

**HOẠT TÍNH ỨC CHẾ NẤM VÀ VI KHUẨN GÂY BỆNH
CỦA BA LOÀI THỰC VẬT NGẬP MẶN *Aegiceras corniculatum*,
Avicennia marina VÀ *Lumnitzera racemosa*
TẠI VƯỜN QUỐC GIA XUÂN THỦY**

TRẦN MỸ LINH, LÊ QUỲNH LIÊN, NINH KHẮC BẢN
*Viện Hóa sinh biển,
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

Vườn Quốc gia (VQG) Xuân Thủy có diện tích khoảng 7.100ha, với hơn 4.000ha là đất rừng ngập mặn, được ghi nhận bởi độ đa dạng sinh học cao với tổng cộng khoảng 500 loài động vật và 190 loài thực vật thuộc 137 chi, 60 họ. Ở VQG Xuân Thủy quan sát thấy hai kiểu quần xã chính: Quần xã Sú (*Aegiceras corniculatum*)-Bần chua (*Sonneratia caseolaris*)-Mắm biển (*Avicennia marina*)-Ô rô (*Acanthus ilicifolius*) và xen kẽ Cóc trắng (*Lumnitzera racemosa*) phân bố tại phía Bắc của vườn; quần xã rừng trồng Trang (*Kandelia obovata*)-Sú (*Aegiceras corniculatum*) phân bố ở phía Nam vườn. Ngoài ra, có một diện tích nhỏ quần xã Sú-Mắm biển và một quần thể tương đối thuần loại mọc tự nhiên là Mắm biển trên một số bãi đất cát thuộc Cồn Lu [2].

Sú, Mắm biển và Cóc trắng là những loài thực vật ngập mặn chủ yếu tại VQG Xuân Thủy và là điển hình cho các quần xã tiên phong, trên đất cát ngập triều, cần được bảo vệ và phát triển. Ngoài các giá trị không thể phủ nhận về mặt sinh thái và chắn bão, bảo vệ bãi bồi, đầm nuôi tôm, các loài thực vật trên còn có tiềm năng ứng dụng trong lĩnh vực y-dược. *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. có tên thường gọi là cây Mắm biển hay Mắm đen, Mắm ôi; gỗ cây làm củi hoặc đóng đồ gia dụng, quả ăn được, hoa làm thức ăn cho ong mật; một số bộ phận của cây như vỏ được dùng làm thuốc dạng cao để chữa bệnh ngoài da, lá để đuổi côn trùng, muỗi. *Aegiceras corniculatum* (L.) Blanco hay gọi là cây Sú hay Trú, Mui biển, Cát là loài cây bụi hoặc cây gỗ. Trên thực tế, người dân địa phương tại VQG Xuân Thủy đã sử dụng cây sú làm thuốc giảm đau, cây cóc trắng làm thuốc trị ghẻ ngứa ngoài da. Tuy nhiên, phần lớn các tri thức y học dân tộc liên quan tới thực vật ngập mặn đều do từ thế hệ trước truyền lại cho thế hệ sau, cơ sở khoa học về tác dụng và cách thức chữa bệnh hiệu quả của hầu hết các loài thực vật ngập mặn tại đây đều chưa được tìm hiểu.

Sự xuất hiện nhiều bệnh truyền nhiễm mới cùng với hiện tượng kháng thuốc của các vi sinh vật gây bệnh dẫn tới nhu cầu cấp bách về các dược phẩm mới, dược phẩm thay thế và đặc trị với các loại sinh vật gây bệnh. Do vậy, tiến hành nghiên cứu về cơ sở khoa học và đánh giá hoạt tính sinh học của các nguồn hợp chất từ thực vật là rất quan trọng và có ý nghĩa ứng dụng cao, phù hợp với tình hình thực tế tại nước ta, một quốc gia có nguồn tài nguyên thực vật đa dạng và kho tàng tri thức y dược học dân tộc vô cùng phong phú. Nghiên cứu này nhằm mục tiêu đánh giá hoạt tính ức chế vi sinh vật của 3 loài thực vật ngập mặn chủ yếu tại VQG Xuân Thủy: *Aegiceras corniculatum* (L.) Blanco, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh và *Lumnitzera racemosa* Wild, sử dụng 6 chủng vi sinh vật kiểm định là những vi sinh vật gây bệnh phổ biến ở người. Cả ba loài thực vật trên thuộc nhóm cây cho gỗ và đang chủ yếu được sử dụng để bảo vệ bờ biển, nuôi trồng thủy sản hoặc nuôi ong tại VQG Xuân Thủy. Đánh giá chính xác hoạt tính ức chế vi sinh vật gây bệnh để định hướng nghiên cứu sâu về thành phần hoạt chất sinh học từ các loài thực vật này sẽ là cơ sở khoa học để phát triển tiềm năng ứng dụng của chúng trong lĩnh vực y-dược ở nước ta.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu thực vật và dịch chiết thực vật

- Các mẫu thực vật ngập mặn trong nghiên cứu được thu thập tại VQG Xuân Thủy-tỉnh Nam Định (20°10'N- 20°15' N; từ 106°20'E- 106°32'E) và được PGS.TS. Ninh Khắc Bản, thành viên nghiên cứu, định tên khoa học dựa trên đặc điểm hình thái: *Aegiceras corniculatum* (Sú), *Lumnitzera racemosa* Wild. (Cóc trắng), *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. (Mắm biển). Tiêu bản được lưu trữ tại Viện Hóa sinh biển.

- Cành và lá (300g) của mỗi mẫu được sấy khô ở nhiệt độ 40°C-50°C rồi nghiền nhỏ, bổ sung methanol và chiết siêu âm ở 40°C trong vòng 1 giờ. Sau khi lặp lại bước chiết siêu âm 5 lần và lọc qua giấy lọc, phần dịch methanol được cất loại dung môi bằng máy cất quay chân không ở 50°C để thu được cặn chiết methanol (cặn chiết tổng); được cất giữ tại 4°C cho thí nghiệm tiếp theo.

2. Chủng vi sinh vật và điều kiện nuôi cấy

- Hai chủng nấm: *Aspergillus fumigatus* ATCC® 204305™*; *Candida albicans* ATCC® 24433™ và bốn chủng vi khuẩn: *Escherichia coli* ATCC® 25922™*; *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™; *Proteus mirabilis* ATCC® 29245™; *Proteus vulgaris* ATCC® 33420™* được cung cấp bởi hãng Microbiologics, Mỹ.

- Chủng nấm được nuôi cấy từ ống chủng gốc trên môi trường nuôi nấm (Glucose: 50g/L; Tryptone: 10g/L; KH₂PO₄: 3g/L; MgSO₄.7H₂O: 2g/L pH = 5,6) tại 25°C, ủ qua đêm. Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy từ ống chủng gốc trên môi trường LB (NaCl 5g/L; Yeast extract 10g/L; Tryptone 10g/L; pH = 7,2) tại 37°C, ủ qua đêm.

3. Thử hoạt tính ức chế vi sinh vật bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch

Phương pháp thử hoạt tính ức chế vi sinh vật thực hiện theo Hadacek *et al.* (2000) và có điều chỉnh, cụ thể như sau: Chủng vi sinh vật sau khi được hoạt hóa từ ống chủng gốc trên môi trường nuôi cấy lỏng tương ứng, một khuẩn lạc được cấy chuyển sang 5ml môi trường nuôi lỏng và lắc qua đêm ở nhiệt độ 25°C với chủng nấm hoặc 37°C với chủng vi khuẩn. Đĩa thử hoạt tính được chuẩn bị bằng cách cấy trải 200μL dịch vi sinh vật (OD₆₀₀ = 0,4-0,5) lên bề mặt đĩa petri có chứa môi trường đặc, để khô và đục 5-6 giếng đường kính 6mm sao cho mỗi giếng cách nhau khoảng 2-3cm. Các cặn chiết tổng từ mỗi mẫu thực vật được cân và pha thành các dịch chiết thử với các nồng độ 10, 50 và 100mg/ml trong DMSO (Dymethyl sulfoxide). Bổ sung 50 μL dịch chiết thử trên vào mỗi giếng trên đĩa vi khuẩn và giữ tại tủ ẩm 25°C/48h với nấm hoặc 37°C/24h với vi khuẩn. Đối chứng dương: Clotrimazole 1mg/ml đối với các đĩa cấy chủng nấm; Ampicilin 0,1mg/ml với đĩa cấy vi khuẩn *E. coli* và *P. mirabilis*; Kanamycin 5mg/ml với đĩa cấy vi khuẩn *S. aureus* và *P. vulgaris*; đối chứng âm: DMSO. Hoạt tính ức chế vi sinh vật được đánh giá bằng cách đo bán kính (BK) vòng ức chế vi sinh vật bằng công thức: BK (mm) = D-d; trong đó D = đường kính vòng ức chế vi sinh vật và d = đường kính giếng thạch. Lặp lại thí nghiệm ba lần và lấy số liệu trung bình để đánh giá hoạt tính ức chế.

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế vi sinh vật gây bệnh (bảng 1) cho thấy loài *Aegiceras corniculatum* (Sú) tạo ra vòng ức chế nấm có bán kính rất rộng đối với nấm *C. albicans* ở cả ba nồng độ dịch chiết nghiên cứu; đạt tới 10mm, 80% bán kính vòng ức chế của đối chứng dương với nồng độ dịch chiết là 100mg/ml. Đáng chú ý là, cũng với các nồng độ dịch chiết này, cây Sú lại không thể hiện hoạt tính ức chế đối với nấm *A. fumigatus* và chỉ thể hiện hoạt tính ức chế

trung bình với vi khuẩn *E. coli* và *S. aureus*. Ngược lại, loài *Avicennia marina* (Mắm biển) thể hiện hoạt tính ức chế rõ rệt đối với nấm *A. fumigatus* với vòng ức chế là 4mm (nồng độ dịch chiết 100mg/ml), xấp xỉ 30% đối chứng dương nhưng lại không biểu hiện hoạt tính ức chế đối với nấm *C. albicans*. Điều này có thể lý giải bởi sự tác động đặc hiệu của các hợp chất hóa học có mặt trong dịch chiết của loài Sú và Mắm biển đối với mỗi loại nấm gây bệnh. Trên thực tế nhiều loại kháng sinh không tiêu diệt được nấm nên việc điều trị bệnh nấm thường yêu cầu thuốc đặc trị. Khả năng ức chế đặc hiệu nấm của hai loài Sú và Mắm biển trong nghiên cứu này có thể góp phần định hướng để phát triển tiềm năng ứng dụng của chúng trong điều trị bệnh do nấm. Ngoài nấm *A. fumigatus*, loài Mắm biển còn thể hiện hoạt tính ức chế rõ rệt với hai loại vi khuẩn *E. coli* và *S. aureus* (bảng 1).

Bảng 1

Hoạt tính ức chế vi sinh vật kiểm định của các dịch chiết thực vật ngập mặn

Mẫu thực vật	<i>Aegiceras corniculatum</i> (Sú)			<i>Avicennia marina</i> (Mắm biển)			<i>Lumnitzera racemosa</i> (Cóc trắng)			Đối chứng dương
	10 mg/ml	50 mg/ml	100 mg/ml	10 mg/ml	50 mg/ml	100 mg/ml	10 mg/ml	50 mg/ml	100 mg/ml	
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	-	-	1	3	4	-	-	-	12
<i>Candida albicans</i>	3	7	10	-	-	-	-	-	-	13
<i>Escherichia coli</i>	-	-	3	-	-	5	-	2	2	20
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	1	-	-	5	3	4	7	11
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	2	5	12
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-	-	-	-	2	8	10	12

Ghi chú: Giá trị biểu hiện ở các cột: Bán kính vùng ức chế vi sinh vật, đo bằng mm. Các giá trị bán kính vùng ức chế vi sinh vật được tính trung bình của 3 lần thí nghiệm lặp lại. (-): Không có biểu hiện ức chế, vi sinh vật phát triển bình thường. Hoạt động của các chất làm đối chứng dương ổn định ở tất cả các đĩa trong các lần lặp lại thí nghiệm. Đối chứng âm DMSO hoàn toàn không xuất hiện vòng ức chế vi sinh vật.

Dịch chiết loài Cóc trắng tạo vòng ức chế lớn nhất với vi khuẩn *P. vulgaris*, đạt 8-10mm (65%-85% đối chứng dương), tiếp đến là vi khuẩn *S. aureus* với 7mm (~65% đối chứng dương) và vi khuẩn *P. mirabilis* với bán kính 5mm (~ 40% đối chứng dương) (bảng 1).

Như vậy, hoạt tính ức chế vi sinh vật mang tính đặc hiệu đối với từng loài thực vật do phụ thuộc vào thành phần và tác động đặc hiệu của các hợp chất tự nhiên có mặt trong dịch chiết đối với mỗi loại vi sinh vật. Sú và Mắm biển có hoạt tính ức chế mạnh đối với nấm bệnh tuy nhiên mỗi loài chỉ biểu hiện hoạt tính ức chế với một trong hai loại nấm được kiểm tra. Cả hai loài thực vật này cũng thể hiện hoạt tính ức chế trung bình với hai loại vi khuẩn *E. coli* và *S. aureus* (liên quan tới bệnh tiêu hóa và tiết niệu) và không hề biểu hiện hoạt tính ức chế với hai loại vi khuẩn *P. mirabilis* và *P. vulgaris* (thường gây bệnh đường tiết niệu). Cóc trắng không ức chế hai loại nấm bệnh kiểm tra mà có hoạt tính ức chế rõ rệt với 4 loại vi khuẩn, là nhóm vi khuẩn thường gặp trong bệnh viêm đường tiết niệu.

Do sống trong điều kiện khắc nghiệt nên thực vật ngập mặn đã phát triển các đặc điểm hình thái, cấu trúc và chu trình sinh lý, sinh hóa thích ứng với điều kiện mặn, ngập nước hay mật độ oxy thấp. Điều này cũng dẫn đến việc hình thành nhiều hợp chất tự nhiên, đặc biệt là hợp chất thứ cấp có giá trị ở thực vật ngập mặn. Trong vài thập kỷ gần đây, các nhà khoa học đã nghiên cứu phát hiện được nhiều hợp chất mới từ nhiều loài thực vật ngập mặn với hoạt tính sinh học có thể ứng dụng trong y-dược như hoạt tính ức chế vi sinh vật (vi khuẩn, vi nấm gây bệnh ở người, thực vật và động vật), ức chế virus, hoạt tính chống gốc oxy hóa khử, gây độc tế bào... [8, 10]. Các hợp chất tự nhiên nguồn gốc từ thực vật ngập mặn có khả năng tiêu diệt vi khuẩn và nấm gây bệnh ở người, động vật, cá cũng đã được rất nhiều nhà khoa học trên thế giới quan tâm nghiên cứu [7]. Thành phần hóa học của loài *Avicennia marina* (Mắm biển) và *Lumnitzera racemosa* (Cóc trắng) đã được phân tích và phát hiện nhiều hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học giá trị [1, 10]. Các nghiên cứu đánh giá khả năng ức chế vi sinh vật của một số loài thuộc họ Mắm (*Avicennia*) cho thấy dịch chiết từ loài Mắm biển có hoạt tính rõ rệt với hàng loạt vi sinh vật gây bệnh phổ biến như *Mycobacterium vaccae*, *M. aurum*, *M. smegmatis*, *M. fortuitum*, *Candida albicans* và *Staphylococcus aureus* [3, 5]. Gần đây, Varahalarao *et al.* (2012) cũng đã đánh giá hoạt tính ức chế 16 loại vi sinh vật gây bệnh (gồm nấm, vi khuẩn gây bệnh cho người, thực vật và động vật thủy sinh) của dịch chiết loài *Avicennia alba* (Mắm trắng) và nhận thấy cả hai loại dịch chiết thực vật bằng methanol hoặc chloroform cho hoạt tính ức chế vi sinh vật tốt hơn so với dịch chiết từ hexane. Với nồng độ dịch chiết thử là 100mg/ml, dịch chiết bằng methanol cho hoạt tính kháng vi sinh vật nhạy nhất, thể hiện ở vùng ức chế vi sinh vật dao động từ 11- 28mm trong khi với dịch chiết bằng chloroform là từ 9-17mm, trong đó vùng ức chế *S. aureus* là 10-11mm [9]. Trong nghiên cứu ở đây, dịch chiết loài *Avicennia marina* (Mắm biển) cũng cho kết quả ức chế vi khuẩn rõ rệt tại nồng độ chất thử 100mg/ml, thể hiện ở vòng ức chế vi khuẩn với bán kính vòng ức chế là 5mm đối với cả hai loại vi khuẩn *E. coli* và *S. aureus*.

III. KẾT LUẬN

Hoạt tính ức chế sáu chủng vi sinh vật kiểm định bao gồm hai loài nấm và bốn loài vi khuẩn đối với dịch chiết loài thực vật ngập mặn Sú, Mắm biển và Cóc trắng, thu thập tại VQG Xuân Thủy đã được nghiên cứu, sử dụng phương pháp khuếch tán giếng trên đĩa thạch. Với nồng độ dịch chiết từ 10-100mg/ml, cả ba loài thực vật đều thể hiện hoạt tính ức chế với các vi sinh vật được kiểm tra. Trong số đó, Sú có hoạt tính ức chế mạnh với nấm *Candida albicans*, Mắm biển có hoạt tính rõ rệt với nấm *Aspergillus fumigatus*, vi khuẩn *Escherichia coli* và *Staphylococcus aureus*. Cóc trắng có hoạt tính cao đối với cả 4 chủng vi khuẩn *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis* và *Proteus vulgaris*. Mặc dù ba loài thực vật trên đều được sử dụng trong một số bài thuốc dân gian nhưng mỗi loài thể hiện hoạt tính ức chế đặc hiệu và các mức độ khác nhau với mỗi loại tác nhân gây bệnh được kiểm tra. Kết quả này là cơ sở khoa học để định hướng cho các nghiên cứu sâu hơn về thành phần hóa học và sử dụng hiệu quả các loài thực vật ngập mặn trên tại VQG Xuân Thủy.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Châu Ngọc Diệp, Nguyễn Hoài Nam, Lê Đức Đạt, Vũ Anh Tú, Ninh Thị Ngọc, Nguyễn Phương Thảo, Phan Thị Thanh Hương, Nguyễn Xuân Cường, Ninh Khắc Bản, Phan Văn Kiệm và Châu Văn Minh**, 2012. Các hợp chất Tritecpen và Tritecpen glycosit phân lập từ cây Cóc trắng *Lumnitzera racemosa*. Tạp chí Hóa học 50 (5A) 219-223.
2. **Phan Nguyễn Hồng, Lê Xuân Tuấn, Phan Thị Anh Đào**, 2007, Đa dạng sinh học ở Vườn Quốc gia Xuân Thủy, MERC-MCD, Hà Nội, Việt Nam.
3. **Abeyasinghe, P.**, 2010. Antibacterial activity of some medicinal mangroves against antibiotic resistant pathogenic bacteria,. Indian J. Pharm. Sci., 72: 167-172.

4. **Hadacek, F.; Greger, H.**, 2000. Testing of antifungal natural products: Methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochem. Anal.*, 11: 137-147.
5. **Han L, Huang X, Dahse HM, Moellmann U, Fu H, Grabley S, Sattler I, Lin W.**, 2007. Unusual naphthoquinone derivatives from the twigs of *Avicennia marina*. *J. Nat. Prod.* 70 (6): 923-7.
6. **Patra, J.K., Thatoi, H.N.**, 2011. Metabolic diversity and bioactivity screening of mangrove plants: A review. *Acta. Physiologiae Plantarum.* 33 (4): 1051-1061.
7. **Piyusha Suresh Shelar, Vijay Kumar Reddy. S, Gauri Suresh Shelar and G. Vidya Sagar Reddy**, 2012. Medicinal value of mangroves and its antimicrobial properties-A review *Continental J. Fisheries and Aquatic Science* 6 (1): 26-37.
8. **Pradeep V., Rathod J.**, 2010. Antimicrobial activity of extracts of *Acanthus ilicifolius* extracted from the mangroves of Karwar coast Karnataka. *Pharmacology. Recent Research in Science and Technology*, 2 (6): 98-99.
9. **Varahala Rao Vadlapudi**, 2012. *In vitro* antimicrobial activity of plant extracts of *Avicennia alba* against some important pathogens. *Asia Pacific Journal of Tropical Disease* S408-S411.
10. **Zhu F., Chen X., Yuan Y., Huangm., Sun H., Xiang W.**, 2009. The Chemical Investigations of the Mangrove Plant *Avicennia marina* and its Endophytes. *The Open Natural Products Journal* 2: 24-32.

**ANTIFUNGAL AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF METHANOL EXTRACTS
OF THREE MANGROVE PLANT SPECIES *Aegiceras corniculatum*, *Avicennia marina*
AND *Lumnitzera racemosa* IN XUAN THUY NATIONAL PARK**

TRAN MY LINH, LE QUYNH LIEN, NINH KHAC BAN

SUMMARY

Antifungal and antimicrobial activity of the methanol extracts of three mangrove plant species *Aegiceras corniculatum*, *Avicennia marina* and *Lumnitzera racemosa* has been studied. The specimens have been collected from the Xuan Thuy National Park. The antifungal and antibacterial activity against six human pathogenic microorganisms (*Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis* and *Proteus vulgaris*) were determined by agar well diffusion method with analysis of the diameter of inhibition zone. The extracts (10-100mg/ml) of the three mangroves plants species showed promising antimicrobial activity against all tested microorganisms depending upon the natural active components in the extract and their specificity against each microorganism species. The extracts of *Aegiceras corniculatum* and *Avicennia marina* strongly inhibited the growth of *C. albicans* and *A. fumigatus*, respectively. *Lumnitzera racemosa* extract showed moderate antibacterial activity against all tested bacteria (*E. coli*, *S. aureus*, *P. mirabilis* and *P. vulgaris*) which are commonly in urinary tract infections. Further research is needed to determine the chemical components in these plant extracts what is needed for the efficient and sustainable use of Vietnamese mangrove plant species for medical-pharmaceutical purposes.