

SỰ THUẦN CHỦNG VÀ TÍNH KHÁNG KHUẨN CỦA SÂM ĐẠI HÀNH (*Eleutherine subaphylla*)

Huỳnh Kim Diệu
Đại học Cần Thơ

TÓM TẮT

30 mẫu thân hành Sâm đại hành được thu thập từ nhiều nơi thuộc tỉnh Vĩnh Long, Hậu Giang và Kiên Giang được điện di protein bằng phương pháp SDS-PAGE và thử hoạt tính kháng khuẩn bằng phương pháp pha loãng trong thạch (xác định nồng độ ức chế tối thiểu MIC) trên 8 chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella spp.*, *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella ictaluri* và *Edwardsiella tarda*.

Kết quả cho thấy các mẫu sâm đại hành có 15 dãy băng protein khác nhau với tỉ lệ cá thể đa hình là 40%, tỉ lệ băng protein đa hình 6,7%, chỉ số đa dạng về kiểu gen $H_{EP} = 0,46$, rõ nhất là chỉ số đa dạng về kiểu hình $H_o = 2,76$ và số allele hiệu quả $SENA = 0,86$. Như vậy, Sâm đại hành không thuần chủng, được chia làm 11 dòng, tính kháng khuẩn của các dòng trên vi khuẩn thử nghiệm có khác nhau, nhưng tất cả đều tác động rất tốt trên *Staphylococcus aureus* (MIC=256-512µg/ml), kể đến *Streptococcus faecalis* (MIC=512-1024µg/ml), yếu hơn trên *Pseudomonas aeruginosa* và *Aeromonas hydrophila* (MIC=2048-4096µg/ml), kháng khuẩn yếu nhất trên *Escherichia coli* và *Salmonella spp.* (MIC=4096µg/ml). Đặc biệt Sâm đại hành kháng khuẩn rất mạnh trên vi khuẩn gây bệnh gan thận mủ và nhiễm khuẩn huyết trên cá *Edwardsiella ictaluri* (MIC=16-32µg/ml) và *Edwardsiella tarda* (MIC=64-128µg/ml). Trong các dòng Sâm đại hành, dòng 1 khả năng kháng các vi khuẩn thử nghiệm mạnh nhất.

Từ khóa: Sâm đại hành, Dòng, Tính kháng khuẩn

The genetic diversity and the antibacterial activity of *Eleutherine subaphylla*

Huỳnh Kim Diệu

SUMMARY

30 rhizome samples of *Eleutherine subaphylla* cultivated in different places in Vinh Long, Hau Giang and Kien Giang province were collected. Their rhizomes were used for protein electrophoresis employing the SDS-PAGE method and testing the antibacterial susceptibilities expressed as minimum inhibitory concentrations (MIC) of eight selected gram positive and gram negative strains: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella spp.* and *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella ictaluri* and *Edwardsiella tarda*.

There were 15 different protein bands were discovered. Protein bands were 6.7%, polymorphic while the polymorphic individuals were 40% and the phenotypic diversity value (H_o) was 2.76, the genetic diversity value (H_{EP}) was 0.46 and sum of the effective number alleles (SENA) was 0.86. *Eleutherine subaphylla* could divide into 11 lines with the antibacterial susceptibilities were best against *Edwardsiella ictaluri* (MIC=16-32µg/ml) and *Edwardsiella tarda* ((MIC=64-128µg/ml) which caused *Bacillary necrosis pangasius* and septicemia in fish, and *Staphylococcus aureus* (MIC=256-512µg/ml), followed by *Streptococcus faecalis* (MIC=512-1024µg/ml), *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas aeruginosa* (MIC=2048-4096µg/ml). All *Eleutherine subaphylla* lines nearly have no effect against *Escherichia coli* and *Salmonella spp* (MIC=4096µg/ml). *Eleutherine subaphylla* is a potential medicinal plant to replace or reduce the amount of antibiotics in preventing and treating animal diseases and fish diseases. The difference in lines and the antibacterial activities must be taken into account.

Key words: *Eleutherine subaphylla*, Lines, Antibacterial activity

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Kháng sinh đóng vai trò quan trọng trong phòng trị bệnh, kích thích tăng trưởng và tăng hiệu quả sử dụng thức ăn cho gia súc gia cầm. Tuy nhiên, hiện tượng kháng thuốc và sự tồn dư kháng sinh trong sản phẩm động vật đang là mối quan tâm. Vì kháng sinh tích lũy trong sản phẩm động vật không những gây độc tính mà có thể gây dị ứng cho người tiêu dùng (Anon, 1984). Dư lượng kháng sinh trong sản phẩm còn là rào cản doanh nghiệp Việt Nam trong xuất khẩu sản phẩm động vật, đặc biệt trong lĩnh vực thủy sản (Nguyễn Thị Hoa Lý, 2002). Điều đáng quan tâm hơn cả là sự đề kháng của vi khuẩn đối với kháng sinh và sự truyền kháng, ảnh hưởng đến việc sử dụng thuốc điều trị cho con người (Prescott et al., 1994). Ở Thụy Điển, kháng sinh đã bị cấm sử dụng với mục đích phòng bệnh hay kích thích tăng trưởng (Vestervall, 1993). Do đó, hiện nay khuynh hướng chung của thế giới nói chung và Việt Nam nói riêng là quay về với thiên nhiên, đã tìm cách giảm sử dụng kháng sinh cho gia súc gia cầm và động vật thủy sinh và dần dần thay thế bằng dược thảo thân thiện. Việc sử dụng dược thảo đã tăng vượt bậc trong thập kỷ vừa qua. Hiện nay 20-30% thuốc trong Dược điển Mỹ có nguồn gốc từ thực vật. Việt Nam có nguồn dược thảo có khả năng kháng khuẩn dồi dào và đã được dân gian sử dụng điều trị bệnh hiệu quả từ lâu đời. Trong số đó Sâm đại hành đã được dân gian dùng làm thuốc cầm máu trong băng huyết, ho ra máu, bị thương chảy máu; cũng dùng chữa ho gà, viêm họng, mụn nhọt, chốc lở (Đỗ Huy Bích và ctv, 2004). Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào cho biết sự thuần chủng của Sâm đại hành. Để góp phần tìm hiểu thêm về Sâm đại hành, nghiên cứu về sự thuần chủng của cây Sâm đại hành được thực hiện. Mục đích từng bước chọn lọc ra những dòng có tính kháng khuẩn cao.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP THÍ NGHIỆM

2.1. Vật liệu

- Thân hành sâm đại hành tại một số huyện thuộc tỉnh Kiên Giang, Hậu Giang và Vĩnh Long được thu mẫu chạy điện đi; các cây có sự khác biệt di truyền được trồng lại ở huyện Hòn Đất, tỉnh Kiên Giang để lấy mẫu phân tích.

- Sử dụng các chủng vi khuẩn:

+ Chủng vi khuẩn nguồn gốc từ viện Pasteur Tp Hồ Chí Minh: *Staphylococcus aureus* (S. aureus), *Streptococcus faecalis* (S. faecalis), *Escherichia coli* (E.coli), *Pseudomonas aeruginosa* (P. aeruginosa), *Salmonella spp.* (Sal. spp), *Edwardsiella tarda* (E. tarda) và *Aeromonas hydrophila* (A. hydrophila).

+ Chủng vi khuẩn nguồn gốc từ khoa Thủy Sản (Đại học Cần Thơ): *Edwardsiella ictaluri* (E. ictaluri).

2.2. Phương pháp thí nghiệm

2.2.1. Điện di protein

- 30 mẫu thân hành sâm đại hành được thu từ 30 nơi khác nhau dùng điện di protein theo phương pháp SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel) (Laemmli, 1970).

Sự đa dạng về di truyền được đánh giá dựa trên những thông số Ho (đa dạng về kiểu hình), H_{EP} (đa dạng về kiểu gen) và SENA (sum of the effective number of alleles -tổng của số alen hiệu quả) (Hub and Ohnishi, 2002):

$$Ho = -\sum f_i \ln f_i, \quad H_{EP} = 1 - f_i^2, \quad SENA = (1/f_i^2 - 1)$$

Trong đó:

- f_i là tần số xuất hiện dây băng protein i. Qui định tần số của những dây băng protein được thấy bằng mắt thường, nếu có hiện diện cho điểm là 1, nếu không hiện diện cho điểm là 0.

- n là số dây băng protein hiện diện.

- Nếu $Ho = 0$ chứng tỏ tính thuần chủng cao, nếu giá trị Ho lớn chứng tỏ có sự đa dạng về di truyền, tức cây không thuần chủng.

- H_{EP} biến thiên từ 0 đến 1, nếu trị số H_{EP} nhỏ chứng tỏ tính thuần chủng cao, nếu trị số H_{EP} lớn chứng tỏ có sự đa dạng về di truyền.
- SENA được tính toán dựa vào xác định số allele hiệu quả.
- Sự đa dạng về hình thái của cá thể hay của các dãy băng protein được ghi nhận khi sự biến đổi những dãy băng protein của nó < 90%.

2.2.2. Thử tính kháng khuẩn

Các cây có sự khác biệt về dãy băng protein được trồng lại trong cùng điều kiện chăm sóc, dinh dưỡng. Sau 5 tháng, sử dụng thân hành thử tính kháng khuẩn.

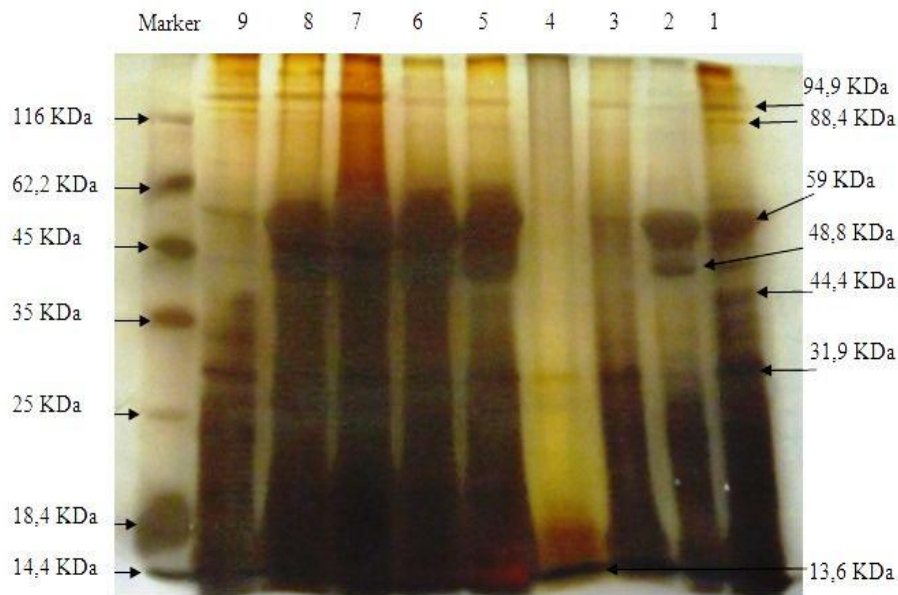
- Thân hành Sâm đại hành được sấy khô và chiết với methanol đến cạn, được cao thô, dùng thử tính kháng khuẩn, xác định nồng độ ức chế tối thiểu MIC (*minimum inhibitory concentration*) (Nguyễn Văn Đàn và Nguyễn Viết Tựu, 1985).

- Dùng phương pháp pha loãng liên tục trong thạch để xác định MIC (Trương Công Quyền và ctv, 1986; Từ Minh Koóng và ctv, 2001).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Sự đa dạng về di truyền

Trong 30 mẫu thân hành sâm đại hành bằng phương pháp điện di protein SDS-PAGE phát hiện được sâm đại hành có 15 dãy băng protein có sự khác biệt (Hình 1).



Hình 1. Phổ điện di protein của Sâm đại hành

Những thông số biểu thị sự đa dạng về di truyền của các thân hành Sâm đại hành được trình bày qua bảng 1.

Bảng 1. Những thông số đa dạng về di truyền của Sâm đại hành

Thông số	Giá trị
Cá thể đa hình (%)	40
Băng protein đa hình (%)	6,7
Đa dạng về kiểu hình Ho	2,76
Đa dạng về kiểu gen H_{EP}	0,46
SENA	0,86

Qua kết quả bảng 1 cho thấy tỉ lệ cá thể đa hình của sâm đại hành là 40%, tỉ lệ băng protein đa hình là 6,7%, chỉ số đa dạng về kiểu gen $H_{EP} = 0,46$ và số allele hiệu quả $SENA = 0,86$, rõ nhất là chỉ số đa dạng về kiểu hình $H_o = 2,76$. Như vậy, cây sâm đại hành không thuần chủng mà gồm nhiều dòng (line), nhưng cùng loài (species). Theo Rao và ctv (1992), kết quả cấu trúc những dãy băng protein giữa các dòng trong cùng loài có khác biệt nhưng vẫn tiêu biểu cho mỗi loài, và giữa các loài khi điện di bằng SDS-PAGE sẽ cho các dãy băng protein khác nhau về số lượng lẫn trọng khối.

Kết quả thu nhận được từ điện di protein cho thấy cấu trúc các dãy băng protein sâm đại hành khác nhau và các thông số đa dạng về di truyền đã đánh giá được sự không thuần chủng của chúng. Như vậy sâm đại hành có sự đa dạng về di truyền.

Dựa vào kết quả điện di protein, sâm đại hành có khác biệt về gen di truyền và chia làm 11 dòng khác nhau.

3.2. Thử tính kháng khuẩn

Các cây sâm đại hành có sự khác biệt các dãy băng protein, được trồng trong cùng điều kiện chăm sóc, sau 5 tháng thân hành các nhóm cây này được thử tính kháng khuẩn, kết quả được trình bày qua bảng 2.

Bảng 2. Nồng độ ức chế tối thiểu của các dòng Sâm đại hành ($\mu\text{g/ml}$)

Dòng SDH	Vi khuẩn							
	<i>S. aureus</i>	<i>S. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Sal. spp</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>E. ictaluri</i>	<i>E. tarda</i>
1	256	512	4096	2048	4096	2048	16	64
2	256	1024	4096	4096	4096	4096	32	64
3	512	1024	4096	4096	4096	4096	32	64
4	512	1024	4096	4096	4096	4096	32	128
5	512	1024	4096	4096	4096	4096	32	64
6	256	512	4096	2048	4096	2048	32	64
7	512	1024	4096	4096	4096	4096	32	128
8	512	1024	4096	2048	4096	2048	32	128
9	512	1024	4096	4096	4096	4096	32	128
10	256	512	4096	2048	4096	2048	16	128
11	256	1024	4096	2048	4096	2048	32	64

Qua kết quả bảng 2 cho thấy tất cả các dòng sâm đại hành đều tác động rất tốt trên vi khuẩn gram dương *Staphylococcus aureus* (MIC=256 - 512 $\mu\text{g/ml}$) và *Streptococcus faecalis* (MIC=512-1024 $\mu\text{g/ml}$). Khả năng kháng các vi khuẩn gram âm gây bệnh trên gia súc yếu hơn: *Pseudomonas aeruginosa* (MIC=2048-4096 $\mu\text{g/ml}$) yếu nhất đối với *E. coli* và *Salmonella* (MIC= 4096 $\mu\text{g/ml}$).

Bên cạnh đó, kết quả có được cũng cho thấy khả năng kháng mạnh vi khuẩn gây bệnh quan trọng và gây tử vong cao trên động vật thủy sinh của các dòng sâm đại hành: *Edwardsiella ictaluri* gây bệnh gan thận mủ (MIC= 16-32 $\mu\text{g/ml}$), và *Edwardsiella tarda* gây nhiễm khuẩn máu, gây áp xe

gan thận, gây bệnh trên tôm càng xanh (MIC= 64-128µg/ml), tỉ lệ tử vong 30-70% (có thể lên đến 100%) (Bùi Quang Tề và ctv, 2004), kể đến yếu hơn trên *Aeromonas hydrophila* gây bệnh đốm đỏ (MIC=2048-4096 µg/ml).

Kết quả có được phù hợp với Đỗ Tất Lợi (2003), cho sâm đại hành có tác dụng ức chế rõ rệt *in vitro* đối với phế cầu khuẩn, liên cầu tan máu, tụ cầu vàng, không có tác động đối với *Escherichia coli* và cũng lý giải được trên lâm sàng sâm đại hành có tác dụng tốt đối với chốc đầu trẻ em, nốt đinh, viêm da có mủ, viêm họng cấp và mạn tính, chàm nhiễm trùng,...(Đỗ Huy Bích và ctv, 2004).

Hiện nay, các chủng vi khuẩn gây bệnh đã kháng rất nhiều loại kháng sinh mạnh như *Staphylococcus aureus* đề kháng cao với penicillin (89,4%), tetracyclin (82,4%), trimethoprim-sulfamethazin (80,65%), chloramphenicol (64,8%), erythromycin (38,4%) và methicillin (35,9%), ampicillin, Co-trimoxazol, erythromycin, lincomycin (50-80%). *Streptococcus faecalis* kháng gentamicin (7%), streptomycin (20%), gentamicin + streptomycin (22%), kháng cả vancomycin (4%); *Streptococcus faecalis* kháng aztreonam, cephalosporins, clindamycin, nafcillin, oxacillin, trimethoprim-sulfamethoxazol. *Pseudomonas aeruginosa* kháng tất cả cephalosporin (ngay cả ceftazidim chỉ còn nhạy 50%), kháng mạnh với nhóm aminoglycosid (65-70%). Nhóm vi khuẩn gây bệnh trên cá càng kháng nhiều kháng sinh mạnh như ampicillin (100%), oxacillin (100%), bacitracin (100%), streptomycin (26%), clindamycin (43%), nalidixic acid (26%), novobiocin (87%), rifampicin (4%), vancomycin (9%)...(Orozaval et al., 2008). Colistin (>90%), streptomycin (83%), oxytetracycline (81%), trimethoprim (73%) (Bùi Thị Tho, 2003; Tu Thanh Dung et al., 2008).

Kết quả thử tính kháng khuẩn đã cho thấy khả năng kháng các vi khuẩn, đã và càng lúc càng đề kháng với kháng sinh, của sâm đại hành và kết quả điện di protein đã giúp trong chọn lọc dòng sâm đại hành có tính kháng khuẩn cao để có thể thay thế kháng sinh trị bệnh cho người, gia súc và động vật thủy sinh trong tương lai.

IV. KẾT LUẬN

Cây Sâm đại hành có nhiều dòng và các dòng này có sự khác biệt về tính kháng khuẩn, đa số các dòng đều tác động tốt trên *Staphylococcus aureus* và *Streptococcus faecalis* và đặc biệt nhóm vi khuẩn gây bệnh trên cá, *Edwardsiella ictaluri* và *Edwardsiella tarda*. Cây sâm đại hành là tiềm năng lớn có thể khai thác để thay thế kháng sinh, nên cần được quan tâm nhiều hơn nữa

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bùi Thị Tho (2003), Thuốc kháng sinh và nguyên tắc sử dụng trong chăn nuôi, NXB Hà Nội.
2. Đỗ Huy Bích và cộng tác viên (2004). Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam, Tập II, NXB Khoa học và kỹ thuật.
3. Hub, M.K. and Ohnishi O. (2002), Genetic diversity and genetic population of wild radish revealed by AFLP, *Breeding Science* 52:79-88.
4. Nguyễn Văn Đàn và Nguyễn Viết Tựu (1985), Phương pháp nghiên cứu hóa học cây thuốc, NXB Y học Tp Hồ Chí Minh.
5. Tu Thanh Dung, Freddy H., Nguyen A.T., Patric S., Margo B. and Annemie D. (2008), Antimicrobial susceptibility pattern of *Edwardsiella ictaluri* isolates from natural outbreaks of *Bacillary necrosis of Pangasianodon hypophthalmus* in Vietnam, *Microbial drug resistance*, 14(4): 311-316.
6. Bùi Quang Tề, Đỗ Thị Hòa, Nguyễn Hữu Dũng và Nguyễn Thị Muội (2004), Bệnh học thủy sản, NXB Nông Nghiệp.
7. Nguyễn Thị Hoa Lý (2002), Làm thế nào kiểm soát được kháng sinh tồn dư trong sản phẩm động vật, *Khoa học kỹ thuật thú y* 9 (3): 96-97.
8. Vestervall F. (1993), Use of antibiotics and development of resistance alternatives in piglet feeding, The 11th International symposium of The World Association of Veterinary Food Hygienists, Bangkok, Thailand, pp.271-272.