

NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG DIỆT KHUẨN *IN VITRO* CỦA DỊCH CHIẾT TỎI (*ALLIUM SATIVUM* L.) ĐỐI VỚI *E. COLI* GÂY BỆNH VÀ *E. COLI* KHÁNG AMPICILLIN, KANAMYCIN

Nguyễn Thanh Hải^{1*}, Bùi Thị Tho²

¹ Khoa Công nghệ sinh học, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội;

² Khoa Thú y, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội

Email*: nthaicnsh@hua.edu.vn

Ngày gửi bài: 26.07.2013

Ngày chấp nhận: 26.09.2013

TÓM TẮT

Nghiên cứu được tiến hành nhằm kiểm tra khả năng diệt khuẩn của dịch chiết tỏi (*Allium sativum* L.) trong 7 dung môi khác nhau (nước cất, acid acetic 5%, ethanol 35%, ethanol 70%, methanol 70%, axeton 70%, axetonitrile 70%) đối với vi khuẩn *E. coli* (1 chủng *E. coli* O₄₄ phân lập từ phân gia cầm bị bệnh tiêu chảy; chủng *E. coli* Top 10 đã có plasmid kháng đơn thuốc: *E. coli* Top 10 pJET 1.2/blunt kháng ampicillin và *E. coli* Top 10 pPS1 kháng kanamycin). Kết quả cho thấy cả 7 loại dung môi đều có thể thu được dịch chiết tỏi có khả năng tiêu diệt các chủng *E. coli* trên. Trong đó có 3 dung môi dùng để thu dịch chiết cho kết quả diệt khuẩn đạt độ mẫn cảm cao (đường kính vòng vô khuẩn ≥ 20 mm) là: axetonitrile 70%, axit axetic 5%, axeton 70%.

Từ khóa: Dịch chiết tỏi, diệt khuẩn, *E. coli* O₄₄, *E. coli* Top 10, pJET 1.2/blunt, pPS1, kháng kháng sinh

In Vitro Anti-Bacterial Activity of Garlic (*Allium Sativum* L.) Extract in *E. coli* Pathogenic Strain and Antibiotic Resistant Strains of *E. coli*

ABSTRACT

The present study was carried out to examine anti-bacterial effects of garlic extract obtained from 7 different solvents (distilled water, acid acetic 5%, ethanol 35%, ethanol 70%, methanol 70%, acetone 70%, acetone nitrile 70%) on *E. coli* (1 pathogenic strain *E. coli* O₄₄ isolated from fecal samples of cholera infected chicken; *E. coli* strain Top 10 with plasmid: *E. coli* Top 10 pJET 1.2/blunt resistant to ampicillin and *E. coli* Top 10 pPS1 resistant to kanamycin). Results have identified that all 7 different garlic extracts had anti-bacterial effects against *E. coli*. Garlic extracts obtained from acetonitrile 70%, acetic acid 5%, and 70% acetone) showed high anti-bacterial activity (inhibition zone diameters ≥ 20 mm)

Keywords: Anti-bacterial effect, garlic extract, *E. coli* O₄₄, *E. coli* Top 10, pJET 1.2/blunt, pPS1.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện tượng kháng kháng sinh của vi khuẩn gây bệnh hiện đang trở thành vấn đề lớn trên toàn thế giới. Vi khuẩn kháng thuốc không chỉ làm giảm thậm chí mất hiệu lực điều trị bệnh của vật nuôi và người, mà còn làm ô nhiễm môi trường sống, ảnh hưởng đến chất lượng cuộc sống cộng đồng. Các chất có nguồn gốc tự nhiên là một nguồn lợi đáng kể để nghiên cứu và sản xuất thuốc thay thế các chất hóa học tổng hợp (Cos et al., 2006; Solanki, 2010.). Thảo dược đang ngày càng chứng minh vai trò quan trọng

của mình trong nền công nghiệp dược phẩm như là một giải pháp an toàn sinh học thay thế cho các thuốc hóa học tổng hợp (Mahesh et al., 2008). Thảo dược được ưa chuộng bởi tính an toàn sinh học, không có hay ít có tác dụng phụ, thậm chí chưa tìm thấy vi khuẩn kháng thuốc (Seyyednejad et al., 2010).

Tỏi là một thảo dược quý có chứa kháng sinh thực vật với rất nhiều ưu điểm. Trong tỏi, ngoài chất allicin - kháng sinh thảo mộc rất mạnh, còn chứa các hợp chất sulphur và polyphenol có nhiều tác dụng sinh học khác (Vũ Xuân Quang, 1993;

Bùi Thị Tho và Nguyễn Thị Thanh Hà, 2009; Rahman et al., 2012; Gull et al., 2012). Tỏi đã được sử dụng nhiều trong phòng và trị bệnh ở người và vật nuôi, theo cách truyền thống. Gần đây, không chỉ ở Việt Nam mà nhiều nước trên thế giới đã chiết tách và sử dụng những hoạt chất của tỏi như những dược phẩm quý trong y học và thú y (Đỗ Tất Lợi, 1999; Bùi Thị Tho và Nguyễn Thị Thanh Hà, 2009). Mục tiêu của nghiên cứu này là tìm ra các dung môi hữu cơ có khả năng hòa tan tốt phytocid có trong tỏi, ngoài ra còn nghiên cứu ảnh hưởng của dịch chiết đối với *E. coli* Top 10 có chứa có plasmid kháng đơn thuốc (ampicillin và kanamycin).

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

+ Giống tỏi trắng - tỏi ta (*Allium. sativum* L.) được trồng vào vụ đông tại Kinh Môn - Hải Dương, thu hoạch, phơi khô và bảo quản trong nhà nơi khô thoáng.

+ Dịch chiết của tỏi trong các dung môi khác nhau (nước cất, acid acetic 5%, ethanol 35%, ethanol 70%, methanol 70%, axeton 70%, axetonitrile 70%).

+ Vi khuẩn *E. coli* O₄₄ phân lập từ phân gia cầm bị bệnh tiêu chảy do bộ môn vi sinh vật truyền nhiễm Khoa Thú y Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội cung cấp.

+ Vi khuẩn *E. coli* Top 10 của hãng Invitrogen chứa plasmid pJET 1.2/blunt có gen kháng ampicillin của hãng Fermentas (*E. coli* Top 10 pJET 1.2/blunt) và vi khuẩn *E. coli* Top 10 của hãng Invitrogen chứa plasmid pPS1 có gen kanamycin của Cornell University (*E. coli* Top 10 pPS1), được bảo quản trong tủ -80 °C, do bộ môn CNSH thực vật cung cấp.

+ Giấy tẩm kháng sinh do công ty TNHH Nam Khoa sản xuất đạt tiêu chuẩn quốc tế (ampicillin 10µg; kanamycin 30µg).

+ Môi trường Luria-Bertani (LB) dạng lỏng, được hấp khử trùng trong các bình tam giác để nuôi cấy thu dịch khuẩn.

+ Môi trường LB rắn, được hấp tiệt trùng để nguội tới 40⁰- 50⁰C, đổ vào đĩa petri có đường kính 10cm, với độ dày là 4 ± 0,2 mm.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

+ *Thu dịch chiết tỏi*: bóc bỏ vỏ lụa thu ánh tỏi (*Bulbus alli*), nghiền mịn trong các dung môi hữu cơ theo tỷ lệ 1:1 (1g tỏi: 1ml dung môi), dịch này được bảo quản 2 giờ ở nhiệt độ phòng, lọc qua gạc. Dung dịch chiết được siêu âm trong 30 phút ở điều kiện lạnh. Tiếp tục li tâm với tốc độ 3500 vòng/phút trong 20 phút. Hút lấy dịch trong, mang đi cô quay hút chân không để loại bỏ hoàn toàn dung môi. Dịch chiết đã được loại bỏ dung môi được bảo quản trong tủ mát 4⁰C.

+ *Nuôi cấy vi khuẩn E.coli trên môi trường rắn và lỏng*

Vi khuẩn *E. coli* được cấy vạch trong môi trường LB đặc, trên đĩa petri ủ 37⁰C/24h, để chọn khuẩn lạc đơn điển hình. Khuẩn lạc đơn được nuôi cấy trong bình tam giác với môi trường LB lỏng, đặt trong tủ bảo ôn ở 37⁰C, với tốc độ lắc 200 vòng/phút trong 12 - 14h; thu dịch khuẩn (mật độ vi khuẩn phải đạt 10⁸ tế bào/ml là đạt chuẩn).

Xác định mật độ vi khuẩn

Mật độ vi khuẩn sau khi nuôi cấy trong môi trường LB lỏng được xác định theo phương pháp đo mật độ quang (OD) ở bước sóng λ= 600nm.

Kiểm tra tác dụng diệt khuẩn của các dịch chiết bằng *phương pháp kháng sinh đồ khuếch tán trên đĩa thạch* của Kirby-Bauer.

Các thao tác được thực hiện trong tủ cấy vô trùng. Khi mật độ vi khuẩn đạt 10⁸tế bào/ml, lắc đều bình chứa vi khuẩn, dùng pipet man hút 100µl canh khuẩn nhỏ vào giữa đĩa thạch, dùng que thủy tinh tráng đều cho đến khi mặt thạch khô. Sau 15 phút đục lỗ trên mặt thạch với đường kính 6mm/lỗ đục cách nhau khoảng 20mm. Mỗi lỗ thạch, nhỏ 100µl dịch chiết, đặt đĩa vào tủ ấm ở 37⁰C/24h đọc kết quả bằng cách đo đường kính vòng vô khuẩn, rồi tính số bình quân.

2.3 Phương pháp xử lý số liệu

Các thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên và được lặp lại 3 lần. Số liệu thu được xử lý thống kê sinh học bằng phần mềm Excel 2007.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

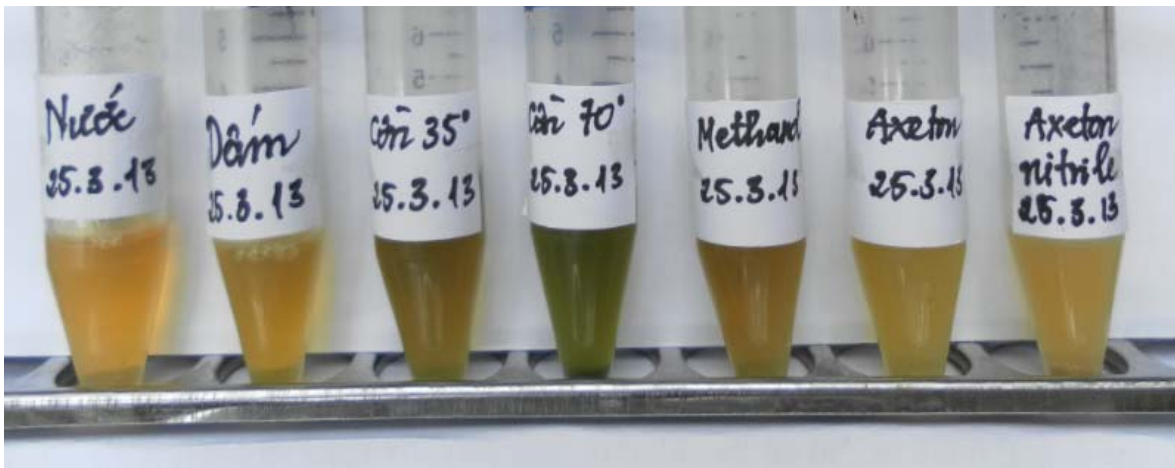
3.1. Thu dịch chiết tỏi trên các loại dung môi khác nhau

Kết quả thu dịch chiết tỏi trong 7 loại dung môi cho thấy, cùng một tỷ lệ pha loãng nhưng dịch chiết thu được từ các dung môi lại có các màu sắc và mùi vị khác nhau. Các dịch chiết tỏi thu được có màu sắc biến đổi từ vàng nhạt đến vàng đậm (Hình 1). Trong các loại dung môi đã sử dụng thì ethanol cho màu sắc đậm hơn các dung môi khác (nồng độ ethanol càng cao màu sắc càng đậm).

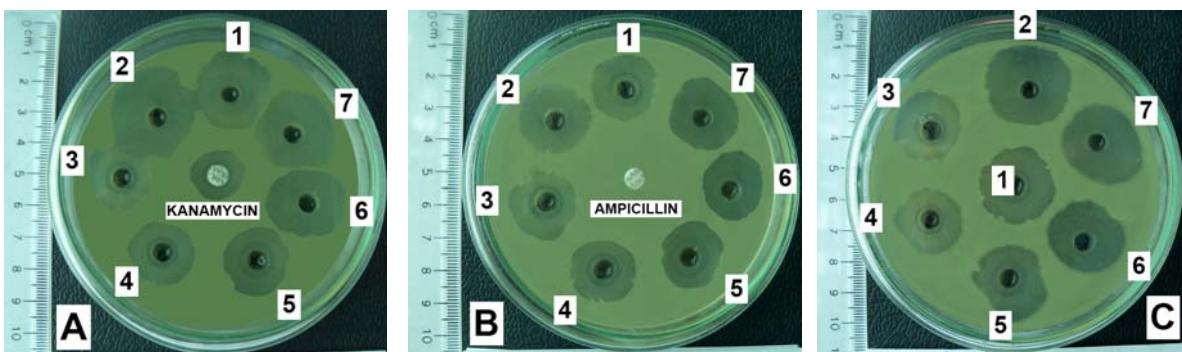
3.2. Kiểm tra tác dụng tiêu diệt vi khuẩn *E.coli* của các dịch chiết tỏi

3.2.1. Tác dụng tiêu diệt vi khuẩn của dịch chiết tỏi trên *E.coli* O₄₄ gây bệnh

Mẫu dịch chiết tỏi thu được từ thí nghiệm 1, được sử dụng để đánh giá khả năng diệt khuẩn *E.coli* O₄₄ gây bệnh, bằng phương pháp khuếch tán trên thạch. Kết quả được thể hiện trên hình 2 và bảng 1. Kết quả cho thấy tất cả 7 loại dịch chiết của tỏi trong các dung môi khác nhau đều có khả năng tiêu diệt *E.coli* O₄₄ gây bệnh, đường



Hình 1. Dịch chiết tỏi thu được



Hình 2. Khả năng tiêu diệt vi khuẩn *E.coli* O₄₄ của các dịch chiết tỏi
(Dịch chiết tỏi trong các dung môi: 1 - nước cất, 2 - axit axetic 5%, 3 - ethanol 35%,
4 - ethanol 70%, 5 - methanol 70%, 6 - axeton 70%, 7 - axetonitrile 70%)

Bảng 1. Tác dụng tiêu diệt vi khuẩn *E.coli* O₄₄ gây bệnh của các dịch chiết tảo *in vitro*

Đường kính vòng vô khuẩn (mm)								
Dung môi chiết xuất						Giấy tẩm kháng sinh		
Nước	Axit axetic 5%	Ethanol 35%	Ethanol 70%	Methanol 70%	Axeton 70%	Axetonitrile 70%	Kanamycin 30µg/đĩa	Ampicillin 10 µg/đĩa
20,8 ^b ±0,91	23,4 ^a ±1,08	18,8 ^c ±0,57	19,1 ^c ±0,55	19,7 ^{bc} ±0,84	21,3 ^b ±0,97	24,1 ^a ±0,55	15,0 ^d ±0,56	0

Ghi chú: a,b,c,d trên cùng một hàng chỉ ra sự khác nhau có ý nghĩa về mặt thống kê $P < 0,05$

kính vòng vô khuẩn bình quân dao động từ 18,8mm (với dung môi ethanol 35%) đến 24,1mm (với dung môi axetonitrile 70%). Theo nghiên cứu của tác giả Srinivasan et al. (2009), thì dịch chiết tảo trong nước ở các pH khác nhau (5,8 - 9) có tác dụng tiêu diệt vi khuẩn *E.coli* có độ dao động lớn (đường kính vòng vô khuẩn giao động từ 12 - 33,0mm); còn tác giả Sana Mukhtar et al. (2012) khi nghiên cứu trên chủng *E.coli* (ATCC 25922) với dung môi là ethanol ở các nồng độ khác nhau cho đường kính vòng vô khuẩn từ 18,0 - 22,0mm.

Với 3 dung môi phổ thông (nước, ethanol 35% và acid acetic) thì dịch chiết của tảo trong acid acetic 5% cho vòng vô khuẩn trung bình lớn nhất, đạt độ mẫn cảm cao. Dựa trên phân loại về độ mẫn cảm của vi khuẩn, còn có 2 loại dịch chiết tảo khác cũng đạt độ mẫn cảm cao (đường kính vòng vô khuẩn ≥ 20 mm) theo thứ tự lần lượt là axetonitrile 70%, axeton 70%.

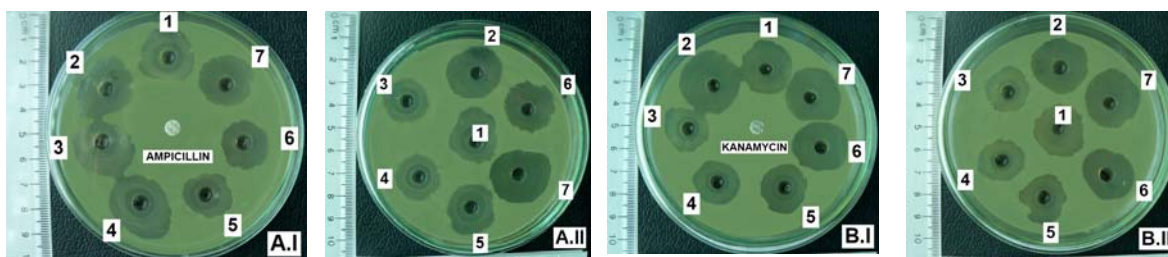
Dịch chiết của tảo có tác dụng tiêu diệt vi khuẩn tốt hơn kanamycin. Với kanamycin,

đường kính vòng vô khuẩn chỉ đạt 15,0mm trong khi đó đường kính vòng vô khuẩn của dịch chiết tảo thấp nhất cũng là 18,8 mm. Sự chênh lệch này có ý nghĩa thống kê sinh học. Trong thí nghiệm, vi khuẩn *E.coli* O₄₄ gây bệnh đã kháng lại ampicillin (không có vòng vô khuẩn xem ảnh B, Hình 2).

3.2.2. Tác dụng tiêu diệt vi khuẩn của các loại dịch chiết tảo trên *E.coli* chứa plasmid có gen kháng kháng sinh

Kết quả kiểm tra tác dụng của 7 loại dịch chiết tảo trên *E. coli* chứa plasmid có gen kháng thuốc có chứa gen kháng thuốc (*E.coli* Top 10 pJET 1.2/blunt kháng ampicillin và *E. coli* Top 10 pPS1 kháng kanamycin) được thể hiện ở hình 3 và bảng 2. Với vi khuẩn chứa gen kháng thuốc, kết quả cho thấy đường kính vòng vô khuẩn bình quân đều lớn hơn so với chủng *E.coli* O₄₄ gây bệnh ở cả 7 loại dịch chiết của tảo.

Đường kính vòng vô khuẩn bình quân của chủng *E.coli* có chứa 2 loại plasmid khác nhau



Hình 3. Khả năng tiêu diệt vi khuẩn *E.coli* Top 10 pJET 1.2/blunt và *E.coli* Top 10 pPS1 của các dịch chiết tảo *in vitro* (A - *E.coli* Top 10 pJET 1.2/blunt; B - *E. coli* Top 10 pPS1; I – đối chứng có giấy tẩm kháng sinh nhưng không cho vòng vô khuẩn; II – thí nghiệm; Dịch chiết tảo trong các dung môi: 1 - nước cất, 2 - axit axetic 5%, 3 - ethanol 35%, 4 - ethanol 70%, 5 - methanol 70%, 6 -axeton 70%, 7 - axetonitrile 70%)

Bảng 2. Tác dụng tiêu diệt vi khuẩn *E.coli* Top 10 pJET 1.2/blunt (kháng ampicillin) và *E. coli* Top 10 pPS1 (kháng kanamycin) của các dịch chiết tỏi *in vitro*

E.coli	Đường kính vòng vô khuẩn, mm								
	Dung môi chiết xuất							Giấy tẩm kháng sinh	
	Nước	Acid acetic 5%	Ethanol 35%	Ethanol 70%	Methanol 70%	Axeton 70%	Axetonitrile 70%	Kanamycin 30µg/đĩa	Ampicillin 10 µg/đĩa
Top 10 pJET 1.2/blunt	22,7 ^b ±0,92	24,6 ^{ab} ±1,24	21,7 ^c ±0,92	22,1 ^c ±1,02	21,9 ^c ±1,06	22,8 ^{bc} ±0,80	24,9 ^a ±1,23	Không kiểm tra	0
Top 10 pPS1	22,3 ^b ±1,08	24,4 ^a ±0,92	21,3 ^b ±0,94	21,8 ^b ±0,82	21,8 ^b ±0,75	22,4 ^b ±1,02	25,0 ^a ±0,95	0	Không kiểm tra

Ghi chú: a,b,c trên cùng một hàng chỉ ra sự khác nhau có ý nghĩa về mặt thống kê $P < 0,05$

(pJET 1.2/blunt, pPS1) đều không có sự sai khác mang ý nghĩa về mặt thống kê sinh học khi sử dụng cùng một loại dịch chiết tỏi. Kết quả đã khẳng định dịch chiết tỏi có tác dụng tiêu diệt vi khuẩn rất tốt không chỉ trên *E.coli* O₄₄ gây bệnh mà còn có tác dụng trên *E. coli* chứa plasmid có gen kháng kháng sinh (ampicillin và kanamycin). Theo kết quả nghiên cứu của Palaksha et al. (2010) còn cho biết dịch chiết tỏi có tác dụng với *E.coli* kháng streptomycin.

4. KẾT LUẬN

Sử dụng cả 7 loại dung môi để chiết tỏi đều cho kết quả diệt vi khuẩn *E. coli* O₄₄ gây bệnh. Trong đó 3 dung môi dùng để thu dịch chiết cho kết quả tiêu diệt vi khuẩn đạt độ mẫn cảm cao (đường kính vòng vô khuẩn ≥ 20 mm) là: axetonitrile 70%, axit axetic 5%, axeton 70%.

Dịch chiết tỏi thu được còn có tác dụng diệt khuẩn cả đối với chủng *E.coli* kháng kháng sinh (*E.coli* Top 10 pJET 1.2/blunt kháng ampicillin, *E.coli* Top 10 pPS1 kháng kanamycin).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bùi Thị Tho, Nguyễn Thị Thanh Hà (2009). Dược liệu học Thú y. NXB Nông Nghiệp, Hà Nội, trang 77-81.
- Cos, P., Vlietinck A.J., Berghe D.V., Maes L. (2006). Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger *in vitro* 'proof of concept'. J. Ethnopharmacol. 106 (3): 290-302.
- Đỗ Tất Lợi (1999). Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. NXB Y học, Hà Nội, trang
- Gull, I., Saeed M., Shaukat H., Aslam S.M., Samra Z.Q., and Athar A.M. (2012). Inhibitory effect of

Allium sativum and *Zingiber officinale* extracts on clinically important drug resistant pathogenic bacteria. Annals clinical Microbiology Antimicrobials 2012, 11:8. doi: 10.1186/1476-0711-11-8.

- Mahesh, B., Satish S. (2008). Antimicrobial activity of some important medicinal plant against plant and human pathogens. World J Agric Sci, 4 [S] 839-843.
- Palaksha, M. Mansoor N., A., Sanjoy D. (2010). Antibacterial activity of garlic extract on streptomycin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* solely and in synergism with streptomycin. J Nat Sci Biol Med. Jul – Dec. 1(1): 12-15.
- Rahman, M. Fazlic M., V. and Saad N. W. (2012). Antioxidant properties of raw garlic (*Allium sativum*) extract. International Food Research Journal 19(2): 589-591.
- Sana, M. and Ifra G. (2012). Antibacterial activity of aqueous and ethanolic extracts of garlic, cinnamon and turmeric against *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Bacillus subtilis* DMS 3256. International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology. Vol 3 (2): 131-136.
- Seyyedneiad, Motamedi S.M., H. (2010). A review on Native medicinal Plant in Khuzestan, Iran with Antibacterial properties. International journal of Pharmacology, 6: 551-560.
- Solanki, R. (2010). Some medicinal plants with antibacterial activity. Pharmacies Globate (IJCP), 4(10). ISSN 0976-8157.
- Srinivasan, D., Sangeetha S., Lakshmanaperumalsamy P. (2009). *In vitro* Antibacterial Activity and Stability of Garlic Extract at Different pH and Temperature. Electronic Journal of Biology, Vol. 5(1): 5-10.
- Vũ Xuân Quang (1993). Những cây thuốc nam chữa một số bệnh viêm nhiễm. NXB Y học.