



DOI:10.22144/ctu.jsi.2019.058

**PHÂN LẬP VÀ ĐỊNH DANH VI KHUẨN NỘI SINH Ở CÂY DIẾP CÁ (*Houttuynia cordata* THUNB, SAURURACEAE) TẠI TỈNH KIÊN GIANG CÓ HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN VỚI VI KHUẨN *Staphylococcus aureus* TỪ MỤN NHỌT Ở NGƯỜI**

Huỳnh Văn Trương<sup>1\*</sup>, Nguyễn Hữu Hiệp<sup>2</sup> và Lý Tú Hương<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Y Dược Cần Thơ

<sup>2</sup>Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

\*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Huỳnh Văn Trương (email: hvtruong@ctump.edu.vn)

**Thông tin chung:**

Ngày nhận bài: 13/11/2018

Ngày nhận bài sửa: 31/03/2019

Ngày duyệt đăng: 12/04/2019

**Title:**

Isolation and identification of the endophytic bacteria in *Houttuynia cordata* Thunb, Saururaceae; in Kien Giang province which have antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* of human furuncle

**Từ khóa:**

*Bacillus* spp., cây diếp cá, kháng khuẩn, mụn nhọt, vi khuẩn nội sinh

**Keywords:**

Antibacterial, *Bacillus* spp, endophytic bacteria, furuncle, *Houttuynia cordata* Thunb

**ABSTRACT**

Research on isolation and identification of endophytic bacteria of *Houttuynia cordata* which have the antimicrobial activity to *Staphylococcus aureus* of human furuncle was conducted. Samples of *Houttuynia cordata* Thunb were collected from Phu Quoc district, Ha Tien and Rach Gia city of Kien Giang province. The antibacterial ability of endophytic bacterial strains in *Houttuynia cordata* Thunb against *Staphylococcus aureus* was done by disk diffusion assay. Then endophytic bacteria in *Houttuynia cordata* Thunb were identified based on the sequence of 16SrRNA. The results showed that 60 endophytic bacteria strains in *Houttuynia cordata* Thunb were isolated on the potato dextrose agar medium. Fourteen strains inhibited the growth of *Staphylococcus aureus* of human furuncle with the clear zone varied from 10- 40 mm. Three bacterial strains HTT2, PQT4 and RGT2 were identified as *Bacillus amyloliquefaciens* strain CD2901, *Bacillus megaterium* strain 22 and *Bacillus subtilis* strain B237, respectively.

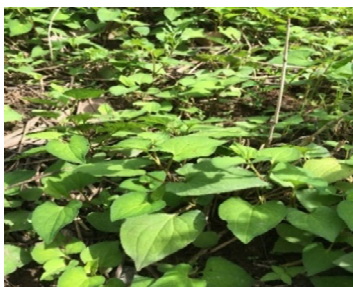
**TÓM TẮT**

Nghiên cứu phân lập và định danh vi khuẩn nội sinh của cây diếp cá có hoạt tính kháng khuẩn với vi khuẩn *Staphylococcus aureus* từ mụn nhọt người. Cây diếp cá thu ở huyện Phú Quốc, thành phố Hà Tiên và Rạch Giá, tỉnh Kiên Giang được sử dụng để phân lập vi khuẩn nội sinh. Khảo sát khả năng kháng khuẩn của những dòng vi khuẩn nội sinh cây diếp cá với *Staphylococcus aureus* bằng phương pháp tẩm vi khuẩn nội sinh trên giấy lọc và định danh bằng phương pháp giải trình tự gen 16S rRNA. Kết quả cho thấy 60 dòng vi khuẩn nội sinh cây diếp cá được phân lập trên môi trường PDA. Mười bốn dòng có khả năng kháng được vi khuẩn *Staphylococcus aureus* từ mụn nhọt ở người với vòng vô khuẩn từ 10-40 mm. Ba dòng vi khuẩn HTT2, PQT4 và RGT2 được nhận diện theo thứ tự là *Bacillus amyloliquefaciens* strain CD2901, *Bacillus megaterium* strain 22 và *Bacillus subtilis* strain B237.

Trích dẫn: Huỳnh Văn Trương, Nguyễn Hữu Hiệp và Lý Tú Hương, 2019. Phân lập và định danh vi khuẩn nội sinh ở cây diếp cá (*Houttuynia cordata* Thunb, Saururaceae) tại tỉnh Kiên Giang có hoạt tính kháng khuẩn với vi khuẩn *Staphylococcus aureus* từ mụn nhọt ở người. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 55(Số chuyên đề: Công nghệ Sinh học)(2): 166-173.

## 1 GIỚI THIỆU

Việt nam có rất nhiều cây cỏ có hoạt chất kháng khuẩn và là nguồn dược liệu vô cùng phong phú, trong đó có nhiều cây thuốc có tính kháng khuẩn đã được y học, dân gian dùng làm thuốc từ lâu. Chúng thường là những cây cỏ rất quen thuộc, mọc hoang dại hoặc được trồng ngay trong vườn nhà (Đỗ Tất Lợi, 1997). Ngày nay việc lạm dụng kháng sinh đã và đang làm giảm hiệu quả của các loại kháng sinh. Bên cạnh, dư lượng kháng sinh tồn tại trong các loại thực phẩm có nguồn gốc chăn nuôi cũng như ngoài môi trường đang gây ra những tác động nghiêm trọng trực tiếp và gián tiếp đến sức khỏe con người (Phạm Hùng Văn, 2013). Nghiên cứu tìm ra các hợp chất kháng khuẩn rất cần thiết để đảm bảo hiệu quả và an toàn. Các chất kháng khuẩn tự nhiên từ thực vật, vi sinh vật được xem là một nguồn hứa hẹn, góp phần quan trọng trong bảo vệ sức khỏe của con người. Cây diếp cá là loài cây thân thảo thuộc họ Saururaceae sử dụng trong ngành y được biết đến với tác dụng kháng khuẩn, kháng viêm, lợi tiểu, chống oxy hóa,... (Kumar *et al.*, 2014). Các nghiên cứu cho thấy các hợp chất trích từ cây diếp cá như tinh dầu, flavonoid thể hiện hoạt tính kháng khuẩn, kháng virus, kháng viêm và chống dị ứng (Kumar *et al.*, 2014). Vi sinh vật nội sinh nói chung và vi khuẩn nội sinh thực vật nói riêng từ lâu đã được biết đến với khả năng kích thích sự phát triển của cây trồng qua việc cố định đạm, hòa tan dạng lân vô cơ khó tan trong đất, tổng hợp các hormone thực vật (Kumar *et al.*, 2014). Trong những năm gần đây, khi vi khuẩn nội sinh được tìm thấy là có thể tổng hợp các dạng kháng sinh tự nhiên có thể kháng lại nhiều vi khuẩn gây bệnh đã kháng thuốc (Christina *et al.*,



Hình 1: Cây diếp cá sử dụng trong nghiên cứu

### 2.3 Vật liệu thí nghiệm

Sử dụng các thiết bị có tại phòng thí nghiệm Vi sinh vật Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học như tủ cấy vô trùng, tủ ủ, nồi khử trùng nhiệt ướt, máy khuấy từ...

Môi trường sử dụng trong nghiên cứu được trình bày trong bảng 1.

2013). Điều này cho thấy tiềm năng hứa hẹn về sản xuất kháng sinh tự nhiên từ vi khuẩn nội sinh thực vật và có nhiều công trình nghiên cứu về vi khuẩn nội sinh ở thực vật nói chung và cây diếp cá nói riêng. Tuy nhiên, việc nghiên cứu chủ yếu trên các hoạt tính của những hợp chất phân lập từ cây và có rất ít nghiên cứu trên vi sinh vật nội sinh với cây dược liệu. Trong hệ vi sinh vật nội sinh cây dược liệu, vi khuẩn nội sinh được biết đến ngoài khả năng hỗ trợ cây sinh trưởng và phát triển tốt, còn có thể sản xuất các hợp chất chuyển hóa có hoạt tính kháng khuẩn tự nhiên. Phân lập và định danh vi khuẩn nội sinh trong cây diếp cá có hoạt tính kháng khuẩn với vi khuẩn *Staphylococcus aureus* từ mụn nhọt là nội dung nghiên cứu đã được thực hiện.

## 2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Thời gian thực hiện đề tài

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 01/2017 đến tháng 01/2018 tại phòng thí nghiệm Vi sinh vật của Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ và Phòng thí nghiệm Bệnh viện Trường Đại học Y Dược Cần Thơ

### 2.2 Địa điểm thu mẫu nghiên cứu

Mẫu cây diếp cá thu tại các vùng ở khu vực của huyện Phú Quốc, thành phố Hà Tiên và Rạch Giá, tỉnh Kiên Giang. Mẫu cây diếp cá được định danh bằng cách so sánh các đặc điểm hình thái thực vật với các đặc điểm được mô tả trong các tài liệu thực vật học chuyên ngành tại bộ môn Dược liệu – Dược cổ truyền và Thực vật của khoa Dược, Trường Đại học Y Dược Cần Thơ. Tên khoa học cây Diếp cá là *Houttuynia cordata* Thunb, Saururaceae.



Bảng 1: Thành phần môi trường Potato Dextrose Agar (PDA)

Hóa chất	Liều lượng (g/L)
Khoai tây	200
Dextrose	20
Agar	18
pH	6,7-6,8

– Để nhận diện vi khuẩn nội sinh sống trong cây, sử dụng các đoạn mồi 16S rRNA (Lane, 1991) được thiết kế với trình tự sau:

27F: 5'- AGAGTTTGATCMTGGCTC -3'

1492R: 5'- TACGGYTACCTTGTTACGACT-3'

## 2.4 Phương pháp nghiên cứu

### 2.4.1 Phân lập vi khuẩn *Staphylococcus aureus*

Vi khuẩn *Staphylococcus aureus* được phân lập từ mụn nhọt ở vùng mặt của người qua chọn ngẫu nhiên khi vào Bệnh viện da liễu Cần Thơ để điều trị mụn nhọt trên môi trường thạch máu (BA). Sau khi phân lập được và định danh bằng máy định danh tự động VITEK2 cùng các thí nghiệm sinh hóa để định danh vi khuẩn *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), sau đó nuôi cấy lưu trữ dùng cho suốt quá trình nghiên cứu, *S. aureus* được lưu trữ và cung cấp cho thí nghiệm từ phòng xét nghiệm vi sinh của Bệnh viện Trường Đại học Y Dược Cần Thơ.

#### 2.4.2 Phương pháp thu thập và xử lý mẫu

– Thu thập mẫu: Mẫu cây diếp cá được thu bằng cách dùng xẻng đào xung quanh cây và sâu xuống với kích thước 15 x 15 x 15 cm để thu được mẫu. Tách phần rễ và thân ra khỏi đất, cho cây và đất vào túi nhựa riêng ghi chú rõ địa điểm thu mẫu và thời gian thu mẫu. Sau đó, mẫu được trữ trong thùng lạnh Tại phòng thí nghiệm, mẫu được xử lý và phân lập vi khuẩn theo quy trình sau:

– Mẫu đất tại nơi thu mẫu được tiến hành đo pH.

– Lá, thân, rễ của mẫu được rửa sạch bằng nước máy.

Sau đó, tách riêng mẫu và tiến hành khử trùng:

– Mẫu lá: Khử trùng với cồn 70% trong 30 giây, sau đó khử trùng với H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% trong 30 giây và rửa lại bằng nước cất đã khử trùng từ 3-4 lần cho sạch.

– Mẫu thân: Cắt thành đoạn từ 2-3 cm, khử trùng với cồn 70% trong 1 phút, sau đó khử trùng với H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% trong 1 phút và rửa lại bằng nước cất đã khử trùng từ 3-4 lần cho sạch.

– Mẫu rễ: Cắt riêng rễ và khử trùng với cồn 70% trong 1 phút, sau đó khử trùng với H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% trong 1 phút và rửa lại bằng nước cất đã khử trùng từ 3-4 lần cho sạch.

#### 2.4.3 Phân lập vi khuẩn nội sinh ở cây diếp cá

– Dịch trích mẫu từ các bộ phận rễ, thân lá của cây diếp cá được ly tâm ở 2.000 rpm ở 4°C để loại bỏ xác bã còn sót lại; hút dịch trong ở phía trên cho vào môi trường bán rắn; ủ từ 3-5 ngày ở nhiệt độ

30°C và ghi nhận sự xuất hiện của vòng pellicle, màng mỏng trắng đục, cách bề mặt môi trường từ 2-4 mm, vòng này chứng tỏ sự hiện diện của vi khuẩn nội sinh.

– Dung dịch được hút 50 µL của vùng này trải sang môi trường PDA trên đĩa, sau đó được ủ ở 30°C để vi khuẩn phát triển, tiếp tục cấy chuyển vi khuẩn đến khi rỗng.

– Độ rỗng của vi khuẩn được kiểm tra bằng cách quan sát dưới kính hiển vi.

#### 2.4.4 Quan sát hình thái và đo kích thước khuẩn lạc

Khi cấy chuyển vi khuẩn trên đĩa môi trường PDA đặc tiến hành đo kích thước và quan sát hình thái các dạng khuẩn lạc bao gồm các chỉ tiêu: màu sắc, hình dạng, độ nổi và dạng bìa khuẩn lạc bằng mắt thường.

#### 2.4.5 Quan sát hình dạng và khả năng chuyển động của vi khuẩn

Sau khi phân lập vi khuẩn, tiến hành quan sát hình dạng và sự chuyển động của vi khuẩn bằng phương pháp giọt ép dưới kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 400 lần theo Cao Ngọc Diệp và Nguyễn Hữu Hiệp (2008).

#### 2.4.6 Đo kích thước tế bào vi khuẩn và quan sát chuyển động của vi khuẩn

Chuyển động của vi khuẩn được quan sát bằng phương pháp giọt ép dưới kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 400 lần theo Cao Ngọc Diệp và Nguyễn Hữu Hiệp (2008).

#### 2.4.7 Nhuộm Gram vi khuẩn

Vi khuẩn được nhuộm Gram theo mô tả của Cao Ngọc Diệp và Nguyễn Hữu Hiệp (2008). Quan sát mẫu trên kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 400 lần và ghi nhận Gram của vi khuẩn. Nếu mẫu vi khuẩn có màu tím xanh của crystal violet là mẫu Gram dương, có màu hồng đỏ của fushin là mẫu Gram âm

#### 2.4.8 Khảo sát tính kháng khuẩn của các dòng vi khuẩn nội sinh với các dòng vi khuẩn gây bệnh

– Tính kháng khuẩn của các dòng vi khuẩn được khảo sát bằng phương pháp khuếch tán qua vòng giấy lọc (Disk diffusion assay) (Bauer et al., 1966) với vi khuẩn *Staphylococcus aureus*.

– Tiến hành pha loãng và đếm mật số vi khuẩn bằng phương pháp đếm sống nhỏ giọt (Somasegaran and Hoben, 1994). Đồng thời, đếm mật số của dòng vi khuẩn gây bệnh. Sau khi xác định được mật số của các dòng vi khuẩn gây bệnh, tiến hành khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của các dòng vi khuẩn nội sinh.

– Dòng vi khuẩn gây bệnh được nuôi cấy trên môi trường PDA và được điều chỉnh mật số  $10^8$  CFU/mL.

– Bố trí thí nghiệm dùng để khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của vi khuẩn nội sinh đối với vi khuẩn *Staphylococcus aureus*.

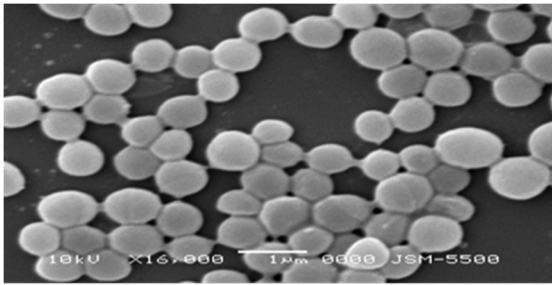
2.4.9 Khả năng kháng khuẩn của các dòng vi khuẩn nội sinh được đánh giá theo quy ước của Galindo (2004)

Đường kính vòng kháng khuẩn = đường kính tổng-đường kính khuẩn lạc.

### 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1 Phân lập và định danh vi khuẩn

*Staphylococcus aureus*(*S. aureus*)



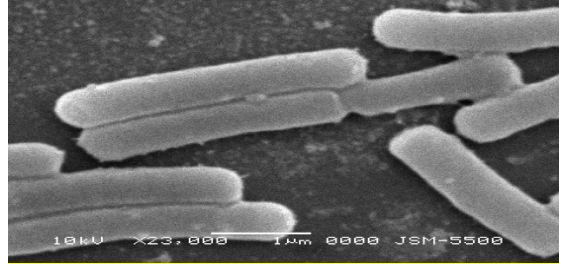
Hình 2: Vi khuẩn *S. aureus* chụp qua kính hiển vi quét (SEM)

Vi khuẩn *S. aureus* phân lập từ mụn nhọt người là những vi khuẩn hình cầu, không di động, gram dương, đường kính 0,5-1,5  $\mu$ m, tế bào xếp thành hình chùm nho. Thành tế bào kháng với lysozyme

và nhạy với lysotaphin, *S. aureus* là những vi khuẩn hiếu khí hay kỵ khí tùy nghi (Hình 2).

#### 3.2 Phân lập và định danh vi khuẩn nội sinh cây diếp cá

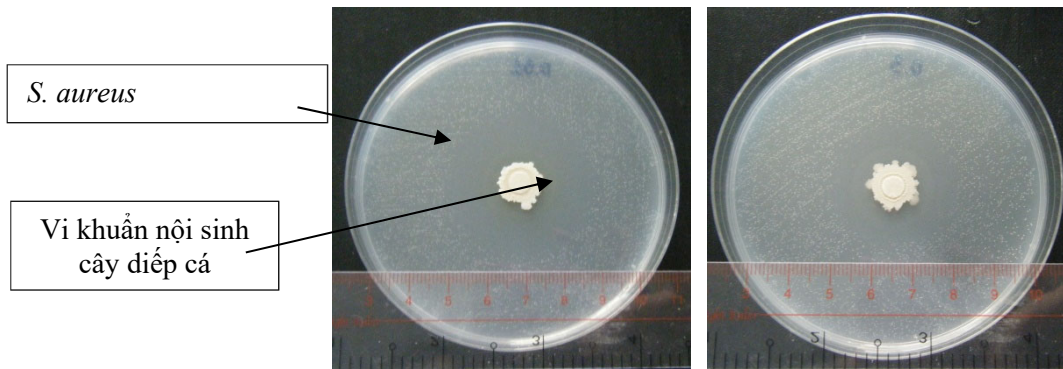
Sáu mươi dòng vi khuẩn nội sinh cây diếp cá được phân lập trên môi trường PDA. Khuẩn lạc của các dòng vi khuẩn có dạng tròn hoặc không đều, màu trắng hoặc màu vàng. Tất cả các dòng vi khuẩn có dạng hình que, gram dương có một số dòng di động. Vi khuẩn có dạng hình que.



Hình 3: Vi khuẩn nội sinh cây diếp cá chụp qua kính hiển vi SEM

#### 3.3 Hoạt tính kháng khuẩn của vi khuẩn nội sinh cây diếp cá với vi khuẩn *S. aureus* từ mụn nhọt ở người

Sáu mươi dòng vi khuẩn nội sinh cây diếp cá khảo sát hoạt tính kháng khuẩn với *S. aureus* thu được 14 dòng vi khuẩn nội sinh có hoạt tính kháng khuẩn với vi khuẩn *S. aureus* từ mụn nhọt ở người với vòng vô khuẩn từ 10-40 mm.

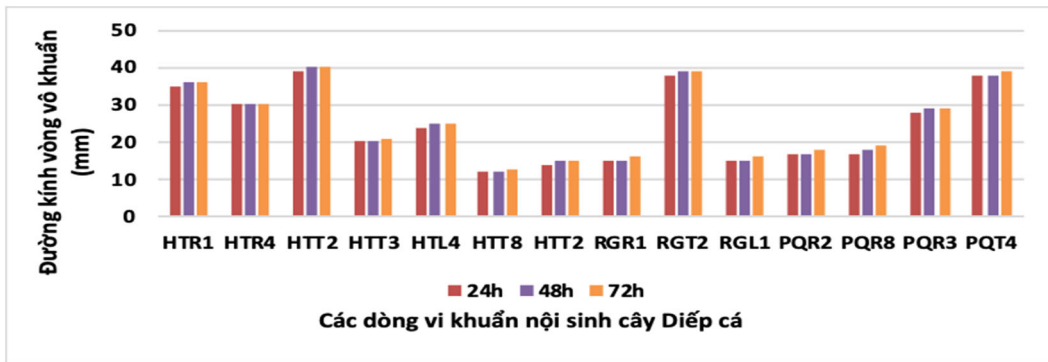


Hình 4: Vòng vô khuẩn khi khảo sát tính kháng khuẩn của các dòng vi khuẩn nội sinh

##### 3.3.1 Kết quả khảo sát hoạt tính kháng khuẩn

Kết quả có 14 dòng trong 60 dòng vi khuẩn nội sinh cây diếp cá có khả năng kháng được

*Staphylococcus aureus*, đường kính kháng khuẩn từ 10-40 mm.

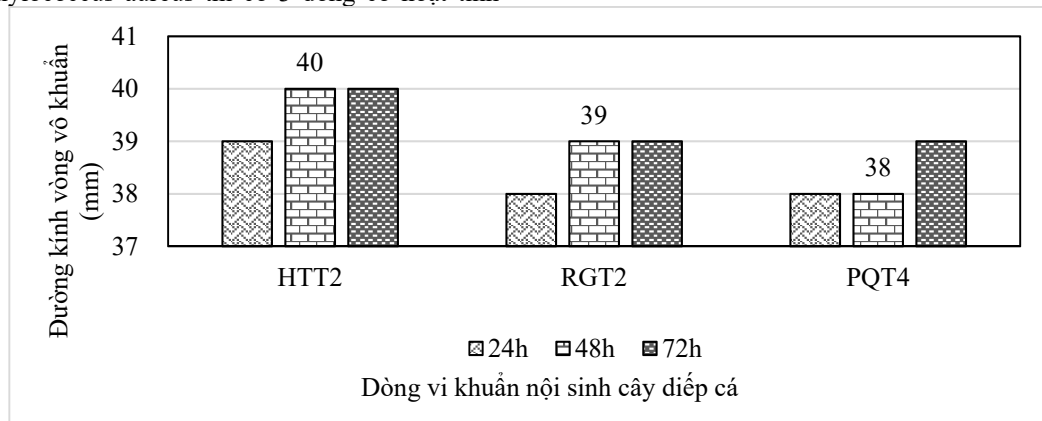


**Hình 5: Đường kính (mm) vòng vô khuẩn của 14 dòng vi khuẩn nội sinh cây diếp cá có hoạt tính kháng khuẩn với S. aureus**

3.3.2 Nhận diện một số dòng vi khuẩn nội sinh cây diếp cá

Trong mười bốn dòng vi khuẩn nội sinh cây diếp cá có hoạt tính kháng khuẩn với vi khuẩn Staphylococcus aureus thì có 3 dòng có hoạt tính

kháng khuẩn cao là HTT2, PQT4, RGT2. Đường kính vòng kháng khuẩn của dòng HTT2 là 40 mm và RGT2 và PQT4 là 39mm phân lập từ mẫu cây diếp cá thu ở huyện Phú Quốc, thành phố Hà Tiên và Rạch Giá, tỉnh Kiên Giang.



**Hình 6: Đường kính (mm) vòng vô khuẩn của HTT2, RGT2 và PQT4 có hoạt tính kháng khuẩn với S. aureus**

3.4 Kết quả định danh dòng vi khuẩn triển vọng

Ba dòng vi khuẩn HTT2, RGT2 và PQT4 được nhận diện lần lượt là Bacillus amyloliquefaciens

strain CD2901, Bacillus megaterium strain 22 và Bacillus subtilis strain B237 (Bảng 2).

**Bảng 2: Kết quả giải trình tự của 03 dòng vi khuẩn nội sinh**

STT	Dòng vi khuẩn	Kết quả nhận diện	Độ tương đồng (%)
1	HTT2	Bacillus amyloliquefaciens strain CD2901	97
2	PQT4	Bacillus megaterium strain 22	97
3	RGT2	Bacillus subtilis strain B237	96

3.4.1 Kết quả giải trình tự gen 16S-rRNA của dòng HTT2

So sánh trình tự của dòng HTT2 với trình tự các dòng vi khuẩn có trong ngân hàng dữ liệu NCBI thì đoạn DNA của dòng HTT2 dài 1.230 bp có tỷ lệ đồng hình 97% với trình tự DNA của Bacillus amyloliquefaciens strain CD2901. B. amyloliquefaciens là vi khuẩn đất, Gram dương,

hình que. Giống như các dòng Bacillus khác, B. amyloliquefaciens tạo nội bào tử để tồn tại trong khoảng thời gian dài trong điều kiện thời tiết khắc nghiệt. Vi khuẩn B. amyloliquefaciens có khả năng kháng nấm Aspergillus parasiticus (Hajare et al., 2016; Bouba-Adjij et al., 2014). Dòng B. amyloliquefaciens cũng có khả năng kháng các vi khuẩn Gram âm như: Escherichia coli, Proteus vulgaris, Pseudomonas fluorescens, Salmonella

*cholerasuis*, *Salmonella gallinarum*, *Serratia marcescens*. *B. amyloliquefaciens* LBM5006 có khả năng đối kháng với các loài nấm *Aspergillus*, *Fusarium* và *Bipolaris sorokiniana* bằng cách sinh ra iturin (Benitez *et al.*, 2010). Trịnh Thành Trung và *ctv.* (2013) cho biết dòng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* SP 1901 có khả năng kháng các loại vi khuẩn Gram dương và Gram âm gây bệnh trên người như *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* và *Shigella* sp. và nấm gây bệnh cây *F. oxysporum*. *B. amyloliquefaciens* R3 cũng có khả năng kháng *E. coli* bằng cách sinh ra các hợp chất như biosurfactins (Chi *et al.*, 2015). Bhoonobtong *et al.* (2012) đã thử nghiệm tính kháng khuẩn của các dịch trích thô bằng các dung môi khác nhau của *B. amyloliquefaciens*, kết quả cho thấy dịch trích từ dung môi ethyl acetate có khả năng kháng *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli*; dịch trích bằng diethyl ether kháng *B. cereus*, *S. aureus* và *E. coli*; dịch trích bằng dung môi chloroform có khả năng kháng *S. aureus*. Theo Kadaikunnan *et al.* (2015) dịch trích bằng dung môi hữu cơ của *B. amyloliquefaciens* VJ-1 kháng được vi khuẩn *B. subtilis*, *Enterococcus cloacae*, *S. aureus*, *S. epidermidis*.

#### 3.4.2 Kết quả giải trình tự gen 16S-rRNA của dòng PQT4

Kết quả so sánh trình tự của dòng PQT4 với trình tự các dòng vi khuẩn có trong ngân hàng dữ liệu NCBI thì đoạn DNA của dòng PQT4 dài 1.290 bp có tỷ lệ đồng hình 97% với trình tự DNA của *Bacillus megaterium* strain 22. *B. megaterium* là vi khuẩn hình que, Gram dương có bào tử. *B. megaterium* được xem như một loại vi khuẩn hiếu khí nhưng vẫn có thể phát triển trong điều kiện kỵ khí khi cần thiết, là một trong những loại vi khuẩn có kích thước lớn nhất được tìm thấy trong đất cát nên vì thế được gọi là “mega”. Nấm dòng *B. megaterium* phân lập từ một loại hạt *Hibiscus sabdariffa* lên men của Cameroon thể hiện khả năng kháng nhiều loại nấm như: *Rhodotorula mucilaginosa*, *Debaryomyces hansenii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida parapsilosis*, *Fusarium oxysporum* (Bouba-Adji *et al.*, 2014). Sumi *et al.* (2015) cho biết các loại lipopeptide mà *B. megaterium* tiết ra để kháng khuẩn như surfacin, lichenysin, iturin, bacillomycins, mycosubtilin, subtilene, agrastatin1. Aslim *et al.* (2000) trong số các dòng *Bacillus* phân lập từ đất, có 6 dòng *B. megaterium* sản sinh ra bacteriocin, megacin và có khả năng kháng lại *E. coli*, *Yersinia enterocolitica*, *S. aureus*, *Micrococcus flavus*. Rowaida *et al.* (2008) phân lập được dòng *B. megaterium* 22 từ đất ở Alexandria, Ai Cập tổng hợp bacteriocin có khả

năng ức chế các dòng vi khuẩn *Salmonella typhimurium*, *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*.

#### 3.4.3 Kết quả giải trình tự gen 16S-rRNA của dòng RGT2

Kết quả so sánh trình tự của dòng RGT2 với trình tự các dòng vi khuẩn có trong ngân hàng dữ liệu NCBI thì đoạn DNA của dòng RGT2 dài 1.120 bp có tỷ lệ đồng hình 96% với trình tự DNA của *Bacillus subtilis* strain B237. Chi *Bacillus* là một chi lớn với gần 200 loài vi khuẩn hiếu khí, hình que, có khả năng sinh nội bào tử để chống chịu các điều kiện bất thường của môi trường sống. Chúng phân bố rộng rãi khắp mọi nơi trong các hệ sinh thái tự nhiên và được tìm thấy trong nhiều môi trường đa dạng như đất và đất sét, đá, bụi, môi trường nước, thực vật, thực phẩm và ống tiêu hóa của nhiều loài côn trùng và động vật khác nhau (Nicholson, 2002). Nhóm *B. subtilis* có tiềm năng sản xuất các sản phẩm thương mại ứng dụng trong y học, trong nông nghiệp và trong công nghiệp thực phẩm. Vi khuẩn *Bacillus sensu lato* có khả năng sản xuất các hợp chất kháng khuẩn, bao gồm các kháng sinh peptide và lipopeptide và bacteriocin (Stein, 2005). Ramachandran *et al.* (2014) đã thử nghiệm khả năng kháng khuẩn của dịch tế bào vi khuẩn cô đặc và dịch ly tâm không có vi khuẩn của dòng *B. subtilis* RLID kết quả dịch ly tâm không có vi khuẩn của dòng *B. subtilis* RLID 12.1 có khả năng kháng vi khuẩn Gram âm là *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Acinetobacter baumannii* và *Yersinia aldovae*, vi khuẩn Gram dương là *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* và *Enterococcus faecalis* và các loại nấm gây bệnh như: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, và *Cryptococcus neoformans*. Dịch tế bào vi khuẩn cô đặc của dòng *B. subtilis* RLID 12.1 có khả năng kháng 28 dòng vi khuẩn được nghiên cứu. Perez *et al.* (1992) đã báo cáo dòng *B. subtilis* MIR 15 có thể kháng lại vi khuẩn *P. aeruginosa*, *E. coli* và *M. luteus*. Aslim *et al.* (2000) tìm ra loài *B. subtilis* có khả năng kháng lại *E. coli* và *Y. enterocolitica*. Kết quả nghiên cứu của Perez *et al.* (1993) cho thấy *B. subtilis* ATCC 6633 kháng lại *S. aureus*. Một nghiên cứu của Bouba-Adji *et al.* (2014) về khả năng kháng khuẩn ở 11 dòng *Bacillus* được phân lập từ một loại hạt lên men ở Cameroon cho thấy có 1 dòng *B. subtilis* S12 kháng lại *S. aureus* và 3 dòng *B. subtilis* S16, S18 và SY kháng lại *E. coli* với đường kính vòng kháng khuẩn 6-8 mm. Ouoba *et al.* (2007) thử nghiệm 3 dòng *B. subtilis* (B7, B9, B15) với các vi khuẩn gây bệnh và nấm trong quá trình lên men *Parkia biglobosa* để sản xuất Soumbala. Kết quả dòng B15 có khả năng kháng *S. aureus* A12, *E. coli* A13; dòng B7 có khả năng kháng *S. aureus* A12, *E. coli* A13. Fernandes

et al. (2007) nhận thấy khả năng kháng khuẩn của lipopeptide được sản xuất bởi *B. subtilis* R14 chống lại các cầu khuẩn Gram dương như *Enterococcus faecalis* và *S. aureus* mạnh hơn trực khuẩn Gram âm như *Pseudomonas aeruginosa* và *E. coli*. Kivanc et al. (2014) phân lập các dòng *Bacillus* từ màng kết của mắt và thử khả năng chống lại các vi khuẩn gây bệnh mắt, kết quả *B. subtilis* PCA 11.2 có khả năng chống lại *S. aureus* SDA 40.2 và *S. aureus* SDA 48. Xie et al. (2009) phân lập được dòng *B. subtilis* LFB112 từ thảo dược ở Trung Quốc có khả năng sản xuất hợp chất kháng khuẩn được xác định là bacteriocin, chất này có khả năng chống lại cả vi khuẩn Gram âm và Gram dương như *E. coli*, *Salmonella pullorum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pasteurella multocida*, *Clostridium perfringens*, *Micrococcus luteus*, *Streptococcus bovis* và *Staphylococcus aureus*.

#### 4 KẾT LUẬN

Sáu mươi dòng vi khuẩn nội sinh cây diếp cá được phân lập từ lá, thân và rễ thu huyện Phú Quốc, thành phố Hà Tiên và Rạch Giá, tỉnh Kiên Giang Trong đó, mười bốn dòng có khả năng kháng được vi khuẩn *Staphylococcus aureus* từ mụn nhọt ở người với vòng vô khuẩn từ 10-40 mm. Ba dòng vi khuẩn nội sinh cây diếp cá có hoạt tính kháng khuẩn cao HTT2, PQT4 và RGT2 được nhận diện theo thứ tự là *Bacillus amyloliquefaciens* strain, *Bacillus megaterium* strain 22 và *Bacillus subtilis* strain B237.

#### LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn đến phòng xét nghiệm Vi sinh của Bệnh viện Trường Đại học Y Dược Cần Thơ, Phòng thí nghiệm Vi sinh vật của Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học Trường Đại học Cần Thơ đã tạo điều kiện và nhiệt tình hỗ trợ chúng tôi hoàn thành nghiên cứu.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

Aslim, B., Saglam, N. and Beyatli, Y., 2000. Determination of some properties of *Bacillus* isolated from soil. *Turk. J. Biol.* 26(2002): 41-48.

Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C. and Turck, M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.* 45(4): 493-496.

Benitez, L. B., Velho, R. V., Lisboa, M. P., Medina, L. F. and Brandelli, A., 2010. Isolation and characterization of antifungal peptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* LBM5006. *J Microbiol*, 48(6): 791-797.

Bouba-Adji, M., Gwenaelle, L. B., Carl, M. M. and Georges, B., 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.

Bhoonobong, A., Sawaditang, S., Sodngam, S. and Mongkolthanaruk, W., 2012. Characterization of Endophytic Bacteria, *Bacillus amyloliquefaciens* for Antimicrobial Agents Production. In: International Conference on Biological and Life Sciences, Singapore. IACSIT Press.

Chi, Z., Rong, Y. J., Li, Y., Tang, M. J. and Chi, Z. M., 2015. Biosurfactins production by *Bacillus amyloliquefaciens* R3 and their antibacterial activity against multi-drug resistant pathogenic *E. coli*. *Bioprocess Biosyst Eng*, 38(5): 853-861.

Christina, A., Christoph, V. and Bhore, S. J., 2013. Endophytic bacteria as a source of novel antibiotics: An overview. *Pharmacogn Rev*, 7(13): 11-16.

Cao Ngọc Diệp và Nguyễn Hữu Hiệp, 2008. Thực tập vi sinh vật đại cương.

Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh Học, Trường Đại Học Cần Thơ. Cần Thơ.

Cao Ngọc Diệp, 2010. *Sách chuyên khảo vi khuẩn nội sinh thực vật*. Nhà xuất bản Đại học Cần Thơ, trang 35.

Đỗ Tất Lợi, 1997. *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, trang 65 – 67.

Fernandes, P. A. V., de Arruda, I. R., dos Santos, A. F. A. B., de Araújo, A. A., Maior, A. M. S. and Ximenes, E. A., 2007. Antimicrobial activity of surfactants produced by *Bacillus subtilis* R14 against multidrug-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, (38):704-709.

Hajare, S. N., Gautam, S. and Sharma, A., 2016. A novel strain of *Bacillus amyloliquefaciens* displaying broad spectrum antifungal activity and its underlying mechanism. *Annals of Microbiology*, 66(1): 407-416.

Phạm Hoàng Hộ, 1999. *Phân loại thực vật*. Nhà xuất bản tuổi trẻ, trang 298-300.

Kadaikunnan, S., Rejiniemon, T., Khaled, J. M., Alharbi, N. S. and Mothana, R., 2015. In-vitro antibacterial, antifungal, antioxidant and functional properties of *Bacillus amyloliquefaciens*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 14(9):1-11.

Kumar, M., Prasad, S.K. and Hemalatha, S., 2014. A current update on the phytopharmacological aspects of *Houttuynia cordata* Thunb. *Pharmacogn Rev*, 8(15): 22-35.

Kivanc, S. A., Takim, M., Kivanc, M. and Gullulu, G., 2014. *Bacillus* spp. isolated from the conjunctiva and their potential antimicrobial activity against other eye pathogens. *Afr Health Sci*, 14(2): 364-371.

Lane, D.J., 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic Acid Techniques in*

- Bacterial Systematics. Stackebrandt, E. and Goodfellow, M., eds. John Wiley and Sons. New York. NY. 115–175.
- Nicholson, W. L. 2002. Roles of *Bacillus* endospores in the environment. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*, 59(3): 410-416.
- Phạm Hùng Vân, 2013. *Kháng sinh – Đề kháng sinh*. Nhà xuất bản y học, Hà Nội, trang 27- 33.
- Ouoba, L., Diawara, B., Jespersen, L., and Jakobsen, M., 2007. Antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* during the fermentation of African locust bean (*Parkia biglobosa*) for Sombala production. *Journal of Applied Microbiology*, 102: 963-970.
- Ramachandran, R., Chalasani, A. G., Lal, R., and Roy, U., 2014. A broad-spectrum antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* RLID 12.1. *The Scientific World Journal*, 1-10.
- 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): 011-022.
- Somasegaran P., and Hoben, H.J., 1994. Quantifying the Growth of Rhizobia. In: *Handbook for Rhizobia*. Springer, New York, NY.
- Stein, 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions, *Molecular Microbiology*, 56(4): 845 – 857.n
- Sumi, C., Yang, B., Yeo, I.-C. & Hahm, Y., 2015. Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for antibiotics. *Canadian Journal of Microbiology*, 61: 93–103.
- Trịnh Thành Trung, Phan Lạc Dũng và Trần Thị Lệ Quyên, 2013. Đặc điểm sinh học và tiềm năng ứng dụng của chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* sp, 1901. Phân lập tại Rừng Quốc gia Hoàng Liên. *Tạp chí Khoa học Đại học Quốc Gia Hà Nội, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ*. 29(3): 59-70.