



DOI:10.22144/ctu.jsi.2019.047

**PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN NỘI SINH CÓ KHẢ NĂNG KHÁNG KHUẨN TRONG CÂY CHÙM NGÂY (*Moringa oleifera* LAM.) TẠI HUYỆN CHÂU THÀNH, TỈNH ĐỒNG THÁP**

Nguyễn Hồng Ái Vy\* và Nguyễn Hữu Hiệp

*Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ*

\*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Nguyễn Hồng Ái Vy (email: aivy.nguyenhong@gmail.com)

**ABSTRACT**

Synthetic antibiotics are commonly used to treat human and animal infectious diseases. However, antimicrobial resistance (AMR) is occurring worldwide. Endophytic bacteria capable of producing the natural antibacterial compounds from medicinal plants which opens a new way to solve that problem. The purpose of this study were to isolate endophytic bacteria from *Moringa oleifera* collected in Dong Thap province to investigate the antibacterial activity of these isolates against pathogenic microorganisms. PDA medium was used for isolation and test. Antibacterial ability of these strains was examined by using disc diffusion antibiotic sensitivity testing. The result showed that 19 out of 50 isolates had ability to inhibit at least one of three pathogenic bacterial strains. It has been found that 9 endophytic strains have ability against *Escherichia coli*, thirteen out of 35 strains were active against *Aeromonas hydrophila*, nine strains showed antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*. Cell-free extracts of T3.3 strain inhibited the growth of *S. aureus*. Based on 16S-rRNA gene sequences C3.3 and C1.4 were high similarity (98%) to the closely related strains *Bacillus subtilis* NBT-15, and *Bacillus megaterium* S1, respectively.

**Thông tin chung:**

Ngày nhận bài: 13/11/2018

Ngày nhận bài sửa: 21/02/2019

Ngày duyệt đăng: 12/04/2019

**Title:**

Isolation and screening of antibacterial endophytic bacteria from *Moringa oleifera* Lam. in Chau Thanh district, Dong Thap province

**Từ khóa:**

Cây Chùm ngây, kháng khuẩn, phân lập, tuyển chọn, vi khuẩn nội sinh

**Keywords:**

Antimicrobial agent, endophytic bacteria, isolation, *Moringa oleifera*, screening

**TÓM TẮT**

Kháng sinh tổng hợp thường được sử dụng để điều trị bệnh cho người và động vật. Tuy nhiên, hiện tượng kháng kháng sinh ngày nay dần trở nên phổ biến. Việc nghiên cứu tập đoàn vi khuẩn nội sinh có khả năng sản xuất những hợp chất có hoạt tính kháng khuẩn tự nhiên trong cây dược liệu đang mở ra hướng giải quyết mới. Trên cơ sở đó, đề tài phân lập vi khuẩn nội sinh có khả năng kháng khuẩn trong cây Chùm ngây (*Moringa oleifera*) được thực hiện. Vi khuẩn nội sinh được phân lập từ mẫu cây chùm ngây được trồng tại huyện Châu Thành, tỉnh Đồng Tháp. Khả năng kháng khuẩn của những dòng vi khuẩn này được khảo sát đối với ba loài vi khuẩn gây bệnh *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli* và *Staphylococcus aureus* bằng phương pháp khuếch tán qua vòng giấy lọc. Kết quả ghi nhận được 19/35 dòng có khả năng kháng ít nhất một trong ba loài vi khuẩn gây bệnh. Trong đó, 9 dòng có khả năng kháng *Escherichia coli*, 13 dòng có khả năng kháng *Aeromonas hydrophila* và 9 dòng có khả năng kháng *Staphylococcus aureus*. Các dòng được tuyển chọn nổi bật là dòng C3.3 và C1.4 có khả năng kháng lại cả ba loài vi khuẩn gây bệnh. Kết quả nhận diện hai dòng vi khuẩn này lần lượt là *Bacillus subtilis* NBT-15 và *Bacillus megaterium* S1 với độ tương đồng cao (98%).

Trích dẫn: Nguyễn Hồng Ái Vy và Nguyễn Hữu Hiệp, 2019. Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn nội sinh có khả năng kháng khuẩn trong cây chùm ngây (*Moringa oleifera* Lam.) tại huyện Châu Thành, tỉnh Đồng Tháp. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 55(Số chuyên đề: Công nghệ Sinh học)(2): 81-88.

## 1 GIỚI THIỆU

Ngày nay, con người đang phải phụ thuộc vào kháng sinh trong việc chữa trị hầu hết các bệnh về nhiễm khuẩn. Tuy nhiên, việc sử dụng kháng sinh không đúng cách có thể dẫn đến tình trạng kháng kháng sinh. Việc tìm ra chất kháng khuẩn mới đảm bảo hiệu quả và an toàn là vô cùng cần thiết. Để giải quyết các vấn đề trên, nhiều nghiên cứu đã được thực hiện nhằm khai thác khả năng kháng khuẩn các chủng vi khuẩn nội sinh trong cây dược liệu. Theo một nghiên cứu mới đây, dịch ly tâm môi trường nuôi cấy của các dòng vi khuẩn *Lactobacillus* sp. có khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh *Escherichia coli* (Poppi *et al.*, 2015). Nhóm nghiên cứu của Bhoonobtong *et al.* (2012) cũng đã phân lập được vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* từ cây dược liệu ở Thái Lan và dịch trích từ vi khuẩn này có thể ức chế vi khuẩn có hại như *S. aureus* và *E. coli*. Cây chùm ngây (*Moringa oleifera* Lam.) là một trong những cây dược liệu phổ biến trong thời gian gần đây tại Việt Nam với giá trị dinh dưỡng nổi bật. Theo nghiên cứu Zaffer *et al.* (2014), dịch chiết vỏ cây chùm ngây chứa hợp chất kháng khuẩn có khả năng ức chế *Staphylococcus aureus*, *Citrobacter freundii*, *Bacillus megaterium* và *Pseudomonas fluorescens*. Vào tháng 3 năm 2016, tại Brazil, cây chùm ngây lần đầu được chứng minh có chứa vi khuẩn nội sinh (Souza *et al.*, 2016), là bước tiến đầu tiên cho các nghiên cứu về vi khuẩn nội sinh trong cây chùm ngây. Trên cơ sở đó, đề tài được thực hiện với mục tiêu phân lập, tuyển chọn và định danh được một số dòng vi khuẩn sống nội sinh trong cây chùm ngây có khả năng kháng khuẩn tốt.

## 2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Phương tiện nghiên cứu

Vật liệu: Mẫu cây chùm ngây thu tại huyện Châu Thành, tỉnh Đồng Tháp. Ba dòng vi khuẩn gây bệnh *Staphylococcus aureus* sub. *Aureus* ATCC 25923; *Escherichia coli* ATCC 8739 do Trung tâm Dịch vụ kỹ thuật và Huấn luyện nghiệp vụ quản lý chất lượng Nông, Lâm, Thủy sản Cà Mau cung cấp. Vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* do Khoa Thủy sản, Đại học Cần Thơ cung cấp.

### 2.2 Phương pháp xử lý mẫu và phân lập

Để loại trừ các vi sinh vật có khả năng còn bám ở bề mặt, mẫu (rễ, thân, lá) mẫu được tiến hành khử trùng bề mặt bằng cồn 70% (v/v), sau đó bằng H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% (v/v), rửa sạch mẫu bằng nước cất vô trùng 5 lần để loại bỏ hóa chất khử trùng còn thừa. Mẫu được nghiền, thu lấy dịch trích và chuyển 100 µL vào ống nghiệm chứa môi trường bán đặc và ủ đến khi xuất hiện vòng pellicle cách mặt môi trường 2-4mm là đặc trưng của vi khuẩn vi hiếu khí. Chuyển vi khuẩn

từ pellicle lên môi trường PDA và tiếp tục phân lập cho đến khi thu được các dòng vi khuẩn ròng (Cao Ngọc Điệp và Nguyễn Hữu Hiệp, 2002).

### 2.3 Khảo sát khả năng kháng khuẩn của dung dịch vi khuẩn nội sinh

Khảo sát khả năng kháng khuẩn của dung dịch vi khuẩn nội sinh đã phân lập được đối với 3 loại hại khuẩn *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli* bằng phương pháp khuếch tán qua vòng giấy lọc (Bauer *et al.*, 1966). Trải vi khuẩn gây bệnh *E.coli* lên bề mặt đĩa môi trường. Dùng giấy thấm đường kính 0,6cm nhúng vào dịch vi khuẩn nuôi đạt mật số 10<sup>8</sup> tế bào/ml trong 5 phút và đặt giấy thấm lên bề mặt môi trường đã trải vi khuẩn *E.coli*. Ủ các đĩa trong tủ ủ ở 30°C và quan sát vòng vô khuẩn sau 24, 48 và 72 giờ. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên và lặp lại 3 lần.

### 2.4 Khảo sát khả năng kháng khuẩn của dịch ly tâm không chứa vi khuẩn nội sinh

Tiến hành ly tâm dung dịch nuôi cấy, loại bỏ tế bào vi khuẩn nội sinh và khảo sát tính kháng khuẩn của dịch ly tâm không chứa vi khuẩn với 3 loại vi khuẩn gây bệnh nhằm xác định chất kháng khuẩn của vi khuẩn nội sinh trong cây Chùm ngây là có phải hợp chất ngoại bào. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần dựa trên phương pháp khuếch tán qua vòng giấy lọc như đã mô tả ở Mục 2.3 trong đó ngâm giấy thấm vào dịch ly tâm không chứa tế bào vi khuẩn.

### 2.5 Thử nghiệm khả năng kháng khuẩn của tế bào vi khuẩn nội sinh

Thí nghiệm được tiến hành tương tự với tế bào vi khuẩn sau khi được ly tâm tách môi trường nuôi cấy nhằm xác định khả năng kháng khuẩn khi vi khuẩn có mặt trong môi trường. Trong đó dịch vi khuẩn sau ly tâm và loại bỏ phần nước trong, lấy phần cặn của dịch ly tâm chỉ có tế bào vi khuẩn, đem rửa bằng nước muối sinh lý 3 lần để làm sạch mặt ngoài của tế bào vi khuẩn và loại bỏ tất cả các chất ngoại bào của vi khuẩn nếu có. Sau đó, sinh khối vi khuẩn được hòa tan vào môi trường nuôi cấy vi khuẩn và ngâm các giấy thấm vào dịch vi khuẩn này trong 5 phút và tiến hành thí nghiệm như mô tả ở Mục 2.3.

### 2.6 Nhận diện các dòng vi khuẩn nội sinh được tuyển chọn

Sau khi phân lập, các dòng vi khuẩn nội sinh có tính kháng khuẩn tốt nhất được tiến hành phản ứng Polymerase chain reaction với mồi 16S rRNA, giải trình tự và so sánh với dữ liệu trên ngân hàng gene NCBI để định danh (Lane, 1991)

27F 5'- AGAGTTTGATCCTGGCTC - 3'

1492R 5'-TACGGTTACCTTGTTACGACT-3'

### 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1 Kết quả phân lập vi khuẩn nội sinh

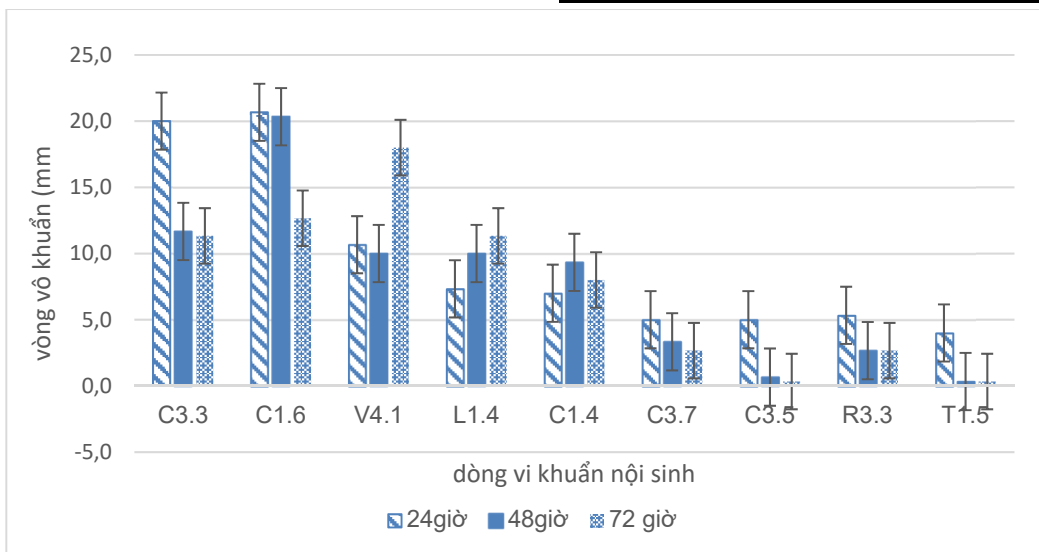
Từ rễ, thân, lá và củ của cây Chùm ngây được trồng tại huyện Châu Thành, tỉnh Đồng Tháp, 35 dòng vi khuẩn nội sinh đã được phân lập trên môi trường PDA. Trong đó mẫu rễ phân lập được 4/35 dòng (chiếm 11,4%), mẫu thân phân lập được 12/35 dòng (chiếm 34,3%), mẫu lá phân lập được 6/35 dòng (chiếm 17,1%), mẫu củ phân lập được 11/35 dòng (chiếm 31,4%) và mẫu vỏ củ phân lập được 2 dòng (chiếm 5,7%). Quan sát trên kính hiển vi cho thấy, đa số các dòng vi khuẩn phân lập được có dạng que ngắn (19/35) và que dài (13/35), một số dòng còn lại có dạng chuỗi, có 22/35 dòng có khả năng di chuyển. Kết quả nhuộm Gram cho thấy 17 dòng Gram dương và 19 dòng Gram âm.

#### 3.2 Kết quả khảo sát tính kháng khuẩn

Sau khi thử tính kháng khuẩn của 35 dòng vi khuẩn nội sinh phân lập được với ba loài vi khuẩn gây bệnh (*Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila* và *Staphylococcus aureus*), kết quả ghi nhận được tổng số 19/35 dòng vi khuẩn thể hiện tính kháng khuẩn. Trong tổng số 19 dòng có tính kháng khuẩn, có 10 dòng được phân lập từ củ chiếm 54% số dòng vi khuẩn có tính kháng. Đặc biệt, hai dòng vi khuẩn C3.3 và C4.1 có khả năng kháng lại cả 3 loài vi khuẩn gây bệnh.

**Bảng 1: Tỷ lệ các dòng vi khuẩn nội sinh có tính kháng khuẩn**

Vi khuẩn gây bệnh	Số dòng vi khuẩn có tính kháng	Tỷ lệ (%)
<i>Escherichia coli</i>	9	25,7
<i>Aeromonas hydrophila</i>	13	37,1
<i>Staphylococcus aureus</i>	9	25,7



**Hình 1: Khả năng kháng khuẩn của các dòng vi khuẩn nội sinh với vi khuẩn *E. coli***

#### 3.2.1 Khả năng kháng vi khuẩn *Escherichia coli*

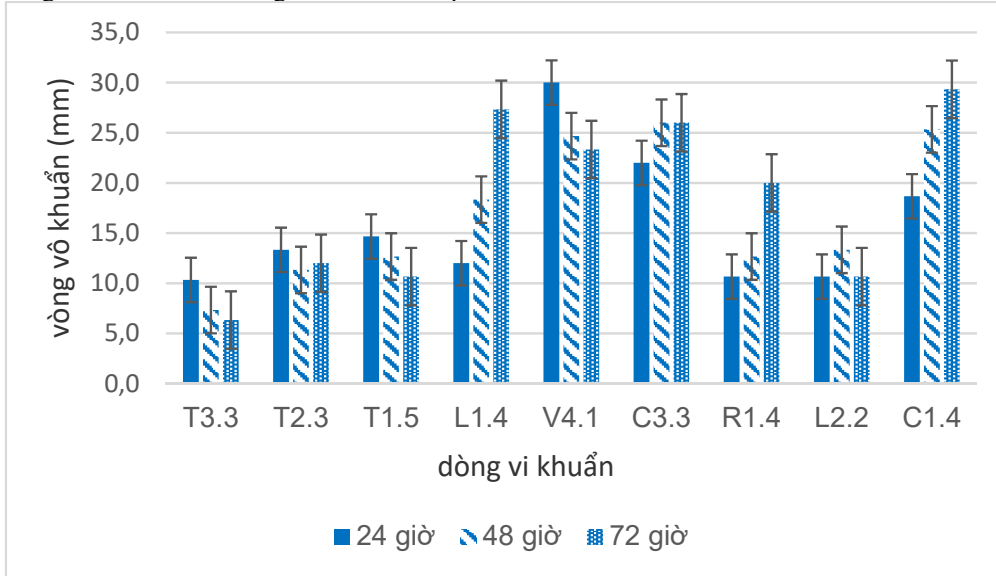
Dựa vào số liệu ghi nhận qua 3 ngày quan sát, các dòng vi khuẩn nội sinh có vòng tròn kháng khuẩn có đường kính giảm mạnh so với ngày 2, trừ dòng V4.1 và L4.1 đường kính vòng kháng vẫn tiếp tục tăng. Có thể do các dòng vi khuẩn nội sinh phát triển nhanh nên môi trường dần hết chất dinh dưỡng vì vậy chúng không tiết ra chất kháng khuẩn trong khi vi khuẩn gây bệnh vẫn tiếp tục phát triển nên vòng kháng khuẩn có giảm đi. Dòng V4.1 có đường kính 18 mm, có khác biệt lớn nhất so với các dòng còn lại. Hai dòng C3.3 và C1.6 có đường kính vòng kháng giảm mạnh, tuy nhiên vẫn duy trì ở mức trên

10 mm. Nhóm các dòng có hoạt tính kháng khuẩn thấp bao gồm C3.5, C3.7, R3.3 và T1.5 có đường kính vòng kháng giảm dần về 0. Nhìn chung, qua 3 ngày quan sát khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh đường ruột *E. coli*, kết quả ghi nhận được 9 dòng vi khuẩn sống nội sinh ở các bộ phận của cây Chùm ngây có khả năng kháng *E. coli* tốt, đặc biệt là 3 dòng C3.3, C1.6 và V4.1 có hiệu quả tốt nhất với đường kính vòng kháng khuẩn lần lượt là 20 và 20,7 mm (ngày thứ nhất) và 18 mm (ngày thứ ba) (Hình 1). Kết quả tương tự được tìm thấy ở các dòng vi khuẩn nội sinh *Bacillus* sp. phân lập từ cây rau cần dây lá có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn *E. coli* ATCC 9637 (El-Deeb *et al.*, 2013).

3.2.2 Khả năng kháng vi khuẩn *Staphylococcus aureus*

Kết quả thí nghiệm ghi nhận được có 9 dòng vi khuẩn nội sinh có khả năng kháng khuẩn đối với *S. aureus*, với đường kính vòng vô khuẩn trung bình từ 6,3- 30 mm (Hình 2). Nhìn chung, các dòng có khả năng kháng khuẩn khá tốt. Dòng V4.1 cho kết quả

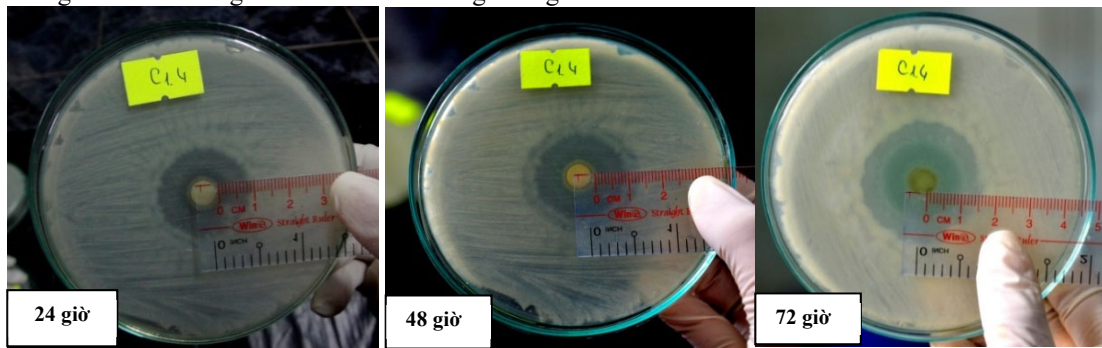
vượt trội khi tạo ra được vòng kháng có đường kính 30 mm, khác biệt có ý nghĩa với tất cả các dòng còn lại. Tuy nhiên, khả năng cạnh tranh với vi khuẩn gây bệnh giảm theo thời gian. Dòng C3.3 xếp thứ hai với đường kính vòng kháng khuẩn đạt 22 mm. Các dòng còn lại có khả năng kháng khuẩn thấp hơn, tuy nhiên, vòng kháng khuẩn vẫn lớn hơn 10 mm.



Hình 2: Khả năng kháng khuẩn của các dòng vi khuẩn nội sinh với *Staphylococcus aureus*

Quan sát sau 48 và 72 giờ ủ, các dòng T3.3, T2.3, L2.2, T1.5 và V4.1 có đường kính vòng kháng giảm dần. Dòng T3.3 có hoạt tính kháng khuẩn thấp nhất chỉ còn 6,3 mm. Dòng V4.1 được ghi nhận hoạt tính kháng khuẩn cao nhất ở ngày 1, đến ngày thứ 3 giảm còn 23,3 mm. (Hình 3). Các dòng L1.4, C3.3 và C1.4, có đường kính vòng vô khuẩn tăng dần theo thời gian ủ. Các dòng vi khuẩn có khả năng kháng

*S. aureus* có nguồn gốc từ cả 5 bộ phận lá, thân, rễ, củ và vỏ củ của cây Chùm ngây, trong đó nổi bật với các dòng có tính kháng khuẩn mạnh và tăng dần sau 72 giờ quan sát như C3.3 và C1.4. Dòng vi khuẩn nội sinh *Bacillus megaterium* phân lập từ lá cây rau cần dây lá có khả năng kháng vi khuẩn *Staphylococcus aureus* ATCC 29212 (El-Deeb et al., 2013).



Hình 3: Khả năng kháng khuẩn của dòng C1.4 với vi khuẩn gây bệnh *S.aureus* qua 24, 48, 72h

3.2.3 Khả năng kháng vi khuẩn *Aeromonas hydrophila*

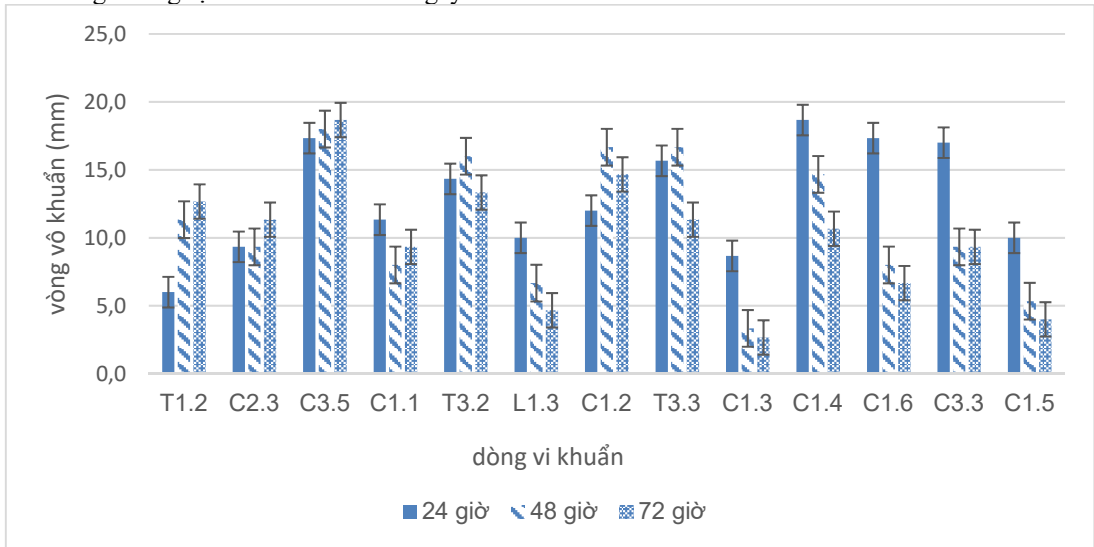
Tiến hành khảo sát khả năng kháng khuẩn của các dòng vi khuẩn phân lập được với vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* (vi khuẩn gây bệnh ở cá), kết

quả có 13/35 dòng vi khuẩn có khả năng tạo vòng vô khuẩn (Hình 4), đa số là các dòng có nguồn gốc từ củ. Đặc biệt dòng C3.5 thể hiện tính kháng tăng đều qua 3 ngày quan sát và đạt vòng kháng cao nhất ở ngày thứ 3 (18,7 mm). Các dòng C1.2, C2.3 và

C3.5 có khả năng kháng khuẩn tốt thể hiện qua kết quả vòng kháng tăng dần sau 3 ngày quan sát. Nhóm thứ hai, gồm các dòng thể hiện tính kháng khuẩn giảm dần (dòng C1.1, L1.3, C1.3, C1.4, C1.6, C3.3 và C1.5) các dòng vi khuẩn này có khả năng cạnh tranh với vi khuẩn gây bệnh yếu dần và bị tấn công thu hẹp vòng kháng khuẩn dần sau 3 ngày.

Thí nghiệm khảo sát khả năng kháng khuẩn của các dòng vi khuẩn nội sinh đã cho thấy hơn 50% số dòng vi khuẩn nội sinh phân lập được từ cây Chùm ngây có khả năng kháng lại các loài vi khuẩn gây

bệnh *E. coli*, *S. aureus* và *A. hydrophila*, trong đó ghi nhận các dòng triển vọng như C1.4, V4.1, C3.3, C3.5. Hầu hết các dòng vi khuẩn nội sinh cho thấy khả năng kháng khuẩn được tuyển chọn để tiếp tục thực hiện thí nghiệm tiếp theo nhằm xác định cơ chế đối kháng thông qua khảo sát khả năng kháng khuẩn của dịch ly tâm và tế bào sống vi khuẩn nội sinh. Trần Trọng Hiếu và Nguyễn Hữu Hiệp (2016) cũng tìm thấy dòng vi khuẩn nội sinh *B. megaterium* phân lập từ cây Trinh nữ có khả năng kháng vi khuẩn *A. hydrophila*.



Hình 4: Khả năng kháng khuẩn của các dòng vi khuẩn nội sinh đối với *Aeromonas hydrophila*

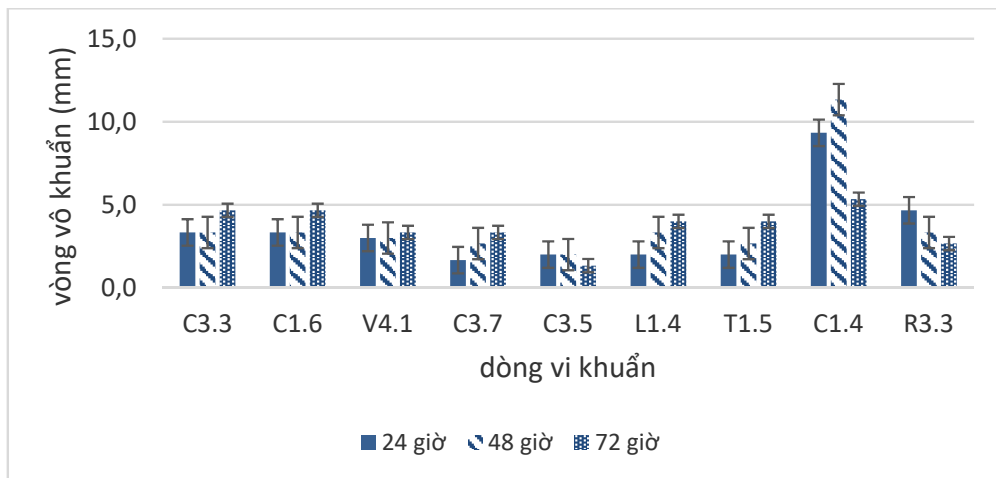
### 3.3 Tính kháng khuẩn của dịch ly tâm môi trường nuôi cấy vi khuẩn nội sinh với các dòng vi khuẩn gây bệnh

Trong thí nghiệm này, dòng T3.3 cho kết quả cả dịch tế bào vi khuẩn và dịch ly tâm của vi khuẩn đều thể hiện khả năng kháng khuẩn với vi khuẩn gây bệnh *S. aureus* với đường kính kháng khuẩn lớn nhất lần lượt là 9,3 mm và 5,67 mm. Điều này chứng minh trong quá trình sinh trưởng và phát triển của dòng T3.3 có sản sinh ra những hoạt chất kháng sinh tự nhiên ức chế sự phát triển của vi khuẩn gây bệnh *S. aureus*. Dịch ly tâm của vi khuẩn nội sinh phân lập từ cây cải *Exiguobacterium acetylicum* có khả năng ức chế sự tăng trưởng của vi khuẩn *E. coli*.

#### 3.3.1 Tính kháng khuẩn của dịch tế bào vi khuẩn với vi khuẩn *E. coli*

Sau khi ly tâm, tế bào vi khuẩn được rửa trong nước muối sinh lý và đặt vào đĩa môi trường được trải sẵn vi khuẩn *E. coli*. Kết quả ghi nhận được hầu hết dịch tế bào của các dòng vi khuẩn có khả năng tạo vòng kháng với vi khuẩn *E. coli*, tuy nhiên,

đường kính vòng kháng khuẩn dao động từ 1,3 – 11,3 mm. Sau 24 giờ quan sát, dòng C1.4 cho kết quả đường kính vòng kháng cao vượt trội (9,3 mm), có ý nghĩa thống kê so với các dòng còn lại, đường kính vòng kháng của dòng này tiếp tục tăng sau 48 giờ và giảm dần sau 72 giờ quan sát (Hình 5). Tuy nhiên, dòng C1.4 vẫn duy trì hoạt tính kháng khuẩn cao nhất so với các dòng còn lại. Các dòng C3.3, C1.6, V4.1, C3.7, L1.4 và T1.5 có hoạt tính kháng khuẩn tương đối thấp và tăng dần sau 72 giờ quan sát. Đường kính vòng kháng trung bình trong khoảng 1,7 – 4,7 mm. Nguyên nhân đường kính vòng kháng của các dòng này nhỏ hơn kết quả được ghi nhận ở thí nghiệm trước đó có thể giải thích do sau quá trình ly tâm và gạn rửa, vi khuẩn nội sinh đang ở pha tiềm phát dẫn đến khả năng kháng khuẩn chưa cao. Ở ngày thứ 2 và thứ 3, vi khuẩn dần thích nghi và gia tăng mật số, thể hiện hoạt tính kháng khuẩn tốt hơn, kết quả được chứng minh bởi đường kính vòng kháng khuẩn của dịch tế bào vi khuẩn tăng đều sau 3 ngày quan sát. Beiranvand *et al.*, (2017) cũng tìm thấy dòng vi khuẩn EB69 và EB7 được phân lập từ các cây dược liệu ở Iran có khả năng kháng rất tốt với tế bào vi khuẩn *E. coli*.

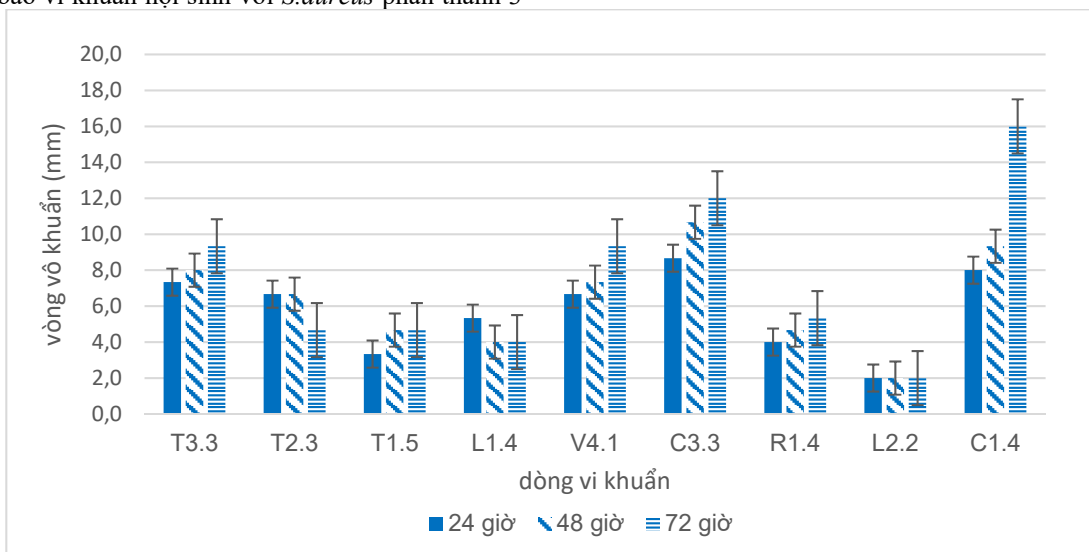


**Hình 5: Khả năng kháng khuẩn của dịch tế bào vi khuẩn nội sinh với vi khuẩn gây bệnh *E. coli***

3.3.2 *Tính kháng khuẩn của dịch tế bào vi khuẩn với vi khuẩn S.aureus*

Kết quả khảo sát khả năng kháng khuẩn của dịch tế bào vi khuẩn nội sinh với *S.aureus* phân thành 3

nhóm. Nhóm các dòng vi khuẩn có khả năng tạo đường kính vòng kháng tăng dần sau 3 ngày gồm 6/9 dòng T3.3, T1.5, V4.1, C3.3, R1.4 và C1.4 (Hình 6).



**Hình 6: Khả năng kháng khuẩn của dịch tế bào vi khuẩn nội sinh với vi khuẩn gây bệnh *S. aureus***

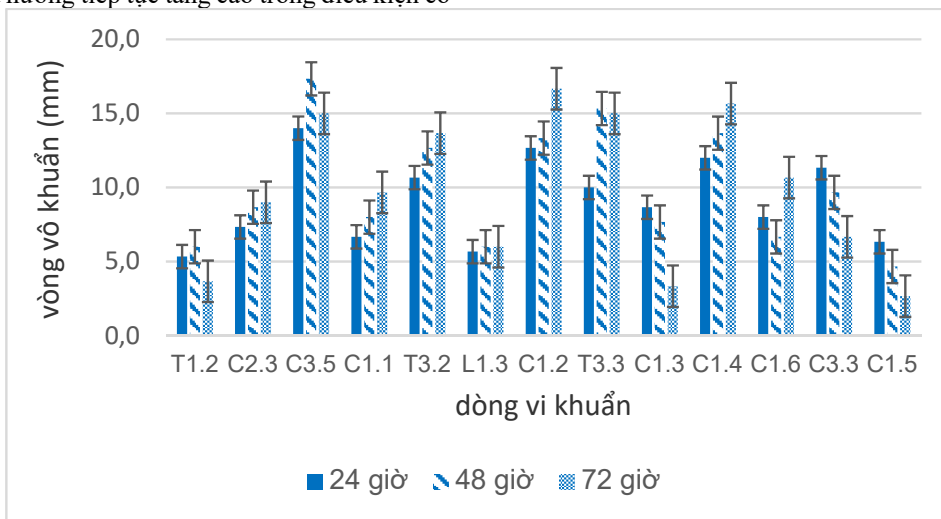
Trong đó, nổi bật là dòng C1.4 có hoạt tính kháng khuẩn tăng vọt vào ngày thứ 3 đạt 16 mm, kế đến là dòng C3.3 xếp thứ 2 với đường kính vòng kháng đạt 12 mm. Nhóm thứ 2 gồm các dòng vi khuẩn có khả năng cạnh tranh với *S. aureus* giảm dần theo thời gian gồm các dòng T2.3 và L1.4, với đường kính vòng kháng dao động từ 4- 6,7 mm. Riêng dòng L2.2 có hoạt tính kháng khuẩn yếu nhất và không đổi sau 3 ngày quan sát (2 mm). Beiranvand *et al.*, (2017) cũng tìm thấy dòng vi khuẩn EB5 và EB7 phân lập từ các cây dược liệu ở Iran có khả năng kháng rất tốt với tế bào vi khuẩn *S. aureus*.

3.3.3 *Tính kháng khuẩn của dịch tế bào vi khuẩn với vi khuẩn A. hydrophila*

Dịch tế bào vi khuẩn nội sinh có khả năng kháng *A. hydrophila* tương đối cao, đường kính trung bình dao động từ 2,7- 17,3 mm (Hình 7). Các dòng C3.5, C1.2, T3.3 và C1.4 vẫn duy trì đường kính vòng kháng cao trên mức 14 mm sau 3 ngày quan sát. Đặc biệt dòng C3.5 có hoạt tính kháng khuẩn cao nhất vào ngày thứ 2 đạt 17,3 mm. Kết quả chứng minh các dòng vi khuẩn nội sinh này có khả năng sinh trưởng và kháng khuẩn tốt sau quá trình ly tâm và gạn rửa bằng nước muối sinh lý. Các dòng vi khuẩn còn lại có hoạt tính kháng khuẩn thấp hơn, tuy nhiên,

các dòng C2.3, C1.1, T3.2, L1.3 và C1.6 có đường kính vòng kháng khuẩn tăng đều sau 72 giờ quan sát, cho thấy hoạt tính kháng khuẩn của các dòng này có xu hướng tiếp tục tăng cao trong điều kiện có

mặt vi khuẩn gây bệnh. Theo Hammed *et al.*, (2015) khi sử dụng nước trích lá cây chùm ngây có khả năng kháng vi khuẩn *A. hydrophila*.



**Hình 7: Khả năng kháng khuẩn của dịch tế bào vi khuẩn nội sinh với vi khuẩn gây bệnh *A. hydrophila***

So sánh khả năng kháng khuẩn của các dòng vi khuẩn nội sinh được phân lập từ lá, thân, rễ, củ và vỏ củ của cây Chùm ngây

Nhìn chung, các dòng vi khuẩn được phân lập từ cây chùm ngây có khả năng kháng khuẩn tốt. Kết quả so sánh khả năng kháng khuẩn của các dòng vi khuẩn có nguồn gốc từ lá, thân, rễ, củ và vỏ củ của cây chùm ngây cho thấy số lượng các dòng vi khuẩn được phân lập từ củ nhiều nhất và là các dòng có khả năng kháng khuẩn mạnh nhất. Thí nghiệm khảo sát khả năng kháng khuẩn của các dòng vi khuẩn nội sinh nói chung và dịch tế bào sống nói riêng cho kết quả dòng C3.3, C1.6, C1.4 và C3.5 có hoạt tính kháng khuẩn cao với 3 loài vi khuẩn gây bệnh được sử dụng trong nghiên cứu. Dòng C3.3 và C1.4 có khả năng kháng lại cả 3 loài vi khuẩn gây bệnh *E.coli*, *S. aureus* và *A. hydrophila*, dòng T3.3 có khả năng tiết hợp chất kháng khuẩn trong quá trình nuôi cấy là các dòng vi khuẩn có tiềm năng ứng dụng cao được tuyển chọn để định danh nhằm phục vụ các nghiên cứu về sau.

**3.4 Nhận diện dòng vi khuẩn nội sinh triển vọng**

Hai dòng vi khuẩn C3.3 và C1.4 có khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh tốt được nhận diện theo

**Bảng 2: Kết quả nhận diện các dòng vi khuẩn triển vọng**

Dòng	Kết quả nhận diện	Độ tương đồng (%)	Accession number
C3.3	<i>Bacillus subtilis</i> NBT 15	98	HQ244501.1
C1.4	<i>Bacillus megaterium</i> S1	98	LX158859.1

thứ tự là *Bacillus subtilis* NBT15 và *Bacillus megaterium* S1 (Bảng 2).

Theo kết quả nghiên cứu của đề tài, dòng C3.3 được nhận diện là loài *Bacillus subtilis* NBT-15 với độ tương đồng 98% có nguồn gốc phân lập từ củ của cây chùm ngây và cho thấy khả năng kháng lại cả 3 loài vi khuẩn gây bệnh *E.coli*, *S. aureus* và *A. hydrophila*. Tương tự trước đó, nghiên cứu của Boubba-Adji *et al.* (2014) cho thấy dòng *Bacillus subtilis* S12 kháng lại *S. aureus* và *E. coli* với đường kính vòng kháng khuẩn khoảng từ 6 – 8 mm.

Dòng C1.4 có khả năng kháng lại cả 3 loài vi khuẩn gây bệnh *E.coli*, *S. aureus* và *A. hydrophila* và có tỷ lệ đồng hình 98% với trình tự DNA của *Bacillus megaterium* S1. Khả năng kháng khuẩn của dòng vi khuẩn này đã được chứng minh trong nghiên cứu của, Rowaida *et al.* (2008), dòng *B. megaterium* 22 được xác định có khả năng sản sinh bacteriocin ức chế *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*. Ngoài ra, *B. megaterium* cũng có khả năng kháng lại *A. hydrophila*, theo Parthasarathy *et al.* (2012), *B. megaterium* có khả năng ngăn chặn sự phát triển của *A. hydrophila* gây bệnh trên cá trôi Ấn Độ (*Catla catla*) trong điều kiện in vitro.

## 4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

### 4.1 Kết luận

Ba mươi lăm dòng vi khuẩn nội sinh được phân lập từ lá, thân, rễ, củ và vỏ củ của cây Chùm ngây trồng tại huyện Châu Thành, tỉnh Đồng Tháp. Trong số 35 dòng thì có 19/35 dòng có khả năng kháng ít nhất 1 loài vi khuẩn gây bệnh, cụ thể 9/35 dòng có khả năng kháng được vi khuẩn *E. coli*, 13/35 dòng có khả năng kháng lại *A. hydrophila* và 9/35 dòng có khả năng kháng vi khuẩn *S. aureus*. Hai dòng C3.3 và C1.4 có khả năng kháng tốt với cả 3 loài vi khuẩn gây bệnh. Dòng T3.3 được ghi nhận có dịch ngoại bào và dịch tế bào có khả năng tạo vòng kháng khuẩn với vi khuẩn *S. aureus*. Kết quả nhận diện dòng C3.3 và C1.4 lần lượt là *Bacillus subtilis* NBT-15 và *Bacillus megaterium* S1.

### 4.2 Đề xuất

Khảo sát đặc tính kháng của những dòng vi khuẩn phân lập với những dòng vi khuẩn hoặc nấm gây bệnh khác.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bauer, MD., Kirby, WM., Sherris, M. and Turck, M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *The American Journal of Clinical Pathology*, 45:494 - 498.

Beiranvand, M., Amin, M., Hashemi-Shahraki, A., Romani, B., Yaghoobi, and Sadeghi, P., 2017. Antimicrobial activity of endophytic bacterial populations isolated from medicinal plants of Iran. *Iranian J of Microbiol.* 9 (1): 11-18.

Bhoonobong, A., Sawadsitang, SSS. and Mongkolthanaruk, W., 2012. Characterization of endophytic bacteria, *Bacillus amyloliquefaciens* for antimicrobial agents production. *International Conference on Biological and Life Sciences*. IPCBEE. Singapore, ACSIT Press. 40: 6-11.

Mohammadou, B.A., Le Blay, G., Mbofung, C.M. and Barbier, G., 2014. Antimicrobial activities, toxinogenic potential and sensitivity to antibiotics of *Bacillus* strains isolated from Mbuja, an *Hibiscus sabdariffa* fermented seeds from Cameroon. *African Journal of Biotechnology*, 13(35): 3617-3627.

Cao Ngọc Diệp và Nguyễn Hữu Hiệp, 2002. *Thực tập vi sinh đại cương*, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.

El-Deeb, B., Fayed, K. and Gherbawa, Y., 2013. Isolation and characterization of endophytic bacteria from *Plectranthus tenuiflorus* medicinal plant in Saudi Arabia desert and their antimicrobial activities. *J of Plant Interactions*. 8 (1): 56-64.

Hammed, AM., Amosu, AO., Awe, AF. and Gbadamosi, FF., 2015. Effects of *Moringa oleifera* leaf extracts on bacteria (*Aeromonas hydrophila*) infected adults African mud cat fish *Clarias gariepinus*. *Int. J of Curr. Res.* 7 (11): 22117-22122.

Trần Trọng Hiếu và Nguyễn Hữu Hiệp. 2016. Phân lập và khảo sát đặc tính của vi khuẩn nội sinh ở cây Trinh nữ (*Mimosa pudica* L. ) tại tỉnh Trà Vinh. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần thơ*. 46:23-29.

Lane, DJ., 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E. and M. Goodfellow (Editors). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley and Sons. Chichester. United Kingdom. 115-175.

Parthasarathy, R., Ramasubramanian, V. and Ravi, D., 2012. Effect of probiotic bacteria as a biocontrol agent against disease causing pathogen in *Catla catla* (Hamilton, 1822). *IJCRR*, 4(19): 15-24.

Poppi, LB., Rivaldi, JD., Coutinho, TS., Astolfi-Ferreira, CS., Piantino, AJ. and Mancilha, I M., 2015. Effect of *Lactobacillus* sp. Isolates supernatant on *Escherichia coli* O157:H7 enhances the role of organic acids production as a factor for pathogen control. *Pesq.Vet. Bras.* 35(4): 353-359.

Rowaida K., Fatima, D., Yasser, E. and Sanaa, O., 2008. The influence of cultural and physical conditions on the antimicrobial activity of bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus megaterium* 22 strain. *African Journal of Food Science*, 3(1): 11-22.

Souza, I FAC., Napoleão, TH., de Sena, KXRF., Paiva, PMG., Patrícia M., Paiva G. and Coelho, LCBB., 2016. Endophytic Microorganisms in Leaves of *Moringa oleifera* Collected in Three Localities at Pernambuco State, Northeastern Brazil. *British Microbiology Research Journal*, 13(5): 1-7.

Zaffer, M., Ahmad, S., Sharma, R., Mahajan, S., Gupta, A. and Agnihotri, RK., 2014. Antibacterial activity of bark extracts of *Moringa oleifera* Lam. against some selected bacteria. *Pak J Pharm Sci.* 27(6):1857-62.