

SÀNG LỌC HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN CỦA RONG BIỂN MIỀN TRUNG-VIỆT NAM

Cao Thị Thúy Hằng*, Trần Nguyễn Hà Vy, Võ Mai Như Hiếu, Nguyễn Bách
Khoa, Bùi Minh Lý và Trần Thị Thanh Vân

Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công nghệ Nha Trang, Viện HLKHCNVN

*Email: caohang@nitra.vast.vn

Tóm tắt: Bài báo này trình bày kết quả sàng lọc hoạt tính kháng khuẩn cả 02 dòng vi khuẩn Gram âm và Gram dương các dịch chiết methanol và ethyl acetate của 20 loài rong đỏ và rong nâu. Hoạt tính kháng khuẩn được tính theo đường kính vòng kháng khuẩn. Dịch chiết từ rong nâu trừ rong *Turbinaria ornata* đều có hoạt tính kháng chủng *Pseudomonas aeruginosa* trong khi hoạt tính kháng khuẩn cao là các loài rong *S.henslowianum*, *Dictyota dichotoma* và *Dictyota linearis*. Hoạt tính của các phân đoạn ethyl acetate cao hơn các phân đoạn methanol và hoạt tính phân đoạn ethyl acetate mạnh nhất là từ rong *S.crasifolium*.

Từ khóa: Sàng lọc, Hoạt tính kháng khuẩn, Rong biển, Miền Trung Việt Nam.

SCREENING FOR ANTIBACTERIAL ACTIVITIES IN SOME MARINE ALGAE FROM THE CENTRAL VIET NAM

Cao Thi Thuy Hang*, Tran Nguyen Ha Vy, Vo Mai Nhu Hieu, Nguyen Bach
Khoa, Bui Minh Ly and Tran Thi Thanh Van

Nhatrang Institute of Technology research and Application, VAST

Abstract: In this study, methanolic and ethyl acetate extracts of 20 marine algae belong to Rhodophyceae and Phaeophyceae were screened for their antibacterial activities both gram positive bacteria and negative bacteria. The antibacterial activities were expressed as zone of inhibition. Extract of brown seaweed except *Turbinaria ornata* showed inhibition against *Pseudomonas aeruginosa* while highest inhibition activity among all the extract was shown to *S.henslowianum*, *Dictyota dichotoma* and *Dictyota linearis*. The activities of ethyl acetate extracts were higher those of methanolic extracts and the most powerful inhibitory extract was ethyl acetate of *S.crasifolium*.

Key words: Screening, Antibacterial activities, Marine Algae, Central Viet Nam.

I. MỞ ĐẦU

Rong biển là nguồn cung cấp các hợp chất thiên nhiên đa dạng và phong phú nhất, bao gồm các chất sau: sulfate polysaccharide, amino acid, terpenoid, phlorotannin, steroid, các hợp chất phenolic,...4. Nhóm các chất này sở hữu nhiều hoạt tính sinh học quý giá như chống oxy hóa, kháng khuẩn, kháng u,... Trong số các hoạt tính sinh học kể trên thì hoạt tính kháng khuẩn là một trong những hoạt tính được nghiên cứu nhiều nhất. Hoạt tính kháng khuẩn của các loài rong sinh trưởng tại vùng ôn đới và cận nhiệt đới thuộc cả 03 ngành rong là rong đỏ, rong xanh và rong nâu đã được nghiên cứu như *Asparagopsis armata*, *Bonnemaisonia*, *Asparagoides*, *Hapalospongidion*, *Macrocarpum*, *Caulera racemosa*, *Laminaria pallida*, *Enteromorpha intestinalis*, *Cystoseira barbata*, *Cladophora prolifera* 29, 10. Tại Việt Nam một số loài rong sinh trưởng tại Khánh Hòa như *Dictyota dichotoma*, *Turbinaria ornata*, *Sargassum polycystum*, *Sargassum swartzii*, *Sargassum oligocystum*, *Ulva lactuca* đã được thử hoạt tính với 04 loại vi khuẩn *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus faecalis*. Trong bài báo này chúng tôi tiến hành nghiên cứu sàng lọc hoạt tính kháng khuẩn các dịch chiết methanol và ethyl acetate của 20 loài rong đỏ và rong nâu Việt Nam.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Thu thập mẫu rong

Các mẫu rong biển thu thập vào các tháng 4, 5 và 6 năm 2010 tại các vùng biển miền Trung. Rong được rửa sạch sạn cát và các chất bẩn cơ học và phơi khô trong bóng râm, đen xay nhỏ và bảo quản tại nhiệt độ phòng. Xác định tên và phân loại bởi chuyên gia về rong biển, lưu giữ tiêu bản tại Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công nghệ Nha Trang.

2 Chuẩn bị mẫu chiết

Cân 1g rong khô đã xay nhỏ vào trong bình chiết màu nâu có dung tích 100 ml thêm vào đó 20 ml methanol 50%, để trong thời gian 48 giờ thỉnh thoảng lắc nhẹ. Lọc lấy dung dịch cô dưới áp suất tại nhiệt độ 40⁰C đến khi còn 5ml dung dịch, bảo quản trong tủ lạnh dùng để xác định hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết.

2.1. Chuẩn bị chiết phân đoạn

10g rong khô được thêm 200 ml methanol 50%. Quá trình ngâm này tiến hành trong 2 ngày ở nhiệt độ phòng. Sau đó, dịch lọc đem cô quay ở nhiệt độ 40⁰C thu được phần dịch nước được chiết phân đoạn lần lượt với các dung môi khác nhau như hexan (HX), cloroform (CF), ethylacetate (EA) và butanol (Bu).Thu được phân đoạn ethylacetate (EA) cô dưới áp suất tại nhiệt độ 40⁰C đến khi còn 5ml dung dịch, bảo quản trong tủ lạnh dùng để xác định hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết.

2.2. Thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn

Thử hoạt tính kháng khuẩn được tiến hành bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch theo phương pháp của El Masry HA và CS 1 với 100 µl dịch nuôi cấy có chứa $10^7 - 10^8$ và lượng dịch chiết sử dụng là 200 µl để thử hoạt tính

Kháng sinh kiểm định bao gồm: Cloramphenicol (10 mg/đĩa) đối với khuẩn Gr (+), Tetracylin (30 mg/đĩa) đối với vi khuẩn Gr (-).

Các chủng vi sinh vật kiểm định bao gồm :

Vi khuẩn Gr (-):	<i>Raoultella terigena</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Enterobacter cloace</i>
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
Vi khuẩn Gr (+):	<i>Staphylococcus hominis</i>
	<i>Baccillus subtilis</i>

Vi khuẩn được duy trì trong môi trường dinh dưỡng: Trypcase soya broth (TSB). Các chủng kiểm định được hoạt hóa trước khi tiến hành thử nghiệm trong môi trường dinh dưỡng dịch thể (24 giờ đối với vi khuẩn).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết methanol và ethylaxetate từ 20 loài rong được trình bày trên Bảng 1 và Bảng 2. Số liệu Bảng 1 cho thấy tất cả dịch chiết methanol có khả năng kháng từ 1 đến 4 chủng khuẩn trong số 6 chủng đem thử. Dịch chiết từ rong nâu có khả năng kháng nhiều chủng hơn dịch chiết từ rong đỏ.

Bảng 1. Hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết methanol chiết từ một số loài rong biển miền Trung Việt Nam

Chú thích: Rt: *Raoultella terigena*; Ec: *Enterobacter cloace*; Pa: *P. aeruginosa*; Vp: *Vibrio parahaemol-yticus*; Sh: *Staphylococcus hominis*; Bs: *Baccillus subtilis*.

TT	Nhóm	Loài rong	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)					
			Vi khuẩn Gr (-):			Vi khuẩn Gr (+)		
			Rt	Ec	Pa	Vb	Sh	Bs
1	Đối chúng	Cloramphenicol	9	12,5	8,5	13,5	13,5	23,5
2		Tetracylin	10	15,5	12,5	7,5	23,0	19,0
3	Rong Nâu	<i>S.crasifolium</i>	-	-	9	16	-	-
4		<i>S. seratum</i>	-	-	13	12	-	-

TT	Nhóm	Loài rong	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)					
			Vi khuẩn Gr (-):			Vi khuẩn Gr (+)		
			Rt	Ec	Pa	Vb	Sh	Bs
5		<i>S. baeculeria</i>	-	-	10	-	-	-
6		<i>S. cristaefolium</i>	-	-	12	-	-	-
7		<i>S. aemulum</i>	-	8	8	-	8	8
8		<i>S. kuetzingii</i>	-	11	8	-	8	9
9		<i>Turbinaria ornata</i>	-	12	-	14	-	-
10		<i>Dictyota linearis</i>	-	10	13	8	-	10
11		<i>D. dichotoma</i>	-	10	12	9	-	10
12		<i>Padina australis</i>	-	-	13	-	-	-
13		<i>Chnoospora Implexa</i>		11	12	8	-	8
14		<i>Hormophysa</i>	-	-	10	-	-	-
15		<i>Caulerpa cupresspoides</i>	-	11	9	-	-	-
16		<i>S. henslowianum</i>	-	10	13	8	8	-
17		<i>Gracilaria firma</i>	-	-	9	8	-	-
18	Rong đỏ	<i>Laurencia papilosa</i>	-	10	-	8	-	-
19		<i>Acanthophora spicifera</i>	-	11	-	13	12	-
20		<i>Porphyra Vietnameusis</i>	-	-	14	-	-	-
21	Rong lục	<i>Chaetomorpha linum</i>		-	-	8	-	-
22		<i>Enteromorpha intestinalis</i>	-	-	10	-	-	-

Kết quả này tương tự như nghiên cứu của Nagayama 6 và được giải thích bởi sự có mặt các hợp chất phlorotannin có trong rong nâu.

Trong số 14 loài rong đem thử hoạt tính thì có tới 06 dịch chiết từ các loài rong *S. Aemulum*, *S.kuetzingii*, *S.henslowianum*, *Dictyota linearis*, *Dictyota dichotoma*, *Chnoo. Implexa* có khả năng kháng 4 chủng vi khuẩn thuộc 02 dòng Gr (-) và Gr (+) và tất cả rong nâu đem thử đều có hoạt tính kháng khuẩn *Pseudomonas alruginoso* với đường kính vòng kháng khuẩn từ 8-13 mm gần tương đương với các chất kháng sinh. Các dịch chiết từ các loài rong *Dictyota linearis*, *Dictyota dichotoma* có khả năng kháng khuẩn mạnh nhất trong số các loài rong nâu nghiên cứu có thể do sự có mặt của tecpenoid trong loài rong này là nhiều nhất và nhóm hợp chất này được biết đến như là chất kháng khuẩn mạnh 7. Với rong đỏ thì 6 dịch chiết từ rong đỏ chỉ có dịch chiết từ rong *Acanthophora spicifera* có khả năng kháng 03 chủng.

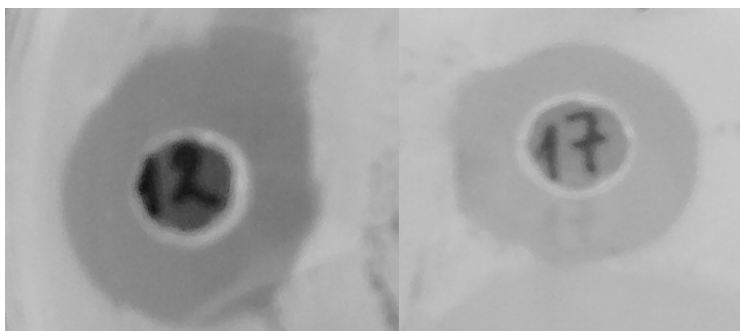
Bảng 2. Hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết Ethylaxetate chiết từ một số loài rong biển miền Trung Việt Nam

Chú thích: *Rt*: *Raoultella terigena*; *Ec*: *Enterobacter cloac*; *Pa*: *P. albuginosa*; *Vp*: *Vibrio parahaemolyticus*; *Sh*: *Staphylococcus hominis*; *Bs*: *Bacillus subtilis*.

T	Nhóm rong	Tên loài rong	Đường kính vòng kháng khuẩn					
			Vi khuẩn Gr (-):			Vi khuẩn Gr (+)		
			<i>Rt</i>	<i>Ec</i>	<i>Pa</i>	<i>Vp</i>	<i>Sh</i>	<i>Bs</i>
1	Đôi	<i>Cloramphenicol</i>	9	12,5	8,5	13,5	13,5	23,5
2	chúng	<i>Tetracylin</i>	10	15,5	12,5	7,5	23,0	19,0
3	Rong	<i>S. crasifolium</i>	21	-	20	22	20	21
4	Nâu	<i>S. seratum</i>	20	-	22	20	19	22
5		<i>S. baeculeria</i>	12	-	20	14	21	21
6		<i>S. cristaefolium</i>	12	-	21	12	18	18
7		<i>S. aemulum</i>	12	-	25	12	22	18
8		<i>S. kuetzingii</i>	-	-	23	-	-	-
9		<i>Turbinaria ornata</i>	18	-	24	12	17	19
10		<i>Dictyota linearis</i>	14	-	26	12	19	20
11		<i>Dictyota dichotoma</i>	14	-	26	12	21	20
12		<i>padina australis</i>	14	-	19	14	18	18
13		<i>Chnoo. implexa</i>	-	-	18	-	-	-
14		<i>Hormophysa</i>	12	14	26	12	22	20
15		<i>Caulerpa cupressoides</i>	18	-	19	18	21	17
16		<i>S. henslowianum</i>	-	-	21	-	-	-
17	Rong	<i>Gracilaria firma</i>	-	-	14	9,0	-	-
18	đỏ	<i>Laurencia papilosa</i>	-	10	12	10	-	-
19		<i>Acanthophora spicifera</i>	-	8	-	6	7	-
20		<i>Porphyra vietnameusis</i>	-	-	16	+	-	-
21	Rong lục	<i>Chaetomorpha linum</i>	-	-	11	9	-	-
22		<i>Enteromorpha intestinalis</i>	-	-	10	+	-	-

Từ Hình 1 cho thấy khả năng kháng khuẩn của một số loài rong phần lớn tương đương với các chất kháng sinh đem thử 10 mg với *Cloramphenicol* và 30 mg với *Tetracylin*. Kết quả này cho thấy khả năng sử dụng nguồn rong biển như là nguồn chất chống kháng khuẩn. Hoạt tính kháng khuẩn của các loài rong biển đã được nhiều nhà khoa học nghiên cứu 4. Tuy nhiên tùy theo phương pháp chiết, dung môi sử dụng chiết và địa điểm, thời gian lấy mẫu mà hoạt tính kháng khuẩn của chúng cũng biến đổi khác nhau 3. Một số dung môi hữu cơ đã được dùng để chiết và sàng lọc là benzen, clorofooc, methanol và axeton. Kết quả những nghiên cứu này cho thấy, khi các loài rong được chiết từ các dung môi kể trên đều có khả năng kháng khuẩn với mức độ khác nhau, điều này chứng tỏ rằng trong rong biển có chứa nhiều chất có hoạt

tính kháng khuẩn khác nhau. Để có thể tìm ra dung môi thích hợp có thể chiết được nhiều hợp chất có khả năng kháng khuẩn, trong bài báo này chúng tôi tiến hành chiết cả 02 dung môi có độ phân cực khác nhau. Đó là methanol tan trong nước và ethylaxetate không tan trong nước. Khả năng kháng khuẩn của 2 dung môi được dẫn ra trên Bảng 1 và 2, cho thấy sử dụng dung môi ethylaxetate có khả năng chiết nhiều chất kháng khuẩn hơn thể hiện qua đường kính vòng kháng khuẩn tăng mạnh khi sử dụng dung môi này. Tất cả các mẫu rong nâu mà chúng tôi nghiên cứu đều có khả năng kháng cả 04 chủng vi khuẩn trong khi chất chiết methanol chỉ có 06 loài rong kháng 4 chủng.



Hình 1. Hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết ethyl acetate đối với chủng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*

Như vậy, có thể cho rằng với rong nâu dịch chiết ethylaxetate tốt hơn dịch chiết methanol. Trong đó, hoạt tính mạnh nhất là dịch chiết ethylaxetate từ rong *S.crasifolium* với đường kính kháng khuẩn đều cao hơn cao hơn thuốc kháng sinh đem thử. Khi so sánh 02 dung môi là clorofooc và ethylaxetate nhóm tác giả Patra và CS (Patra và cs., 2009) cũng thu được kết quả là dung môi ethylaxetate tốt hơn đối với các loài rong *Enteromorpha compressa*, *Chaetomorpha linum* và *Polysiphonia subtilissima*. Tuy nhiên, với loài rong đỏ *Acanthophora spicifera* thì dịch chiết methanol có khả năng kháng khuẩn tốt hơn tương ứng với đường kính kháng khuẩn là 11-13 mm. Điều này có thể do dịch chiết methanol có chứa polysaccharide dạng agaran có khả năng kháng khuẩn trong khi dung môi ethylaxetate không hòa tan agaran 5. Mặc dù vậy đối với các loài rong đỏ khác hoạt tính kháng khuẩn đều tăng khi sử dụng dung môi ethylaxetate.

IV. KẾT LUẬN

Các dịch chiết methanol và ethylaxetate từ rong biển sinh trưởng tại miền Trung -Việt Nam đều có khả năng kháng khuẩn thuộc cả 2 dòng Gram (-) và Gram (+). Dịch chiết ethylaxetate từ rong nâu có khả năng kháng khuẩn mạnh hơn dịch chiết methanol. Trong số các loài rong nghiên cứu thì dịch chiết methanol của các loài *S.henslowianum*, *Dictyota dichotoma*, *Dictyota linearis* và dịch chiết ethylaxetate từ loài rong *S.crasifolium* có khả năng kháng khuẩn cao nhất.

Lời cảm ơn: Để hoàn thành kết quả trên, tập thể tác giả cảm ơn sự hỗ trợ kinh phí của đề tài “Nghiên cứu xây dựng quy trình chiết tách và sàng lọc các chất phlorotannin có hoạt tính sinh học từ rong Nâu tại vùng biển Nam Trung bộ” do Tiến sĩ Trần Thị Thanh Vân chủ nhiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bùi Minh Lý, Trần Thị Thanh Vân, Đặng Xuân Cường. 2009. Sàng lọc hoạt tính kháng khuẩn của một số loài rong biển Khánh Hòa, Tuyển tập Hội nghị Khoa học Toàn quốc về Sinh học biển và phát triển bền vững, ISBN 978-604-913-007-6, Hải phòng 11-2009, 671-677.
2. El Masry H.A., H.H. Fahmy, A.S.H. Abdelwhed. 2000. Synthesis and antimicrobial activity of some new benzimidazole derivatives, *Molecules* 5, 1429-1438.
3. Ely R., T. Supria, C. Naik. 2004. Antimicrobial activity of marine organisms collected off the coast of South East India. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 309:121-127.
4. Kandhasamy M., K.D. Arunachalam. 2008. Evaluation of in vitro antibacterial property of seaweeds of southeast coast of India, *Afr. J. Biotechbol.* 7(12), 1958-1961.
5. Kolanjinathan K., D. Stella. 2009. Antibacterial activity of marine macro algae against human pathogens. *Recent Res. Sci. Technol.*, 1(1), 20-22.
6. Maria E.R.D., P.C. Jean, G.N. Diego, D.N. Miguel, G. G. Alan, A.P. Carlos, B.D. Elsa, S. C. Alberto. 2004. The structure of the agaran sulfate from *Acanthoforia spicifera* (Rhodomelaceae, Ceramiales) and its antiviral activity, Relation between structure and antiviral activity in agarans. *Carbohydr. Res.*, 339, 335-347.
7. Nagayma K., Y. Iwamura, T. Shibata, T. Nakamura. 2002. Bactericidal activity phlorotannins from brown alga *Ecklonia kurome* , *J. Antimicrob. Chemother.* 50, 889-893.
8. Panayiota Siamopoulou, Antonis Bimplakis, Dimitra Iliopoulou, Constantinos Vagias, Paul Cos. 2004. Diterpenes from the brown algae *Dictyota dichotoma* and *Dictyota linearis*, *Phytochemistry*, 65,14, 2025-2030.
9. Patra J.K., A.P. Patra, N. Mahapatra, H.N. Thatoi. 2009. Antimicrobial activity of organic solvent extracts of three marine macroalgae from chilika lake orissa, India, *Malaysian J. Microbiol*, 5(2), 128-131.
10. Salvaldo N., A. Go'mez garreta, L. Lavelli, M.A. Ribera. 2007. Antimicrobial activity of Iberian macroalgae , *Sci. Mar* . 71:101-113.
11. Turney I., B.H. Cadirci, A. Sukata. 2007. In antimicrobial activities of crude extracts of marine algae from coast of Irmir (Turkey). *Fress. Environ. Bull*, 16:42, 428-434.