6064/2012/963401>
- Kobayashi, D. Y., Palumbo, J. D., Bacon, C. W., & White, J. F. (2000). Microbial endophytes. Bacon Ch. W, White J. Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. *In Microbial Endophytes*, 9, 213-250.
- Kusari, S., Verma, V. C., Lamshoeft, M., & Spiteller, M. (2012). An endophytic fungus

- from *Azadirachta indica* A. Juss. that produces azadirachtin. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(3), 1287-1294  
<https://doi.org/10.1007/s11274-011-0876-2>
- Li, J., Zhao, G. Z., Chen, H. H., Wang, H. B., Qin, S., Zhu, W. Y., Xu, L. H., Jiang, C. L., & Li, W. J. (2008). Antitumour and antimicrobial activities of endophytic streptomycetes from pharmaceutical plants in rainforest. *Letters in Applied Microbiology*, 47(6), 574-580.  
<https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02470.x>
- Liarzi, O., Bucki, P., Braun Miyara, S., & Ezra, D. (2016). Bioactive volatiles from an endophytic *Daldinia cf. concentrica* isolate affect the viability of the plant parasitic nematode *Meloidogyne Javanica*. *PLoS one*, 11(12).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168437>
- Molina, G., Pimentel, M. R., Bertucci, T. C., & Pastore, G. M. (2012). Application of fungal endophytes in biotechnological processes. *Chem. Eng. Trans*, 27.
- Pastor-Villaescusa, B., Rangel-Huerta, O. D., Aguilera, C. M., & Gil, A. (2015). A systematic review of the efficacy of bioactive compounds in cardiovascular disease: carbohydrates, active lipids and nitrogen compounds. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 66(2-3), 168-181.  
<https://doi.org/10.1159/000430960>
- Patricia, S., & Laura, C. (2010). Oxidase test protocol. *American Society of Microbiology: Washington, DC, USA*, 1-9.
- Reiner, K. (2010). Catalase test protocol. *American society for Microbiology*, 1(1), 1-9.
- Tuan, N. T., & Hong, N. V. (2021). Research completing the process of flavonoid compound fractional extraction from *Anoectochilus setaceus* Blume Cao Bang plant. *TNU Journal of Science and Technology*, 226(10), 350-355.  
<https://doi.org/10.34238/tnu-jst.4414>
- Zinniel, D. K., Lambrecht, P., Harris, N. B., Feng, Z., Kuczmariski, D., Higley, P., ... & Vidaver, A. K. (2002). Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5), 2198-2208.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.68.5.2198-2208>