

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG SINH POLYPHENOL VÀ KÍCH THÍCH SINH TRƯỞNG THỰC VẬT CỦA VI KHUẨN NỘI SINH PHÂN LẬP TỪ CÂY TẮM MA

Đỗ Quang Trung^{1*}, Đỗ Danh Quang¹, Đinh Mai Vân²

¹Khoa Công nghệ sinh học, Trường Đại học Đại Nam

²Khoa Môi trường, Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

*Tác giả liên hệ: trungdq@dainam.edu.vn

Ngày nhận bài: 12.03.2024

Ngày chấp nhận đăng: 07.08.2024

TÓM TẮT

Cây tầm ma (*Urtica dioica* L.) là cây dược liệu được sử dụng rộng rãi trong y học do chứa nhiều loại hợp chất có hoạt tính sinh học. Nghiên cứu này nhằm phân lập vi khuẩn nội sinh từ cây tầm ma để thu được các hợp chất có hoạt tính sinh học của chúng. Các mẫu từ cây tầm ma được khử trùng bề mặt và ủ trên đĩa môi trường dinh dưỡng để các chủng vi khuẩn nội sinh phát triển. Kết quả thu được 07 chủng vi khuẩn nội sinh (LG1 đến LG7) từ cây tầm ma, trong đó hai chủng vi khuẩn nội sinh, xác định là chủng *Bacillus cereus* LG1 và *Bacillus cereus* LG7, có khả năng tổng hợp chất polyphenol lớn nhất (lần lượt là 187,81 và 281,03mg GAE/l). Ngoài ra, kết quả nghiên cứu cũng cho thấy một số khả năng khác của hai chủng này như tổng hợp enzyme ngoại bào (amylase, cellulase và protease), và tổng hợp IAA. Dịch nuôi của hai vi khuẩn nội sinh này kháng lại hầu hết các chủng vi sinh vật thử nghiệm và hiệu quả cao nhất ở nồng độ 20 mg/ml. Hơn nữa, dịch nuôi vi khuẩn (nồng độ 20 mg/ml) cho thấy khả năng kích thích sự nảy mầm của hạt giống được thử nghiệm. Các kết quả nghiên cứu này cho thấy *B. cereus* LG1 và *B. cereus* LG7 được phân lập từ cây tầm ma có thể là nguồn cung cấp chất polyphenol tiềm năng.

Từ khóa: Cây tầm ma, vi khuẩn nội sinh, polyphenol, cây dược liệu, IAA.

Characterizing Polyphenol-producing and Plant-growth-promoting Abilities of Endophytic Bacteria Isolated from Stinging Nettle, *Urtica dioica* L.

ABSTRACT

Stinging nettle (*Urtica dioica* L.) is a medicinal plant widely used in medicine due to its content of diverse biologically active compounds. The objective of this study was to isolate endophytic bacteria (VKNS) from *U. dioica* L. and identify their biologically active compounds. The plant samples were surface-sterilized and placed on the nutrient agar plates. The results revealed that seven VKNS strains (LG1 to LG7) were obtained from *U. dioica* L., of which two strains, *Bacillus cereus* LG1 and *Bacillus cereus* LG7, had the highest ability to synthesize polyphenols (187.81 and 281.03mg GAE/l, respectively). Moreover, the research revealed that these two strains had other capabilities such as producing extracellular enzymes (amylase, cellulase, and protease), and synthesizing IAA. The supernatant of these two bacteria was resistant to most tested microbial strains and most effective at a concentration of 20 mg/ml. Furthermore, the bacterial supernatant (20 mg/ml) showed the ability to stimulate the germination of the tested seeds. Therefore, the research suggests that *B. cereus* LG1 and *B. cereus* LG7 isolated from *U. dioica* L. were potentially valuable sources of polyphenols. Nevertheless, further research is required to comprehend the process mechanism and achieve effective polyphenol production by endophytic bacteria.

Keywords: *Urtica dioica* L., endophytic bacteria, polyphenol, medicinal plants.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi sinh vật nội sinh sống trong các khoảng không gian giữa các tế bào trong các mô thực

vật mà không gây hại cho sức khỏe hoặc chức năng của cây chủ (Chen & cs., 2021). Vi sinh vật nội sinh đã thu hút sự quan tâm của cộng đồng khoa học do tiềm năng to lớn của chúng trong

việc hỗ trợ phát triển các hợp chất có hoạt tính sinh học mới. Ví dụ, vi khuẩn nội sinh (VKNS) có thể tổng hợp các chất kích thích tăng trưởng thực vật và các tác nhân kiểm soát sinh học để sử dụng trong nông nghiệp (Santoyo & cs., 2016). Nhiều nhóm nghiên cứu đang nghiên cứu cách sử dụng những vi khuẩn này để tạo ra các phân tử hữu cơ có thể sử dụng để sản xuất nhiên liệu sinh học (Shaw & cs., 2015). Ngoài ra, một số nghiên cứu (Sharma & Kumar, 2021) đã chứng minh tiềm năng của các enzyme từ vi sinh vật nội sinh hoặc chính các vi sinh vật nội sinh như là tác nhân xử lý sinh học. Tuy nhiên, được lý học có lẽ đi đầu trong nghiên cứu vi sinh vật nội sinh, vì những vi sinh vật này có thể được coi là nguồn kháng sinh mới, chất chống ung thư và các hợp chất hoạt tính sinh học (Ruan & cs., 2021). Khả năng của một số vi sinh vật nội sinh tạo ra các hợp chất có hoạt tính sinh học tương tự như vật chủ thực vật của chúng cũng đã được chứng minh, khiến chúng trở thành nguồn cung cấp các chất này cho công nghiệp bền vững hơn (Srinivasa & cs., 2022).

Một trong nhiều loại cây được sử dụng rộng rãi trong y học cổ truyền là cây tầm ma (*Urtica dioica* L.), được biết đến là vật chủ của VKNS, đặc biệt là nấm (Salmi & cs., 2021). Cây tầm ma đã được chứng minh là có tác dụng lợi tiểu và thải nước tiểu, cũng như làm giảm viêm, giảm lượng đường trong máu và hoạt động như một chất chống xuất huyết (Dhouibi & cs., 2020). Thành phần hóa học của chiết xuất từ cây tầm ma bao gồm một số axit (formic, malic và oxalic), polyphenol (kaempferol, quercetin, axit caffeic và axit chlorogen), các amin sinh học (acetylcholine, histamine và serotonin) và nhiều thành phần hoạt tính sinh học khác (Repajić & cs., 2021). Chiết xuất của cây tầm ma chứa một lượng đáng kể polyphenol. Nhiều nghiên cứu (Dhouibi & cs., 2020; Repajić & cs., 2021) đã chứng minh khả năng chống viêm, chống oxy hóa và chống ung thư của các hóa chất này, thường được tìm thấy trong thực vật, bao gồm cả trái cây và rau quả. Trong một nghiên cứu gần đây của Marchut-Mikołajczyk & cs. (2023) cho thấy tiềm năng của VKNS từ cây tầm ma

trong sản xuất hợp chất polyphenol. Trong đó, hai chủng *Bacillus cereus* và một chủng *Bacillus mycooides*, có khả năng sản xuất polyphenol lớn nhất (nồng độ hợp chất polyphenol từ 0,325-1,633 mol/l. Polyphenol vẫn phải được chiết xuất từ thực vật để sử dụng trong sản xuất dược phẩm, do đó phát triển các kỹ thuật công nghệ sinh học mới sử dụng vi sinh vật làm đơn vị sản xuất có thể giúp giảm chi phí và ảnh hưởng đến môi trường của các hóa chất đó.

Trong nghiên cứu này, các chủng VKNS được phân lập từ cây tầm ma thu thập tại xã Hồng Dương, huyện Thanh Oai, Hà Nội, sau đó các chủng này được sàng lọc khả năng sinh enzyme thủy phân, các hợp chất polyphenol và khả năng kích thích sinh trưởng thực vật.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Ba cây tầm ma khỏe mạnh được thu thập tại xã Hồng Dương, huyện Thanh Oai, Hà Nội. Toàn bộ cây được đào lên cẩn thận, đảm bảo không làm gián đoạn tính liên tục của mô và vận chuyển trong ngày đến phòng thí nghiệm tại Trường Đại học Đại Nam để phân lập VKNS.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập vi khuẩn nội sinh

Mẫu cây được rửa dưới vòi nước đang chảy để loại bỏ bụi và đất. Cây được chia thành các phần thân, lá và rễ và được khử trùng bề mặt. Quy trình khử trùng như sau: cồn 70% (3 phút), nước Javen 6% (6 phút) và cồn 70% (30 giây), rửa 5 lần bằng nước cất vô trùng. Dùng kéo vô trùng cắt các mô thực vật đã khử trùng thành từng miếng 1cm, đặt trên các đĩa có môi trường thạch NB (Nutrient Broth) và ủ trong 6 ngày ở 30°C. Hiệu quả của quy trình khử trùng đã được khẳng định bằng cách lấy 100µl nước của lần rửa cuối cùng cấy lên môi trường NB và kiểm tra khả năng phát triển của vi sinh vật. Các khuẩn lạc của VKNS xuất hiện được cấy chuyển lên đĩa lên môi trường LB (Luria Broth) mới đến khi thu được khuẩn lạc có màu sắc và hình thái không đổi (Trung & cs., 2023).

2.2.2. Xác định khả năng tổng hợp polyphenol của các chủng vi khuẩn nội sinh

Các chủng VKNS chọn lọc được nuôi cấy trong môi trường LB lỏng. Các bình lên men chứa 40ml môi trường được khử trùng (15 phút, 121°C) và cấy 0,6ml môi trường chứa các chủng VKNS (OD600 = 0,8). VKNS được nuôi cấy trong 24 giờ ở 30°C trên máy lắc quay, 180 vòng/phút. Ly tâm canh trường tế bào để thu dịch nuôi vi khuẩn. Hàm lượng polyphenol tổng số trong dịch nuôi vi khuẩn được xác định bằng phương pháp Folin-Ciocalteu (Singleton & cs., 1999; Ayar-Sümer & cs., 2024). Cho vào bình định mức 100ml gồm: 60l nước cất, 1ml dịch nuôi vi khuẩn và 5ml thuốc thử Folin-Ciocalteu. Lắc nhẹ hỗn hợp và để ở nhiệt độ phòng trong hai phút. Sau đó thêm 15ml natri cacbonat 20% và thêm nước cất đến vạch 100ml và để ở nơi tối trong hai giờ. Sau thời gian này độ hấp thụ được đo ở $\lambda = 760\text{nm}$ trên máy quang phổ UV-Vis (U-5100, Hitachi, Nhật Bản).

Chất chuẩn được sử dụng là axit gallic (20-120 $\mu\text{g/ml}$). Xác định độ hấp phụ của dung dịch axit gallic theo qui trình như trên (thay 1ml dịch nuôi vi khuẩn bằng 1ml dung dịch axit gallic chuẩn). Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Giá trị độ hấp phụ được ghi nhận và tiến hành vẽ đường thẳng hiệu chuẩn $y = ax + b$ với y là độ hấp phụ, x là nồng độ axit gallic ($\mu\text{g GA/ml}$). Hàm lượng polyphenol tổng trong mẫu dịch nuôi vi khuẩn được là giá trị x từ đường chuẩn của axit gallic được biểu thị bằng μg axit gallic đương lượng (GAE) trong 1 ml dịch nuôi vi khuẩn.

2.2.3. Xác định hoạt tính của enzyme ngoại bào từ vi khuẩn nội sinh phân lập được

Khả năng sinh enzyme amylase của VKNS được tiến hành bằng cách nuôi cấy vi khuẩn trên môi trường chứa: 1% tinh bột hòa tan; 0,2% chiết xuất nấm men; 0,5% pepton; 0,05% MgSO_4 ; 0,05% NaCl ; 0,015% CaCl_2 và 2% agar (pH 7). Các chủng VKNS được cấy và ủ trên đĩa thạch ở 30°C trong 48 giờ. Sau đó, các đĩa được đổ ngập dung dịch iốt trong 1 phút và đổ lượng dư ra ngoài (Santos & Martins, 2003). Vòng sáng (halo) xung quanh khuẩn lạc vi khuẩn chứng tỏ khả năng sinh enzyme amylase của chúng. Hoạt tính amylase được đánh giá sơ bộ = Đường kính vòng Halo – đường kính khuẩn lạc.

Khả năng sản xuất enzyme cellulase được xác minh bằng cách cấy các chủng VKNS trên môi trường thạch LB có bổ sung 1% cơ chất CMC (Carboxymethyl Cellulose) ở 30°C trong 48 giờ (Prihatiningsih & cs., 2020). Khả năng sinh enzyme cellulase của các chủng vi khuẩn được xác định bằng sự xuất hiện của vòng halo trên môi trường với nguồn cơ chất CMC xung quanh khuẩn lạc, sử dụng thuốc thử lugol. Hoạt tính cellulase của các chủng phân lập được xác định định tính bằng cách đo đường kính vòng halo. Hoạt tính cellulase được đánh giá sơ bộ = Đường kính vòng Halo – đường kính khuẩn lạc.

Khả năng tạo ra enzyme protease ngoại bào của VKNS được phân tích bằng cách cấy các chủng VKNS trên đĩa môi trường thạch LB có bổ sung casein ở 30°C trong 48 giờ (Prihatiningsih & cs., 2020). Các dòng vi khuẩn có hoạt tính protease tạo vòng halo trên môi trường. Đo đường kính thủy phân để đánh giá sơ bộ hoạt tính protease của các dòng vi khuẩn. Hoạt tính protease được đánh giá sơ bộ = Đường kính vòng Halo – đường kính khuẩn lạc.

2.2.4. Xác định hàm lượng IAA

Khả năng sinh IAA của các chủng vi khuẩn được xác định theo phương pháp được mô tả bởi Trung & cs. (2023). Các chủng VKNS được nuôi qua đêm trong môi trường LB lỏng bổ sung 100 mg/l tryptophan ở 30°C. Hỗn hợp phản ứng gồm 1ml dịch sau ly tâm cho vào 2ml thuốc thử Salkowski. Phản ứng được lắc đều, ủ tối trong 20 phút và đo trên máy đo quang phổ ở bước sóng 530nm. Giá trị OD của mẫu được đối chiếu với đồ thị chuẩn để tính hàm lượng IAA trong dịch nuôi cấy theo đơn vị $\mu\text{m IAA/ml}$.

Đường chuẩn IAA được chuẩn bị bằng cách đo mật độ quang trên máy quang phổ UV-Vis (U-5100, Hitachi, Nhật Bản), ở độ hấp thụ 530nm so với nồng độ dung dịch IAA (Glickmann & Dessaux, 1995).

2.2.5. Hoạt tính kháng khuẩn của dịch nuôi tế bào

Để đánh giá hoạt tính chống oxy hóa và kháng khuẩn của dịch nuôi tế bào, dịch nuôi tế bào (không chứa tế bào) được làm khô lạnh và sử dụng trong nghiên cứu.

Vi khuẩn được nuôi trong môi trường lỏng (130 vòng/phút, 30°C, 24 giờ). Sau đó, môi trường được ly tâm ở tốc độ 10.000g trong 1 phút để tách tế bào vi khuẩn ra khỏi canh trường và dịch nuôi được lọc qua bộ lọc 0,45µm (Millipore). Sau đó, làm đông lạnh dịch lọc này ở -80°C qua đêm trước khi làm khô lạnh trên máy sấy đông khô phòng thí nghiệm (VaCo 5 & VACO 5-II, Zirbus - Germany). Hòa tan dịch nuôi tế bào đã được làm khô lạnh (CSL) trong metanol 95% để tạo ra các dung dịch có nồng độ 2,5 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml và 20 mg/ml.

Hoạt tính kháng khuẩn của CSL được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán đĩa. Các dung dịch CSL đã khử trùng được đặt vào các đĩa giấy lọc vô trùng có đường kính 5mm. Lấy 0,1ml canh trường (10^5 CFU/ml) từng chủng vi sinh vật thử nghiệm (gồm vi khuẩn Gram âm (*Pseudomonas aeruginosa* và *Escherichia coli*), Gram dương (*Bacillus subtilis*) và nấm sợi (*Mucor racemosus* và *Phanerochaete chrysosporium*) cấy trải riêng rẽ trên đĩa Petri vô trùng chứa 10 ml môi trường thạch LB. Sau đó, trên các đĩa thạch LB này, đặt các đĩa giấy lọc vô trùng chứa các dung dịch CSL với các nồng độ 2,5; 5; 10 và 20 mg/ml. Đối chứng dương là các đĩa giấy lọc chứa 5g gentamycin. Các đĩa được bảo quản ở 4°C trong hai giờ để cho chiết xuất thực vật khuếch tán và sau đó ủ ở 35°C trong 24 giờ. Sự xuất hiện của các vùng ức chế (bằng chứng về hoạt động kháng khuẩn) được đo bằng thước cặp Vernier (Patel & cs., 2023).

2.2.6. Thử nghiệm tính năng kích thích khả năng nảy mầm của hạt

Khả năng kích thích sự nảy mầm của hai loại cây: Cải xong (*Lepidium sativum*) và cây củ dền (*Beta vulgaris*) được đánh giá. Nồng độ CSL cao nhất như trên (20 mg/ml) được sử dụng để đánh giá khả năng kích thích nảy mầm của hạt.

Các chủng VKNS đơn lẻ có khả năng sinh chất polyphenol cao được sàng lọc khả năng kích thích sự nảy mầm của hạt giống trong điều kiện *in vitro* (dịch lọc vi khuẩn). Hạt giống được khử trùng bề mặt theo phương pháp được mô tả bởi Trung & cs. (2023). Hạt giống được lác đều trong cồn 70% (v/v, 1 phút), sau đó hạt tiếp tục được

khử trùng bằng dung dịch Javen 6% (v/v) trong 5 phút. Rửa lại bằng nước cất vô trùng 2-3 lần và làm khô trên giấy lọc vô trùng trong tủ hút.

Lấy 0,25ml của mỗi dịch lọc vô trùng thêm vào ống eppendorf 1,5ml vô trùng. Cho hạt giống đã được khử trùng bề mặt vào và ủ trong 60 phút. Sau đó, các hạt giống được lấy ra và cấy trên các đĩa petri chứa môi trường MS (Murashige & Skoog, 1962) có bổ sung 20 g/l sucrose và 7 g/l agar, pH = 5,8. Mẫu đối chứng được tiến hành tương tự, tuy nhiên dùng nước đã khử trùng để thay cho dịch lọc vi khuẩn.

Các đĩa được giữ thẳng đứng 3 ngày trong tủ nuôi ở nhiệt độ phòng ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) dưới ánh sáng 3.000lux và chu kỳ chiếu sáng 16 h/ngày. Thí nghiệm được thiết kế hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại cho mỗi chủng.

2.2.7. Định danh các chủng vi khuẩn nội sinh bằng phương pháp sinh học phân tử

Các chủng VKNS chọn lọc được nuôi trong môi trường LB lỏng (130 vòng/phút, 30°C, 24 giờ). Canh trường vi khuẩn được ly tâm thu tế bào vi khuẩn. Các tế bào này được tách DNA bằng cách sử dụng kit Rapid Bacteria Genomic DNA Isolation Kit (Biobasic, Canada) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nồng độ DNA được đo bằng máy NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific, USA).

Để xác định vi sinh vật, phản ứng PCR sử dụng mồi 27F (5'-TAACACATGCAAGTCGAACG-3') và 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') được thực hiện trong C1000 Touch™ Thermal Cycler (BIO-RAD). Chu trình nhiệt của phản ứng PCR gồm: 95°C trong 3 phút; 35 chu kỳ ở 94°C trong 15 giây, 55°C trong 30 giây; và 72°C trong 60 giây và bước kéo dài cuối cùng ở 72°C trong 5 phút. Mỗi phản ứng PCR được thực hiện với thể tích 50µl gồm: ~0,015µg DNA mẫu, 25µl 2× AmpliTaq Gold 360 Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA), 1µl mỗi mồi (10µM) và nước không có nuclease. Các sản phẩm PCR được phân tách bằng điện di trên gel agarose 1% với nhuộm ethidium bromide. Các sản phẩm PCR được giải trình tự tại công ty 1stBase (Singapore). Trình tự nucleotide được so sánh với các trình tự có trên NCBI bằng phần mềm BLAST.

2.2.8. Phân tích thống kê

Dữ liệu thí nghiệm được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm Excel và IRRISTAT 5.0. Dữ liệu được biểu diễn dưới dạng độ lệch chuẩn trung bình \pm (SD) của các mẫu ba lần. Đối với việc sản xuất polyphenol, sự khác biệt giữa các thí nghiệm được đánh giá bằng mô hình ANOVA một chiều và thử nghiệm Duncan ($P < 0,05$).

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn nội sinh

Từ các mẫu thực vật, chúng tôi đã phân lập được 07 chủng VKNS (LG1 đến LG7). Trong đó số lượng chủng VKNS thu được từ mẫu lá, thân, và rễ lần lượt là 02, 01 và 04 (Bảng 1). Tất cả các chủng vi khuẩn này được lưu trữ trên đĩa môi trường thạch LB và trong glycerol 20% ở -80°C .

Kết quả đánh giá khả năng tạo ra các chất polyphenol của các chủng vi khuẩn này cho thấy, tất cả các chủng phân lập được đều có tiềm năng sản xuất các chất polyphenol, trong đó các chủng vi khuẩn LG1 và LG7 có giá trị nồng độ hợp chất polyphenol cao nhất, lần lượt là 187,20 và 281,03mg GAE/l. Các chủng vi khuẩn còn lại (LG2-LG6) có nồng độ chất phenol dao động trong khoảng 17,52-36,75mg GAE/l.

Thêm vào đó, kết quả xác định hoạt tính của các enzyme ngoại bào cho thấy 04 chủng được kiểm tra sinh cellulase, 03 chủng sinh

amylase và 03 chủng sinh protease với các vòng phân giải khác nhau, đường kính từ 2-15mm (Bảng 1). Trong số các chủng phát hiện thấy có sinh enzyme thủy phân, chỉ có chủng LG4 sinh cả 3 loại enzyme được kiểm tra, đường kính dao động từ 3-5mm.

Hơn nữa, kết quả nghiên cứu cũng cho thấy hàm lượng IAA được tổng hợp giữa các dòng vi khuẩn khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% (Hình 1).

Dòng VKNS LG1 và LG7 có khả năng tổng hợp IAA cao, lần lượt là $4,62 \pm 0,03$ mg/l và $3,33 \pm 0,01$ mg/l. Các dòng VKNS khác, LG2 đến LG6, cũng có khả năng tổng hợp IAA nhưng nồng độ thấp hơn (từ $1,05 \pm 0,14$ đến $1,61 \pm 0,04$ mg/l).

Kết quả định danh bằng phương pháp sinh học phân tử cho thấy hai chủng LG1 và LG7 được xác định là hai chủng gần với hai chủng lần lượt là *Bacillus cereus* RW075 (mã định danh MH010126.1, độ tương đồng là 99,01%) và *Bacillus cereus* 5KN (mã định danh OP777497.1, độ tương đồng là 98,48%). Các trình tự nucleotide thu được của hai chủng LG1 và LG7 được lưu trên ngân hàng Genbank với mã định danh lần lượt là PP461828 và PP461829.

3.2. Hoạt tính kháng khuẩn của dịch nuôi từ các vi khuẩn nội sinh được chọn

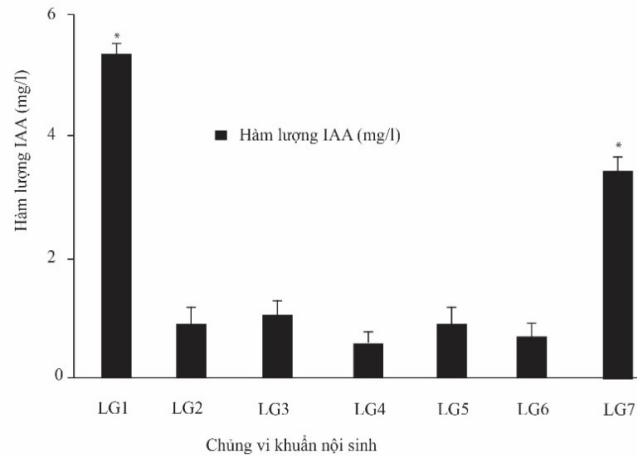
Hoạt tính kháng khuẩn của CSL thu được sau khi nuôi cấy các chủng VKNS LG1 và LG7 bằng phương pháp khuếch tán đĩa (Hình 2).

Bảng 1. Đặc tính của các chủng vi khuẩn nội sinh phân lập từ cây tầm ma

Chủng vi khuẩn nội sinh	Nguồn phân lập	Nồng độ polyphenol (mg GAE/l)	Đường kính vòng phân giải (mm)		
			CMC	Tinh bột	Casein
LG1	Lá	$187,81^b \pm 0,05$	6	5	-
LG2	Rễ	$35,89^a \pm 0,06$	-	-	3
LG3	Rễ	$18,20^a \pm 0,05$	-	3	-
LG4	Lá	$34,19^a \pm 0,04$	3	5	3
LG5	Rễ	$36,75^a \pm 0,07$	-	-	-
LG6	Thân	$17,52^a \pm 0,06$	10	-	8
LG7	Rễ	$281,03^b \pm 0,05$	15	2	-

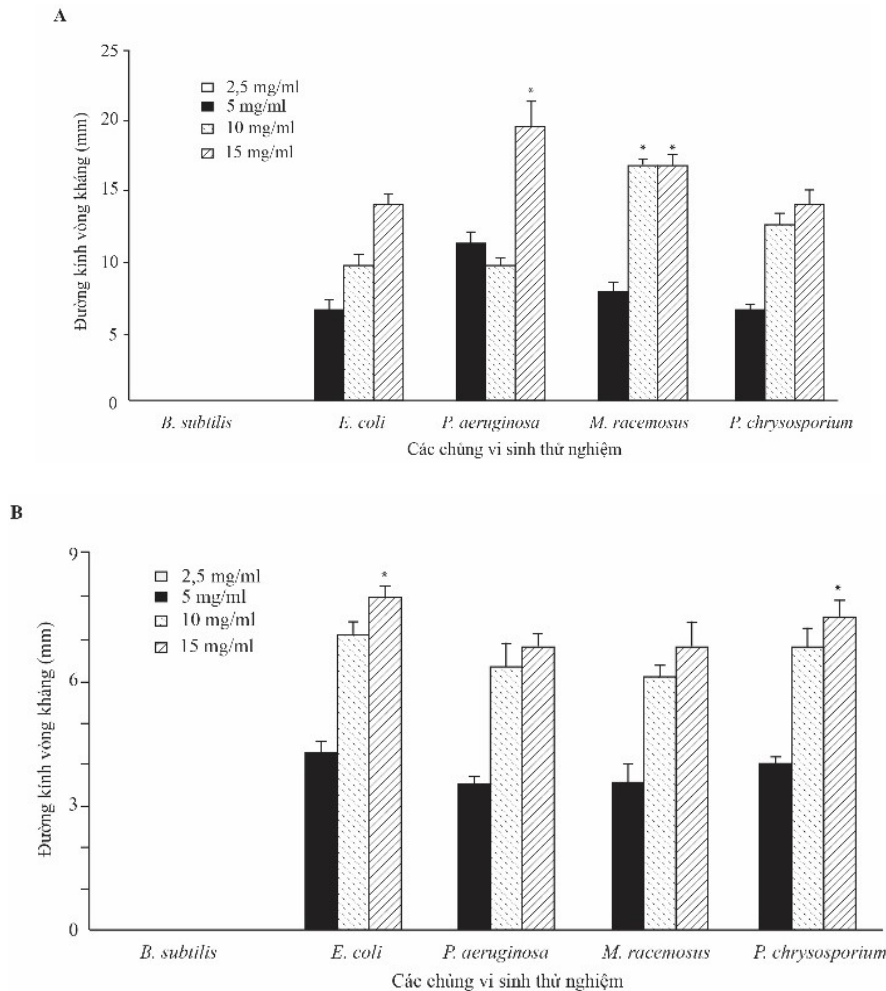
Ghi chú: Giá trị là trung bình \pm độ lệch chuẩn (thanh sai số) cho ba lần lặp lại. Trong cùng một cột, các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa ($P < 0,05$) về khả năng tổng hợp polyphenol giữa các chủng (thử nghiệm Duncan).

Đánh giá khả năng sinh polyphenol và kích thích sinh trưởng thực vật của vi khuẩn nội sinh phân lập từ cây tầm ma



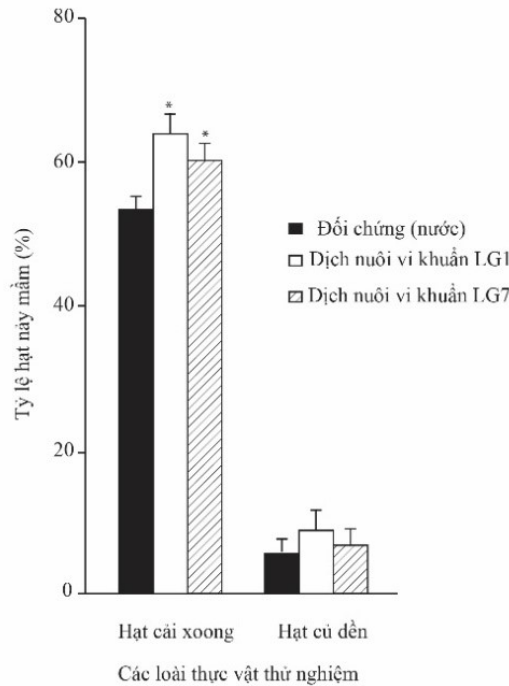
Ghi chú: Giá trị là trung bình \pm độ lệch chuẩn (thanh sai số) cho ba lần lặp lại. Dấu sao cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa ($P < 0,05$) về khả năng tổng hợp IAA giữa các chủng (thử nghiệm Duncan).

Hình 1. Khả năng tổng hợp IAA của các chủng vi khuẩn nội sinh phân lập từ cây tầm ma



Ghi chú: Giá trị là trung bình \pm độ lệch chuẩn (thanh sai số) cho ba lần lặp lại. Dấu sao cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa ($P < 0,05$) về khả năng kháng vi sinh vật giữa các nồng độ thử (thử nghiệm Duncan).

Hình 2. Hoạt tính kháng một số chủng vi sinh của dịch nuôi vi khuẩn LG1 (A) và LG7 (B)



Ghi chú: Giá trị là trung bình \pm độ lệch chuẩn (thanh sai số) cho ba lần lặp lại. Dấu sao cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa ($P < 0,05$) về khả năng kích thích sự nảy mầm của các dịch nuôi vi khuẩn lên các loài thực vật khác nhau (thử nghiệm Duncan).

Hình 3. Ảnh hưởng của dịch nuôi tế bào vi khuẩn nội sinh LG1 và LG7 đến sự nảy mầm của hạt giống

Kết quả nghiên cứu của các giải pháp được thử nghiệm cho thấy dịch nuôi của cả hai chủng LG1 và LG7 kháng hiệu quả đối với vi khuẩn gram âm (*Pseudomonas aeruginosa* và *Escherichia coli*) và nấm sợi (*Mucor racemosus* và *Phanerochaete chrysosporium*). Tuy nhiên, các dịch nuôi được thử nghiệm không có tác dụng đối với chủng Gram dương (*Bacillus subtilis*).

3.3. Khả năng kích thích sinh trưởng thực vật của dịch nuôi vi khuẩn nội sinh

Hai chủng được kiểm tra cho thấy khả năng thúc đẩy nảy mầm tốt hơn so với đối chứng (chỉ sử dụng nước) (Hình 3). Dịch nuôi có nguồn gốc từ chủng LG1 có tác dụng lớn nhất đối với hạt cải xoong, tăng 13% so với đối chứng (nước), mức tăng nhỏ hơn được quan sát thấy với dịch nuôi từ chủng LG7, tăng 12%. Ngoài ra, hạt cây củ dền phát triển với số lượng lớn hơn trong môi trường nước; tuy nhiên, mức tăng này là tương tự đối với tất cả các dịch nuôi được thí nghiệm.

4. THẢO LUẬN

Cây tầm ma được biết đến là cây chủ của nhiều loại vi sinh vật nội sinh. Krimi & cs. (2016) phân lập các VKNS từ cây tầm ma, trong đó các loài được xác định theo phân tích BLAST về trình tự 16S rDNA của nó đều là đại diện của chi *Bacillus* (*B. toyonensis*/*B. thuringiensis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. methylotrophicus*). Các nhà nghiên cứu đã thử nghiệm khả năng của chúng về việc cải thiện sự phát triển và hoạt động của cây cà chua chống lại các tác nhân gây bệnh như loài *Agrobacteria* và *Pectobacter*, trong đó *Bacillus methylotrophicus* được xác định một trong những chủng có lợi (Krimi & cs., 2016). Hơn nữa, Naoufal & cs. (2018) đã phân lập được 54 vi sinh vật nội sinh từ cây tầm ma và cho thấy chủng *Paenibacillus polymyxa* (còn được gọi là *Bacillus polymyxa*) thể hiện tiềm năng lớn trong việc sử dụng làm tác nhân kiểm soát sinh học chống lại nấm *Fusarium*, một tác nhân gây

bệnh héo ở thực vật. Ngoài ra, Toubal & cs. (2018) đã phân lập và xác định được 11 loài VKNS sống ở cây tầm ma. Trong số đó, có 4 loài thuộc chi *Bacillus*: *B. anthracis*, *B. megaterium*, *B. pumilus* và *B. cereus*. Marchut-Mikołajczyk & cs. (2023) đã phân lập được 20 chủng VKNS từ cây tầm ma và cho thấy 3 chủng *Bacillus* có khả năng sản xuất chất hoạt động bề mặt sinh học và polyphenol lớn nhất. Những phát hiện này tương quan với nghiên cứu của chúng tôi, trong đó xác định hai chủng *Bacillus cereus* là các VKNS của cây tầm ma được phân lập từ lá và rễ theo trình tự 16S rDNA. Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào về VKNS của cây tầm ma tập trung vào sản xuất polyphenol, và chưa có nghiên cứu về cơ chế của quá trình giúp tăng hiệu quả sản xuất polyphenol bằng VKNS.

Vi khuẩn thường không được nghiên cứu về quá trình sinh tổng hợp các hợp chất polyphenol vì chúng không được coi là đơn vị sản xuất tự nhiên của các hợp chất này và yêu cầu sử dụng các con đường tổng hợp nhân tạo (Milke & cs., 2018). Polyphenol (axit phenolic, flavonoid, stilben, lignan) được biết là có tác dụng ức chế sự phát triển của vi khuẩn và các vi khuẩn khác bằng cách làm hỏng thành tế bào và thay đổi con đường trao đổi chất, dẫn đến tế bào bị chết. Đây là vấn đề chính hạn chế làm giảm hiệu suất của việc sản xuất các chất này bằng vi sinh vật và do đó, các bài báo khoa học về chủ đề này rất ít (Efenberger & cs., 2021). Kết quả của chúng tôi cho thấy VKNS từ loài *Bacillus* có khả năng tổng hợp các hợp chất polyphenol *in vitro* trong khoảng 17,52-281,03mg GAE/l và chủng LG7 có hàm lượng polyphenol trong dịch nuôi là cao nhất. Phát hiện đó cho thấy tiềm năng của chủng LG7 là đối tượng để tối ưu hóa quá trình sản xuất polyphenol.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy cả hai chủng LG1 và LG7 đều có khả năng tạo ra amylase và cellulase, đây là những enzyme thủy phân có ý nghĩa công nghiệp, phù hợp với các báo cáo trước đây về chi *Bacillus* nội sinh (Rahman & cs., 2017). *Bacillus cereus* nổi tiếng với hoạt tính enzyme, các đặc điểm thúc đẩy

tăng trưởng thực vật, phân hủy sinh học dầu, cũng như là mầm bệnh từ thực phẩm (Bhutani & cs., 2021). Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào chứng minh được tiềm năng của *Bacillus cereus* nội sinh trong việc sản xuất polyphenol. Đối với các chủng VKNS *Bacillus cereus* phân lập được trong nghiên cứu này, nồng độ polyphenol cao nhất đạt được sau 48 giờ đối với *B. cereus* LG7 (1,652 mol/l).

García & cs. (2023) nghiên cứu ba chủng nấm nội sinh sản xuất phenol đã chứng minh rằng polyphenol ảnh hưởng đến sự phát triển của thực vật chủ yếu thông qua áp lực môi trường, khả năng phòng vệ và bảo vệ chống lại nhiều loại sâu bệnh. Vì các điều kiện thí nghiệm cực kỳ thuận lợi cho sự phát triển của thực vật và thực vật không bị sâu bệnh hại nên chức năng bảo vệ của polyphenol có thể không phải là cơ chế chính trong trường hợp này. Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy khả năng kích thích sự nảy mầm hạt cải xoong so với đối chứng của dịch nuôi vi khuẩn LG1. Có thể do hợp chất IAA trong dịch nuôi kích thích sự nảy mầm và sự phát triển của thực vật. Giả thiết này phù hợp với các nghiên cứu trước đây cho thấy IAA có vai trò kích thích tăng trưởng thực vật (Trung & cs., 2023).

5. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phân lập được 07 chủng VKNS từ cây tầm ma. Các chủng VKNS được phân lập đều có khả năng tạo ra chất polyphenol, nhưng chỉ có hai chủng, LG1 và LG7 (được xác định lần lượt là *Bacillus cereus* và *Bacillus mycooides*), cho thấy khả năng tạo ra nồng độ polyphenol khá cao. Thêm vào đó, hai chủng LG1 và LG7 cũng cho thấy khả năng tổng hợp enzyme ngoại bào (cellulase, amylase, và protease), khả năng tổng hợp chất kích thích sinh trưởng thực vật (IAA). Hơn nữa, dịch nuôi của hai chủng LG1 và LG7 cho thấy khả năng kháng được một số vi sinh vật tham khảo và kích thích sự nảy mầm của hạt giống. Các kết quả này cho thấy tiềm năng ứng dụng của các chủng vi LG1 và LG7 trong sản xuất polyphenol phục vụ nhu cầu của xã hội.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ayar-Sümer E.N., Verheust Y., Özçelik B. & Raes K. (2024). Impact of lactic acid bacteria fermentation based on biotransformation of phenolic compounds and antioxidant capacity of mushrooms. *Foods*. 13: 1616.
- Bhutani N., Maheshwari R., Kumar P., Dahiya R. & Suneja P. (2021). Bioprospecting for extracellular enzymes from endophytic bacteria isolated from *Vigna radiata* and *Cajanus cajan*. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*. 9(3): 26-34.
- Chen Y., Hu B., Xing J. & Li C. (2021). Endophytes: the novel sources for plant terpenoid biosynthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 105(11): 4501-4513.
- Dhouibi R., Affes H., Ben Salem M., Hammami S., Sahnoun Z., Zeghal K.M. & Ksouda K. (2020). Screening of pharmacological uses of *Urtica dioica* and others benefits. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 150: 67-77.
- Efenberger-Szmechtyk M., Nowak A. & Czynowska A. (2021). Plant extracts rich in polyphenols: antibacterial agents and natural preservatives for meat and meat products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 61(1): 149-178.
- García-Latorre C., Rodrigo S., Marin-Felix Y., Stadler M. & Santamaria O. (2023). Plant-growth promoting activity of three fungal endophytes isolated from plants living in dehesas and their effect on *Lolium multiflorum*. *Scientific Reports*. 13: 7354.
- Glickmann E. & Dessaux Y. (1995). A Critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 61: 793-796.
- Krimi Z., Alim D., Djellout H., Tafifet L., Mohamed-Mahmoud F. & Raio A. (2016). Bacterial endophytes of weeds are effective biocontrol agents of *Agrobacterium* spp., *Pectobacterium* spp., and promote growth of tomato plants. *Phytopathologia Mediterranea*. 55: 184.
- Milke L., Aschenbrenner J., Marienhagen J. & Kallscheuer N. (2018). Production of plant-derived polyphenols in microorganisms: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 102: 1575–1585.
- Marchut-Mikołajczyk O., Chlebicz M., Kawecka M., Michalak A., Prucnal F., Nielipinski M., Filipek J., Jankowska M., Perek Z., Drożdżyński P., Rutkowska N. & Otlewska A. (2023). Endophytic bacteria isolated from *Urtica dioica* L.-preliminary screening for enzyme and polyphenols production. *Microbial Cell Factories*. 22: 169.
- Murashige T. & Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology plant*. 15: 473-497.
- Naoufal D., Ilham B., Amine H. & Khadija O. (2018). Isolation and characterisation of endophytic strain *Paenibacillus polymyxa* SR19 from *Urtica dioica* and the study of their effect against *Fusarium oxysporum* f. sp tomato. *Annual Research & Review in Biology*. 29(4): 1-8.
- Patel S., Dubey A., Kumar G.A. & Sekhar Ghosh N. (2023). Evaluation of antimicrobial activity of *Calotropis gigantea* extracts on two main skin infection causing bacteria-*Escherichia Coli* and *Staphylococcus aureus*. *IJFANS International Journal of Food and Nutritional Sciences*. 12(1): 145-156.
- Prihatiningsih N., Arwiyanto T., Hadisutrisno B. & Widada J. (2020). Characterization of *Bacillus* spp. from the rhizosphere of potato granola variety as an antibacterial against *Ralstonia solanacearum*. *Biodiversitas*. 21(9): 4199-4204.
- Rahman L., Shinwari Z.K., Iqar I., Rahman L. & Tanveer F. (2017). An assessment on the role of endophytic microbes in the therapeutic potential of *Fagonia indica*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 16(1): 53.
- Ruan Q., Patel G., Wang J., Luo E., Zhou W., Sieniawska E., Hao X. & Kai G. (2021). Current advances of endophytes as a platform for production of anti-cancer drug camptothecin. *Food and Chemical Toxicology*. 151: 112113.
- Repajić M., Cegledi E., Zorić Z., Pedisić S., Garofulić I.E., Radman S., Palčić I. & Dragović-Uzelac V. (2021). Bioactive compounds in wild nettle (*Urtica dioica* L.) leaves and stalks: polyphenols and pigments upon seasonal and habitat variations. *Foods*. 10(1): 190.
- Singleton V.L., Orthofer R. & Lamuela-Raventos R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymology*. 299: 152-178.
- Santos E.D.O. & Martins M.L.L. (2003). Effect of the medium composition on formation of amylase by *Bacillus* sp. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 46(1): 129-134.
- Santoyo G., Moreno-Hagelsieb G., del Carmen O-M. & Glick B.R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*. 183: 92-99.
- Shaw J.J., Spakowicz D.J., Dalal R.S., Davis J.H., Lehr N.A., Dunican B.F., Orellana E.A., Narváez-Trujillo A. & Strobel S.A (2015). Biosynthesis and genomic analysis of medium-chain hydrocarbon production by the endophytic fungal isolate

- Nigrograna mackinnonii* E5202H. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 99(8): 3715-3728.
- Sharma P. & Kumar S. (2021). Bioremediation of heavy metals from industrial effluents by endophytes and their metabolic activity: recent advances. *Bioresource Technology*. 339(5): 125589
- Srinivasa C., Mellappa G., Patil S.M., Ramu R., Shreevatsa B., Dharmashekar C., Kollur S.P., Syed A. & Shivamallu C. (2022). Plants and endophytes—a partnership for the coumarin production through the microbial systems. *Mycology*. 13(4): 243-56.
- Salmi D., Riou C., Issaoui M. & Titouche Y. (2021). Antibacterial and antioxidant activities of endophytic fungi and nettle (*Urtica dioica* L.) leaves as their host. *Cellular and Molecular Biology*. 67(3): 3.
- Sarjono P.R., Putri L.D., Budiarti C.E., Mulyani N.S., Ngadiwiyana N., Ismiyanto I., Kusriani D. & Prasetya Nor. (2019). Antioxidant and antibacterial activities of secondary metabolite endophytic bacteria from papaya leaf (*Carica papaya* L.). *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. 509(1): 012112.
- Trung D.Q., Tri N.T. & Van D.M. (2023). Application of endophytic bacterium *Bacillus velezensis* BTR11 to control bacterial leaf blight disease and promote rice growth. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*. 33: 97.
- Toubal S., Bouchenak O., Elhaddad D., Yahiaoui K., Boumaza S. & Arab K. (2018). MALDI-TOF MS detection of endophytic bacteria associated with great nettle (*Urtica dioica* L.), grown in Algeria. *Polish Journal of Microbiology*. 67(1): 67-72.
- Tharmasothirajan A., Wellfonder M. & Marienhagen J. (2021). Microbial polyphenol production in a biphasic process. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*. 9(51): 17266-17275.