



DOI:10.22144/ctujos.2024.485

KHẢO SÁT HOẠT TÍNH CHỐNG OXY HÓA VÀ KHÁNG VIÊM *IN VITRO* CỦA DỊCH CHIẾT NGOẠI BÀO VI KHUẨN NỘI SINH PHÂN LẬP TỪ CÂY MÀNH CỘNG (*Clinacanthus nutans*)

Lý Khôi Nguyên¹, Trần Chí Linh² và Đái Thị Xuân Trang^{3*}¹Viện Công nghệ sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ, Việt Nam²Khoa Y, Trường Đại học Nam Cần Thơ, Việt Nam³Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ, Việt Nam

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

Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received): 21/06/2024

Sửa bài (Revised): 09/08/2024

Duyệt đăng (Accepted): 26/09/2024

Title: Studying extracellular extracts of endophytic bacteria showing antioxidant and anti-inflammatory properties from *Clinacanthus nutans*

Author(s): Ly Khoi Nguyen¹, Tran Chi Linh² and Dai Thi Xuan Trang^{3*}

Affiliation(s): ¹Institute of Food and Biotechnology, Can Tho University, Viet Nam; ²Faculty of Medicine, Nam Can Tho University, Viet Nam; ³College of Natural Sciences, Can Tho University, Viet Nam

TÓM TẮT

Mục tiêu nghiên cứu là phân lập vi khuẩn nội sinh (VKNS) có khả năng sinh tổng hợp các hợp chất chống oxy hóa và kháng viêm ở cây Mành CỘNG (*Clinacanthus nutans*). Hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết ngoại bào (DCNB) từ VKNS được đánh giá qua hàm lượng polyphenol, flavonoid tổng số, khả năng trung hòa gốc tự do DPPH, khả năng chống oxy hóa tổng số và năng lực khử. Khả năng kháng viêm được xác định qua ức chế sự biến tính của albumin huyết thanh bò. Kết quả đã phân lập được 24 dòng VKNS có khả năng sinh tổng hợp các hợp chất polyphenol ngoại bào, chống oxy hóa và kháng viêm. Hàm lượng TPC từ 94,32 đến 2284,44 mg GAE/mL DCNB, TFC từ 5,35 đến 99,69 mg QE/mL DCNB. Khả năng chống oxy hóa bởi phương pháp DPPH, RP và TAC từ 0,13 đến 1067,36 mg vitamin C tương đương/mL DCNB. Hàm lượng chất kháng viêm từ 0,32 đến 0,46 mg diclofenac tương đương/mL DCNB. Ba dòng VKNS có hoạt tính cao đồng đều ở các chỉ tiêu khảo sát là *Bacillus* sp. CN-R1, *Enterobacter* sp. CN-R15 và *Enterobacter* sp. CN-L7.

Từ khóa *Clinacanthus nutans*, chống oxy hoá, kháng viêm, Mành CỘNG, vi khuẩn nội sinh

ABSTRACT

This study aimed to isolate endophytic bacteria (EB) from *Clinacanthus nutans* with the ability to synthesize compounds possessing antioxidant and anti-inflammatory properties. The antioxidant activity of extracellular extracts (EE) from EB was evaluated based on total phenolic content, total polyphenol content, DPPH free radical scavenging, total antioxidant capacity, and reducing power. Anti-inflammatory activity was assessed through inhibition of bovine serum albumin denaturation. The study isolated 24 EB strains that could synthesize extracellular polyphenol compounds with antioxidant and anti-inflammatory properties. Total polyphenol content (TPC) ranged from 94.32 to 2284.44 mg GAE/mL EE, and total flavonoid content (TFC) ranged from 5.35 to 99.69 mg QE/mL EE. Antioxidant activity measured by DPPH, reducing power (RP), and total antioxidant capacity (TAC) ranged from 0.13 to 1067.36 mg vitamin C equivalent/mL EE. Anti-inflammatory content ranged from 0.32 to 0.46 mg diclofenac equivalent/mL EE. The three EB strains with consistently high activity across all parameters were identified as *Bacillus* sp. CN-R1, *Enterobacter* sp. CN-R15, and *Enterobacter* sp. CN-L7.

Keywords: Antioxidant, anti-inflammatory, *Clinacanthus nutans*, endophytic bacteria

1. GIỚI THIỆU

Thực vật là một trong những nguồn dược liệu quan trọng nhất, cung cấp cho chúng ta một loạt các loại thuốc chiết xuất từ thiên nhiên. Tính an toàn, giá thành hợp lý và sự dễ dàng tiếp cận là những điểm mạnh khiến cho thực vật trở thành lựa chọn phổ biến trong việc điều trị nhiều loại bệnh (Anjum et al., 2015). Những bài thuốc từ thảo mộc được lấy từ rễ, vỏ, hoa, hạt, trái cây, lá của thực vật là một trong những thành phần quan trọng nhất của Y học cổ truyền phương Đông. Trong thời gian gần đây, vi khuẩn nội sinh đã được xác nhận rằng đóng vai trò quan trọng trong việc ảnh hưởng đến quá trình trao đổi chất của thực vật, đặc biệt là trong quá trình tổng hợp các hợp chất có hoạt tính sinh học (Castronovo et al., 2021). Vi khuẩn nội sinh được tìm thấy ở vùng rễ, thân, lá, quả của thực vật (Elmagzob et al., 2019). Vi khuẩn nội sinh sản xuất hàng loạt các chất chuyển hoá thứ cấp có lợi cho thực vật ký chủ, có thể khai thác những tác nhân đó để ứng dụng trong y học, nông nghiệp hay công nghiệp (Ryan et al., 2008). Nghiên cứu tầm quan trọng của vi khuẩn nội sinh trong cây thuốc cũng đã được thực hiện trong thập kỷ qua, ví dụ như gia tăng dược tính của cây, khả năng chống chịu stress... (Gouda et al., 2016). Các yếu tố môi trường không chỉ ảnh hưởng đến cây thuốc mà còn xác định các loại vi khuẩn nội sinh có thể xâm nhập cây chủ trong suốt vòng đời của cây (Deng et al., 2011). Sự đa dạng của vi khuẩn nội sinh còn đặc trưng bởi một số yếu tố như kiểu gene (Walitang et al., 2018), tình trạng sức khỏe của cây chủ (Bogas et al., 2015).

Họ Acanthaceae là một trong những họ thực vật có hoa, hai lá mầm có khoảng 210 chi và 4000 loài và là nguồn cung cấp các hợp chất có khả năng làm thuốc cao (Phongsopitanun et al., 2020). Cây Mảnh Cộng (*Clinacanthus nutans*) là một trong những loài thực vật quan trọng thuộc họ này. Cây mảnh cộng (*Clinacanthus nutans*) là một trong những loài thực vật quan trọng thuộc họ này. Cây mảnh cộng được sử dụng như một loại thuốc thảo dược để ngăn ngừa ung thư, điều trị phát ban, vết côn trùng và rắn cắn. Cây mảnh cộng được nghiên cứu y học có các đặc tính chống oxy hoá, kháng viêm, kháng virus... (Shim et al., 2013). Ngoài ra, còn có các thành phần như tannin, alkaloid, steroid, flavonoid, saponin và triterpenoid (Phong et al., 2023). Tuy nhiên, những nghiên cứu về sinh vật nội sinh trong loài cây này ít được báo cáo. Mục tiêu chính của nghiên cứu này là phân lập các chủng vi khuẩn nội sinh trong cây Mảnh Cộng có khả năng sinh tổng

hợp các hợp chất có hoạt tính chống oxy hoá và kháng viêm.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Cây Mảnh Cộng được thu mẫu ở tỉnh An Giang. Sử dụng môi trường Potato Dextrose Agar (PDA) thành phần gồm 200 g khoai tây (cắt lát, nấu khoảng 30 phút trên 1 L nước cất), 20 g dextrose trên 1 L môi trường để nuôi cấy và phân lập vi khuẩn nội sinh. Môi trường PDA đặc bổ sung 1,5% agar và môi trường PDA bán đặc bổ sung 0,15% agar được sử dụng cho những thí nghiệm thích hợp. Nghiên cứu được thực hiện tại Phòng Nghiên cứu và Phát triển Dược liệu, Bộ môn Sinh học, Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ.

2.2. Thiết bị và hoá chất sử dụng

Thiết bị được sử dụng trong nghiên cứu bao gồm: tủ cấy vô trùng (TTS V1000, Thien Truong Scientific, Việt Nam), nồi hấp khử trùng nhiệt ướt (Sturdy SA300VF, Đài Loan), máy vortex (RS-VA10 Phoenix, Đức), máy đo quang phổ (Thermo Scientific Multiskan GO, Phần Lan), đĩa 96 giếng (Y), cân điện tử (PA213 Ohaus, USA), tủ sấy (BE 200, Memmert, Đức), máy ly tâm lạnh (Mikro12-24, Hettich, Đức), bể ủ (Memmert, Đức), Micropipette 10 μ L, 100 μ L, 1000 μ L (Nichiryo LE, Nhật Bản), cối và chày sứ, đĩa petri và một số thiết bị khác.

Hoá chất được sử dụng trong nghiên cứu bao gồm: Nước cất, lugol, safranin, crystal violet, agar Hải Long, D-glucose, quercetin (Sigma-Aldrich, Gemmany), gallic acid (Trung Quốc), Folin-Ciocalteu (Merck KgaA, Gemmany), NaNO₂ (Trung Quốc), Na₂CO₃ (Trung Quốc), NaOH (Merck KgaA, Gemmany), AlCl₃ (Trung Quốc), K₃Fe(CN)₆ (Merck), FeCl₃ (Trung Quốc), CCl₃COOH (Merck), albumin huyết thanh bò (BSA) (Himedia, Ấn Độ), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma) và một số hoá chất khác.

2.3. Phương pháp thu thập, xử lý mẫu và phân lập các dòng vi khuẩn nội sinh

2.3.1. Thu thập mẫu

Cây Mảnh Cộng được thu vào tháng 02/2024 tại tỉnh An Giang. Cây được thu thập trong tình trạng khi đang phát triển khỏe mạnh, không bị héo úa hoặc có sâu bệnh; sau đó mang mẫu cây về rửa thật sạch dưới vòi nước chảy mạnh để loại bỏ đất và bụi bẩn trên mẫu; tiếp theo tách rời các bộ phận rễ, thân, lá. Sau đó, cây được rửa sạch với nước cất vô trùng rồi

cắt rễ, thân, lá thành những đoạn nhỏ khoảng 3-4 cm, làm khô mẫu bằng giấy thấm.

2.3.2. Xử lý mẫu và phân lập các dòng vi khuẩn nội sinh

Bề mặt mẫu được khử trùng bằng cồn 70% trong 30 giây, rửa lại bằng nước cất vô trùng 3-4 lần. Tiếp theo, mẫu được khử trùng bằng hydrogen peroxide 3% (H₂O₂) và rửa lại mẫu bằng nước cất vô trùng 4-5 lần để loại bỏ hóa chất khử trùng còn thừa. Các mẫu sau khi khử trùng bề mặt đạt yêu cầu được cho vào các cối sứ đã khử trùng, dùng chày sứ vô trùng nghiền mịn mẫu. Sau đó, 2-3 mL nước cất vô trùng được cho vào trong cối, trộn đều và để yên 10-12 phút cho phần cặn lắng. Tiếp theo, 100 µL phần dịch bên trên được rút và cho vào ống nghiệm chứa 10 mL môi trường PDA bán đặc, ủ trong 48 giờ ở nhiệt độ là 30°C. Sự xuất hiện của vi khuẩn nội sinh tạo thành một màng mỏng trắng đục (vòng pellicle) cách mặt môi trường 2-4 mm. Chuyển vi khuẩn từ pellicle lên môi trường PDA và tiếp tục phân lập cho đến khi thu được các dòng vi khuẩn ròng. Sau đó, các dòng vi khuẩn được quan sát và ghi nhận đặc điểm khuẩn lạc về hình dạng, kích thước, màu sắc, dạng bìa, độ nổi.



Hình 1. Cây Mãnh Cộng (*Clinacanthus nutans*)

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Phương pháp nhuộm Gram

Trình tự nhuộm Gram được thực hiện theo phương pháp Hucker and Conn (1923): Nhỏ một giọt nước cất vô trùng lên giữa kính mang vật (lame). Dùng que cấy đã khử trùng trên ngọn lửa đèn cồn lấy một ít vi khuẩn rồi trải mỏng trên kính mang vật. Hơ lame có giọt nước cất vô trùng chứa mẫu

khối trên ngọn lửa đèn cồn nhằm cố định mẫu. Nhỏ đều 1-2 giọt crystal violet lên mẫu đã cố định, để yên 1 phút, rửa lại bằng nước cất vô trùng, dùng giấy sạch chậm nhẹ cho khô, nhỏ từ từ 1-2 giọt dung dịch lugol, để yên 1 phút, rửa lại bằng nước cất vô trùng, dùng giấy sạch chậm nhẹ cho khô, 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, rửa lại bằng nước cất vô trùng, dùng giấy sạch chậm nhẹ cho khô, nhỏ dung dịch safranin lên mẫu vật, để trong khoảng 1 phút, rửa lại bằng nước cất vô trùng, dùng giấy sạch chậm nhẹ cho khô. Sau cùng, ta quan sát mẫu trên kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 40X và ghi nhận Gram của vi khuẩn.

2.4.2. Nuôi tăng sinh các dòng vi khuẩn nội sinh

Các dòng vi khuẩn nội sinh được nuôi tăng sinh trên môi trường potato dextrose broth để thu lấy dịch chiết ngoại bào bằng cách chủng 1000 µL của dòng vi khuẩn nội sinh (OD₆₀₀=0,5) vào 9000 µL môi trường potato dextrose broth. Sau đó, nuôi tăng sinh 24 giờ ở nhiệt độ 30°C trên máy lắc ngang 200 vòng/phút. Sau 24 giờ, dịch nuôi tăng sinh được ly tâm 3000 vòng/phút trong 15 phút loại bỏ tế bào thu được dịch chiết ngoại bào. Dịch chiết ngoại bào sử dụng cho các khảo sát tiếp theo.

2.4.3. Xác định hàm lượng polyphenol tổng

Hàm lượng polyphenol tổng số (TPC) xác định bằng thuốc thử Folin - Ciocalteu (Fu et al., 2011). Các chất lần lượt được cho vào phản ứng với tỷ lệ bằng nhau như sau: dịch chiết ngoại bào của vi khuẩn, nước cất và thuốc thử Folin - Ciocalteu, lắc đều và ủ 10 phút ở nhiệt độ phòng. Sau khi ủ 10 phút, thêm Na₂CO₃ 10% cùng thể tích như các chất trên, tiếp tục ủ ở 40°C trong 30 phút. Độ hấp thụ quang phổ của hỗn hợp được đo ở bước sóng 765 nm. Acid gallic được sử dụng như chất chuẩn. Hàm lượng polyphenol trong dịch chiết ngoại bào của các dòng vi khuẩn nội sinh được xác định dựa trên phương trình đường chuẩn gallic acid (mg GAE/mL dịch chiết ngoại bào).

2.4.4. Xác định hàm lượng flavonoid tổng

Hàm lượng flavonoid tổng (TFC) của dịch chiết ngoại bào từ vi khuẩn nội sinh được xác định bằng phương pháp được báo cáo trong nghiên cứu của Bag et al. (2015), có hiệu chỉnh. Sau đó, 200 µL dịch chiết ngoại bào được trộn với 200 µL nước cất và 40 µL NaNO₂ 5% để yên 5 phút tiếp tục cho thêm 40 µL AlCl₃ 10% vào hỗn hợp và ủ trong 6 phút. Sau đó, 400 µL NaOH 1 M được thêm vào cùng dung dịch được trộn với 120 µL nước cất, tiếp tục ủ 15 phút ở nhiệt độ phòng và đo độ hấp thụ quang phổ ở

bước sóng 510 nm. Quercetin được sử dụng như chất chuẩn. Hàm lượng flavonoid trong dịch chiết ngoại bào của các dòng vi khuẩn nội sinh được xác định dựa trên phương trình đường chuẩn quercetin (mg QE/ mL dịch chiết ngoại bào).

2.4.5. Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa

Phương pháp chống oxy hóa tổng

Khả năng chống oxy hóa tổng (total antioxidant capacity, TAC) của các dòng vi khuẩn nội sinh trong cây Mảnh Cọng được đánh giá bằng phương pháp phosphomolybdenum mô tả bởi Prieto et al. (1999), có hiệu chỉnh. Khoảng 300 μ L dịch chiết ngoại bào vi khuẩn phản ứng với 900 μ L dung dịch TAC (0,6 M acid sulfuric, 28 mM sodium phosphate và 4 mM ammonium molybdate). Hỗn hợp phản ứng được ủ ở 95°C trong 90 phút. Sau đó, hỗn hợp phản ứng được đo ở bước sóng 695 nm sau khi làm mát ở nhiệt độ phòng. Hàm lượng chất chống oxy hoá sinh tổng hợp bởi vi khuẩn nội sinh được xác định dựa trên phương trình đường chuẩn của vitamin C (mg vitamin C tương đương/mL dịch chiết ngoại bào).

Phương pháp khảo sát năng lực khử

Năng lực khử (Reducing power-RP) của các dòng vi khuẩn nội sinh trong cây Mảnh Cọng được thực hiện theo phương pháp của Oyaizu (1986). Hỗn hợp phản ứng lần lượt gồm 500 μ L dịch chiết ngoại bào vi khuẩn, 500 μ L đệm phosphat (0,2 M, pH=6,6) và 500 μ L $K_3Fe(CN)_6$ 1%. Sau khi hỗn hợp phản ứng được ủ ở 50°C trong 20 phút, thêm 500 μ L CCl_3COOH 10% rồi ly tâm 3000 vòng/phút trong 10 phút. Phần dịch sau khi ly tâm được rút 500 μ L cho vào 500 μ L nước và 100 μ L $FeCl_3$ 0,1%, lắc đều. Độ hấp thụ quang phổ của hỗn hợp phản ứng được đo ở bước sóng 700 nm. Hàm lượng chất chống oxy hoá sinh tổng hợp bởi vi khuẩn nội sinh được xác định dựa trên phương trình đường chuẩn của vitamin C (mg vitamin C tương đương/mL dịch chiết ngoại bào).

Phương pháp trung hòa gốc tự do DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

Khả năng chống oxy hóa của các dòng vi khuẩn nội sinh trong cây Mảnh Cọng được đánh giá dựa trên khả năng trung hòa gốc tự do DPPH của Sharma và Bhat (2009), có hiệu chỉnh. Hỗn hợp phản ứng gồm 40 μ L DPPH (1000 μ g/mL) và 960 μ L dịch chiết ngoại bào vi khuẩn. Hỗn hợp phản ứng được ủ trong tối 30°C trong thời gian 30 phút. Sau đó, đo độ hấp thụ quang phổ của DPPH ở bước sóng 517 nm. Hàm lượng chất chống oxy hoá sinh tổng hợp bởi vi

khảo nội sinh được xác định dựa trên phương trình đường chuẩn của vitamin C (mg vitamin C tương đương/mL dịch chiết ngoại bào).

2.4.6. Khảo sát hoạt tính kháng viêm in vitro

Khả năng kháng viêm của các dòng vi khuẩn nội sinh trong cây Mảnh Cọng được thực hiện theo phương pháp của Shah et al. (2017), có hiệu chỉnh. Hỗn hợp phản ứng gồm 150 μ L dịch chiết ngoại bào vi khuẩn với 150 μ L dung dịch albumin huyết thanh bò (BSA) 5%. Hỗn hợp được ủ ở 27°C, 15 phút. Sự biến tính protein được gây ra bằng cách giữ hỗn hợp phản ứng ở 60°C trong 10 phút. Sau khi làm mát, tiến hành đo mật độ quang ở bước sóng 660 nm. Hàm lượng chất kháng viêm có trong dịch chiết ngoại bào của các dòng vi khuẩn nội sinh được xác định dựa trên phương trình đường chuẩn diclofenac (mg DE tương đương/mL dịch chiết ngoại bào).

2.4.7. Định danh vi khuẩn

Trình tự gene *16S rRNA* của các dòng vi khuẩn nội sinh có khả năng sinh tổng hợp polyphenol, flavonoid, chất chống oxy hoá và kháng viêm ổn định lựa chọn để định danh được khuếch đại bằng phản ứng chuỗi polymerase (Polymerase Chain Reaction, PCR). Đề nhận diện vi khuẩn nội sinh sử dụng trình tự mỗi *16S rRNA* từ nghiên cứu của tác giả Lane (1991) được thiết kế như sau:

27F: 5'- AGAGTTTGATCMTGGCTC - 3'

1492R: 5'- TACGGYTACCTTGTACGACT - 3'

Quá trình PCR được thực hiện ở chu trình nhiệt: 95°C (5 phút), 35 chu kỳ – 94°C (45 giây-1 phút), 53°C (45 giây-1 phút), 72°C (1,5 phút) và 72°C (5 phút). Chương trình BLAST N được sử dụng để so sánh trình tự các đoạn DNA của các dòng vi khuẩn với trình tự DNA của bộ gene ở các loài vi khuẩn có trong ngân hàng gene National Coalition Building Institute (NCBI).

2.4.8. Phân tích và xử lý số liệu

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

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập vi khuẩn

Các nghiên cứu về vi khuẩn nội sinh trong cây được liệu hiện nay đã trở nên phổ biến và cho ra nhiều kết quả, chứng minh sự hiện diện của các vi

khuẩn này. Chẳng hạn, nghiên cứu của Nguyen và Nguyen (2019) trên rễ, thân, lá của cây Chùm ngây (*Moringa oleifera* Lam.) tại tỉnh Đồng Tháp đã phân lập được 35 dòng vi khuẩn nội sinh, trong khi nghiên cứu của Tran và Nguyen (2016) ở cây Trinh nữ (*Mimosa pudica* L.) tại tỉnh Trà Vinh đã phân lập được 45 dòng vi khuẩn nội sinh.

Kết quả phân lập vi khuẩn nội sinh từ các bộ phận khác nhau của cây Mảnh Cọng đã thu được 24 vi khuẩn nội sinh. Trong đó, 15 dòng vi khuẩn ở rễ (chiếm tỉ lệ 62,5%), 2 dòng vi khuẩn ở thân (chiếm tỉ lệ 8,3%) và 7 dòng vi khuẩn ở lá (chiếm tỉ lệ 29,2%). Các dòng vi khuẩn được kí hiệu như sau: CN-Rx, CN-Tx, CN-Lx với R: rễ (root), T: thân (trunk), L: lá (leaf), CN: *Clinacanthus nutans*, x: số thứ tự dòng vi khuẩn phân lập.

Đặc điểm hình thái khuẩn lạc:

Màu sắc khuẩn lạc: Đa số khuẩn lạc có màu trắng đục, 12/24 dòng có khuẩn lạc màu trắng đục (chiếm tỉ lệ 50%), 3/24 dòng có khuẩn lạc màu trắng sữa (chiếm tỉ lệ 12,5%), 5/24 dòng có khuẩn lạc màu

trắng ngà (chiếm tỉ lệ 20,8%), 4/24 dòng có khuẩn lạc màu vàng (chiếm tỉ lệ 16,7%).

Hình dạng khuẩn lạc: Tất cả đều có dạng hình tròn, có 9/24 dòng vi khuẩn nội sinh có dạng tròn nhỏ (<2mm) chiếm 37,5%, còn lại là 15/24 dòng vi khuẩn có dạng tròn lớn (≥2mm) chiếm tỉ lệ 62,5%.

Kích thước khuẩn lạc: Đường kính của các dòng vi khuẩn nội sinh phân lập được dao động từ 0,5 – 5 mm.

Độ nổi khuẩn lạc: Khuẩn lạc đa số có độ nổi mô với 15/24 dòng (62,5%), còn lại là độ nổi lồi với 9/24 dòng (37,5%).

Dạng bìa: Khuẩn lạc đa số có dạng bìa nguyên với 21/24 dòng (87,5%), còn lại là dạng bìa răng cưa với 3/24 dòng (12,5%).

Đặc điểm hình thái tế bào:

Các dòng vi khuẩn đa số có dạng hình que (23/24 dòng chiếm 95,8%) và 1 dòng có dạng hình cầu (4,2%) Ngoài ra, có 22 dòng vi khuẩn Gram âm (91,7%) và 2 dòng vi khuẩn Gram dương (8,3%).

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

Chỉ tiêu	Mô tả	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Hình dạng khuẩn lạc	Tròn nhỏ (<2mm)	9	37,5
	Tròn lớn (≥2mm)	15	62,5
Hình dạng tế bào	Que	23	95,8
	Cầu	1	4,2
Gram	Dương	2	8,3
	Âm	22	91,7
Màu sắc	Trắng đục	12	50
	Trắng sữa	3	12,5
	Trắng ngà	5	20,8
	Vàng	4	16,7
Độ nổi	Mô	15	62,5
	Lồi	9	37,5
Bìa	Nguyên	21	87,5
	Răng cưa	3	12,5

3.2. Kết quả định lượng polyphenol và flavonoid

Vi khuẩn nội sinh được báo cáo là tạo ra một số chất chuyển hóa có hoạt tính sinh học, đóng vai trò là nguồn thuốc để điều trị các bệnh khác nhau và có ứng dụng trong nông nghiệp, y học, thực phẩm và mỹ phẩm (Jalgaonwala et al., 2011; Godstime et al., 2014). Các chất chuyển hóa thứ cấp phổ biến là alkaloid, benzopyranones, chinon, flavonoid, acid phenolic, quinon, steroid, saponin, tannin, terpenoid (Jalgaonwala et al., 2011; Pimentel et al., 2011;

Godstime et al., 2014). Polyphenol không chỉ bảo vệ tế bào và các thành phần tế bào khỏi tổn thương do oxy hóa mà còn làm giảm nguy cơ stress oxy hóa liên quan đến các bệnh thoái hóa khác nhau (Pandey et al., 2009).

Kết quả định lượng polyphenol và flavonoid tổng số trong dịch chiết ngoại bào của các dòng vi khuẩn nội sinh được trình bày ở Bảng 2.

Qua khảo sát cho thấy 24 dòng vi khuẩn đều có khả năng sinh tổng hợp các hợp chất polyphenol và flavonoid. Hàm lượng polyphenol tổng số dao động

từ 94,32±33,4 (CN-T1) đến 2284,44±94,57 (CN-L2) mg GAE/mL dịch chiết ngoại bào. Hàm lượng flavonoid thấp nhất ở dòng vi khuẩn CN-R8 (5,35±2,88 mg QE/mL dịch chiết ngoại bào), đạt cao nhất được sản sinh bởi dòng vi khuẩn CN-R1 thu được cao nhất với giá trị 99,69±4,75 mg QE/mL dịch chiết ngoại bào.

Ngoài ra, các dòng vi khuẩn CN-R1, CN-R15, CN-L4, CN-L6, và CN-L7 đều sản sinh polyphenol tổng số từ 1711,60±33,40 đến 2114,07±55,92 mg GAE/mL và flavonoid tổng số từ 73,27±4,75 đến 99,69±4,75 mg QE/mL, mở đường cho việc khảo sát sâu hơn để xác định ba dòng vi khuẩn tiềm năng nhất.

Bảng 2. Khả năng chống oxy hóa và kháng viêm của các dòng vi khuẩn nội sinh từ cây Mảnh Cộng

STT	Dòng vi khuẩn	Hàm lượng chất chống oxy hoặc chất kháng viêm (mg chất chuẩn ^(*) /mL dịch chiết ngoại bào)					
		TPC (1) (mg GAE/mL dịch chiết ngoại bào)	TFC (2) (mg QE/mL dịch chiết ngoại bào)	TAC (3) (mg vitamin C tương đương/mL dịch chiết ngoại bào)	RP (4) (mg vitamin C tương đương/mL dịch chiết ngoại bào)	DPPH (5) (mg vitamin C tương đương/mL dịch chiết ngoại bào)	Kháng viêm (6) (mg DE tương đương/mL dịch chiết ngoại bào)
1	CN-R1	2114,07±55,92 ^{ab}	99,69±4,75 ^a	611,38±19,48 ^d	216,39±5,88 ^c	0,59±0,04 ^g	0,45±0,01 ^{a-c}
2	CN-R2	158,52±59,26 ^{lm}	72,01±4,75 ^c	673,33±11,02 ^c	86,69±1,75 ⁱ	-	0,40±0,01 ^h
3	CN-R3	1795,56±64,58 ^{cd}	7,23±3,93 ^{ij}	591,26±18,13 ^d	172,69±16,36 ^d	0,16±0,02 ^h	0,45±0,01 ^{ab}
4	CN-R4	1210,37±102,91 ^{fg}	76,53±3,94 ^{bc}	566,42±25,38 ^{de}	160,08±11,67 ^{de}	-	0,32±0,01 ^k
5	CN-R5	951,11±60,63 ^{hi}	27,36±3,77 ^{fg}	487,17±14,15 ^{fg}	146,64±9,47 ^{ef}	-	0,39±0,01 ^{hi}
6	CN-R6	425,19±72,95 ^k	68,87±3,77 ^c	428,36±20,93 ^{hi}	126,47±5,04 ^{fg}	0,19±0,03 ^h	0,37±0,01 ^{ij}
7	CN-R7	810,37±57,85 ^{ij}	17,30±2,88 ^{g-j}	530,25±48,93 ^{ef}	156,72±8,77 ^{de}	-	0,43±0,01 ^{c-e}
8	CN-R8	1254,81±58,79 ^{e-g}	5,35±2,88 ^j	424,59±9,50 ^{hi}	95,38±7,33 ^{hi}	-	0,45±0,01 ^{a-d}
9	CN-R9	210,37±51,85 ^{lm}	91,51±3,77 ^a	166,42±10,88 ^{kl}	103,78±5,51 ^{g-i}	1,44±0,01 ^a	0,42±0,01 ^{e-g}
10	CN-R10	1943,70±67,89 ^{bc}	46,23±3,77 ^{de}	443,77±6,19 ^{gh}	110,50±4,53 ^{g-i}	1,03±0,05 ^d	0,42±0,01 ^{ef}
11	CN-R11	751,11±85,43 ^{ij}	13,52±2,88 ^{h-j}	1067,36±9,00 ^a	121,43±6,06 ^{fg}	0,18±0,03 ^h	0,41±0,01 ^{f-h}
12	CN-R12	1084,44±85,43 ^{gh}	34,28±3,93 ^{ef}	993,77±10,71 ^b	47,48±8,77 ^{jk}	0,92±0,03 ^e	0,45±0,01 ^{ab}
13	CN-R13	640,00±51,85 ^j	53,77±3,77 ^d	447,55±6,19 ^{gh}	57,00±5,60 ^j	1,21±0,03 ^{bc}	0,39±0,01 ^h
14	CN-R14	365,93±59,26 ^{kl}	7,95±3,00 ^{ij}	106,98±19,26 ^m	25,63±4,20 ^k	1,03±0,06 ^d	0,45±0,01 ^{ab}
15	CN-R15	2054,81±64,58 ^b	87,11±3,93 ^{ab}	385,91±6,07 ^{ij}	300,42±6,20 ^{ab}	1,26±0,04 ^b	0,43±0,01 ^{c-e}
16	CN-T1	94,32±33,4 ^m	5,97±3,93 ^j	61,70±18,37 ^m	320,59±8,53 ^a	1,12±0,03 ^{cd}	0,44±0,01 ^{b-e}
17	CN-T2	1121,48±85,43 ^{f-h}	19,18±2,88 ^{g-i}	108,87±41,88 ^{lm}	124,79±6,06 ^{fg}	0,51±0,03 ^g	0,46±0,01 ^a
18	CN-L1	1440,00±57,85 ^e	48,11±3,77 ^d	583,71±16,62 ^{de}	177,73±5,51 ^d	-	0,40±0,01 ^{gh}
19	CN-L2	2284,44±94,57 ^a	21,07±3,93 ^{gh}	684,34±11,44 ^c	43,28±4,39 ^{jk}	0,13±0,02 ^h	0,46±0,01 ^a
20	CN-L3	1269,63±58,79 ^{e-g}	7,86±4,75 ^{ij}	455,09±6,60 ^{gh}	36,27±8,75 ^{jk}	-	0,44±0,01 ^{b-e}
21	CN-L4	1951,11±65,84 ^{bc}	73,27±4,75 ^c	99,43±5,89 ^m	153,92±16,22 ^{de}	0,74±0,03 ^f	0,36±0,01 ^j
22	CN-L5	1306,67±75,18 ^{ef}	10,38±6,80 ^{h-j}	220,19±7,72 ^k	114,71±4,68 ^{gh}	-	0,42±0,01 ^{e-g}
23	CN-L6	1928,89±65,84 ^{bc}	90,25±4,75 ^a	358,24±5,69 ^j	145,80±7,47 ^{ef}	-	0,40±0,01 ^{gh}
24	CN-L7	1711,60±33,40 ^d	95,91±4,75 ^a	403,84±5,20 ^{h-j}	293,70±6,06 ^b	0,91±0,03 ^e	0,43±0,01 ^{d-f}

Ghi chú: (*) chất chuẩn sử dụng trong các phương pháp TPC, TFC lần lượt là mg GAE/ mL dịch chiết ngoại bào, mg QE/ mL dịch chiết ngoại bào đối với TPC và TFC; TAC, RP và DPPH chất chuẩn sử dụng là vitamin C; chất chuẩn sử dụng trong khảo sát kháng viêm là diclofenac tương đương/mL.

(1): TPC được xác định dựa trên đường chuẩn gallic có dạng $y = 0,0027x + 0,0886$ ($R^2 = 0,9971$); (2) TFC được xác định dựa trên đường chuẩn gallic có dạng $y = 0,0053x + 0,0125$ ($R^2 = 0,9987$) (3), (4), (5): TAC, RP, DPPH được xác định dựa vào phương trình đường chuẩn của vitamin C lần lượt là $y = 0,0106x - 0,0024$ ($R^2 = 0,9978$); $y = 0,0119x + 0,0605$ ($R^2 = 0,9982$) và $y = -0,8179x + 1,1592$ ($R^2 = 0,9958$); (6) hàm lượng chất kháng viêm được xác định dựa vào phương trình đường chuẩn diclofenac $y = 6,5792x - 0,0902$ ($R^2 = 0,991$). Trong cùng một cột, các số trung bình theo sau bởi một hoặc những chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% bằng phép thử Tukey's

3.3. Khảo sát khả năng chống oxy hoá in vitro

Stress oxy hóa là nguyên nhân chính gây ra một số bệnh mãn tính như ung thư, lão hóa, bệnh tim, các bệnh về dạ dày do đái tháo đường, ức chế miễn dịch,

bệnh thoái hóa thần kinh. Các sản phẩm chuyển hoá thứ cấp thu được từ vi khuẩn nội sinh được phát hiện là có tác dụng kháng khuẩn, chống oxy hóa, kháng viêm (Strobel & Daisy, 2003; Gouda et al., 2016). Phương pháp kháng oxy hóa tổng (TAC), năng lực

khử (RP) và trung hòa gốc tự do DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) được sử dụng để đánh giá hoạt tính kháng oxy hóa thể hiện qua Bảng 2.

Theo kết quả nghiên cứu, hàm lượng chất kháng oxy hóa của dịch chiết ngoại bào các dòng vi khuẩn nội sinh trong cây Mảnh Cọng ở phương pháp TAC, RP và DPPH lần lượt dao động từ 61.70±18.37 đến 1067.36±9.00 mg vitamin C tương đương/mL dịch chiết ngoại bào, từ 25.63±4.20 đến 320.59±8.53 mg vitamin C tương đương/mL dịch chiết ngoại bào và từ 0.13±0.02 đến 1.44±0.01 mg vitamin C tương đương/mL dịch chiết ngoại bào. Kết quả nghiên cứu cho thấy phương pháp TAC thu được giá trị cao nhất với dòng vi khuẩn CN-R11, đạt 1067.36±9.00 mg vitamin C tương đương/mL dịch chiết ngoại bào; phương pháp RP cho dòng CN-T1 với 320.59±8.53 mg vitamin C tương đương/mL; và phương pháp DPPH cho dòng CN-R9 với 1.44±0.01 mg vitamin C tương đương/mL. Tuy nhiên, các dòng vi khuẩn này không sinh tổng hợp polyphenol và flavonoid cao nhất.

Dựa vào kết quả khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa trình bày trong Bảng 2 có thể thấy CN-R1, CN-R15 và CN-L7 là những dòng vi khuẩn có khả năng sản sinh chất kháng oxy hóa với hàm lượng ổn định ở cả 3 phương pháp.

3.4. Khảo sát hoạt tính kháng viêm in vitro

Viêm là một phản ứng cơ bản của hệ thống miễn dịch nhằm loại bỏ mầm bệnh như virus, vi khuẩn, chất kích thích, khôi phục tế bào về trạng thái bình thường và thay thế các mô bị phá hủy (Emmendoerffer et al., 2000). Viêm và stress oxy hoá có mối liên hệ chặt chẽ với nhau về sinh lý và bệnh tật (Ambade et al., 2012).

Sự biến tính protein là một trong những nguyên nhân gây viêm (Leelaprakash et al., 2011). Hoạt tính kháng viêm in vitro của dịch chiết ngoại bào các dòng vi khuẩn nội sinh trong cây Mảnh Cọng được khảo sát thông qua hoạt động ức chế sự biến tính của albumin huyết thanh bò (BSA) được trình bày ở Bảng 2.

Dựa vào kết quả thu được ở Bảng 2, hàm lượng chất kháng viêm của các dòng vi khuẩn nội sinh trong cây Mảnh Cọng dao động từ 0.32±0.01 đến 0.46±0.01 mg diclofenac tương đương/mL dịch chiết ngoại bào. Dòng vi khuẩn ở dòng vi khuẩn CN-R1 đạt giá trị 0.45±0.01 mg diclofenac tương đương/mL dịch chiết ngoại bào, tiếp theo là dòng vi khuẩn CN-R1, CN-R3, CN-R7, CN-R8, CN-R12, CN-R14, CN-R15, CN-T1, CN-T2, CN-L2, CN-L3 và CN-L7 có khả năng sản sinh chất kháng viêm nhiều hơn các dòng vi khuẩn còn lại.

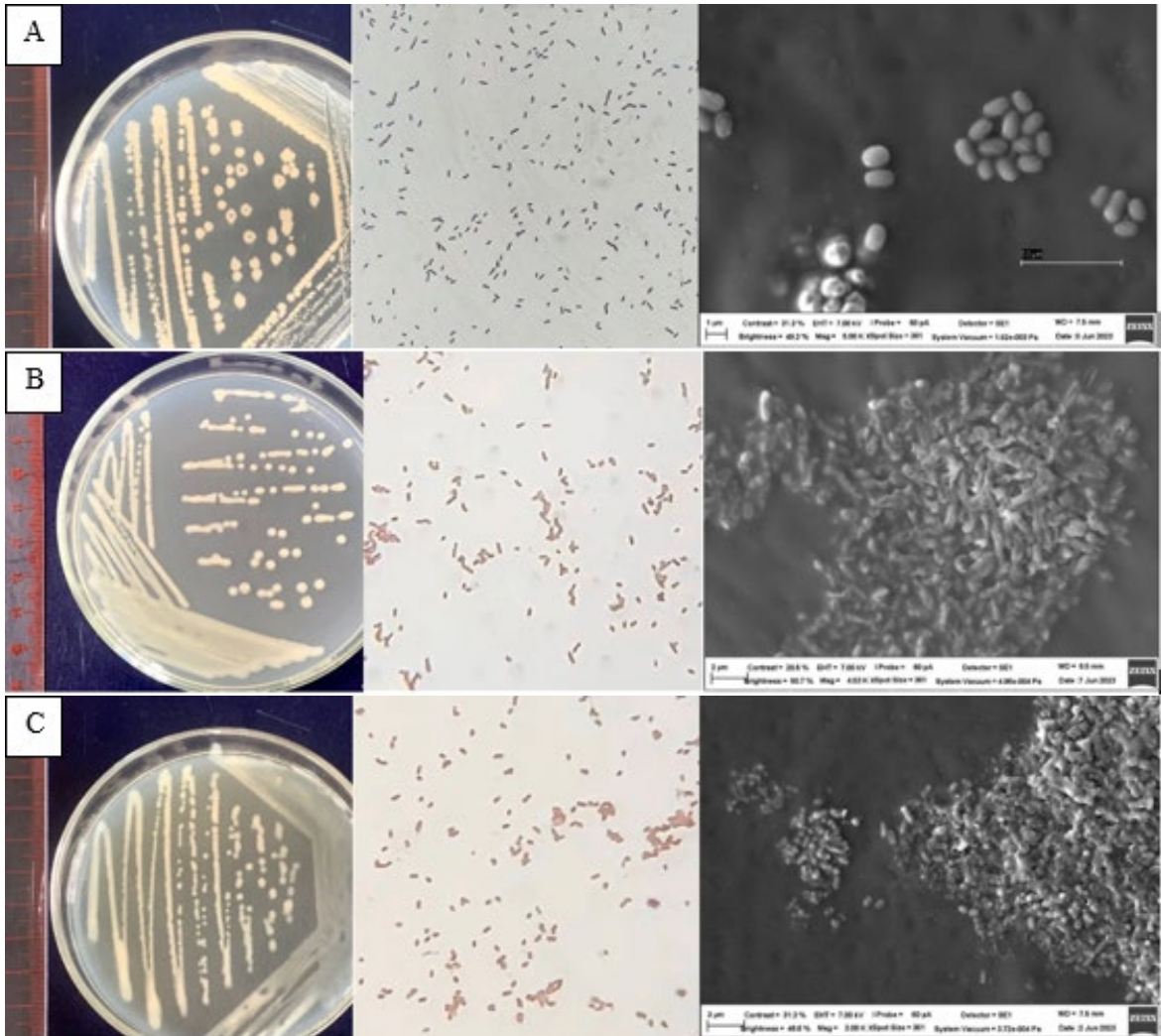
3.5. Kết quả nhận diện vi khuẩn

Các kết quả sàng lọc cho thấy, dòng vi khuẩn CN-R1, CN-R15, CN-L7 có khả năng sản sinh hàm lượng polyphenol, flavonoid, chống oxy hoá và kháng viêm khá cao và ổn định qua các khảo sát. Ngược lại, các dòng vi khuẩn khác thể hiện sự không ổn định về khả năng sản sinh chất chống oxy hóa và kháng viêm. Do đó, nghiên cứu đã chọn dòng vi khuẩn CN-R1, CN-R15, CN-L7 để giải trình tự đoạn gene 16S rDNA. Trình tự sau đó được so sánh với các trình tự tương đồng trong ngân hàng gene bằng công cụ BLAST của NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Dựa vào các đặc điểm hình thái khuẩn lạc, hình thái tế bào vi khuẩn và kết hợp với quá trình giải đoạn gene 16S rDNA có 2 dòng vi khuẩn thuộc chi *Enterobacter* và 1 dòng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus*. Dòng vi khuẩn CN-R1 có mối quan hệ di truyền gần gũi với *Bacillus cereus* strain EB14. Kết quả này tương ứng với đặc điểm khuẩn lạc của dòng vi khuẩn *Bacillus* sp. (hình dạng khuẩn lạc tròn, bia răng cưa, màu trắng đục) và đặc điểm tế bào (Gram dương, hình que) đã được mô tả. Hai dòng vi khuẩn CN-R15 và CN-L7 có mối quan hệ di truyền gần gũi với *Enterobacter quasiroggenkampii* strain WCHECL1060 (Bảng 3). Kết quả này tương ứng với đặc điểm khuẩn lạc của dòng vi khuẩn *Enterobacter* sp. (hình dạng khuẩn lạc tròn, bia nguyên, màu trắng hoặc vàng) và đặc điểm tế bào (Gram âm, hình que) đã được mô tả

Bảng 3. Kết quả định danh ba dòng vi khuẩn tuyển chọn

Dòng vi khuẩn	Loài tương đồng	Độ dài đoạn gene (bp)	Mức độ tương đồng (%)	Accession number
CN-R1	<i>Bacillus cereus</i> strain EB14	1326	99,85%	MT_256104.1
CN-R15	<i>Enterobacter quasiroggenkampii</i> strain WCHECL1060	1360	99,85%	NR_179166.1
CN-L7	<i>Enterobacter quasiroggenkampii</i> strain WCHECL1060	1360	99,85%	NR_179166.1



Hình 2. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào của các dòng vi khuẩn

Ghi chú: A: Dòng vi khuẩn *Bacillus* sp. CN-R1 Gram dương, hình que, B: Dòng vi khuẩn *Enterobacter* sp. CN-R15 Gram âm, hình que, C: dòng vi khuẩn *Enterobacter* sp. CN-L7 Gram âm, hình que. Hình bên trái là đặc điểm khuẩn lạc; Hình ở giữa là đặc điểm Gram; Hình bên phải là đặc điểm hình dạng tế bào dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM)

Bacillus cereus là vi khuẩn Gram dương, hình que, sinh bào tử và kỵ khí. Bao gồm ít nhất tám loài có quan hệ gần gũi: *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis*, *B. cytotoxicus* và *B. toyonensis* (Liu et al., 2015). Ngoại trừ *B. cytotoxicus*, là loài khác biệt nhất trong nhóm với bộ gene dài 4,085 Mb, các loài thuộc nhóm *B. cereus* thường có bộ gene với kích thước từ 5,2 đến 5,9 Mb và các trình tự gene *16S rRNA* rất giống nhau (Lapidus et al., 2008).

Một số chủng *B. cereus* nội sinh có thể giúp thực vật phát triển tốt hơn và giảm mầm bệnh (Halverson et al., 1993; Dutta et al., 2013). Gần đây, có nghiên cứu cho rằng chủng *B. cereus* AR156 có khả năng

kích thích sự kháng bệnh đối với *Pseudomonas syringae* pv. tomato (Wang et al., 2018). Điều này cho thấy các khu vực rễ của thực vật có thể là môi trường sống tự nhiên của *B. cereus*.

Chi *Enterobacter* thuộc họ *Enterobacteriaceae*, là vi khuẩn Gram âm, có hình que, kỵ khí tùy ý, không tạo bào tử, lên men đường thành lactic acid, có môi trường sống rất đa dạng như trong đất, nước và sống nội sinh thực vật. Chi *Enterobacter* đã được báo cáo có hai loài mới là *Enterobacter quasirogerkampii* và *Enterobacter quasimori*. Trình tự gene *16S rRNA* của chủng *Enterobacter quasirogerkampii* giống khoảng 99% với trình tự gene của một số loài *Enterobacter* bao gồm *E.*

asburiae, *E. cloacae*, *E. hormaechei*, *E. kobei* và *E. ludwigii* và được dự đoán bộ gene có kích thước 4,8 Mb (Wu et al., 2020).

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã phân lập được 24 dòng vi khuẩn nội sinh trong cây Mảnh Cọng. Sau khi thực hiện các khảo sát, khả năng sản sinh hàm lượng polyphenol, flavonoid, chống oxy hoá và kháng viêm đã tuyển chọn được 3 dòng vi khuẩn tiềm năng, trong đó có 2 dòng vi khuẩn thuộc chi *Enterobacter* và 1 dòng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus*. Kết quả nghiên cứu trên đã làm tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo như khảo sát tối ưu điều kiện

tăng trưởng của vi khuẩn nội sinh trong cây Mảnh Cọng và khảo sát tiếp các khả năng kháng khuẩn, chống oxy hóa, kháng viêm *in vivo* của các dòng vi khuẩn này. Ngoài ra, ta có thể tiến hành khảo sát khả năng ức chế tế bào ung thư, kháng virus, tìm thêm những dòng vi khuẩn tiềm năng khác có thể cư trú trong cây Mảnh Cọng.

LỜI CẢM TẠ

Nghiên cứu này 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 (REFERENCES)

- Ambade, A., & Mandrekar, P. (2012). Oxidative stress and inflammation: essential partners in alcoholic liver disease. *International Journal of Hepatology*, 2012(1), 853175. <https://doi.org/10.1155/2012/853175>
- Anjum, N., & Chandra, R. (2015). Endophytic bacteria: optimization of isolation procedure from various medicinal plants and their preliminary characterization. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 8(4), 233-238.
- Bogas, A. C., Ferreira, A. J., Araújo, W. L., Astolfi-Filho, S., Kitajima, E. W., Lacava, P. T., & Azevedo, J. L. (2015). Endophytic bacterial diversity in the phyllosphere of Amazon Paullinia cupana associated with asymptomatic and symptomatic anthracnose. *Springerplus*, 4, 1-13. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1037-0>
- Castronovo, L. M., Vassallo, A., Mengoni, A., Miceli, E., Bogani, P., Firenzuoli, F., Fani, R. & Maggini, V. (2021). Medicinal plants and their bacterial microbiota: a review on antimicrobial compounds production for plant and human health. *Pathogens*, 10(2), 106. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020106>
- Deng, Z. S., Zhao, L. F., Kong, Z. Y., Yang, W. Q., Lindström, K., Wang, E. T., & Wei, G. H. (2011). Diversity of endophytic bacteria within nodules of the *Sphaerophysa salsula* in different regions of Loess Plateau in China. *FEMS microbiology Ecology*, 76(3), 463-475. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01063.x>
- Elmagzob, A. A. H., Ibrahim, M. M., & Zhang, G. F. (2019). Seasonal diversity of endophytic bacteria associated with *Cinnamomum camphora* (L.) Presl. *Diversity*, 11(7), 112. <https://doi.org/10.3390/d11070112>
- Emmendoerffer, A., Hecht, M., Boeker, T., Mueller, M., & Heinrich, U. (2000). Role of inflammation in chemical-induced lung cancer. *Toxicology letters*, 112, 185-191. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(99\)00285-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(99)00285-4)
- Fu, L., Xu, B. T., Xu, X. R., Gan, R. Y., Zhang, Y., Xia, E. Q., & Li, H. B. (2011). Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. *Food Chemistry*, 129(2), 345-350. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.079>
- G.C. Bag, P.G. Devi, T. Bhaigyabati (2015). Assessment of Total Flavonoid Content and Antioxidant Activity of Methanolic Rhizome Extract of Three Hedychium Species of Manipur Valley, *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 30(1), 154-159.
- Gouda, S., Das, G., Sen, S. K., Shin, H. S., & Patra, J. K. (2016). Endophytes: a treasure house of bioactive compounds of medicinal importance. *Frontiers in Microbiology*, 7, 219261. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01538>
- Tran, H. T., & Nguyen, H. H. (2016). Isolation and characterization of endophytic bacteria in *Mimosa pudica* L. collected in Tra Vinh province. *Can Tho University Journal of Science*, 46, 23-29 (in Vietnamese). <https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2016.538>
- Hucker, G. J. & Conn, H. J. (1923). Methods of Gram Staining. *New York State Agricultural Experiment Station Technical Bulletin*, 93, 3-37.
- Leelaprakash, G., & Dass, S. M. (2011). In vitro anti-inflammatory activity of methanol extract of *Enicostemma axillare*. *International Journal of Drug Development and Research*, 3(3), 189-196.
- M. Oyaizu (1986). Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine, *Jap J Nutr*, 44, 307-315. <https://doi.org/10.5264/eiyogakuzashi.44.307>
- Pandey, K. B., Mishra, N., & Rizvi, S. I. (2009). Protective role of myricetin on markers of oxidative stress in human erythrocytes subjected to oxidative stress. *Natural Product*

- Communications*, 4(2), 1934578X0900400211. <https://doi.org/10.1177/1934578X0900400211>
- Phong, H. X., Ngan, T. T. K., Thanh, N. N., Long, B. H. D., & Viet, N. T. (2023). Antioxidant activities and phytochemical screening of some medicinal species harvested in the Mekong Delta, Vietnam. *AIP Conf. Proc.*, 2764(1), 020004. <https://doi.org/10.1063/5.0144097>
- Phongsopitanun, W., Sripreechusak, P., Rueangsawang, K., Panyawut, R., Pittayakhajonwut, P., & Tanasupawat, S. (2020). Diversity and antimicrobial activity of culturable endophytic actinobacteria associated with Acanthaceae plants. *ScienceAsia*, 46, 288-296. <http://dx.doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2020.036>
- 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>
- 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>
- Shah, M., Parveen, Z., & Khan, M. R. (2017). Evaluation of antioxidant, anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the stem bark of *Sapindus mukorossi*. *BMC complementary and alternative medicine*, 17, 1-16. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-2042-3>
- Wang, S., Zheng, Y., Gu, C., He, C., Yang, M., Zhang, X., Guo, J., Zhao, H., & Niu, D. (2018). *Bacillus cereus* AR156 activates defense responses to *Pseudomonas syringae* pv. tomato in *Arabidopsis thaliana* similarly to flg22. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 31(3), 311-322. <https://doi.org/10.1094/MPMI-10-17-0240-R>
- Wu, W., Feng, Y., & Zong, Z. (2020). Precise species identification for *Enterobacter*: a genome sequence-based study with reporting of two novel species, *Enterobacter quasiroggenkampii* sp. nov. and *Enterobacter quasimori* sp. nov. *MSystems*, 5(4), 10-1128. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00527-20>
- Dutta, S., Rani, T. S., & Podile, A. R. (2013). Root exudate-induced alterations in *Bacillus cereus* cell wall contribute to root colonization and plant growth promotion. *PLoS One*, 8(10), e78369. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078369>
- Halverson, L. J., Clayton, M. K., & Handelsman, J. (1993). Variable stability of antibiotic-resistance markers in *Bacillus cereus* UW85 in the soybean rhizosphere in the field. *Molecular Ecology*, 2(2), 65-78. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1993.tb00001.x>
- Sharma, O. P., & Bhat, T. K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113(4), 1202-1205. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.008>
- Shim, S. Y., Aziana, I., & Khoo, B. Y. (2013). Perspective and insight on *Clinacanthus nutans* Lindau in traditional medicine. *International Journal of Integrative Biology*, 14(1), 7-9.
- Lapidus, A., Goltsman, E., Auger, S., Galleron, N., Ségurens, B., Dossat, C., Land, M.L., Broussolle, V., Brillard, J., Guinebretiere, M.H., Sanchis, V., Nguen-the, C., Lereclus, D., Richardson, P., Wincker, P., Weissenbach, J., Ehrlich, S. D., & Sorokin, A. (2008). Extending the *Bacillus cereus* group genomics to putative food-borne pathogens of different toxicity. *Chemico-Biological Interactions*, 171(2), 236-249. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2007.03.003>
- Liu, Y., Lai, Q., Göker, M., Meier-Kolthoff, J. P., Wang, M., Sun, Y., Wang, L., & Shao, Z. (2015). Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. *Scientific reports*, 5(1), 14082. <https://doi.org/10.1038/srep14082>
- Strobel, G., & Daisy, B. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 491-502. <https://doi.org/10.1128/mmbr.67.4.491-502.2003>
- Nguyen, V. H. A., & Nguyen, H. H. (2019). Isolation and screening of antibacterial endophytic bacteria from *Moringa oliefera* Lam. in Chau Thanh district, Dong Thap province. *Can Tho University Journal of Science*, 55(2), 81-88 (in Vietnamese). <https://doi.org/10.22144/ctu.jsi.2019.047>
- Walitang, D. I., Kim, C. G., Kim, K., Kang, Y., Kim, Y. K., & Sa, T. (2018). The influence of host genotype and salt stress on the seed endophytic community of salt-sensitive and salt-tolerant rice cultivars. *BMC Plant Biology*, 18(1), 1-16. <https://bmcplantbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12870-018-1261-1>