

Nghiên cứu hoạt tính kháng khuẩn của dịch nuôi xạ khuẩn nội sinh trên cây Màng tang (*Listea Cubeba*) và tương tác với tinh dầu Màng tang trên vi khuẩn gây bệnh truyền qua thực phẩm

Antimicrobial Interaction between Endophytic Actinobacteria Associated with *Listea Cubeba* and *Listea Cubeba* Essential Oils against Food Borne Bacteria

Vũ Thu Trang^{1*}, Nguyễn Hải Vân¹, Vũ Thị Hạnh Nguyễn², Phí Quyết Tiến²,
Đỗ Thị Yến¹, Chu Kỳ Sơn¹

¹ Trường Đại học Bách Khoa Hà Nội - Số 1, Đại Cồ Việt, Hai Bà Trưng, Hà Nội, Việt nam

² Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam - Số 18, Hoàng Quốc Việt, Hà Nội, Việt Nam

Đến Tòa soạn: 12-9-2018; chấp nhận đăng: 20-3-2020

Tóm tắt

Nghiên cứu này khảo sát khả năng kháng khuẩn của dịch nuôi xạ khuẩn nội sinh trên cây Màng tang *Litsea cubeba* (Lour.) Pers (*L. cubeba*) và tinh dầu Màng tang với 02 chủng vi khuẩn gây bệnh truyền qua thực phẩm điển hình là vi khuẩn Gram âm *Escherichia coli* ATCC 25922 (*E. coli*) và vi khuẩn Gram dương *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (*S. aureus*) khi sử dụng riêng rẽ và kết hợp. Kết quả khảo sát bảy chủng xạ khuẩn nội sinh trên cây Màng tang cho thấy ba chủng xạ khuẩn nội sinh MPT44, MPT42, MPT 62 cho hoạt tính kháng khuẩn cao trên các vi khuẩn kiểm định với đường kính vòng kháng khuẩn trong khoảng từ 17 – 44 mm. Bằng phương pháp pha loãng liên tục, nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) xạ khuẩn nội sinh với vi khuẩn kiểm nghiệm dao động từ 6,25 – 25 µl/ml. Dựa trên giá trị nồng độ ức chế riêng phần (FIC), sự kết hợp của tinh dầu Màng tang và dịch nuôi xạ khuẩn có tác dụng hiệp đồng và cộng hưởng với hai chủng vi khuẩn kiểm định *E. coli*, *S. aureus*. Sự kết hợp của tinh dầu màng tang và dịch nuôi xạ khuẩn tăng cường hiệu quả kháng vi khuẩn gây bệnh thực phẩm gấp 3-8 lần so với khi sử dụng riêng rẽ. Bên cạnh đó, sử dụng kết hợp tinh dầu và các chất chuyển hóa thứ cấp từ xạ khuẩn nội sinh sẽ là công cụ hữu hiệu cho việc đảm bảo an toàn thực phẩm và ngăn ngừa vi khuẩn gây bệnh truyền qua thực phẩm.

Từ khóa: xạ khuẩn nội sinh, màng tang, hoạt tính kháng khuẩn, tương tác, cộng hưởng

Abstract

The purpose of the study was to investigate the antimicrobial activity of endophytic actinomycetes isolated from *Listea Cubeba* (*L. cubeba*) and its essential oil on two food-borne pathogenic bacteria Gram-positive *Escherichia coli* ATCC 25922 (*E. coli*) and Gram-positive *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (*S. aureus*) individual and in combination. The results indicated that 3 among 7 endophytic actinomycetes (MPT44, MPT42, MPT 62) showed antibacterial activity against tested strains with the antibacterial diameter ranging from 17 - 44 mm. Using the broth micro-dilution assay, minimum inhibitory concentration (MIC) of endophytic actinomycetes bacteria were from 6.25 to 25 µl/ml. From the indices of fractional inhibitory concentration (FIC) of the combination of *L. cubeba* essential oil and its endophytic actinomycetes, the synergistic effects were found against *E. coli*, *S. aureus*. The combination of *L. cubeba* essential oil and its endophytic actinomycetes broth culture enhances the antimicrobial efficacy against foodborne pathogens 3 to 8 times comparing with individual treatment. In addition, the combination use of essential oils and secondary metabolites from endophytic bacteria should be useful way to enhance food security.

Keywords: endophytic bacteria, *Litsea cubeba*, antimicrobial activity, interaction effect, synergy effect

1. Giới thiệu

Những nghiên cứu trên thế giới đã khẳng định vai trò của xạ khuẩn trong sinh tổng hợp chất kháng vi sinh vật. Trong số 8.000 chất kháng sinh đã được biết đến trên thế giới thì trên 75% là do xạ khuẩn sinh ra [1]. Nhiều loài xạ khuẩn nội sinh, đặc biệt là những

loài được phân lập từ cây dược liệu có khả năng ức chế hoặc tiêu diệt nhiều loại VSV gây bệnh như vi khuẩn, nấm và virus, có tiềm năng để phát triển các loại thuốc kháng sinh mới. Sự đa dạng của xạ khuẩn nội sinh trên thực vật là vô cùng phong phú hứa hẹn tiềm năng ứng dụng các hợp chất có hoạt tính sinh học do các chủng xạ khuẩn này sinh ra trong mọi lĩnh vực của đời sống. Tuy nhiên, so với sự đa dạng của giới thực vật, số lượng các nghiên cứu về xạ khuẩn nội cộng sinh trên thực vật vẫn còn rất hạn chế. Chính

* Địa chỉ liên hệ: Tel.: (+84) 934.668.283

Email: trang.vuthu@hust.edu.vn

vi thể, nghiên cứu sàng lọc các hợp chất có hoạt tính kháng khuẩn từ xạ khuẩn nội sinh trên cây dược liệu tự nhiên đang là hướng nghiên cứu đầy triển vọng của các nhà khoa học trên thế giới [2]. Trong hơn 10 năm gần đây (2001-2012), các nhà khoa học thuộc Viện VSV học Văn Nam, Trung Quốc đã không ngừng nghiên cứu, cải tiến, tối ưu hóa các điều kiện phân lập và đưa vào bảo tàng giống hơn 5.000 chủng xạ khuẩn nội cộng sinh phân lập từ hơn 100 loài thực vật [3]. Các hợp chất chuyển hóa thứ cấp do các chủng xạ khuẩn này sinh ra cũng được chứng minh là rất đa dạng về mặt số lượng và hoạt tính sinh học như các chất kiểm soát sinh học, chất kháng VSV, kháng tế bào ung thư, chống oxy hóa, chống sốt rét, chất diệt cỏ, chất kích thích sinh trưởng.

Thực vật có khả năng tổng hợp các hợp chất có hoạt tính sinh học cao như phenolic, alkaloids, flavonoids, tannins and terpenoids ...[4]. Những hợp chất này giúp cho cây cỏ tự bảo vệ khỏi côn trùng, vi sinh vật và động vật ăn cỏ [5]. Ngoài ra, xạ khuẩn nội sinh còn có khả năng kiểm soát bệnh dịch cho cây chủ dựa trên một số cơ chế đối kháng như: sinh chất kháng sinh, tổng hợp nên các enzym phân hủy thành tế bào của nấm gây bệnh, cạnh tranh về dinh dưỡng, nơi cư trú và kích thích tính chống chịu của cây chủ [6, 7]. Các hợp chất phenol, polyphenol và flavonoid là các chất chuyển hóa thứ cấp của cây, có thể liên quan đến các vi khuẩn nội sinh trên cây chủ; sự hiện diện của các chất chuyển hóa này có thể tăng cường khả năng hoạt động của các chất chống oxy hóa trong cây [8]. Nhiều nghiên cứu trên thế giới đã chỉ ra vai trò quan trọng của thực vật và các hợp chất chiết xuất từ thực vật trong phòng bệnh và điều trị các bệnh do vi sinh vật như khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh.

Litsea cubeba (hay Màng tang trong tiếng Việt) đã được biết đến từ lâu như một phương thuốc phổ biến, sử dụng trong y học cổ truyền để điều trị nhức đầu, mệt mỏi, đau cơ, trầm cảm, lở loét và mụn nhọt. Chiết xuất của Màng tang đã được chứng minh có khả năng kháng khuẩn, chống nấm, chống oxy hóa và chống ung thư [9]. Mặc dù nhiều hoạt tính kháng sinh và kháng ung thư của cây Màng tang đã được công bố, hướng nghiên cứu về ứng dụng các hợp chất có hoạt tính sinh học từ nguồn vi sinh vật cũng đã được chú ý, tuy nhiên cho đến nay chưa có nhiều báo cáo đề cập đến đặc tính xạ khuẩn nội cộng sinh trên cây dược liệu tự nhiên và Màng tang tại Việt Nam, cũng như mối tương quan giữa hoạt tính của các xạ khuẩn này với các sản phẩm chuyển hóa của cây dược liệu. Sự kết hợp của các tác nhân kháng khuẩn có thể nâng cao hiệu quả, giảm độc tính, giảm tác dụng bất lợi của thuốc do giảm liều lượng sử dụng của các tác nhân kháng khuẩn khi điều trị [10]. Chính vì thế trong nghiên cứu này, chúng tôi nghiên cứu hoạt tính kháng khuẩn của xạ khuẩn nội sinh từ Màng tang và tương tác của chúng với tinh dầu trên cây với các chủng vi

khẩn Gram âm và Gram dương truyền qua thực phẩm.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1 Vật liệu

Màng tang được thu thập tại xã Cấp Dẫn, huyện Cẩm Khê, tỉnh Phú Thọ, Việt Nam (21°24' N; 105°04' E), được khẳng định loài tại Bộ môn thực vật học, Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam (VNUA). 200 gam quả màng tang sau khi thu hái, rửa sạch được bổ sung vào hệ thống chung cất lõi cuốn hơi nước Clevenger type 2 lit và chung cất trong 4h để thu nhận tinh dầu [9]. Tinh dầu thu được được làm khan bằng natri sunfat và giữ trong bình tối màu kín ở 4°C đến khi sử dụng.

Các chủng xạ khuẩn được phân lập từ rễ, thân, lá cây Màng tang bằng 10 môi trường phân lập khác nhau, đánh giá đa dạng khi quan sát về đặc điểm hình thái khuẩn lạc, hình thái dưới kính hiển vi điện tử, các đặc điểm sinh lý, sinh hóa và giải trình tự gen 16 S rRNA. Bộ sưu tập các chủng xạ khuẩn Màng tang được lưu trữ bộ sưu tập giống phòng công nghệ lên men, Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VAST). Các chủng xạ khuẩn tiềm năng MPT08, MPT21, MPT25, MPT42, MPT44, MPT47, MPT62, MPT64 được sử dụng trong nghiên cứu này [15].

Các chủng vi khuẩn kiểm định từ bộ sưu tập giống Hoa Kỳ bao gồm: vi khuẩn Gram dương *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (*S. aureus*) và vi khuẩn Gram âm *Escherichia coli* ATCC 25922 (*E. coli*).

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Phương pháp chuẩn bị dịch nuôi xạ khuẩn.

Các chủng xạ khuẩn trên Màng tang được phân lập và bảo quản tại Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Các chủng xạ khuẩn được hoạt hóa và nuôi cấy trong môi trường YIM38 lỏng ở 30°C trên máy lắc tốc độ 200 vòng/phút, mật độ cấy giống 10⁶cfu/mL; sau 5 ngày nuôi cấy, ly tâm ở 12000 vòng/phút trong 5 phút thu dịch lên nuôi sử dụng cho thử nghiệm tính kháng khuẩn [11]. Dịch nuôi được lọc qua màng lọc 0.2µm trước khi đem thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn.

2.2.2 Phương pháp đục lỗ thạch

Khả năng kháng vi khuẩn kiểm định của các chủng xạ khuẩn nội cộng sinh được xác định theo phương pháp đục lỗ thạch: vi sinh vật kiểm định được cấy đều trên đĩa thạch LBA, sau đó đục lỗ thạch, nhỏ 100 µl dịch nuôi cấy xạ khuẩn vào lỗ thạch. Vòng kháng khuẩn được quan sát sau 16-24 giờ nuôi cấy ở 30°C. Hoạt tính kháng khuẩn của mỗi chủng xạ

khuẩn được xác định theo kích thước vòng kháng khuẩn: $D - d$ (mm), với D là đường kính vòng kháng khuẩn, d là đường kính lỗ thạch (=8mm). Mỗi thí nghiệm lặp lại 2 – 3 lần [11]

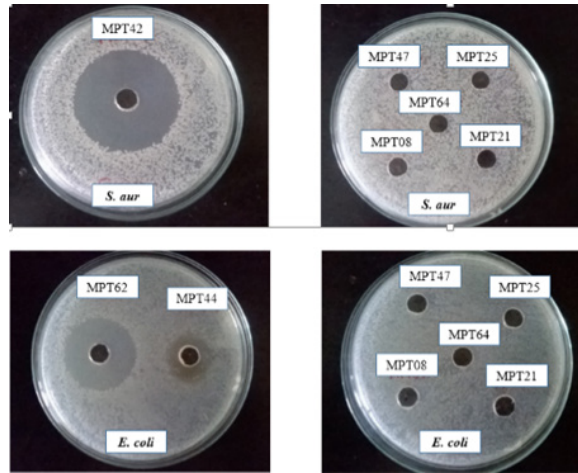
2.2.3 Xác định nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ diệt khuẩn của tinh dầu màng tang và các dịch nuôi xạ khuẩn

Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của tinh dầu và dịch nuôi xạ khuẩn được xác định bằng phương pháp pha loãng liên tục trên đĩa 96 giếng [12]. Tinh dầu màng tang được pha loãng trong nước có Tween 80 0.5% để đạt nồng độ từ 0.195 μ l/ml to 50 μ l/ml. Dịch vi khuẩn kiểm định được pha trong môi trường Mueller Hilton Broth (MHB, Merck) và điều chỉnh nồng độ tới 10^7 CFU/ml bằng Máy quang phổ (OD) bước sóng 600 nm. Mỗi giếng chứa 20 μ l tinh dầu hoặc dịch nuôi xạ khuẩn, 20 μ l vi khuẩn kiểm định và 160 μ l MHB. Nồng độ vi khuẩn kiểm định trong mỗi giếng là 10^6 CFU/ml. Sau khi nuôi cấy 24h tại 37°C, đo giá trị OD tại bước sóng 600 nm sử dụng Elisa reader (Bio-rad Model 680, Nhật Bản). Nồng độ ức chế tối thiểu MIC là nồng độ thấp nhất không nhận thấy sự phát triển của vi sinh vật sau thời gian nuôi cấy (giá trị OD không đổi) [9]. Thí nghiệm được lặp lại ít nhất 2 lần. Các mẫu kiểm chứng cũng được thực hiện đồng thời.

Nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) là nồng độ thấp nhất của chất kháng khuẩn mà ở đó ức chế hoàn toàn sự tăng trưởng của vi khuẩn. Các nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) được xác định bằng cách chang 100 μ l của các dịch nuôi vi khuẩn trên các đĩa, sau đó ủ ở 37°C trong 24 giờ. Giá trị MBC được xác định là nồng độ thấp nhất cho thấy không có sự phát triển của vi khuẩn trên các đĩa thạch

2.2.4 Tương tác của dịch nuôi xạ khuẩn phân lập từ Màng tang và tinh dầu Màng tang

Tương tác hoạt tính kháng khuẩn của dịch nuôi xạ khuẩn và tinh dầu được xác định bằng giá trị nồng độ ức chế riêng phần (FIC) sử dụng đĩa ELISA 96 giếng trong môi trường MHB [9,12]. Mỗi giếng chứa 20 μ l tinh dầu Màng tang (A) pha loãng nhị phân theo hàng ngang với cùng nồng độ dịch nuôi xạ khuẩn (B), pha loãng nhị phân theo hàng dọc. Tiếp đó, 160 μ l của vi khuẩn kiểm định với nồng độ 10^6 CFU/ml được bổ sung vào mỗi giếng. Nồng độ của tinh dầu Màng tang và dịch nuôi xạ khuẩn được chuẩn bị theo dãy nồng độ với giá trị tương ứng là 2, 1,1/2, 1/4, 1/8 và 1/16 giá trị MIC. Đĩa được nuôi ở 37 °C trong 24 h. Giá trị FIC được tính là $FIC A + FIC B$, trong đó $FIC A = (MIC A \text{ kết hợp} / MIC A \text{ riêng phần})$ và $FIC B = (MIC B \text{ kết hợp} / MIC B \text{ riêng phần})$. Kết quả $\Sigma FIC \leq 0,5$: Tương tác cộng hưởng; $0,5 < \Sigma FIC \leq 1$: Tương tác cộng hợp; $1 < \Sigma FIC \leq 4$: Không tương tác; $4 < \Sigma FIC$: Đối kháng [12].



Hình 1. Khả năng ức chế VSV kiểm định của một số chủng xạ khuẩn nội sinh trên cây màng tang

3. Kết quả và thảo luận

3.1 Hoạt tính kháng khuẩn của dịch nuôi xạ khuẩn với chủng vi khuẩn kiểm định Gram dương S. aureus và vi khuẩn Gram âm E. coli

Trong hơn 42 chủng xạ khuẩn phân lập được từ rễ, thân lá của Màng Tang, 8 chủng xạ khuẩn được lựa chọn cho nghiên cứu tiếp theo về hoạt tính kháng vi khuẩn gây bệnh truyền qua thực phẩm dựa trên kết quả khảo sát bước đầu với một số vi khuẩn và nấm gây bệnh. Kết quả nghiên cứu về khả năng kháng 02 chủng vi khuẩn thực phẩm điển hình là vi khuẩn Gram âm E. Coli và Gram dương S. aureus của xạ khuẩn nội sinh MPT08, MPT21, MPT25, MPT42, MPT44, MPT47, MPT62, MPT64 bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch thể hiện qua đường kính vòng kháng khuẩn được trình bày ở Hình 1 và Bảng 1.

Trong 8 chủng xạ khuẩn, 03 chủng MPT42, MPT44, MPT62 cho kết quả khả quan với đường kính vòng tròn vô khuẩn giao động từ 21,8-32,2 MM với chủng E. Coli và từ 25,8-44 mm với chủng S. aureus. Tuy nhiên 06 chủng xạ khuẩn MPT08, 21, 25, 47; 64 lại không thể hiện hoạt tính trên cả hai chủng vi khuẩn kiểm định (Hình 1). Khả năng kháng khuẩn của một số chủng xạ khuẩn phân lập trên cây được liệu đã được chứng minh. Sự khác nhau về hoạt tính kháng khuẩn của dịch nuôi các chủng xạ khuẩn có thể do khả năng sinh tổng hợp các hợp chất chuyển hóa thứ cấp khác nhau của các chủng xạ khuẩn đó. Trong số 42 mẫu xạ khuẩn phân lập từ vườn quốc gia Phawngpuui và khu bảo tồn hồ rừng Mizoram, Ấn Độ, 22 chủng (52,3%) thể hiện hoạt tính đối kháng chống lại ít nhất hai trong số 4 vi khuẩn gây bệnh kiểm định và tất cả các chủng xạ khuẩn đều thể hiện hoạt tính mạnh trên S. aureus và E. coli [13]

Bảng 1. Khả năng ức chế vi khuẩn thử nghiệm của một số chủng xạ khuẩn

Dịch nuôi xạ khuẩn	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)	
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922
MPT42	44,0 ± 2,6	32,3 ± 0,4
MPT44	25,8 ± 2,3	21,8 ± 1,2
MPT62	43,5 ± 1,8	34,8 ± 1,2
MPT64	8	8
MPT08	8	8
MPT21	8	8
MPT25	8	8
MPT47	8	8

3.2 Nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ diệt khuẩn của dịch nuôi xạ khuẩn

Thông qua việc khảo sát hoạt tính kháng vi khuẩn kiểm định của 7 dịch nuôi xạ khuẩn, chúng tôi nhận thấy 3 chủng thể hiện hoạt tính kháng khuẩn trên các vi khuẩn gây bệnh truyền qua thực phẩm. Chính vì thế lựa chọn 3 chủng xạ khuẩn MPT44, MPT42 và MPT62 cho các nghiên cứu tiếp theo. Hoạt tính kháng vi khuẩn thực phẩm cũng được khẳng định lại trên các kết quả tại Bảng 2. Chủng xạ khuẩn MPT62 thể hiện hoạt tính tốt nhất trên cả hai chủng VSV kiểm nghiệm với giá trị MIC và MBC tương ứng là 6,25 và 25 µl/ml, chủng MPT44 có khả năng ức chế vi khuẩn yếu hơn và đặc biệt không có khả năng diệt khuẩn ở nồng độ 400µl/ml với chủng *S. aureus* (Bảng 2). Vi khuẩn thực phẩm *S.aureus* nhạy cảm với các dịch nuôi nhất, với giá trị MIC từ 6,25 µl/ml. Tác dụng diệt khuẩn trên vi khuẩn *E. coli* được tìm thấy ở hai dịch nuôi MPT42 và MPT44 (MBC/MIC < 4). Tương tự, dịch nuôi MPT42 cũng có tác dụng diệt khuẩn với vi khuẩn *S. aureus* nhưng không thể hiện rõ rệt trên chủng MPT62 và MPT 44.

Bảng 2. Nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ diệt khuẩn của dịch nuôi xạ khuẩn (µl/ml)

	MPT42		MPT44		MPT62	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>S. aureus</i>	25	25	25	>400	6,25	25
<i>E. coli</i>	25	100	200	400	6,25	25

MIC: nồng độ ức chế tối thiểu; MBC: nồng độ diệt khuẩn tối thiểu.

Hoạt tính sinh học cao trong các chủng xạ khuẩn có thể giải thích rằng do xạ khuẩn nội sinh sống trong mô của tế bào chủ và nó có thể thực hiện trao đổi gen vào các sản phẩm sinh tổng hợp tự nhiên giữa xạ khuẩn nội sinh và cây chủ thông qua chuyển gen ngang, kết quả tổng hợp các hợp chất sinh học có nguồn gốc từ vi sinh vật nội sinh [14]. Trong vài thập kỷ qua nhiều thành tựu trong tìm kiếm các loài xạ khuẩn và các hợp chất mới có hoạt tính sinh học từ xạ khuẩn trong mô tế bào thực vật đã được công bố do tiềm năng ứng dụng lớn của xạ khuẩn nội sinh nên đối tượng vi sinh vật (VSV) này đang được quan tâm và nghiên cứu ở nhiều nước trên thế giới như: Nhật, Mỹ, Trung Quốc, Hàn Quốc, Ấn Độ, Nhật Bản.... Khi khảo sát hoạt tính các chủng xạ khuẩn thu nhận tại rừng mưa nhiệt đới ở Xishuangbanna, tỉnh Vân Nam, Trung Quốc, Wen-Jun Li cũng thu được kết quả khả quan với các chủng vi khuẩn gây bệnh *S. aureus* và *E. coli* [15]. Tuy nhiên rất ít công bố về xạ khuẩn từ Màng tang được biết đến. Kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng, một số chủng xạ khuẩn phân lập từ Màng tang tại Việt nam có tiềm năng ứng dụng để tách chiết các chất có hoạt tính sinh học mới.

3.4 Nghiên cứu tương tác cộng hợp khi sử dụng kết hợp tinh dầu màng tang và dịch nuôi xạ khuẩn từ tinh dầu màng tang

Khả năng tương tác của tinh dầu Màng tang và dịch nuôi xạ khuẩn nội sinh được khảo sát sơ bộ bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch trước khi xác định nồng độ ức chế riêng phần (Hình 2).



Hình 2. Tương tác giữa tinh dầu màng tang và dịch nuôi khuẩn MPT42 nội sinh từ cây màng tang

Nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ diệt khuẩn của tinh dầu màng tang Việt nam trên hai chủng *S. aureus* và *E. coli* với giá trị tương ứng là 3,13 và 6,25µl/ml; Saikia et al., 2013. Hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu Màng tang với các vi khuẩn gây bệnh cũng đã được nhiều tác giả chứng minh do cách thành phần β-phellandrene, β-terpinene và citral B trong tinh dầu [15, 16]. Tương tác cộng hưởng giữa tinh dầu Màng tang và 03 xạ khuẩn nội sinh phân lập từ Màng tang được thể hiện ở kết quả Bảng 3.3, Bảng

3.4 và Bảng 3.5 trên cả hai chủng khuẩn Gram dương (*S. aureus*) và Gram âm (*E. Coli*).

Bảng 3. Giá trị FIC của tinh dầu màng tang và dịch nuôi xạ khuẩn MPT42

		<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	
		TD	MPT42	TD	MPT42
MIC (µl/ml)	riêng phần	3,13	25	6,25	25
	kết hợp	1,56	6,26	1,56	6,25
FIC riêng phần		0,5	0,25	0,25	0,25
ΣFIC		0,75		0,5	
Tương tác		Cộng hợp		Cộng hưởng	

Bảng 4. Giá trị FIC của tinh dầu màng tang và dịch nuôi xạ khuẩn MPT44

		<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	
		TD	MPT44	TD	MPT44
MIC (µl/ml)	riêng phần	3,13	25	6,25	200
	kết hợp	0,39	3,13	0,38	50
FIC riêng phần		0,125	0,125	0,125	0,25
ΣFIC		0,25		0,38	
Tương tác		Cộng hưởng		Cộng hưởng	

Kết quả nghiên cứu cho thấy, khi sử dụng kết hợp tinh dầu và dịch nuôi xạ khuẩn nội sinh, hiệu quả ức chế và tiêu diệt vi khuẩn tăng lên 3-8 lần trên cả hai chủng vi khuẩn Gram dương và Gram âm. Kết quả trên cũng tương đồng với kết quả của nhóm nghiên cứu khi tiến hành nghiên cứu khả năng tương tác của tinh dầu màng tang và dịch nuôi xạ khuẩn MPT28 từ cây màng tang [17]. Tinh dầu màng tang có thể thâm nhập và phá hủy cả màng trong và màng ngoài tế bào vi khuẩn *E. coli* làm xuất hiện nhiều khoảng trống trên màng tế bào, gây chết tế bào vi khuẩn [18]. Trong khi đó cấu trúc thành tế bào của vi khuẩn Gram dương cho phép các phân tử kỵ nước như các hợp chất phenolic trong tinh dầu truyền qua, xâm nhập và ở nồng độ cao sẽ làm thay đổi hoạt tính của các enzyme hay biến tính protein nội bào [19]. Chính vì thế, tinh dầu thể hiện hiệu quả kháng khuẩn tốt hơn trên vi khuẩn Gram dương *S. aureus* so với vi khuẩn Gram âm *E. coli*. Mặc dù thành phần của dịch nuôi xạ khuẩn nội sinh chưa được khảo sát nhưng

việc sử dụng kết hợp hỗ trợ đến tương tác của 2 dịch, tạo ra các tác dụng hiệp đồng, và cộng hưởng.

Bảng 5. Giá trị FIC của tinh dầu màng tang và dịch nuôi xạ khuẩn MPT62

		<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	
		TD	MPT62	TD	MPT62
MIC (µl/ml)	riêng phần	3,13	6,25	6,25	6,25
	kết hợp	0,39	0,78	0,78	1,56
FIC riêng phần		0,125	0,125	0,125	0,35
ΣFIC		0,25		0,38	
Tương tác		Cộng hưởng		Cộng hưởng	

Kết quả nghiên cứu gợi ý các xạ khuẩn nội sinh trên Màng tang cũng có thể liên quan tới khả năng sinh tổng hợp các hợp chất có hoạt tính sinh học của cây như tinh dầu của cây. Hiện nay, mặc dù đã có một số giả thuyết về sự tạo thành các hợp chất có hoạt tính sinh học của cây có liên quan tới các vi khuẩn nội sinh trong cây chủ [14], nhưng cơ chế của tương tác cộng hưởng hay cộng hợp của các chất chuyển hóa thứ cấp từ xạ khuẩn nội sinh và tinh dầu của cây chủ vẫn chưa được làm sáng tỏ. Các kết quả của nghiên cứu đã cho thấy được tiềm năng khai thác các chất có hoạt tính sinh học từ xạ khuẩn nội sinh trên cây màng tang và cho thấy việc kết hợp giữa tinh dầu màng tang và xạ khuẩn nội sinh trên cây màng tang cho hiệu quả kháng khuẩn mạnh trên các vi khuẩn truyền bệnh qua thực phẩm so với việc sử dụng riêng lẻ từng tác nhân.

4. Kết luận

Các chủng xạ khuẩn nội sinh trên cây màng tang MPT44, MPT42, MPT 62 cho hoạt tính kháng khuẩn cao trên các vi khuẩn kiểm định, đường kính vòng kháng khuẩn trong khoảng từ 17 – 44 mm. Trong khi một số chủng khác (MPT08, MPT21, MPT25, MPT47, MPT64) không có hoạt tính sinh học với các vi khuẩn kiểm định. Việc kết hợp giữa tinh dầu màng tang và dịch lên men xạ khuẩn được chứng minh là tăng hiệu quả kháng khuẩn lên 4 – 8 lần so với sử dụng riêng lẻ. Bên cạnh đó, kết quả nghiên cứu cũng gợi ý sử dụng kết hợp tinh dầu và các chất chuyển hóa thứ cấp từ xạ khuẩn nội sinh sẽ là phương thức hữu hiệu cho việc đảm bảo an toàn thực phẩm và ngăn ngừa vi khuẩn gây bệnh truyền qua thực phẩm.

Tài liệu tham khảo

- [1] J. Bérđy, Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading, *J. antibiotics* 65(8) (2012) 385-395.

- [2] P. Golinska, M. Wypij, G. Agarkar, D. Rathod, H. Dahm and M. Rai, Endophytic actinobacteria of medicinal plants: diversity and bioactivity, *Antonie van Leeuwenhoek* 108(2) (2015) 289-293.
- [3] S. Qin, J. Li, H.-H. Chen, G.-Z. Zhao, W.-Y. Zhu, C.-L. Jiang, L.-H. Xu and W.-J. Li, Isolation, diversity, and antimicrobial activity of rare actinobacteria from medicinal plants of tropical rain forests in Xishuangbanna, China, *Appl. Environ. Microbiol.* 75(19) (2009) 6176-6186.
- [4] A. P. Massiha, P. M. Mohammadreza; P. K. Issazadeh, P. S. Bidarigh, P. Zarrabi, Antibacterial Activity of Essential Oils and Plant Extracts of *Artemisia* (*Artemisia annua* L.) In Vitro, *Zahedan J. Res. Med. Sci.* 15 (2011) 14-18.
- [5] M. N. Alo, C. Anyim, J. C. Igwe, M. Elom and D. S. Uchenna, Antibacterial activity of water, ethanol and methanol extracts of *Ocimum gratissimum*, *Vernonia amygdalina* and *Aframomum melegueta*, *Advances Appl. Sci. Res.* 3 (2012) 844-848.
- [6] S. Ahmad, S. S. Abbas, R. Prakash and A. Alam, Applications of Endophytic Actinomycetes and Their Role in Protection, *Imperial J. Interdisciplinary Res.* 2(7) (2016) 854-859.
- [7] P. T. Lacava and C. P. de Sousa, Role of Endophytic Actinomycetes in Crop Protection: Plant Growth Promotion and Biological Control. *Plant Growth Promoting Actinobacteria*, Springer (2016) 147-160.
- [8] F. M. Nongkhilaw and S. R. Joshi, Investigation on the bioactivity of culturable endophytic and epiphytic bacteria associated with ethnomedicinal plants, *J. Infect. Developing Countries* 9(09) (2015) 954-961.
- [9] N. H. Van, D. Caruso, M. Lebrun, N. T. Nguyen, T. T. Trinh, J. C. Meile, S. K. Chu and S. Sarter, Antibacterial activity of *Litsea cubeba* (Lauraceae, May Chang) and its effects on the biological response of common carp *Cyprinus carpio* challenged with *Aeromonas hydrophila*, *J. Appl. microbiol.* (2016) 341-351.
- [10] S. van Vuuren and A. Viljoen, Plant-based antimicrobial studies-methods and approaches to study the interaction between natural products, *Planta Med* 77(11) (2011) 1168-1182.
- [11] V. T. H. Nguyễn, Đ. T. M. Linh, C. K. Son, T. V. Trang and P. Q. Tiến, Phân loại, đặc tính sinh học của *Streptomyces griseorubens* LCQ8 nội sinh phân lập trên cây Quế tại Lai Châu, Kỷ yếu Hội nghị Khoa học Quốc gia lần thứ hai về Nghiên cứu và giảng dạy Sinh học ở Việt Nam, Đà Nẵng 20/05/2016 (2016).
- [12] J. Gutierrez, C. Barry-Ryan, and P. Bourke, Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components, *Food Microbiol.* 26(2) (2009) 142-150.
- [13] A. K. Passari, V. K. Mishra, R. Saikia, V. K. Gupta and B. P. Singh, Isolation, abundance and phylogenetic affiliation of endophytic actinomycetes associated with medicinal plants and screening for their in vitro antimicrobial biosynthetic potential, *Front. Microbiol.* 6 (2015) 273-279.
- [14] O. Yesil-Celiktas, F. Vardar-Sukan, S. Chandra, H. LATA and A. Varma, *Biotechnology for Medicinal Plants: Micropropagation and Improvement*, Springer (2013)
- [15] J. Li, G. Z. Zhao, H. H. Chen, H. B. Wang, S. Qin, W. Y. Zhu, L. H. Xu, C. L. Jiang and W. J. Li, Antitumour and antimicrobial activities of endophytic streptomycetes from pharmaceutical plants in rainforest, *Lett. Appl. Microbiol.* 47(6) (2008) 574-580.
- [16] M. Sadiki, M. Balouiri, H. Barkai, I. H. Maataoui, S. I. Koraichi and S. Elabed, Synergistic antibacterial effect of *Myrtus communis* and *Thymus vulgaris* essential oils fractional inhibitory concentration index, *Int. J. Pharm. Pharmaceuti. Sci.* 6(6) (2014) 121-124.
- [17] N. H. Van, V. T. H. Nguyen, V. T. Trang, P. Q. Tien, K. T. Nhan, S. Samira and C. K. Son, Antimicrobial activities and interaction effects of Vietnamese *Litsea Cubeba* (Lour.) pers essential oil and endophytic actinobacteria, *J. Sci. Technol.* 54 (3A) (2016) 234-241.
- [18] W. Li, Q. Shi, Q. Liang, X. Xie, X. Huang, Y. Chen, Antimicrobial activity and kinetics of *Litsea cubeba* oil on *Escherichia coli*. *Plos one* 9 (11) (2014) 1-6.
- [19] F. Nazzaro, F. Fratianni, L. D. Martino, R. Coppola, and V. D. Feo, Effect of essential oils on pathogenic bacteria, *Pharmaceuticals* 6 (2013) 1451-1474