

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Bùi Thị Nam Phương

**NGHIÊN CỨU TUYỂN CHỌN CHỦNG VI NẤM
CÓ HOẠT TÍNH SINH HỌC ĐƯỢC PHÂN LẬP TỪ RONG BIỂN
Ở VỊNH NHA TRANG**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC THỰC NGHIỆM

Nha Trang - Năm 2023

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Bùi Thị Nam Phương

**NGHIÊN CỨU TUYỂN CHỌN CHỦNG VI NẤM
CÓ HOẠT TÍNH SINH HỌC ĐƯỢC PHÂN LẬP TỪ RONG BIỂN
Ở VỊNH NHA TRANG**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Mã số: 8420114

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Phan Thị Hoài Trinh', with a horizontal line underneath.

TS. Phan Thị Hoài Trinh

Nha Trang – Năm 2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.

Tác giả luận văn



Bùi Thị Nam Phương

LỜI CẢM ƠN

Trước hết, tôi xin gửi lời cảm ơn đến quý thầy cô giáo tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công nghệ Nha Trang đã tận tình chỉ dạy và truyền đạt kiến thức cho tôi trong suốt quá trình học tập để tôi hoàn thành các học phần trong chương trình đào tạo.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến giáo viên hướng dẫn của mình, TS. Phan Thị Hoài Trinh, Viện Nghiên cứu và Ứng dụng công nghệ Nha Trang đã trực tiếp định hướng nghiên cứu, hướng dẫn tôi thực hiện đề tài và hoàn thành luận văn thạc sĩ này. Đồng thời, tôi xin gửi lời cảm ơn đến các anh chị ở phòng Công nghệ sinh học biển thuộc Viện Nghiên cứu và Ứng dụng công nghệ Nha Trang đã hỗ trợ tôi trong quá trình tiến hành thực nghiệm.

Tôi xin chân thành cảm ơn Ban Lãnh đạo, Phòng Đào tạo và các phòng chức năng của Học viện Khoa học và Công nghệ đã giúp đỡ tôi trong quá trình học tập và hoàn thành luận văn này.

Cuối cùng, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn đến gia đình, người thân và bạn bè đã luôn ủng hộ, động viên tôi trong suốt quá trình học tập.

Nha Trang, ngày tháng năm 2023



Bùi Thị Nam Phương

MỤC LỤC

Trang

MỤC LỤC.....	1
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT	4
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	9
DANH MỤC CÁC HÌNH.....	10
MỞ ĐẦU	11
Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU	14
1.1. ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CỦA VI NẤM BIỂN.....	14
1.2. CÁC NGUỒN PHÂN LẬP VI NẤM BIỂN.....	16
1.2.1. Vi nấm từ động vật biển	16
1.2.1.1. <i>Vi nấm từ hải miên</i>	16
1.2.1.2. <i>Vi nấm từ san hô</i>	17
1.2.1.3. <i>Vi nấm từ hải sâm</i>	19
1.2.2. Vi nấm từ thực vật biển	19
1.2.2.1. <i>Vi nấm từ rong biển</i>	19
1.2.2.2. <i>Vi nấm từ cỏ biển</i>	20
1.2.2.3. <i>Vi nấm từ rừng ngập mặn</i>	21
1.2.3. Vi nấm từ trầm tích biển.....	21
1.3. CÁC HỢP CHẤT TỰ NHIÊN CÓ HOẠT TÍNH SINH HỌC TỪ VI NẤM BIỂN.....	23
1.3.1. Các hợp chất kháng sinh.....	23
1.3.2. Các hợp chất chống oxy hóa	27
1.3.3. Các hợp chất gây độc tế bào ung thư	29
1.3.4. Các hợp chất bảo vệ tế bào.....	32
1.4. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU CÁC HOẠT CHẤT SINH HỌC TỪ VI NẤM BIỂN	33

1.4.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới	33
1.4.2. Tình hình nghiên cứu ở Việt Nam.....	36
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	41
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	41
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu.....	41
2.1.2. Các chủng vi sinh vật kiểm định	41
2.1.3. Các dòng tế bào thử nghiệm.....	41
2.1.4. Hóa chất nghiên cứu.....	41
2.1.5. Thiết bị nghiên cứu.....	41
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	42
2.2.1. Thu thập mẫu rong biển.....	42
2.2.2. Phân lập vi nấm biển	42
2.2.3. Lên men và thu nhận cao chiết từ các chủng vi nấm biển	42
2.2.4. Thử nghiệm hoạt tính sinh học của cao chiết được thu nhận từ các chủng vi nấm biển	43
2.2.4.1. Hoạt tính kháng sinh	43
2.2.4.2. Hoạt tính chống oxy hóa	43
2.2.4.3. Hoạt tính gây độc tế bào ung thư.....	44
2.2.4.4. Hoạt tính bảo vệ tế bào	44
2.2.5. Xác định đặc điểm hình thái và phân loại chủng vi nấm biển tuyển chọn	45
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	46
3.1. PHÂN LẬP CÁC CHỦNG VI NẤM TỪ RONG BIỂN THU NHẬN Ở VỊNH NHA TRANG	46
3.2. ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA CÁC DỊCH CHIẾT LÊN MEN TỪ CÁC CHỦNG VI NẤM ĐƯỢC PHÂN LẬP	58
3.2.1. Hoạt tính kháng sinh.....	59

3.2.2. Hoạt tính chống oxy hóa	62
3.2.3. Hoạt tính gây độc tế bào.....	65
3.2.4. Hoạt tính bảo vệ tế bào.....	68
3.3. PHÂN LOẠI CHỦNG VI NẤM TUYỂN CHỌN CÓ HOẠT TÍNH SINH HỌC CAO	69
KẾT LUẬN	74
KIẾN NGHỊ	74
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ.....	75
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	76
PHỤ LỤC.....	93

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng việt
ABTS	2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid	
AchE	Acetylcholine	
ACHN	Renal carcinoma cell	Tế bào ung thư biểu mô thận
A431	Skin cancer cell	Tế bào ung thư da
A-549	Adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cell	Tế bào ung thư phổi
BV2	Mouse microglial cell	Tế bào thần kinh đệm của chuột
Bax	Bcl-2 Associated X	Bcl-2 liên quan đến X protein
BC	Bacillus cereus	
Caspases	Cysteine aspartases	
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis	Điện di Gel Gradient biến tính
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	Môi trường Dulbecco's Modified Eagle
DNA	Acid Deoxyribonucleic	
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl	

DU145	Prostatic carcinoma cell line	Tế bào ung thư tuyến tiền liệt
EC	Escherichia coli	
EPS	Exopolysaccharide	
EPSs	Exopolysaccharides	
FDA	Food and Drug Administration	Cục quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ
GluPY	Glucose-peptone-yeast extract	
GlyPY	Glycerol-peptone-yeast	
HCT-15	Human colon cancer cell	Tế bào ung thư đại tràng ở người
HCT-116	Human colon cancer cell	Tế bào ung thư đại tràng ở người
HEK293	Human embryonic kidney 293 cells	Tế bào thận phôi người
HeLa	HeLa cell	Tế bào ung thư cổ tử cung
HepG-2	Human liver cancer	Ung thư gan ở người
HL-60	Human leukemic cell	Tế bào ung thư bạch cầu ở người
Huh-7	Immortal cell	Dòng tế bào vĩnh viễn
H1N1	Hemagglutinine H1 và Neuraminidase N1.	
H116	Human colon tumor H116 cell	Dòng tế bào ung thư dạ dày ở người

H1975	Human lung cancer cell	Tế bào ung thư phổi ở người
H9c2	Normal mouse myocardium	Tế bào cơ tim chuột bình thường
IC ₅₀	Inhibitory concentration at 50%	Nồng độ ức chế 50% đối tượng thử nghiệm
ITS	Internal transcribed spacer	Vùng được phiên mã nội bộ
IR	Infrared Spectrum	Phổ khối
K-562	Human leukemic cell	Tế bào ung thư bạch cầu ở người
KP	Klebsiella pneumoniae	
KB	Keratinocyte/ Booster	
LDL	low density lipoprotein	Mật độ lipoprotein thấp
L1210	Murine lymphocytic leukemia	Tế bào bạch huyết dạng Lympho
MCF-7	Human breast carcinoma cell	Tế bào ung thư vú ở người
MDA-MB-231	Human breast cancer cell	Tế bào ung thư vú ở người
MeOH	Methanol	
MIC	Minimum Inhibitory Concentration	Nồng độ ức chế tối thiểu
MOLT-4	Human leukemia	Ung thư bạch cầu ở người
MS	Mass spectroscopy	Quang phổ hồng ngoại

MRSA	Methicillin-resistant Staphylococcus aureus	Tụ cầu vàng kháng methicillin
MTT	3 – [4,5-dimethylthiazol-2- yl] -2,5 diphenyl tetrazolium bromide	
NCBI	National Center for Biotechnology Information	Trung tâm Thông tin Công nghệ Sinh học Quốc gia
NCI-H23	Human lung cancer cell	Tế bào ung thư biểu mô phổi ở người
NCI-H460	Human lung cancer cell	Tế bào ung thư phổi ở người
NUGC-3	Gastric adenocarcinoma cell	Tế bào ung thư biểu mô dạ dày
OGD	Oxygen glucose deprivation	Thiếu hụt glucose oxy
PA	Pseudomonas aeruginosa	
PC-3	Prostatic carcinoma cell	Tế bào ung thư tuyến tiền liệt
PC12	Pheochromocytoma	Tủy thượng thận
ROS SA	Reactive oxygen species Staphylococcus aureus	Loài oxy phản ứng
SAA SF	Axit Secalonic A Streptococcus faecalis	
SGC-7901	Human gastric cancer	Ung thư dạ dày ở người
SK-MEL-2	Human skin cancer	Ung thư da ở người

SMMC-7721 ST	Human hepatocellular carcinoma (HCC) cell line Salmonella Typhimurium	Dòng tế bào ung thư biểu mô tế bào gan (HCC) ở người
SW1990	Pancreatic cancer cell	Tế bào ung thư tuyến tụy
SW480	Human brain cancer cells	Tế bào ung thư não ở người
U251	Colon cancer cells	Tế bào ung thư đại tràng
U937	white blood cells	Tế bào bạch cầu
ZMT	Tropical Marine Research Center	Trung tâm nghiên cứu biển nhiệt đới

DANH MỤC CÁC BẢNG

Trang

Bảng 3.1. Danh sách các mẫu rong biển, địa điểm thu mẫu và số lượng các chủng vi nấm phân lập được	46
Bảng 3.2. Danh sách và đặc điểm hình thái của 38 chủng vi nấm biển được phân lập từ các mẫu rong biển	48
Bảng 3.3. Hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của 38 chủng vi nấm phân lập được.....	59
Bảng 3.4. Hoạt tính chống oxy hóa của 38 chủng vi nấm phân lập	63
Bảng 3.5. Hoạt tính gây độc tế bào của 38 chủng vi nấm phân lập	65
Bảng 3.6. Phân loại 05 chủng vi nấm biển dựa trên phân tích trình tự gen vùng ITS	70

DANH MỤC CÁC HÌNH

	Trang
Hình 3.1. Các chủng vi nấm được lên men trên môi trường gạo (a) và ngâm chiết với ethyl acetate (b)	59
Hình 3.2. Hoạt tính kháng <i>B. cereus</i> (a), <i>S. faecalis</i> (b) và <i>S. aureus</i> (c) của một số chủng vi nấm phân lập	61
Hình 3.3. Hoạt tính bảo vệ tế bào cơ tim H9c2	68
Hình 3.4. Cây phát sinh chủng loại của các chủng vi nấm biển tuyển chọn xây dựng dựa trên trình tự đoạn gen vùng ITS theo phương pháp Neighbor Joining, bootstrap 1000 lần, scale bar = 0,05, được thực hiện bằng phần mềm MEGA7.0	71

MỞ ĐẦU

Trong những năm gần đây, các hợp chất có nguồn gốc tự nhiên với các ưu điểm vượt trội về hoạt tính sinh học và tính an toàn cũng như tiềm năng ứng dụng rộng lớn trong lĩnh vực y dược đã thu hút sự quan tâm của các nhà khoa học và cả xã hội. Trong số đó, các hợp chất tự nhiên có nguồn gốc từ biển đang là một hướng đi tiềm năng, hứa hẹn mang đến những sản phẩm y dược mới góp phần chăm sóc và bảo vệ sức khỏe cộng đồng. Mặc dù chiếm hơn 70% bề mặt trái đất nhưng môi trường biển vẫn chưa được nghiên cứu khai thác đầy đủ về lĩnh vực sinh học. Số lượng vi sinh vật biển được làm rõ thông tin về hình thái, di truyền và đặc tính sinh học chỉ chiếm khoảng 0,01% trong số khoảng hơn 1 triệu loài vi sinh vật biển được công bố [1]. Các điều kiện đặc biệt ở môi trường biển liên quan đến áp suất, nhiệt độ, độ mặn, ánh sáng và hàm lượng dinh dưỡng đã tạo điều kiện cho các vi sinh vật biển có khả năng sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp có cấu trúc hóa học độc đáo và hoạt tính sinh học đáng chú ý hơn rất nhiều so với các vi sinh vật trên cạn [2]. Do đó, vi sinh vật biển nói chung và vi nấm biển nói riêng được xác định là nguồn khai thác phong phú các chất chuyển hóa có hoạt tính sinh học. Vi nấm biển là một nhóm sinh vật đa dạng về mặt sinh hóa đại diện cho một nguồn hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học mới đầy hứa hẹn. Các nhóm chất chuyển hóa thứ cấp được sản xuất bởi vi nấm biển bao gồm terpenoid, steroid, polyketide, peptide, alkaloid và polysacarit. Các chất chuyển hóa này chủ yếu liên quan đến các hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm, chống ung thư, chống oxy hóa, bảo vệ tế bào...[3], [4].

Vi nấm biển hiện diện ở khắp nơi trong hệ sinh thái biển bao gồm vi nấm liên kết với hải miên, san hô, rong biển, cỏ biển hoặc sống tự do trong nước biển, trầm tích biển [5]. Trong đó, rong biển được đánh giá là một trong những nguồn phân lập quan trọng của vi nấm biển với một phần ba tổng số loài vi nấm thu nhận có liên quan đến nhóm thực vật biển này [6], [7], [8]. Đáng lưu ý là nhiều hợp chất tự nhiên có giá trị sinh học đã được thu nhận từ các chủng vi nấm liên kết với rong biển [9]. Cho đến nay nhiều chi nấm được phân lập từ rong biển đã được nghiên cứu các hoạt chất sinh học bao gồm *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Paecilomyces*, *Chaetomium*, *Penicillium*, *Guignardia*, *Phoma*, *Talaromyces*, *Gibberella*, *Coniothyrium*, trong đó chủ yếu là các loài thuộc chi *Aspergillus* và *Penicillium* [10], [9].

Vịnh Nha Trang là nơi có điều kiện khí hậu và môi trường thuận lợi cho sự phát triển của các hệ sinh thái rạn san hô, rong biển, thảm cỏ biển, rừng ngập mặn [11]. Kết quả điều tra cho thấy trữ lượng rong ở Khánh Hòa chiếm tỷ lệ cao nhất cả nước, đặc biệt là các loài rong nâu thuộc chi *Sargassum*. Nhiều hoạt chất sinh học có giá trị như các hợp chất chống oxy hóa, kháng khuẩn, chống u, ung thư và virus HIV... đã được thu nhận từ các đối tượng rong sinh trưởng tại vùng biển Nha Trang [12], [13], [14]. Đặc biệt là một số nghiên cứu gần đây đã cho thấy nhiều hợp chất có cấu trúc mới và hoạt tính sinh học có giá trị y dược đã được thu nhận từ các chủng vi nấm biển phân lập từ các loài rong nâu và rong lục ở vùng biển này [15], [16]. Chính vì vậy việc tiếp tục nghiên cứu tìm kiếm chủng vi nấm có khả năng sinh tổng hợp các hoạt chất sinh học được phân lập từ rong biển ở vịnh Nha Trang là cần thiết, có giá trị khoa học và ý nghĩa thực tiễn, góp phần định hướng nghiên cứu và khai thác một cách hiệu quả nguồn tài nguyên vi sinh vật biển ở Việt Nam. Đó chính là lý do chúng tôi thực hiện đề tài **“Nghiên cứu tuyển chọn chủng vi nấm có hoạt tính sinh học được phân lập từ rong biển ở vịnh Nha Trang”**.

- Mục đích nghiên cứu

Tìm kiếm được chủng vi nấm có khả năng sinh tổng hợp các hoạt chất sinh học được phân lập từ rong biển ở vịnh Nha Trang.

- Nội dung nghiên cứu:

(1) Nội dung 1: Phân lập các chủng vi nấm từ rong biển thu nhận ở vịnh Nha Trang.

(2) Nội dung 2: Đánh giá hoạt tính sinh học (kháng sinh, chống oxy hóa, gây độc tế bào và bảo vệ tế bào) của các dịch chiết lên men từ các chủng vi nấm được phân lập.

(3) Nội dung 3: Phân loại chủng vi nấm tuyển chọn có hoạt tính sinh học cao.

- Cơ sở khoa học và tính thực tiễn của đề tài

+ Ý nghĩa khoa học: Kết quả nghiên cứu của đề tài cung cấp dữ liệu khoa học về tiềm năng sinh học của nguồn tài nguyên vi nấm phân lập từ rong biển ở vịnh Nha Trang. Nghiên cứu đã tuyển chọn được các chủng vi nấm biển có hoạt tính sinh học cao để tiếp tục nghiên cứu phân tách các hoạt chất sinh học

từ các chủng vi nấm tiềm năng.

+ Tính thực tiễn của đề tài: Kết quả nghiên cứu là cơ sở để khai thác các hợp chất tự nhiên có các hoạt tính sinh học như kháng sinh, chống oxy hóa, gây độc tế bào ung thư và bảo vệ tế bào từ nguồn vi nấm phân lập từ rong biển ở vịnh Nha Trang, nhằm định hướng ra các sản phẩm tự nhiên có hiệu quả và tính an toàn cao định hướng ứng dụng trong lĩnh vực y dược đồng thời hướng đến xây dựng và bảo tồn nguồn gen vi nấm có giá trị y dược ở vùng biển Khánh Hòa.

- Những đóng góp của luận văn:

Đề tài đã sàng lọc và đánh giá các hoạt tính sinh học bao gồm hoạt tính kháng sinh, chống oxy hóa, gây độc tế bào ung thư và bảo vệ tế bào cơ tim H9c2 của 38 chủng vi nấm được phân lập từ các mẫu rong nâu và rong lục thu nhận ở vùng biển Nha Trang. Kết quả của đề tài đã tuyển chọn được 05 chủng vi nấm *Penicillium chermesinum* 2104NT-1.3, *Aspergillus* sp. 2104NT-1.5, *Cladosporium* sp. 2104NT-2.1, *Aspergillus* sp. 2104NT-3.3, và *Aspergillus* sp. 2104NT-7.7 có hoạt tính sinh học cao để tiếp tục nghiên cứu sâu hơn về phân tách và thu nhận các hợp chất tự nhiên và thử nghiệm các hoạt tính sinh học. Đây cũng là nghiên cứu đầu tiên tiến hành đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư và bảo vệ tế bào cơ tim của các chủng vi nấm phân lập từ rong lục và rong nâu ở vịnh Nha Trang.

Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CỦA VI NẤM BIỂN

Vi nấm biển ban đầu được định nghĩa dựa trên các đặc điểm sinh lý của chúng như yêu cầu về nồng độ muối để phát triển [17]. Đầu tiên, ‘vi nấm biển’ được chia thành 2 nhóm với hệ sinh thái khác nhau: vi nấm biển bắt buộc hoặc không bắt buộc (obligate and facultative marine fungi). Vi nấm biển bắt buộc là các loài vi nấm phát triển và tạo bào tử chỉ ở môi trường biển và khu vực cửa sông, trong khi vi nấm biển không bắt buộc là các loài vi nấm xuất phát từ môi trường nước ngọt hoặc trên cạn nhưng có khả năng phát triển và tạo bào tử trong môi trường biển. Tuy nhiên dựa trên định nghĩa này hai nhóm vi nấm biển trên khó phân biệt và gây nhiều tranh cãi. Sau đó, Jones và cộng sự [18] định nghĩa vi nấm biển bắt buộc là các loài nấm được phân lập từ vật liệu/cơ chất bất kỳ dưới biển hoặc trầm tích từ môi trường biển. Gần đây, Pang và cộng sự [19] đề xuất định nghĩa rộng hơn về “vi nấm biển” cũng như vi nấm có nguồn gốc từ biển (marine-derived fungi) và kể từ đây vi nấm biển được định nghĩa là vi nấm bất kỳ có khả năng: (i) sinh trưởng và/hoặc tạo bào tử trên vật liệu/cơ chất trong môi trường biển; (ii) có mối quan hệ cộng sinh với các loài sinh vật trong môi trường biển; hoặc (iii) thích hợp và tiến hóa hoặc có khả năng trao đổi chất trong môi trường biển. Số lượng các loài nấm biển được ước tính dao động trong khoảng 1,5 đến 5,1 triệu loài, trong đó chỉ có khoảng 1% loài nấm được nghiên cứu [20], [21], [22]. Theo số liệu thống kê đến tháng 02/2021, số lượng các loài vi nấm biển được mô tả gồm 1.901 loài, thuộc 769 chi, 226 họ, 88 bộ, 22 lớp và 07 ngành, bao gồm *Aphelidiomycota*, *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Blastocladiomycota*, *Chytridiomycota*, *Mortierellomycota* và *Mucoromycota* [23].

Trong suốt 2 thập kỷ qua, nhiều nghiên cứu về sự đa dạng và vai trò của vi nấm biển đã được tiến hành qua cách tiếp cận không phụ thuộc nuôi cấy. Cho đến nay, các phương pháp giải trình tự thế hệ mới đã được sử dụng để nghiên cứu các loài vi nấm trong môi trường biển. Tuy nhiên, một vài trong số các loại nấm biển đã biết có số lượng trình tự gen trong vùng ITS (internal transcribed spacer region) là hạn chế và thường được nhận biết dựa trên một phần vùng ITS hoặc 18S rRNA. Do vậy, cây phân loại dựa trên trình tự gen kết

hợp với đặc điểm về hình thái rất quan trọng để định danh loài vi nấm biển một cách chính xác [24], [3].

Vi nấm là sinh vật đơn giản nhất trong số các sinh vật nhân thực dị dưỡng, không quang hợp, có kích thước rất nhỏ từ 2 đến 500 μm và bị bao bọc bởi thành tế bào chitin. Nó có thể phân biệt với nấm lớn do quả thể đa bào của vi nấm biển không đủ lớn để có thể quan sát bằng mắt thường. Loài vi nấm thường phát triển bằng cách hấp thụ các chất dinh dưỡng từ môi trường sống xung quanh [25].

Trong các sinh vật ở biển, vi nấm biển được xem là một trong các thành phần chính trong chuỗi thức ăn ở biển và chúng tồn tại như các sinh vật hoại sinh, sinh vật tương hỗ, cộng sinh và ký sinh. Trong vai trò hoại sinh, vi nấm biển có thể khu trú trong thực vật, rong cũng như động vật và chuyển hóa các nguồn hữu cơ từ các đối tượng này thành các nguồn dinh dưỡng cho chúng sử dụng. Trong vai trò tương hỗ, vi nấm biển có thể kết hợp với các sinh vật khác như hải miên hoặc động vật nguyên sinh để cả hai cá thể cùng có lợi. Khi cộng sinh, vi nấm biển có thể cung cấp năng lượng cho vật chủ hoặc chia sẻ lợi ích từ chức năng bảo vệ của vật chủ. Khi ký sinh trên sinh vật phù du, thực vật, rong cũng như động vật, vi nấm biển hòa tan các chất hữu cơ và phân hủy vật chủ của nó [26].

Vi nấm biển rất phong phú, đa dạng và tồn tại hầu hết trong các môi trường sống của hệ sinh thái biển bao gồm trầm tích, liên kết với hải miên, san hô, rong, các động vật biển không xương sống và các thực vật biển khác. Chúng phân bố ở những vị trí khác nhau từ vùng biển sâu đến vùng nước bề mặt [27], [28], [29]. Phần lớn các loài nấm được phân lập từ môi trường biển thuộc các ngành nấm chính như *Ascomycota*, *Basidiomycota* và *Chytridiomycota*.

Vi nấm biển thường sinh trưởng tốt trong môi trường giàu dinh dưỡng như các sinh vật chủ (hải miên, rong biển), trầm tích và các mảnh vụn bị phân hủy từ xác động vật, thực vật. Đây là các vị trí mà vi nấm có khả năng bám dính vào vật chủ, tiết ra enzyme và phá vỡ các polymer sinh học phức tạp và hấp thụ chất dinh dưỡng. Chính vì vậy, vi nấm ở tầng nước bề mặt được đánh giá có tính đa dạng thấp hơn do hàm lượng chất dinh dưỡng thấp [30].

1.2. CÁC NGUỒN PHÂN LẬP VI NẤM BIỂN

Vi nấm thường xuất hiện ở hầu hết các môi trường sống dưới biển từ bề mặt đại dương cho đến hàng kilomet bên dưới lớp trầm tích đại dương [27]. Vi nấm biển có thể được phân lập từ nhiều cơ chất khác nhau ở biển như gỗ và lá của thực vật, rong biển, hải miên, san hô, gỗ nổi, thực vật trong vùng đất ngập mặn (*Spartina*), san hô và cát trên bãi biển [31] cũng như từ các môi trường biển đặc biệt như lỗ thông thủy nhiệt (hydrothermal vents), các rãnh sâu dưới đáy biển (deep-sea trenches), các lỗ phun methane lạnh (cold methane seeps), các bề mặt sâu dưới biển (deep-sea subsurfaces) và có độ mặn cao (hypersaline), ở các tầng nước biển có lượng oxi khác nhau [32], [33], [34].

1.2.1. Vi nấm từ động vật biển

1.2.1.1. Vi nấm từ hải miên

Vi nấm biển sống cộng sinh với nhiều sinh vật biển khác nhau, trong số đó, vi nấm biển cộng sinh với loài hải miên có tính đa dạng loài cao và có khả năng tạo ra nhiều hợp chất tự nhiên mới và phong phú [28].

Trong những năm qua, các nhà khoa học đã chứng minh rằng có rất nhiều loài vi nấm đã hiện diện bên trong mô của các loài hải miên và nhiều công trình cũng đã công bố về các hoạt chất sinh học đặc biệt của chúng [35]. Gần một phần năm các hợp chất mới từ nấm biển đã được phân lập từ các chủng vi nấm liên kết với hải miên từ năm 2010 đến năm 2020 [36]. Gao và cộng sự [37] đã điều tra về mối quan hệ cộng sinh giữa các loài vi nấm và 2 loài hải miên *Suberites zeteki* và *Mycale armata* ở vịnh Kaneohe, Hawaii. Qua kết quả phân tích bằng phương pháp điện di gel gradient biến tính (DGGE) cho thấy là 23 và 21 loài vi nấm đã được phân lập lần lượt từ hải miên thuộc hai loài *Suberites zeteki* và *Mycale armata*. Các loài vi nấm này đại diện cho 11 bộ và thuộc ngành *Ascomycota* (7 bộ) và *Basidiomycota* (4 bộ), bao gồm các chi: *Cladosporium*, *Hortaea*, *Aureobasidium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Hypocreales*, *Gibberella*, *Candida*, *Ascomycota*, *Phoma*, *Schizophyllum*, *Phlebia*, *Malassezia*, và *Basidiomycete* [38]. Tương tự, Menezes và cộng sự [39] đã phân lập được tổng số 256 loài vi nấm thuộc các chi *Aspergillus*, *Agaricales*, *Atheliales*, *Acremonium*, *Arthtiniun*, *Bionectria*, *Botryosphaeria*, *Cunninghamella*, *Mucor*, *Nectria*, *Pestalotiopsis*, *Polyporales*, *Rhizopus*, *Cladosporium*, *Cochliobolus*,

Fusarium, *Glomerella*, *Penicillium*, *Phoma*, và *Trichoderma* từ 8 loài hải miên và 1 loài rong biển ở Brazil bao gồm: *Amphimedon viridis*, *Axinella corrugata*, *Dragmacidon reticulata*, *Geodia corticostylifera*, *Mycale laxissima*, *Mycale angulosa*, *Didemnum ligulum*, *Didemnum* sp., *Sargassum* sp.

Theo kết quả nghiên cứu của Wiese và cộng sự (2011), 81 chủng vi nấm được phân lập từ loài hải miên *Tethya aurantium* ở Địa Trung Hải được xác định thuộc 21 chi, đa số là các chủng thuộc chi *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Phomopsis* và *Trichoderma*. Ngoài ra, nhóm nghiên cứu còn phân lập được các chủng vi nấm thuộc các chi hiếm gặp như *Botryosphaeria*, *Epicoccum*, *Parasphaeosphaeria* và *Tritirachium* [40]. Năm 2010, Ding và cộng sự đã nghiên cứu về sự đa dạng của vi nấm cộng sinh với 2 loài hải miên *Clathrina luteoculcitella* và *Holoxea* sp. được thu thập ở vùng biển Đông. Nhóm nghiên cứu đã phát hiện 17 chi vi nấm thuộc 2 ngành *Ascomycota* và *Basidiomycota*, trong đó có 5 chi (*Aspergillus*, *Davidiella*, *Fusarium*, *Paecilomyces* và *Penicillium*) được phân lập ở cả 2 loài hải miên này và 12 chi (*Apiospora*, *Botryosphaeria*, *Candida*, *Marasmius*, *Cladosporium*, *Didymocrea*, *Hypocrea*, *Lentomitella*, *Nigrospora*, *Pestalotiopsis*, *Rhizomucor* và *Scopulariopsis*) chỉ phát hiện ở loài hải miên *C. luteoculcitella*. Đặc biệt 8 chi vi nấm như *Apiospora*, *Botryosphaeria*, *Davidiella*, *Didymocrea*, *Lentomitella*, *Marasmius*, *Pestalotiopsis* và *Rhizomucor* lần đầu tiên được phát hiện ở hải miên [41]. Nhiều nghiên cứu cũng đã cho thấy sự hiện diện của chi *Aspergillus* khá phổ biến khi phân lập được từ 14 loài hải miên ở miền Nam Ấn Độ [28]. Bovio và cộng sự [42] đã phát hiện hai loài vi nấm mới là *Thelebolus balaustiformis* và *T. spongiae* từ ba loài hải miên ở Đại Tây Dương: *Dysidea fragilis*, *Pachymatisma johnstonia* and *Sycon ciliatum*.

Như vậy, vi nấm có nguồn gốc từ hải miên hiện diện trong hệ sinh thái biển rất đa dạng và phong phú. Nhiều loài nấm mới và hiếm gặp đã được phân lập từ các loài hải miên ở nhiều vùng biển khác nhau.

1.2.1.2. Vi nấm từ san hô

Nghiên cứu đã cho rằng có sự tương tác giữa động vật không xương sống như san hô và vi nấm biển liên quan đến cả hai nhóm san hô ở vùng nước nông và biển sâu [43]. Những loài san hô mềm này chứa nhiều loài vi nấm biển khác

nhau có khả năng tạo ra các chất chuyển hóa đa dạng về mặt hóa học và có hoạt tính sinh học [44]. Theo kết quả nghiên cứu của Paulino và cộng sự [43], 89 chủng vi nấm đã được phân lập từ các loài san hô và hải miên ở Đông Bắc Brazil. Thông qua giải trình tự gen vùng ITS rDNA đã xác định được 43 loài vi nấm thuộc 16 chi, hầu hết các chủng vi nấm này đều thuộc ngành *Ascomycota* và bao gồm 4 chi phổ biến như *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* và *Cladosporium*.

Các hợp chất chống ung thư, kháng vi rút, kháng khuẩn, chống oxy hóa và kháng miễn dịch đã được các nhà khoa học phát hiện từ 11 chi vi nấm nội sinh được phân lập từ các loài san hô khác nhau bao gồm *Diploria clivosa*, *Diploria strigose*, *Acropora palmate*, *Plexaura flexuosa*, *Pseudoplexaura porosa*, *Pseudoterogorgia americana*, và *Sidastrea sidereal*. Trong số đó, các chi *Fusarium* và *Curvularia* có nguồn gốc từ san hô cho thấy có hoạt tính gây độc cao nhất đối với một loạt các dòng tế bào ung thư như tế bào ung thư vú, phổi, cổ tử cung và ruột kết [45].

Abd El-Rahman và cộng sự [46] đã phân lập được 18 chủng vi nấm thuộc ngành *Ascomycota*, *Mucoromycota* và *Deuteromycota*, năm chi gồm: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Byssochlamys*, *Rhizopus* và *Curvularia* thuộc 3 bộ *Eutrotiales*, *Mucorales* và *Moniliales* phân lập từ 10 loài san hô thuộc 9 họ bao gồm: *Acroporidae*, *Faviidae*, *Euphylliidae*, *Scleractinia incertae sedis*, *Gorgoniidae*, *Mussidae*, *Poritidae*, *Pocilloporidae* và *Agariciidae* ở vùng Biển Đỏ Ein El-Sukhna.

Năm 2022, Zeng và cộng sự [47] đã tìm thấy loài nấm có tên *Aspergillus hiratsukae* SCSIO 5Bn1003 từ san hô ở vùng biển Nam của Trung Quốc, từ đó phát hiện ra 13 hợp chất thuộc các nhóm chất peptide, ecdysteroid, sesquiterpene lactone, triterpene, butyrolactones, benzaldehyde, bisphthalate và coumarin. Bên cạnh đó, một số hợp chất có hoạt tính sinh học chống lại tác nhân gây bệnh nấm *Candida albicans* và *Aspergillus flavus* cũng được phát hiện bởi Putri và cộng sự [48] bằng phương pháp phân tích gen rRNA cho thấy có liên quan chặt chẽ đến loài *Aspergillus unguis* cộng sinh với san hô mền loài *Sinularia* sp. ở đảo Panjang của biển Bắc Java.

1.2.1.3. Vi nấm từ hải sâm

Bên cạnh hải miên và san hô, vi nấm cũng được phát hiện từ các loài hải sâm. Marchese và cộng sự [49] đã phát hiện 498 chủng vi nấm được phân lập từ 18 mẫu hải sâm *Holothuria poli* ở Đại Trung Hải. Tất cả đều thuộc ngành *Ascomycota*, phổ biến là các chi *Aspergillus* và *Penicillium*, ngoài ra còn có các chi *Chaetomium*, *Acremonium* và *Trichoderma*, bao gồm các loài đại diện *A. creber*, *A. foetidus*, *A. fructus*, *A. micronesiensis*, *A. spelaeus*, *Auxarthron ostraviense*, *Chaetomium subaffine*, *Emericella quadrilineata*, *Myriodontium keratinophilum*, *P. adametzii*, và *Trichoderma epimyces*.

Gần đây, báo cáo cho thấy các vi nấm được phân lập từ sáu loài hải sâm: *A. japonicus*, *Cucumaria japonica*, *Eupentacta scamatrix*, *Holothuria nobilis*, *Holothuria poli*, và *Stichopus japonicus*. Trong đó, số lượng loài vi nấm phân lập được từ loài hải sâm *H. poli* được báo cáo là nhiều nhất với 16 chi. Mười ba chi được phân lập từ *E. scamatrix* và mười hai chi được phân lập từ *A. japonicus*. Hai, ba và một chi vi nấm lần lượt được phân lập từ hải sâm *C. japonica*, *H. nobilis* và *S. japonicus* [50].

1.2.2. Vi nấm từ thực vật biển

1.2.2.1. Vi nấm từ rong biển

Vi nấm biển đã được báo cáo như sinh vật ký sinh, hoại sinh hoặc nội sinh trong rong biển. Rong biển là nhóm sinh vật đa bào tự dưỡng và có thể chia thành 3 nhóm rõ rệt là rong đỏ, rong xanh và rong nâu. Rong nâu thuộc lớp *Phaeophyceae* và chứa sắc tố fucoxanthin làm cho rong có màu nâu pha xanh. Ở một vài nước chúng được dùng như thực phẩm [51]. Số lượng nấm nội sinh được phân lập từ rong đỏ và rong nâu lớn hơn so với số lượng nấm phân lập từ rong lục [28]. Sự đa dạng của nấm nội sinh trong rong phụ thuộc vào các yếu tố môi trường như mùa, loài và tuổi vật chủ [52].

Các chi vi nấm cộng sinh với rong biển đã được báo cáo gồm *Acremonium*, *Arthriniun*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Phoma* và *Trichoderma* [53]. Zuccaro và cộng sự [54] đã nghiên cứu và phát hiện một số loài vi nấm cộng sinh với rong nâu *Fucus serratus*. Các chủng vi nấm được phân lập thuộc các họ *Halosphaeriaceae*, *Lulworthiaceae*, *Hypocreales* và *Dothideomycetes* và gồm các chi phổ biến như

Cladosporium, *S. marina*, *Acremonium fuci*, *Dendryphiella salina* và *Fusarium*. Loque và cộng sự [53] đã nghiên cứu các loài vi nấm sợi và vi nấm men liên quan đến rong biển *Adenocystis utricularis*, *Desmarestia anceps* và *Palmaria decipiens* từ Nam Cực. Kết quả là 75 chủng vi nấm được phân lập, đại diện là 27 chủng vi nấm sợi và 48 chủng vi nấm men thuộc các chi *Geomyces*, *Antarctomyces*, *Oidiodendron*, *Penicillium*, *Phaeosphaeria*, *Aureobasidium*, *Cryptococcus*, *Leucosporidium*, *Metschnikowia* và *Rhodotorula* .

Các công bố cũng đã chỉ ra rằng các loài vi nấm được nghiên cứu có nguồn gốc từ một số lượng lớn các chi rong biển gồm *Ascophyllum*, *Ballia*, *Ceramium*, *Caulerpa*, *Ceratodictyon*, *Chondrus*, *Cladophora*, *Dilsea*, *Dictyota*, *Enteromorpha*, *Egregia*, *Fucus*, *Gelidiella*, *Grateloupia*, *Gracilaria*, *Halimeda*, *Halymenia*, *Hypnea*, *Laminaria*, *Lobophora*, *Padina*, *Portieria*, *Porphyra*, *Saccorhiza*, *Sargassum*, *Stoechospermum*, *Turbinaria*, và *Ulva* [10]. Các nhà khoa học cũng phát hiện được vi nấm liên kết với các loài rong thuộc các chi *Sargassum*, *Laurencia*, *Enteromorpha*, *Ulva*, *Codium*, *Grateloupia*, *Leathesia*, *Pterocladia* và *Undaria* có khả năng tổng hợp nhiều hoạt chất sinh học mới và có giá trị trong y dược [9].

Các loài vi nấm biển ngày càng được chú ý trong những năm gần đây, đặc biệt là các loài vi nấm cộng sinh với rong biển. Bên cạnh việc tạo ra các hoạt chất sinh học có giá trị y dược như chống oxi hóa, kháng khuẩn, chống ung thư, những loài vi nấm này đóng một vai trò quan trọng trong các hệ sinh thái biển như là vi sinh vật hoại sinh, giúp phân hủy xác rong và cung cấp dinh dưỡng cho hệ sinh thái biển [55].

1.2.2.2. Vi nấm từ cỏ biển

Cỏ biển được xác định là một trong những nguồn phân lập các chủng vi nấm có giá trị trong những năm gần đây. Panno cùng cộng sự [56] đã phân lập 88 loài vi nấm (chủ yếu thuộc ngành *Ascomycota* và phổ biến ở các chi *Penicillium*, *Cladosporium* và *Acremonium*) có nguồn gốc từ cỏ biển *Posidonia oceanica*. Sự đa dạng của vi nấm cộng sinh với cỏ biển *Enhalus acoroides* ở Thái Lan. Phần lớn các loài vi nấm thuộc ngành *Ascomycota* (98%), *Basidiomycota* (2%). Trong đó 3 lớp chính thuộc ngành *Ascomycota* gồm

Sordariomycetes, *Eurotiomycetes* và *Dothideomycetes* với các loài hiện diện thuộc chi *Aspergillus*, *Penicillium* và *Cladosporium* [57].

1.2.2.3. Vi nấm từ rừng ngập mặn

Rừng ngập mặn là nơi sinh sống của một số lượng lớn các cộng đồng vi nấm. Các loài vi nấm này đóng một vai trò quan trọng trong chu trình dinh dưỡng và hỗ trợ hệ sinh thái rừng ngập mặn [58], [59].

Các nghiên cứu về vi nấm rừng ngập mặn cho thấy có tổng cộng 625 nhóm vi nấm tồn tại ở quy mô toàn cầu bao gồm 278 *Ascomycetes*, 277 *Anamorphic taxa*, 30 *Basidiomycetes* và 14 *Oomycetes*. Kết quả nghiên cứu của Liu và cộng sự [44] đã cho thấy hơn 200 loài vi nấm nội sinh đã được phân lập và xác định từ rừng ngập mặn, chủ yếu là các chi *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Clolletotrichum*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Phoma*, *Phomopsis*, *Phyllosticta* và *Trichoderma*. Kết quả của Hyde và Jones [60] đã phân lập vi nấm từ rừng ngập mặn ở quần đảo Seychelles (Ấn Độ Dương) thu thập được 47 loài vi nấm, trong đó 37 loài thuộc *Ascomycotina*, 1 loài thuộc *Basidiomycotina* và 9 loài thuộc *Deuteromycotina*, với các loài chủ yếu là *Halocyphura villous*, *Aniptodera mungrovii*, *Antennospora quudricorruita*, *Halosarpheia marina*, *Ascomycete* sp., và *Lulworthia grandispora*.

Như vậy, sự phong phú và đa dạng của vi nấm biển có nguồn gốc từ rừng ngập mặn sẽ đóng một vai trò quan trọng trong việc đáp ứng nhu cầu về sàng lọc các hợp chất mới. Một số chất chuyển hóa có nguồn gốc từ vi nấm ở rừng ngập mặn và có hoạt tính sinh học, đặc biệt từ vi nấm nội sinh rừng ngập mặn, được sử dụng trong ngành dược phẩm như thuốc kháng sinh, trị tiểu đường, kháng vi-rút, chống viêm, chống ung thư, chất chống oxy hóa và thuốc ức chế miễn dịch [59].

1.2.3. Vi nấm từ trầm tích biển

Vi nấm được phát hiện là có hiện diện trong nước biển và trầm tích biển sâu thường ở độ sâu hơn 1000 m. Mặc dù ở biển sâu với các điều kiện môi trường sống khắc nghiệt như: áp suất cao, nhiệt độ môi trường thấp, thiếu oxy và thiếu ánh sáng, nhưng các báo cáo cho thấy vi nấm trong môi trường này rất phong phú và đa dạng. Theo các kết quả nghiên cứu, các loài vi nấm ở biển sâu

được ghi nhận khoảng 50 năm trước, đầu tiên là từ Đại Tây Dương ở độ sâu 4450 m. Tuy nhiên, cho đến năm 2006, Park và cộng sự mới có nghiên cứu đầu tiên về các chất chuyển hóa cấp hai có hoạt tính sinh học từ vi nấm *Chromocleista* sp. xuất phát từ vùng biển sâu. Từ đó, nguồn vi nấm này đã được nhiều nhà khoa học đã tập trung khai thác. Cụ thể, Xu và cộng sự [61] đã mô tả 175 loài vi nấm biển sâu được phân lập từ trầm tích ở Đông Thái Bình Dương, Nam Đại Tây Dương và Tây Nam Ấn Độ Dương. Cụ thể là, các loài này bao gồm: 93 loài vi nấm men và 82 loài vi nấm sợi, thuộc 17 chi: *Rhodosporidium*, *Rhodotorula*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Acremonium*, *Phoma*, *Tritirachium*, *Chaetomium*, *Exophiala*, *Engyodontium*, *Tilleotremia*, *Schizophyllum*, và *Schizophyllum*, được phân loại thành hai ngành *Ascomycota* và *Basidiomycota*. Đặc biệt, 2 chi *Aspergillus* và *Penicillium* thuộc ngành *Ascomycota* được đánh giá chiếm ưu thế trong môi trường biển sâu [62].

Ngoài ra, có nhiều nghiên cứu về đa dạng và sự phân bố của các cộng đồng vi nấm có trong trầm tích biển đã được báo cáo. Zhang và cộng sự [63] đã đánh giá sự đa dạng của cộng đồng vi nấm trong trầm tích biển Kongsfjorden ở Bắc Cực và kết quả nghiên cứu cũng cho thấy có sự xuất hiện của các ngành *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, và *Glomeromycota* với các chi vi nấm phổ biến là *Pichia*, *Fusarium*, *Alternaria* và *Malassezia* [63]. Tương tự, Luo và cộng sự [64] đã báo cáo về sự đa dạng của vi nấm trong 18 mẫu trầm tích ở Tây Bắc Thái Bình Dương và đã phát hiện 7 ngành, 17 lớp, 43 bộ, 7 họ và 98 chi vi nấm. Phần lớn các chi vi nấm này thuộc các ngành *Basidiomycota*, *Ascomycota*, *Mortierellomycota*, *Chytridiomycota*, *Mucoromycota*, và *Glomeromycota*. Năm chi phổ biến trong hầu hết các mẫu bao gồm *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Chaetomium* và *Penicillium*. Kết quả nghiên cứu của Imhoff và cộng sự [35] cho thấy vi nấm *Aspergillus* và *Penicillium* hiện diện gần một nửa trong tổng số 43 chủng vi nấm đã được phân lập từ trầm tích biển sâu ở biển Địa Trung Hải. Ngoài ra, các đại diện 10 chi khác, bao gồm *Cladosporium*, *Paecilomyces*, *Acremonium*, *Auxarthron*, *Biscogniauxia*, *Capnobotryella*, *Engyodontium*, *Eutypella*, *Microascus* và *Ulcocladium*, đã được tìm thấy. Chủng vi nấm *Aspergillus fumigatus* CUGBMF170049 cũng đã được phân lập từ trầm tích biển và được chứng minh là sản xuất hợp chất mới pseurotin [65]. Những kết quả này cho thấy sự tồn tại đa dạng và phong phú của nhóm vi nấm trong trầm tích biển và

đây được xem là một nguồn tiềm năng để tìm kiếm các hoạt chất sinh học mới và có giá trị y dược cao [64].

Cho đến nay các dữ liệu thu được vẫn chưa thể hiện đầy đủ tính đa dạng của nguồn tài nguyên vi nấm biển. Do đó, các nhà khoa học vẫn đang nỗ lực nghiên cứu để khám phá những giá trị mang tính sinh học mới của nguồn sinh vật này để từng bước đánh giá chính xác sự hiện diện và vai trò của chúng trong hệ sinh thái biển, đồng thời tăng cường khả năng khai thác ứng dụng các hoạt chất sinh học mới trong điều trị và chăm sóc sức khỏe của cộng đồng.

1.3. CÁC HỢP CHẤT TỰ NHIÊN CÓ HOẠT TÍNH SINH HỌC TỪ VI NẤM BIỂN

Vi nấm biển đã được chứng minh là nguồn cung cấp phong phú các sản phẩm sinh học tự nhiên mới. Do các đặc tính đặc trưng của chúng liên quan đến nhiệt độ, chất dinh dưỡng, cạnh tranh và độ mặn, chúng đã phát triển các con đường trao đổi chất thứ cấp tạo ra nhiều hợp chất tự nhiên mới, đa dạng với các hoạt tính sinh học có giá trị [66]. Một số chi và một số loài vi nấm biển được ghi nhận sinh tổng hợp các hoạt chất sinh học có giá trị, cho thấy sự cần thiết của việc điều tra nghiên cứu nguồn vi sinh vật này cho các ứng dụng y học [67]. Theo Carol (2019), khoảng 3500 chất chuyển hóa thứ cấp từ các loài vi nấm biển đã được phát hiện [41]. Từ năm 2015 cho đến 2020, khoảng 361 chất chuyển hóa thứ cấp từ các loài vi nấm biển khác nhau thuộc chi *Aspergillus* đã được nghiên cứu cấu trúc và hoạt tính sinh học. Các chất chuyển hóa thu nhận từ vi nấm biển được xác định thuộc các nhóm chất chính bao gồm polyketide, steroroid, fatty acid, peptide, alkaloid, terpenoid và thể hiện các hoạt tính sinh học đa dạng như kháng khuẩn, gây độc tế bào, khả năng chống viêm, ngăn ngừa ung thư và hoạt tính chống ôxi hóa [68].

1.3.1. Các hợp chất kháng sinh

Theo kết quả nghiên cứu của Wong và cộng sự [69], mười hai loài vi nấm đã được phân lập từ san hô và hải miên có khả năng kháng khuẩn tốt nhất được xác định là *Peniophora* sp., *Aspergillus cristatus*, *Acremonium* sp., *Cordyceps memorabilis*, *Aspergillus ochraceus*, *Biscogniauxia* sp., *Aspergillus keratitidis*, *Exserohilum rostratum*, *Chromocleista* sp., *Nigrospora oryzae*, *Aspergillus flavipes* và *Mycosphaerella*. Trong đó, hoạt tính kháng

Staphylococcus aureus được ghi nhận có giá trị MIC mức thấp nhất là 9,8 µg/mL từ dịch chiết lên men chủng *Chromocleista* sp. F34 [43]. Các hợp chất có tính kháng khuẩn từ vi nấm có thể kể đến như các hợp chất có chứa nito (peptide, indole-alkaloid; pyridine và pyridinone, piperazine/ diketopiperazine và pyrimidine/ pyrimidinone), steroid, terpenoid và polyketide [61].

Chủng vi nấm *Mycosphaerella* sp. F8015-2 được phân lập từ trầm tích ở vùng biển Gangwon-do (Hàn Quốc) có khả năng tổng hợp 2 chất mới được xác định là mycousfuran A và B. Hai hợp chất này đã được ghi nhận có hoạt tính kháng *Kocuria rhizophila* và *Staphylococcus aureus* với giá trị MIC lần lượt 8 và 32 µg/mL [70]. Theo Miao và cộng sự [71], hợp chất brevianamide M, 6,8-di-O-methylaverufin, 6,8-di-O-methylaverufin và 6-O-methylaverufin phân tách từ chủng vi nấm *Aspergillus versicolor* pt20 nội sinh ở rong *Sargassum thunbergii* có hoạt tính kháng *Escherichia coli* và *S. aureus* khi thử nghiệm ở nồng độ 30µg/đĩa giấy với đường kính vòng kháng khuẩn 10 mm.

Chủng vi nấm *Aspergillus flavus* phân lập từ rong lục *Codium fragile* thu nhận ở đảo GeoMun, Yeosu, Hàn Quốc được báo cáo sinh tổng hợp hai hợp chất mới (flavuside A và B) cùng 4 hợp chất đã được mô tả (phomaligol A, kojic acid, methyl kojic acid, và dimethyl kojic acid). Trong số đó, 2 hợp chất flavuside A và B thể hiện hoạt tính kháng *S. aureus* và *S. aureus* kháng methicillin với kết quả MIC lần lượt là 15.6 µg/ml và 31.2 µg/ml [72].

Chi *Aspergillus* là chi vi nấm phổ biến trong môi trường sinh thái biển và đã được chứng minh trong nhiều nghiên cứu như nhà máy sản xuất các chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính sinh học đa dạng tiềm năng [73]. Hơn 120 hợp chất tự nhiên chứa hoạt tính sinh học đã được sinh tổng hợp bởi các loài thuộc chi *Aspergillus* [74]. Chủng vi nấm *Aspergillus* và *Penicillium* là hai chủng vi nấm chiếm đa số trong các mẫu san hô và hoạt tính kháng khuẩn đã được nghiên cứu chống lại sáu loại vi khuẩn gây bệnh bao gồm *E. coli* ATCC11775, *N. gonorrhoeae* ATCC19424, *P. aeruginosa* ATCC10145, *S. faecalis* ATCC19433, *S. aureus subsp. aureus* ATCC25923, *B. subtilis subsp. spizizenii* ATCC6633 và chống lại 2 loại nấm gây bệnh là *C. albicans* ATCC7102 và *C. parapsilosis* ATCC22019 [46]. Theo kết quả nghiên cứu của Attia và cộng sự [75], chủng vi nấm biển *A. ochraceus* MSEF6 thể hiện khả năng sinh tổng hợp

các hợp chất kháng khuẩn versicolin, terreic acid, fumigatin, aspyrone, 4-hydroxymellin và terremutin với khả năng kháng khuẩn mạnh [75].

Một số loài vi nấm thuộc chi *Acremonium* cũng được báo cáo là nhà máy sản xuất các hợp chất có hoạt tính kháng khuẩn cao [76], [77]. Chi nấm *Cordyceps* trên cạn đã được nghiên cứu khá chi tiết, nhưng các nghiên cứu về chi này ở biển hầu như chưa nhiều. Các loài vi nấm thuộc chi này có khả năng sản xuất các chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính sinh học và *Cordyceps memorabilis* tồn tại trong môi trường sinh thái biển như nấm nội sinh ở rong [78]. Các hợp chất kháng khuẩn mới bao gồm anthraquinones và morakotins A-E đã được phân tách từ chủng vi nấm *Cordyceps morakotii*. Trong nghiên cứu của Wang và cộng sự [79] đã cho thấy chúng có hoạt tính mạnh kháng *B. cereus* và *S. aureus* với nồng độ MIC là 3,13–25 µg/ml.

Theo báo cáo của Dong và cộng sự [80], chủng vi nấm *Nigrospora oryzae* SCSGAF 0111 được phân lập từ biển có khả năng tổng hợp chất nigrospine (alkaloid) và citrinin có hoạt tính kháng khuẩn. Bảy trong 12 loài vi nấm được phân lập trong nghiên cứu của Keeler và cộng sự [81] cho thấy có hoạt tính kháng 2 loài vi sinh vật gây bệnh trên người là *Staphylococcus aureus* ATCC-35556 và *Escherichia coli* ATCC-25922. Kết quả nghiên cứu của An và cộng sự (2020) chỉ ra trong số các chủng nấm biển phân lập được, chủng *Nigrospora* sp. F8047 và *Clitopilus* sp. F8075 thể hiện khả năng kháng khuẩn mạnh với đường kính vòng kháng khuẩn kháng *C. albicans* và *S. aureus* lần lượt là $19,5 \pm 0,3$ mm và $43,6 \pm 0,8$ mm [82].

Hoạt tính chống sự tạo thành biofilm của hợp chất meleagrin được phân tách từ chủng vi nấm *Emericella dentata* Nq45 cho thấy nó có khả năng kháng vi khuẩn Gram dương (*S. aureus* ATCC 29213) và vi khuẩn Gram âm (*P. aeruginosa* ATCC 9027) với MIC là 0,25 mg/mL và 0,6 mg/mL [83]. Chủng vi nấm *Penicillium* sp. FF001 có nguồn gốc từ hải miên *Melophus* sp. ở đảo Fiji cho thấy có khả năng tổng hợp citrinin có khả năng chống *Enterococcus faecium* kháng vancomycin [84]. Hai chủng nấm *Fusarium* spp. PSU-F14 và PSU-F135 có nguồn gốc từ san hô sừng *Annella* sp. ở biển Hin Ran Pet (Thái Lan) có khả năng tổng hợp đến 18 chất tự nhiên. Trong số những chất có hoạt tính sinh học đã được phân tách, fusarnaphthoquinone A (một trong 5 chất mới), ngoài khả năng gây độc đối với dòng tế bào KB (IC₅₀ 130 µM) và dòng

tế bào MCF-7 (IC_{50} 22 μ M) còn có hoạt tính kháng *Staphylococcus aureus* kháng methicillin, kháng nấm *Cryptococcus neoformas*. Tuy nhiên, fusarnaphthoquinone B có hoạt tính kháng yếu đối với nấm *Cryptococcus neoformas* và *Microsporum gypseum* với nồng độ MIC > 200 μ M [85].

Kháng sinh dạng Fusidane, như helvolic acid và fusidic acid, là lớp chất chuyển hóa mới từ vi sinh vật với cấu trúc khung tetra- hoặc pentacyclic đặc biệt. Trong số đó, chỉ có streptoseolactone được tìm thấy ở xạ khuẩn và số còn lại là chất chuyển hóa từ vi nấm. Phần lớn hoạt tính sinh học đáng chú ý của lớp hợp chất này là hiệu lực kháng vi khuẩn Gram dương. Kháng sinh dạng Fusidane vào những năm 1960 được chấp nhận sử dụng trong lâm sàng để điều trị viêm nhiễm ở người do *Staphylococcus aureus* gây ra và không cho thấy sự kháng chéo với kháng sinh khác thường được sử dụng [86], [87], [88]. Sử dụng fusidic acid trong thử nghiệm lâm sàng pha II tại Mỹ để điều trị kháng nhiễm trùng da cấp tính do vi khuẩn gây ra và các lây nhiễm ở cấu trúc da cho thấy hiệu quả của fusidic acid có thể thực hiện so sánh với nhóm đối chứng dương linezolid. Các dạng dẫn xuất mới của helvolic acid và hai chất đã biết được phân tách từ chủng vi nấm biển *Aspergillus fumigatus* HNMF0047 thu được từ nguồn mẫu hải miên ở bờ biển Wenchang, tỉnh Hải Nam, Trung Quốc. Trong đó, hợp chất 16-O-propionyl-16-O-deacetylhelvolic acid, 6-O-propionyl-6-O-deacetylhelvolic acid và 24-epi- 6 β ,16 β -diacetox-25-hydroxy-3,7-dioxo-29-nordammara-1,17(20)- diene-21,24-lactone có hoạt tính mạnh kháng *Streptococcus agalactiae* (thuộc *Streptococcus* nhóm B, gây bệnh cho người) với MIC lần lượt là 16, 2, 8 μ g/mL [89]. Chủng vi nấm biển *Rhizopus oryzae* có khả năng tổng hợp 3 chất chuyển hóa mới (dẫn xuất của mycophenolic acid) penicacid H–J và hai chất đã được biết là asperpyrone A và dianhydroaurasperone C. Các chất này có hoạt tính kháng 4 chủng vi sinh vật thử nghiệm với MIC trong phạm vi từ 62,5 đến 250 μ g/ml [90].

Liang và cộng sự [91] đã nghiên cứu và phân lập được chủng vi nấm biển *Neosartorya pseudofischeri* từ tế bào bên trong của sao biển *Acanthaster planci*. Sử dụng dịch lên men chủng vi nấm trên môi trường Glycerol-peptone-yeast (GlyPY) và glucose-peptone-yeast extract (GluPY), nhóm nghiên cứu đã chiết suất được hợp chất gliotoxin mới. Hợp chất này thể hiện các hoạt tính ức chế đáng kể đối với vi khuẩn *S. aureus* ATCC29213, MRSA (R3708) và *E. coli*

ATCC25922 đồng thời có khả năng gây độc đối với tế bào biểu mô thận người HEK 293 và dòng tế bào ung thư ruột kết ở người HCT-116 và RKO.

Những kết quả nghiên cứu trên đã cho thấy vi nấm biển là nguồn quan trọng để tiếp tục điều tra và phát triển các hợp chất có hoạt tính kháng sinh cao nhằm ứng dụng trong các lĩnh vực y học và dược học.

1.3.2. Các hợp chất chống oxy hóa

Vi nấm được phân lập từ rong biển được đánh giá là nguồn phong phú để phân tách các chất mới có hoạt tính chống ôxi hóa. Các nghiên cứu về chất chống ôxi hóa ngày càng thu hút sự quan tâm từ các nhà khoa học và gần đây khoảng 10.000 công bố/năm về các chất này từ các nguồn khác nhau [92]. Đặc tính chống ôxi hóa có tác dụng bảo vệ tế bào chống lại các dạng ôxi (oxy hoạt tính, superoxide, gốc tự do peroxy (peroxy radical), gốc tự do hydroxyl (hydroxyl radical) và peroxy nitrite) và giúp điều trị các bệnh như bệnh động mạch vành (atherosclerosis), sa sút trí tuệ (dementia) và ung thư. Ngoài ra, hoạt tính này cũng được sử dụng trong quá trình điều trị hoặc trong thực phẩm bổ sung [93]. Hợp chất chống ôxi hóa có nguồn gốc từ tự nhiên có vai trò quan trọng trong lĩnh vực chăm sóc sức khỏe cho con người, làm giảm nguy cơ các bệnh do lão hóa bằng cách giảm thiểu các căng thẳng và ức chế sự ôxi hóa của các hợp chất cao phân tử [94], [95].

Phần lớn các hợp chất chống oxy hóa thu được thuộc các nhóm chất phenolic, anthraquinone, xanthone, carotenoid, alkaloid và các dẫn xuất indole [96]. Theo kết quả của Samanthi và cộng sự (2015) đã phân tách được hai hợp chất polyketide mới từ chủng vi nấm *P. citrinum* US/PA thể hiện hoạt tính chống oxy hóa với giá trị IC_{50} lần lượt là $159,7 \pm 22,3$ và $68,6 \pm 4,3$ $\mu\text{g/mL}$ trong thử nghiệm khả năng bắt gốc tự do DPPH [97]. Chủng vi nấm biển *Cladosporium cladosporioides* KT384175 được phân lập từ rong *Sargassum wightii* cũng có khả năng chống oxy hóa cao và nhiều hoạt tính sinh học khác [98]. Bên cạnh đó, hợp chất chaetopyramin cùng với các dẫn xuất isotetrahydroauroglauclin và benzaldehyde được phân lập từ chủng vi nấm *Chaetomium globosum* có trong rong đỏ *Polysiphonia urceolata* cũng thể hiện hoạt tính bắt gốc tự do DPPH với IC_{50} 35-88 $\mu\text{g/mL}$ [99]. Từ chủng vi nấm nội sinh rong biển thuộc chi *Dothideomycete*, Leutou cùng nhóm nghiên cứu đã phân tách được hai dẫn xuất toluhydroquinone mới cùng với hai dẫn xuất thuộc

nhóm hydroquinone và các hợp chất này cũng cho thấy khả năng bắt gốc tự do DPPH với giá trị IC_{50} 7-17 μM [100]. Đáng chú ý là chủng vi nấm *A. wentii* EN-48 nội sinh trong rong biển *Sargassum* spp. đã được xác định có khả năng tổng hợp tới 8 hợp chất, trong đó bao gồm một dẫn xuất anthraquinone mới được gọi là wentiquinone C. Ngoài ra, các hợp chất có khả năng chống oxy hóa như 4-(3,4-dihydroxybenzamide) methyl butanoate, 5-O-methylsulochine được phân lập từ chủng vi nấm biển *Aspergillus goii* EN-48 [101].

Các hợp chất thuộc dẫn xuất polyketide đã được phân tách từ chủng vi nấm *Aspergillus europaeus* WZXY-SX-4-1 có nguồn gốc từ hải miên *Xestospongia testudinaria*, trong đó có sáu hợp chất mới là eurobenzophenone A-C, euroxanthone A-B và (+)1-O-demethylvariecolorquinones A. Các hợp chất này được báo cáo có hoạt tính bắt gốc tự do DPPH hiệu quả [102]. Bên cạnh đó, các hợp chất acremonin A và acremonin A glucoside thuộc nhóm hydroquinone cùng với hai hợp chất, 2-(1-hydroxy-1-metyl)-2,3-dihydrobenzofuran-5-ol và 2,2-dimethylchromone-3,6-diol được phân lập từ chủng vi nấm biển *Acremonium* sp. đã được báo cáo có khả năng chống oxy hóa [103]. Tương tự, hợp chất hydro-antraquinone được phân lập từ chủng vi nấm có nguồn gốc từ rong biển *Talaromyces islandicus* EN-501 cũng được ghi nhận là có khả năng chống oxy hóa [104]. Xanthones và anthraquinone là hoạt chất chống oxy hóa được phân lập từ chủng vi nấm thuộc loài *Aspergillus versicolor* và được đánh giá có khả năng chống oxy hóa tương đương trolox (TEAC) [105].

Năm 2014, nhóm nghiên cứu của Zhu và các cộng sự đã phát hiện 2 hợp chất mới là rubrolides R và S từ chủng nấm *Aspergillus terreus* OUCMDZ-1925 được phân lập từ nội tạng của cá nhồng *Chelon haematocheilus* ở vùng cửa sông Hoàng Hà. Hợp chất rubrolides R cho thấy khả năng chống oxy hóa chống lại các gốc tự do ABTS tương đương hoặc vượt trội so với trolox và axit ascorbic với giá trị IC_{50} là 1,33 μM . Hợp chất rubrolides S thể hiện hoạt tính kháng vi-rút cúm A (H1N1) tương đương hoặc vượt trội so với hoạt tính của ribavirin với giá trị IC_{50} là 87,1 μM [106].

Những kết quả nghiên cứu trên đã khẳng định vi nấm biển, đặc biệt là các chủng vi nấm có nguồn gốc từ rong biển là nguồn tiềm năng để khai thác các hợp chất chống oxy hóa.

1.3.3. Các hợp chất gây độc tế bào ung thư

Một số loài vi nấm biển đã được xác định có khả năng sinh tổng hợp các hợp chất có hoạt tính ức chế sự phát triển của các dòng tế bào ung thư [67]. Trong đó, nhiều hợp chất thuộc nhóm alkaloid chứa hoạt tính chống ung thư phân lập được từ các loài vi nấm *Penicillium citrinum*, *Fusarium* sp., *Apiospora montagnei* [66].

Chủng vi nấm *Trichoderma virens* phân lập từ loài *Didemnum molle* đã được nghiên cứu để thu nhận hợp chất trichodermamides A và B. Trong đó, Độc tính đối với tế bào ung thư biểu mô ruột kết ở người đã được báo cáo từ hợp chất trichodermamide B [66]. Leptosin là hợp chất thuộc nhóm epipolysulfanyldioxopiperazine được sản xuất chủ yếu bởi các chủng *Leptosphaeria* sp. ban đầu được phân lập từ rong biển *Sargassum tortile*. Các hợp chất này có cấu trúc tương tự nhau, đều thuộc dẫn xuất indole và thể hiện hoạt tính độc tế bào phổ rộng đối với các dòng tế bào ung thư. Tiềm năng hoạt tính chống ung thư của các hợp chất leptosin M, M1 và N đã được kiểm tra bằng cách sử dụng dòng tế bào ung thư bạch cầu lympho P-388 ở chuột và một bảng định hướng bệnh gồm 39 dòng tế bào ung thư ở người [66].

Hợp chất meleagrinsin tách chiết từ chủng vi nấm *Penicillium* sp. F23-2 được phân lập từ trầm tích biển sâu thể hiện hoạt tính gây độc đối với các dòng tế bào ung thư A-549 và HL-60 với giá trị IC_{50} lần lượt 19,9 và 7,4 mM [107]. Hợp chất tandukisin B-D thu nhận từ chủng vi nấm *Trichoderma harzianum* OUPS111D-4 được phân lập từ hải miên *Halichondria okadai* ở Osaka (Nhật Bản) ức chế mạnh sự phát triển của dòng tế bào ung thư thần kinh trung ương SNB-75. Đây là hợp chất tự nhiên có cấu trúc mới và có thể được thu nhận dễ dàng và chi phí thấp khi chủng vi nấm được lên men trong thời gian ngắn trong môi trường hữu cơ [108].

Dịch chiết thô từ chủng vi nấm *Myrothecium verrucaria* 973023, được phân lập từ loài hải miên *Spongia* sp. ở đảo Hawaii thể hiện hoạt tính gây độc hiệu quả các dòng tế bào ung thư máu L1210 ở chuột và dòng tế bào ung thư dạ dày H116 ở người [109]. Theo công bố của Jenssen và cộng sự [110], hợp chất lulworthinone được phân tách từ chủng vi nấm 067bN1.2 thuộc họ *Lulworthiaceae* ngoài hoạt tính kháng khuẩn còn thể hiện hoạt tính ức chế sự tăng sinh của dòng tế bào ung thư hắc tố ở người (human melanoma), dòng tế

bào ung thư gan, ung thư phổi có các giá trị IC_{50} lần lượt là 15,5, 27, và 32 $\mu\text{g/ml}$.

Theo báo cáo của Abd El-Rahman và cộng sự [46], chủng nấm *Aspergillus ochraceopetaliformis* MN083316 được phân lập từ rạn san hô ở Biển Đỏ của Ai Cập có khả năng sinh tổng hợp chất ditryptophenaline có hoạt tính gây độc đối với dòng tế bào ung thư gan Hep-G2 với giá trị IC_{50} là 18,8 $\mu\text{g/ml}$. Bên cạnh đó, hợp chất này cũng thể hiện hoạt tính kháng khuẩn, hoạt tính chống ôxi hóa mạnh và hoạt tính gây độc tế bào MCF-7 và HEPG2 với giá trị IC_{50} lần lượt là 5,8 và 7,6 mM. Hợp chất varioloid A (dẫn xuất indole mới) và varioloid B được phân tách từ chủng nấm nội sinh *Paecilomyces variotii* EN-291 được thu nhận từ rong biển thể hiện độc tính đối với các dòng tế bào A549, HCT116 và HepG2 với giá trị IC_{50} trong khoảng từ 2,6 – 8,2 $\mu\text{g/mL}$ [111]. Dẫn xuất cinnamolide và hợp chất insulicolide A được phân lập từ chủng *Aspergillus ochraceus* Jcma1F17 được tìm thấy từ rong biển cho thấy độc tính đối với các dòng tế bào ung thư ở người như H1975, U937, K562, –823, Molt-4, –7, A549, HeLa, HL60, và Huh-7 với các giá trị IC_{50} nằm trong khoảng từ 1,95 và 6,35 μM [112]. Hợp chất physcion phân tách từ *Microsporum* sp. (MFS-YL) phân lập từ bề mặt rong biển đỏ *Lomentaria catenata* tại Guryongpo, NamGu, PoHang (Hàn Quốc) có khả năng gây độc tế bào HeLa và cũng ảnh hưởng đến sự biểu hiện của các protein p53, p21, Bax, Bcl-2, caspase-9 và caspase-3. Ngoài ra, physcion cũng cảm ứng sự tạo thành ROS (reactive oxygen species) trong tế bào HeLa [113]. Rong biển *Sargassum* sp. là nguồn phân lập nấm nội sinh *Aspergillus wentii* EN-48 và từ nấm này các hợp chất asperolide A–B cùng với các dẫn xuất của tetranorlabdane diterpenoid (wentilactone A và B) đã được phân tách. Các hợp chất này được ghi nhận có hoạt tính kháng các dòng tế bào ung thư HeLa, HepG2, MCF-7, MDA-MB-231, NCI-H460, SMMC-7721 và SW1990 [114].

Các hợp chất polyketide lopouzanon A và B mới, cùng với các dẫn xuất mới 1-O-acetyl và 2-O-acetyl của dendrodochol B đã được phân lập từ chủng vi nấm biển *Lopadostoma pouzarii* 168CLC-57.3 có nguồn gốc từ hải miên. Bên cạnh đó, chủng vi nấm này còn sinh tổng hợp sáu loại hợp chất thuộc nhóm polyketide bao gồm: gliorosein, balticolid, dendrodolide G, dihydroisocoumarine, (–)-5-methylmellein, và dendrodochol B. Các hợp chất

được phân lập cho thấy khả năng gây độc tế bào đối với tế bào ung thư tuyến tiền liệt PC-3 ở người và tế bào cơ tim chuột bình thường H9c2 [36].

Wang và cộng sự [115] đã nghiên cứu chủng vi nấm *Arthrinium arundinis* ZSDS1-F3 từ mẫu hải miên thu nhận ở quần đảo Tây Sa, Trung Quốc và phát hiện được 2 hợp chất alkaloid 4-hydroxy-2-pyridone mới có hoạt tính gây độc tế bào *in vitro* đối với các dòng tế bào K562, A549, Huh-7, H1975, MCF-7, U937, BGC823, HL60, Hela và MOLT-4, với các giá trị IC_{50} nằm trong khoảng từ 0,24 đến 45 μ M.

Chủng vi nấm *Chondrostereum* sp. được phân lập từ mô bên trong của san hô mềm *Sarcophyton tortuosum* ở Hải Nam, Tam Á, Trung Quốc. Khi chủng vi nấm này được lên men trong môi trường lỏng với glycerol làm nguồn carbon đã thu được một chất chuyển hóa mới là chondrosterin. Hợp chất này thể hiện hoạt tính gây độc tế bào hiệu quả đối với các dòng tế bào ung thư CNE-1 và CNE-2 với giá trị IC_{50} là 1,32 và 0,56 μ M [116]. Từ loài vi nấm *Phomopsis lithocarpus* được phân lập từ một mẫu trầm tích vùng biển sâu ở Ấn Độ Dương ở độ sâu 3606 m, các nhà khoa học đã phân lập năm dẫn xuất benzophenone mới và một dẫn xuất eremophilane mới. Trong số đó, hợp chất mới Tenellon H thể hiện hoạt tính gây độc tế bào HepG-2 và A549 với giá trị IC_{50} lần lượt là 16,0 và 17,6 μ M [117].

Theo kết quả của Meng và nhóm nghiên cứu [118], *Penicillium brocae* MA-231, một loại nấm thu được từ mô tươi của cây ở rừng ngập mặn *Avicennia marina* tại đảo Hải Nam, Trung Quốc đã sinh tổng hợp được bốn dẫn xuất diketopiperazine mới. Bốn hợp chất này thể hiện khả năng gây độc chín dòng tế bào ung thư, bao gồm Du145, HepG2, HeLa, NCI-H460, MCF-7, SGC-7901, SW1990, U251 và SW480, với các giá trị IC_{50} nằm trong khoảng từ 0,89 đến 9,0 μ M. Chủng vi nấm *Astrocystis* sp. BCC 22166 được phân lập từ cây cọ ngập mặn, tại Công viên quốc gia Hat Khanom-Mu Ko Thale Tai, tỉnh Nakhon Si Thammarat của Thái Lan. Zhou và cộng sự [119] đã phân tách hai hợp chất mới là phthalide và dihydroisocoumarin từ loài nấm này. Hợp chất phthalide thể hiện hoạt tính kháng *Bacillus cereus* (IC_{50} = 12,5 μ g/mL), trong khi hợp chất dihydroisocoumarin thể hiện khả năng gây độc tế bào đối với tế bào KB và Vero với giá trị IC_{50} là 22,6 và 48,2 μ g/mL.

Các công bố trên cho thấy vi nấm biển là nguồn tài nguyên tiềm năng để tìm kiếm các hợp chất có hoạt tính chống ung thư nhằm mở ra cơ hội tạo ra các dược phẩm mới góp phần ứng dụng trong điều trị và chăm sóc sức khỏe cộng đồng.

1.3.4. Các hợp chất bảo vệ tế bào

Trong thời gian gần đây vi nấm biển còn được phát hiện là nguồn tiềm năng để tìm kiếm các hợp chất có hoạt tính bảo vệ tế bào và hứa hẹn mang lại nhiều hợp chất mới có giá trị y dược [120], [121]. Một số hợp chất có hoạt tính bảo vệ tế bào thần kinh được tìm thấy từ biển, hiện đang được đưa vào thử nghiệm lâm sàng hoặc đã được đưa ra để điều trị chứng đau thần kinh, tâm thần phân liệt và bệnh Alzheimer [122]. Trong số các vật liệu có hoạt tính sinh học phong phú thì protein và peptide có nguồn gốc từ các sinh vật biển đã được chứng minh là có tác dụng ức chế sự phát triển của các bệnh thoái hóa thần kinh như bệnh Alzheimer, bệnh Parkinson và bệnh đa xơ cứng [123].

Nghiên cứu của Calado [124] tập trung vào nấm nội sinh liên quan đến loài rong biển *Halopteris scoparia* (Linnaeus) ở bờ biển Bồ Đào Nha. Các chất chuyển hóa thứ cấp của nấm này ngoài hoạt tính chống oxy hóa, ức chế các enzyme (hyaluronidase, collagenase, elastase và tyrosinase), chống viêm nhiễm, giảm mẫn cảm với tia tử ngoại, kháng khuẩn (*Cutibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis* và *Malassezia furfur*) còn được thử nghiệm độc tính tế bào. Kết quả cho thấy hợp chất này là an toàn để có thể bổ sung vào các sản phẩm mỹ phẩm.

Trong nghiên cứu của Yurchenko và cộng sự [125], ảnh hưởng của các p-terphenyl polyketide phân tách từ chủng vi nấm *Aspergillus candidus* KMM 4676 và cerebroside flavuside B phân tách từ *Penicillium islandicum* (= *Talaromyces islandicus*) có tác dụng chống lại chất gây độc thần kinh (rotenone và paraquat) đối với sự sống sót của dòng tế bào Neuro-2a và mức ROS nội bào cũng như hoạt động bắt gốc tự do DPPH của các chất này đã được chứng minh. Các polyketide này khi ủ trước với tế bào sẽ làm giảm rõ rệt mức ROS và làm tăng rõ rệt độ sống sót của các tế bào xử lý với rotenone và paraquat trong thử nghiệm sử dụng MTT và LDH. Flavuside B làm tăng rõ rệt sự sống sót của tế bào xử lý với paraquat trong cả hai thử nghiệm sử dụng MTT và LDH. Mối liên quan giữa cấu trúc và hoạt tính ở các dẫn xuất của p-terphenyl,

cũng như cơ chế bảo vệ tế bào của tất cả các hợp chất p-terphenyl polyketide trong nghiên cứu này khẳng định khả năng bảo vệ tế bào của các hợp chất trên ở mô hình có các dạng oxi tạo ra bởi rotenone và paraquat.

Kazuki Kanno và cộng sự [126] cho thấy các dẫn xuất hydroquinone mới, pestalotioquinol A và B, được phân lập từ dịch chiết nuôi cấy nấm *Pestalotiopsis microspora*. Các tế bào PC12 thần kinh đã được tiền xử lý bằng pestalotioquinol A và B và được loại bỏ khỏi môi trường, sau đó được xử lý bằng một chất tạo peroxynitrite (ONOO-), một loại nitro phản ứng, để gây chết tế bào. Kết quả cho thấy dẫn xuất pestalotioquinol là một loại hydroquinone mới sở hữu vinyl alkyne và có tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh tương đối cao. Một số nghiên cứu chỉ ra rằng hợp chất neoechinulin, một indole alkaloid từ vi nấm biển, có thể bảo vệ các tế bào PC12 chống lại độc tính của NO và chất độc thần kinh dẫn đến bệnh Parkinson 1-methyl-4-phenylpyridinium [127], [128].

Hợp chất xyloketal B được phân tách từ chủng vi nấm *Xylaria* sp. có nguồn gốc từ rừng ngập mặn là một hợp chất tự nhiên mới có tác dụng chống oxy hóa và bảo vệ tế bào khỏi tổn thương do lipoprotein mật độ thấp (LDL) bị oxy hóa và chống lại tác động của sự thiếu hụt glucose oxy để bảo vệ tế bào PC12. Nhờ đặc tính chống oxy hóa của hợp chất xyloketal B này có tác dụng bảo vệ, chống lại độc tính thần kinh trong việc điều trị bệnh Parkinson [129], [130]. Theo kết quả của Zhai Aifeng và nhóm nghiên cứu [131] chỉ ra rằng axit secalonic A (SAA) là một hợp chất tự nhiên được tìm thấy trong nấm biển có thể làm giảm độc tính tế bào của colchicine trong các tế bào thần kinh vỏ não.

Như vậy, các nghiên cứu đã chỉ ra khá nhiều hợp chất có hoạt tính bảo vệ tế bào đã được tách chiết từ dịch chiết lên men vi nấm biển. Các kết quả công bố đã khẳng định vi nấm biển là nguồn quan trọng để khai thác các hợp chất tự nhiên có các hoạt tính sinh học quý giá nhằm ứng dụng trong các lĩnh vực y dược.

1.4. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU CÁC HOẠT CHẤT SINH HỌC TỪ VI NẤM BIỂN

1.4.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới

Trong những năm gần đây, nhiều nghiên cứu cho thấy một số lượng không nhỏ các chất chuyển hóa thuộc các nhóm chất như polyketide, alkaloid,

peptide, lactone, terpenoid và steroid với cấu trúc đặc biệt và hoạt tính sinh được học nổi bật đã được phân tách từ vi nấm có nguồn gốc từ biển. Hầu hết các hợp chất này có hoạt tính chống ung thư, hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm, kháng virus, chống viêm, chống ôxi hóa và gây độc tế bào [132]. Gần đây, 14 sản phẩm tự nhiên từ biển được cấp phép sử dụng như thuốc và hơn 30 hoạt chất tự nhiên được thử nghiệm lâm sàng trong các pha khác nhau [133], [134]. Đặc biệt, Plinabulin được phân tách từ loài nấm biển *Aspergillus* sp. đang được hãng dược phẩm BeyondSpring Pharmaceuticals thử nghiệm lâm sàng pha III trong điều trị bệnh ung thư phổi và làm giảm chứng giảm bạch cầu do hóa trị (chemotherapy-induced neutropenia) [135], [136].

Trong hơn 50 năm qua, hơn 30.000 sản phẩm tự nhiên đã được phát hiện từ biển và khoảng 2% trong số đó được tổng hợp bởi các vi sinh vật ở sâu dưới biển, trong đó vi nấm là nguồn quan trọng để khai thác các sản phẩm tự nhiên có ứng dụng trong lĩnh vực lâm sàng [137], [138]. Theo Zain ul Arifeen và cộng sự [139], 151 hợp chất có hoạt tính sinh học đã được chiết xuất từ vi nấm có nguồn gốc từ biển sâu trong 5 năm gần đây. Một số kháng sinh như Methyloisoverrucosidinol, Penicillisocoumarin A-D, Aspergillumarins B, Dehydroaustin, Dehydroaustinol, 7-hydroxydehydroaustin, Austinone, Austinol, Austin, Austinolide và Pestalotionol; Ascomycotin A, Diorcinol, Lindgomycin, Ascocetin và Canescenin A và B được phân tách từ vi nấm có nguồn gốc từ lỗ thông thủy nhiệt và vi nấm được phân lập từ trầm tích biển sâu.

Các hợp chất tự nhiên (Polymixin B, pristinamycin, gramicidin, vancomycin, bleomycin, actinomycin D) có nguồn gốc từ biển đã có mặt trên thị trường và được sử dụng trong điều trị với vai trò kháng sinh và chất chống ung thư, trong khi một số hoạt chất khác như manoalide, discodermolide đang trong quá trình thử nghiệm lâm sàng [140]. Không những chất chuyển hóa có khối lượng phân tử nhỏ (các hợp chất phenolic, anthraquinone, xanthone, carotenoid, các dẫn xuất indole và alkaloid) mà những hợp chất cao phân tử như carbohydrate (bao gồm hợp chất đường cao phân tử từ thành tế bào, exopolysaccharides (EPSs) và endopolysaccharides) có nguồn gốc từ vi sinh vật cũng thể hiện hoạt tính chống ôxi hóa và thu dọn các gốc tự do (scavenging activities) [141]. Đáng chú ý là hơn nửa thập kỷ qua có hàng trăm loại kháng sinh được phân lập từ nấm và vi khuẩn. FS Youssel và cộng sự [142] cũng đã

đánh giá tính chất hóa học cũng như hoạt tính sinh học của các chi nấm biển như: *Acremonium*, *Ascotricha*, *Aspergillus*, *Asteromyces*, *Ceratodictyon*, *Clonostachys*, *Emericella*, *Exserohilum*, *Microsporum*, *Metarrhizium*, *Penicillium*, *Scytalidium*, *Simplicillium*, *Stachylidium*, *Talaromyces*, *Trichoderma* và *Zygosporium*. Chen và cộng sự [143] đã phát hiện hoạt tính sinh học của EPS (lõi là mannan với các chuỗi galactoglucan) mới, được tạo ra bởi chủng vi nấm biển *Alternaria* sp SP-32. Phân đoạn tinh sạch AS2-1 của đường này có hoạt tính chống oxi hóa được xác định bởi thử nghiệm bắt gốc tự do DPPH và gốc tự do hydroxyl với các giá trị EC_{50} lần lượt là 3,4 và 4,2 mg/mL. Hoạt tính gây độc tế bào của EPS tinh sạch đối với dòng tế bào ung thư cổ tử cung Hela, dòng tế bào bạch cầu ở người HL-60 và dòng tế bào ung thư máu tủy xương K562 có giá trị IC_{50} lần lượt là 0,167, 0,143 và 0,46 mg/mL.

Số lượng các hợp chất kháng sinh từ vi nấm biển tăng nhanh chóng từ 2010 và nấm biển đã và đang là nguồn quan trọng để sàng lọc, nghiên cứu và chiết xuất hợp chất kháng khuẩn và kháng nấm. Theo Xu [61], khoảng hơn 700 hợp chất được phân tách từ 105 loài vi nấm biển có thể sinh tổng hợp chất kháng khuẩn, trong số đó 285 hợp chất (khoảng 40% trong tổng số) có hoạt tính kháng khuẩn hoặc kháng nấm và 116 (15% trong tổng số) là hợp chất kháng khuẩn và kháng nấm mới. Theo đó, trung bình là 1 chủng vi nấm sẽ phân tách được nhiều hơn 1 hợp chất mới có hoạt tính kháng sinh. Phần lớn trong số 105 loài nấm biển có hoạt tính kháng sinh này đã được định danh và khoảng 50% trong số đó được định danh dựa trên trình tự DNA của chúng; trong đó có 31 loài thuộc chi *Aspergillus* và 16 loài thuộc chi *Penicillium*.

Người ta ước tính rằng số lượng vi nấm biển dao động từ 10.000 đến 12.500 loài, mặc dù gần đây nhiều nghiên cứu cho rằng có tới 1 triệu loài vẫn chưa được khám phá. Số loài nấm biển được mô tả cập nhật mới nhất đến tháng 2 năm 2021 chỉ là năm 1901, phân bố trong 769 chi, 226 họ, 88 bộ, 22 lớp và 7 ngành thành *Aphelidiomycota*, *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Blastocladiomycota*, *Chytridiomycota*, *Mortierellomycota* và *Mucoromycota* [3]. Hầu hết các nghiên cứu về hợp chất tự nhiên từ vi nấm biển tập trung vào một số chi: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* và *Cladosporium* [49]. Tuy nhiên, các nghiên cứu về các hoạt chất sinh học từ nấm biển vẫn tiếp tục gia tăng và đã được mở rộng sang các chi khác [35]. Hơn nữa, với những tiến bộ

trong công nghệ giải trình tự và kỹ thuật khối phổ, các phương pháp tiếp cận bộ gen và chuyển hóa đã kích thích một làn sóng nghiên cứu mới về vi nấm biển [3].

Wong và cộng sự [69] đã nghiên cứu phân lập vi nấm từ ba loài hải miên *Haliclona* sp., *Iotrochota* sp. và *Biemna* sp. và hai loài rong nâu *Turbinaria conoides* và *Sargassum portierianum*, được thu thập ở phía Bắc Mauritius. Kết quả 12 loài vi nấm cho thấy đặc tính kháng khuẩn tốt nhất đã được xác định thuộc các chi *Peniophora*, *Aspergillus*, *Acremonium*, *Cordyceps*, *Biscogniauxia*, *Exserohilum*, *Chromocleista*, *Nigrospora*, và *Mycosphaerella* với MIC thấp nhất là 0,0098 mg/mL. Kết quả này cho thấy tiềm năng to lớn trong việc tìm kiếm các sản phẩm tự nhiên chống lại vi khuẩn kháng kháng sinh có nguồn gốc từ vi nấm biển.

Trong số các nguồn tìm kiếm các hợp chất có hoạt tính bảo vệ tế bào, vi nấm biển được xem là nguồn tiềm năng và hứa hẹn mang lại nhiều hợp chất mới có giá trị y dược [120], [121]. Hợp chất TMC-256C1, dẫn xuất của naphthopyranone, được phân tách từ *Aspergillus* sp. SF6354 có nguồn gốc từ biển, cho thấy có hoạt tính bảo vệ tế bào và chống viêm nhiễm. Hợp chất này cũng có có hoạt tính bảo vệ tế bào kháng lại độc tính do glutamate tạo ra ở dòng tế bào HT22. Hợp chất TMC-256C1 kìm hãm sự chết của tế bào do glutamate gây ra và cảm ứng sự biểu hiện của HO-1 theo cách phụ thuộc liều và điều này ức chế sự tạo thành ROS (reactive oxygen species) gây ra bởi glutamate ở dòng tế bào này [120].

Những kết quả nghiên cứu trên đã khẳng định khả năng sinh tổng hợp các hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học của vi nấm biển cũng như tiềm năng ứng dụng các hoạt chất sinh học có giá trị y dược từ nguồn vi sinh vật biển này.

1.4.2. Tình hình nghiên cứu ở Việt Nam

Vùng biển Việt Nam có chiều dài hơn 3.260 km và sở hữu hơn 3.000 đảo lớn nhỏ bao gồm 2 quần đảo Trường Sa và Hoàng Sa. Chính vì vậy, Việt Nam được đánh giá là một trong những quốc gia có tiềm năng và lợi thế lớn về tài nguyên biển và hải đảo. Bên cạnh đó, với vị trí địa lý và đặc điểm khí hậu nhiệt đới gió mùa đã tạo cho các vùng biển này có hệ sinh thái đa dạng phong phú. Trong thời gian gần đây, chính phủ Việt Nam đã đề ra chiến lược phát triển

kinh tế biển, khai thác bền vững nguồn tài nguyên thiên nhiên và nghiên cứu các sản phẩm tự nhiên từ biển. Nhiều hoạt động nghiên cứu về tiềm năng dược liệu biển đã được chú trọng. Nhiều chương trình, dự án trọng điểm về đánh giá và khai thác bền vững nguồn tài nguyên sinh vật biển nói chung và vi sinh vật biển nói riêng đã được Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam chủ trì thực hiện và thu nhận được nhiều kết quả khả quan. Từ các công trình công bố đã cho thấy tiềm năng thu nhận các hoạt chất sinh học như các hợp chất kháng sinh, chống viêm, kháng lao, kháng ung thư, và chống oxy hóa từ nguồn vi sinh vật biển ở Việt Nam [144], [145], [146]. Trong số đó, nhiều hợp chất tự nhiên có giá trị y dược đã được thu nhận từ nguồn vi nấm biển.

Theo tài liệu công bố, 73 chủng nấm được phân lập từ môi trường biển thuộc 5 địa danh ở bán đảo Sơn Trà, thành phố Đà Nẵng, Việt Nam thể hiện hoạt tính kháng sinh đối với các chủng vi sinh vật gây bệnh ở người bao gồm *B. cereus* ATCC 11778, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *L. monocytogenes* ATCC 19111, *S. faecalis* ATCC 19433 và *C. albicans* ATCC 10231. Trong số này, 29 chủng có hoạt tính kháng ít nhất 2 chủng vi sinh vật thử nghiệm [147]. Một trong những nghiên cứu đáng chú ý là về các hoạt chất sinh học từ chủng vi nấm *Ascomycota* sp. VK12 được phân lập từ hải miên ở vùng biển tỉnh Quảng Nam. Nghiên cứu này đã thu nhận được hai hợp chất (3R)-(3,5-dihydroxyphenyl) butan-2-one và AGI-7 gây độc đối với cả 3 dòng tế bào ung thư biểu mô thử nghiệm bao gồm HepG2, MCF-7 và SK-Mel2, có giá trị IC_{50} nằm trong khoảng từ 48,6 - 96,5 μ M. Ngoài ra, nghiên cứu đánh giá hoạt tính kháng viêm *in vitro* cho thấy rằng hai hợp chất trên cùng với các hợp chất sescandelin-B và hydroxysydonic acid đã ức chế sự sản sinh NO ở dòng tế bào BV2 với giá trị IC_{50} từ 24,2 - 76,5 μ M [148]. Hoạt tính kháng viêm cũng được ghi nhận ở các hợp chất homogentisic acid và methyl (2,5-dihydroxyphenyl) acetate tách chiết từ chủng vi nấm biển *Aspergillus* sp. IMBC-FP2.05, được phân lập từ mẫu hải miên thu thập ở vùng biển tỉnh Quảng Nam [23].

Năm 2018, nhóm nghiên cứu ở Viện Nghiên cứu và Ứng dụng công nghệ Nha Trang đã hợp tác với các nhà khoa học thuộc Viện Khoa học và Công nghệ Hải dương Hàn Quốc điều tra các hợp chất tự nhiên từ vi nấm được phân lập từ hải miên ở vịnh Nha Trang. Một trong những kết quả nghiên cứu nổi bật của

dự án hợp tác này là từ chủng vi nấm *Aspergillus flocculosus* 01NT.1.1.5 đã phát hiện được ba hợp chất aspertetranone D, wasabidienone E và mactanamide có hoạt tính ức chế hiệu quả tế bào hủy xương (osteoclast). Bên cạnh đó, chủng vi nấm này còn tổng hợp được hợp chất asterriquinone C1 có khả năng ức chế sự phát triển của 06 dòng tế bào ung thư trên người gồm HCT-15, NUGC-3, NCI-H23, ACHN, PC-3 và MDA-MB-231 với giá trị IC_{50} 30 - 40 μ M [149].

Các hợp chất tự nhiên thu thập từ vi nấm có nguồn gốc từ trầm tích biển cũng được đánh giá có hoạt tính sinh học cao. Từ cao chiết lên men chủng vi nấm biển *Penicillium janthinellum* 168CLC-17.1 phân lập được từ trầm tích ở đảo Cù Lao Chàm, hai hợp chất mới là resorcinosides A-B có khả năng kháng tế bào ung thư biểu mô dạ dày NUGC-3 đã được thu nhận [150]. Ngoài ra, hợp chất 2-[(5-methyl-1,4-dioxan-2-yl)methoxy]ethanol có hoạt tính kháng *Enterococcus faecalis* (MIC 32 μ g/mL) và hai hợp chất 2-[(2R-hydroxypropanoyl)amino]benzamide và 4-hydroxybenzaldehyde kháng *E. coli* (MIC lần lượt là 16 và 8 μ g/mL) đã được tách chiết từ chủng vi nấm *Penicillium* sp. M30 được phân lập từ trầm tích biển ở độ sâu 14 m tại đảo Cô Tô, Quảng Ninh. Riêng hợp chất 2',3'-dihydrosorbicillin có khả năng ức chế hiệu quả enzyme α -glucosidase ở nồng độ 2,0 mM [151]. Chủng vi nấm biển *Aspergillus* sp. M28 phân lập từ mẫu trầm tích ở đảo Cô Tô cũng được ghi nhận khả năng tổng hợp các hợp chất kháng sinh có hoạt tính cao [152].

Mặc dù các công bố đã khẳng định tiềm năng tổng hợp các hoạt chất sinh học của nguồn vi nấm được phân lập từ rong biển [9], [153] nhưng cho đến nay số lượng công trình nghiên cứu từ vi nấm liên kết với rong biển Việt Nam vẫn còn khá khiêm tốn. Thống kê cho thấy chỉ có một số lượng ít các báo cáo liên quan đến đối tượng nghiên cứu này. Cụ thể là, từ chủng vi nấm biển *Aspergillus flocculosus* 168ST-16.1 phân lập từ mẫu rong *Padina* sp. ở bán đảo Sơn Trà, Đà Nẵng, 05 hợp chất mới thuộc nhóm sesterterpene gồm 14,15-dehydro-6-*epi*-ophiobolin K, 14,15-dehydroophiobolin K, 14,15-dehydro-6-*epi*-ophiobolin G, 14,15-dehydro-ophiobolin G và 14,15-dehydro-(Z)-14-ophiobolin G đã được phân tách. Kết quả phân tích cho thấy các hợp chất này có hoạt tính gây độc hiệu quả 06 dòng tế bào ung thư ở người, bao gồm ung thư đại tràng, ung thư dạ dày, ung thư phổi, ung thư thận, ung thư tuyến tiền liệt và ung thư vú với giá trị GI_{50} 0,14-2,01 μ M [154].

Gần đây, nhóm nghiên cứu thuộc Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên đã hợp tác với các nhà khoa học thuộc Trung tâm nghiên cứu biển nhiệt đới (ZMT) ở Đức tiến hành đánh giá các hoạt tính sinh học có tiềm năng y dược của nhóm vi sinh vật cộng sinh với rong biển. Kết quả là từ chủng vi nấm *Aspergillus micronesiensis* có nguồn gốc từ rong sụn *Kappaphycus alvarezii* ở vịnh Vân Phong, tỉnh Khánh Hòa đã phân tách được ba hợp chất polyketide (gồm epicoccolide A, epicoccolide B và NC3B) có hoạt tính kháng ung thư [155]. Hơn nữa, chủng vi nấm này còn thể hiện khả năng tổng hợp được ba hợp chất dibenzospiroketal mới là aspermicrone A-C. Trong đó, đáng lưu ý là hợp chất aspermicrone B thể hiện hoạt tính ức chế hiệu quả đối với dòng tế bào ung thư gan HepG2 với IC_{50} 9,9 μ M [156]. Các kết quả nghiên cứu bước đầu về vi nấm phân lập từ rong biển ở Việt Nam kể trên đã góp phần khẳng định tiềm năng của nhóm đối tượng này và là cơ sở để tiếp tục nghiên cứu tìm kiếm các hoạt chất sinh học mới.

Các kết quả công bố trên cũng chỉ ra rằng phần lớn các nghiên cứu về các hợp chất tự nhiên từ vi nấm biển Việt Nam chỉ mới tập trung vào các hoạt tính kháng sinh, chống oxy hóa, kháng ung thư và kháng viêm. Số lượng các công trình khoa học liên quan đến hoạt tính bảo vệ tế bào vẫn còn hạn chế. Trong chương trình hợp tác nghiên cứu với Viện Hóa sinh Hữu cơ Thái Bình Dương (Nga), nhóm nghiên cứu ở Viện Nghiên cứu và Ứng dụng công nghệ Nha Trang đã phân lập thành công hợp chất diketopiperazine mactanamide từ chủng vi nấm *Aspergillus flocculosus* có nguồn gốc mẫu từ trầm tích ở vùng biển Nha Trang. Hợp chất này có khả năng bắt gốc tự do DPPH (15%) ở nồng độ 100 μ M và có khả năng bảo vệ tế bào thần kinh khỏi tác động độc tính của 6-OHDA thông qua sự ức chế hình thành ROS (reactive oxygen species). Đặc biệt là hợp chất này còn có tác động làm giảm sự hình thành ROS ở các tế bào thần kinh được xử lý bằng chất độc paraquat [157]. Hoạt tính bảo vệ tế bào thần kinh cũng đã được ghi nhận ở các hợp chất alkaloid được thu thập từ chủng vi nấm *Aspergillus niveoglaucus* 01NT.1.10.4 phân lập từ trầm tích ở vùng biển Nha Trang. Trong đó, hợp chất cryptoechinuline B có hoạt tính bảo vệ tế bào Neuro-2a khi được xử lý bằng chất gây độc paraquat và rotenone ở mô hình thử nghiệm bệnh Parkinson. Các hợp chất neoechinulin B, neoechinulin C và neoechinulin có khả năng ngăn chặn sự tổn thương tế bào thần kinh, chống lại độc tính thần kinh do rotenone, paraquat và 6-OHDA gây ra [158]. Cho đến

nay hầu như chưa có công trình nào đề cập đến hoạt tính bảo vệ tế bào từ nguồn vi nấm liên kết với rong biển ở Việt Nam; trong khi theo các tài liệu công bố trên thế giới số lượng các hoạt chất sinh học được thu nhận từ đối tượng này chiếm tỉ lệ khá cao.

Như vậy, các nghiên cứu điều tra đánh giá hoạt tính sinh học của các chủng vi nấm biển nói chung và cụ thể là vi nấm phân lập từ rong biển ở vịnh Nha Trang nói riêng còn chưa nhiều mặc dù nguồn tài nguyên thiên nhiên ở đây vô cùng thuận lợi và phong phú. Vì vậy, hướng nghiên cứu đánh giá khả năng sinh tổng hợp các hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học của các chủng vi nấm được phân lập từ rong biển ở vịnh Nha Trang là cần thiết nhằm cung cấp các thông tin định hướng cơ bản để khai thác có hiệu quả nguồn tài nguyên vi sinh vật biển ở vùng vịnh này.

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

Các chủng vi nấm được phân lập từ 08 loài rong biển bao gồm *Hormorphysa cuneiformis*, *Sagassum oligocystum*, *Turbinaria ornata*, *Uval lactuca*, *Padina australis*, *Uval reticulata*, *Sagassum polycystum*, *Enteromorpha flexuosa* được thu thập tại vùng biển Nha Trang.

2.1.2. Các chủng vi sinh vật kiểm định

- 03 chủng vi khuẩn Gram-dương (*Bacillus cereus* ATCC 11778, *Streptococcus faecalis* ATCC 19433, và *Staphylococcus aureus* ATCC 259230)

- 04 chủng vi khuẩn Gram-âm (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, và *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028)

2.1.3. Các dòng tế bào thử nghiệm

Các dòng tế bào thử nghiệm được cung cấp bởi Viện Hóa sinh hữu cơ Thái Bình Dương, Phân Viện Viễn Đông, Viện Hàn lâm Khoa học Nga, bao gồm:

- Dòng tế bào cơ tim chuột (H9c2)
- 03 dòng tế bào ung thư ở người gồm ung thư tuyến tiền liệt (PC-3), ung thư cổ tử cung (Hela), và ung thư vú (MCF-7).

2.1.4. Hóa chất nghiên cứu

Pepton, dịch chiết nấm men, glucose, muối biển, agar (Himedia, Ấn Độ); KH_2PO_4 (Sigma, Mỹ); ethyl acetate, n-hexan, methanol, glycerol, dimethyl sulfoxide (Labscan, Thái Lan); MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma, Mỹ) và một số hóa chất khác.

2.1.5. Thiết bị nghiên cứu

- + Máy đọc ELISA (Biotek, Mỹ);
- + Máy vortex (vision scientific, Hàn Quốc);

- + Máy khuấy từ (vision scientific, Hàn Quốc);
- + Tủ cấy an toàn sinh học (Esco, Anh);
- + Tủ nuôi cấy (Sanyo, Nhật Bản);
- + Cân phân tích AY 120 (Shimadzu, Nhật Bản);
- + Nồi khử trùng (Tomy, Nhật Bản);
- + Tủ sấy (Mettler, Đức),
- + Thiết bị cô quay chân không (EYELA, Nhật Bản) và một số thiết bị nghiên cứu khác.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Thu thập mẫu rong biển

Các mẫu rong biển được thu nhận tại vùng biển Nha Trang ở độ sâu 5-8 mét. Các mẫu được giữ trong túi nhựa vô trùng ở nhiệt độ 4-8 °C và vận chuyển về phòng thí nghiệm làm nguồn phân lập vi nấm biển.

2.2.2. Phân lập vi nấm biển

Các bước phân lập vi nấm từ các mẫu rong biển được thực hiện theo phương pháp của Handayani và cộng sự (2016) với một số thay đổi. Các mẫu rong biển được rửa sạch cát và trầm tích với nước biển vô trùng. Một gam mẫu rong biển được nghiền với 1 mL nước biển vô trùng và cấy trang dịch lên đĩa thạch chứa môi trường thạch Sabouraud có bổ sung kháng sinh (10 g pepton, 20 g glucose, 18-20 g agar, 1000 mL nước biển, 500 mg amoxicillin, pH 6,0-7,0). Hình thái khuẩn lạc vi nấm được bắt đầu quan sát bằng mắt thường sau 3-5 ngày nuôi cấy ở 28 °C và cấy chuyển đến khi được các chủng vi nấm thuần [159]. Các chủng vi nấm biển thuần được lưu giữ thời gian ngắn trong các ống thạch nghiêng chứa môi trường Sabouraud ở 4°C và lưu giữ lâu dài trong môi trường canh Sabouraud có bổ sung 40% glycerol ở -80°C.

2.2.3. Lên men và thu nhận cao chiết từ các chủng vi nấm biển

Các chủng vi nấm được lên men tĩnh ở 28°C trong các bình Erlenmeyer 500 ml chứa môi trường gồm 20 g gạo, 20 mg dịch chiết nấm men, 10 mg KH_2PO_4 và 40 ml nước biển tự nhiên thu ở vịnh Nha Trang [160]. Sinh khối vi nấm sau nuôi cấy 5 ngày trên môi trường thạch Sabouraud được cắt thành các

mẫu có kích thước 1×1 cm và chuyển vào các bình môi trường gạo đã được hấp khử trùng ở 121°C, trong 15 phút. Sau 21 ngày lên men, sinh khối vi nấm và môi trường nuôi cấy được ngâm chiết bằng ethyl acetate (200 ml/bình) trong 48 giờ, sau đó tiến hành lọc, cô quay chân không ở 40°C và thu nhận cao chiết thô để sử dụng cho thử nghiệm sàng lọc hoạt tính sinh học.

2.2.4. Thử nghiệm hoạt tính sinh học của cao chiết được thu nhận từ các chủng vi nấm biến

2.2.4.1. Hoạt tính kháng sinh

Hoạt tính kháng sinh của các chủng vi nấm đối với vi sinh vật kiểm định được xác định dựa trên phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Các cao chiết ethyl acetate thô thu nhận được tẩm lên các đĩa giấy Whatman có đường kính 6 mm ở nồng độ 100 µg/dĩa. Sau đó, các đĩa giấy được đặt lên đĩa thạch Muller Hinton Agar đã cấy các chủng vi sinh vật thử nghiệm. Đĩa giấy tẩm ethyl acetate không chứa dịch chiết được sử dụng làm đối chứng âm. Đường kính vòng vô khuẩn (D, mm) trên các đĩa thạch được xác định sau 24 giờ ủ ở 37°C [161].

2.2.4.2. Hoạt tính chống oxy hóa

Khả năng bắt gốc tự do DPPH

Hoạt tính chống oxy hóa của cặn chiết thô thu từ các chủng vi nấm được đánh giá dựa trên khả năng bắt gốc tự do 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Cặn chiết được hòa trong MeOH và đưa về nồng độ 200 µg/mL. Các dịch chiết lần lượt được cho vào các giếng trên đĩa 96 giếng với thể tích 100 µL, tiếp tục bổ sung 100 µL thuốc thử DPPH (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) và lắc đều. Chứng dương được sử dụng là acid ascorbic và chứng âm là MeOH. Ủ 30 phút trong điều kiện không có ánh sáng, và tiến hành đo mật độ quang OD ở bước sóng 517 nm trên máy ELISA (Biotek, Mỹ)[162]. Khả năng bắt gốc tự do DPPH (Scavenging capacity %) được tính theo công thức sau:

$SC \% = (AC - AS) \times 100/AC$, trong đó AC là mật độ quang của đối chứng âm, AS là mật độ quang của mẫu thí nghiệm.

Phương pháp bắt gốc tự do ABTS

Hoạt tính chống oxy hóa của cao chiết thô thu từ các chủng vi nấm tiếp

tục được đánh giá dựa trên khả năng bắt gốc tự do 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS). Dung dịch gốc tự do ABTS được chuẩn bị bằng cách cho dung dịch ABTS ở nồng độ 7 mM và dung dịch potassium persulfate ($K_2S_2O_8$) nồng độ 2,45 mM với thể tích bằng nhau rồi ủ hỗn hợp dung dịch ở bóng tối trong 16 giờ, sau đó pha loãng bằng metanol rồi điều chỉnh độ hấp thụ của dung dịch ở bước sóng 734 nm về giá trị $OD\ 0,70 \pm 0,05$. Dung dịch này được chuẩn bị ngay trước khi tiến hành thí nghiệm. Cao chiết được hòa trong MeOH, đưa về nồng độ 200 $\mu\text{g/mL}$ và được cho vào đĩa 96 giếng với thể tích 100 μL , tiếp tục bổ sung 100 μL thuốc thử ABTS và lắc đều. Giếng cho 100 μL MeOH thay cho chất thử nghiệm được sử dụng làm mẫu đối chứng âm. Giữ hỗn hợp trong tối ở nhiệt độ phòng, sau 6 phút tiến hành đo ở bước sóng 734 nm [162]. Khả năng bắt gốc tự do ABTS (Scavenging capacity %) được tính theo công thức sau:

$SC\ \% = (AC - AS) \times 100/AC$, trong đó AC là mật độ quang của đối chứng âm, AS là mật độ quang của mẫu thí nghiệm

2.2.4.3. Hoạt tính gây độc tế bào ung thư

Các cao chiết ethyl acetate thu nhận được đánh giá hoạt tính gây độc đối với 03 dòng tế bào ung thư ở người dựa trên phương pháp MTT (3 - [4,5-dimethylthiazol-2-yl] -2,5 diphenyl tetrazolium bromide) [97]. Các dòng tế bào được nuôi cấy trong đĩa 96 giếng trong 24 giờ ở 37°C và 5% CO_2 . Các tế bào (5×10^3 tế bào/giếng) được ủ với các dịch chiết thử nghiệm (100 $\mu\text{g/mL}$) được chuẩn bị trong Dimethyl sulfoxit (DMSO) trong 24 giờ. Tiến hành đo OD trên máy đo quang phổ (Thermo Scientific, Mỹ) để đọc kết quả quang phổ hấp phụ ở bước sóng 570 nm. Từ đó, nồng độ % mật độ sống của các tế bào ung thư thử nghiệm được xác định bằng cách so sánh với mẫu đối chứng là huyền phù tế bào không bổ sung dịch chiết.

2.2.4.4. Hoạt tính bảo vệ tế bào

Dòng tế bào cơ tim chuột H9c2 được nuôi cấy trong môi trường Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) được bổ sung 10% huyết thanh bò thai bất hoạt, 50 U/mL penicilin và 50 $\mu\text{g/mL}$ streptomycin. Tế bào H9c2 (1×10^3 tế bào/giếng) được cho vào đĩa 96 giếng. Độc tố rotenone (10 μM trong 0,1% DMSO) được thêm vào mỗi giếng và các dịch chiết (10 $\mu\text{g/mL}$) được

thêm vào sau 1 giờ. Các tế bào không ủ với độc tố rotenone và các hợp chất được sử dụng làm đối chứng dương. Các tế bào chỉ được ủ với độc tố rotenone sẽ được sử dụng như đối chứng âm. Sau 24 giờ, khả năng sống sót của tế bào sẽ được đo bằng phương pháp MTT. Kết quả sẽ được trình bày dưới dạng % khả năng sống sót của tế bào so với đối chứng [163].

2.2.5. Xác định đặc điểm hình thái và phân loại chủng vi nấm biến tuyển chọn

- Xác định đặc điểm hình thái

Chủng vi nấm được nuôi cấy trên môi trường Sabouraud trong thời gian 5 – 12 ngày ở 28°C và tiến hành quan sát, ghi nhận các đặc điểm hình thái vi nấm trên đĩa thạch.

- Phân loại vi nấm dựa trên giải trình tự gen vùng ITS

DNA tổng số của các chủng vi nấm tuyển chọn được tách chiết và nhân đoạn gen mã hóa cho vùng ITS bằng cặp mồi ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') và ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') [150]. Trình tự đoạn gen vùng ITS được phân tích và so sánh với các trình tự gen tương ứng của các chủng vi nấm trên ngân hàng gen NCBI bằng cách sử dụng công cụ so sánh trình tự tương đồng BLAST ở NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

2.2.6. Xử lý số liệu nghiên cứu

Trong nghiên cứu này, các thí nghiệm được bố trí lặp lại 3 lần và các số liệu được biểu thị bằng giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn thông qua tính toán dựa trên Microsoft Excel 2010.

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. PHÂN LẬP CÁC CHỦNG VI NẤM TỪ RONG BIỂN THU NHẬN Ở VỊNH NHA TRANG

Tám mẫu rong biển bao gồm 05 mẫu rong nâu (*Hormophysa cuneiformis*, *Sargassum oligocystum*, *Sargassum polycystum*, *Turbinaria ornata*, *Padina australis*), và 03 mẫu rong lục (*Ulva reticulata*, *Ulva lactuca*, *Enteromorpha flexuosa*) được thu thập tại 3 địa điểm: Hòn Rùa, Núi Một - Ba Làng, Bờ biển phía bắc cầu Trần Phú tại vùng biển Nha Trang sử dụng làm nguồn phân lập vi nấm biển (Bảng 3.1). Từ 08 mẫu rong biển, 38 chủng vi nấm đã được phân lập và mô tả đặc điểm hình thái khuẩn lạc thông qua các đặc điểm về hình dạng, màu sắc, khả năng tiết chất ra môi trường, bề mặt, độ dày và viền. Trong đó, có 28 chủng vi nấm được phân lập từ 05 mẫu rong nâu *H. cuneiformis*, *S. oligocystum*, *S. polycystum*, *T. ornata*, *P. australis*, và 10 chủng vi nấm được phân lập từ 03 mẫu rong lục. Kết quả phân tích đặc điểm hình thái của các chủng vi nấm được trình bày ở Bảng 3.2.

Bảng 3.1. Danh sách các mẫu rong biển, địa điểm thu mẫu và số lượng các chủng vi nấm phân lập được

STT	Mẫu rong biển	Địa điểm thu mẫu	Số lượng chủng vi nấm phân lập được
1	 <i>Hormophysa cuneiformis</i>	Hòn Rùa	5
2	 <i>Sargassum oligocystum</i>	Hòn Rùa	3

3		Hòn Rùa	4
<i>Turbinaria ornata</i>			
4		Núi Một - Ba Làng	4
<i>Ulva lactuca</i>			
5		Hòn Rùa	8
<i>Padina australis</i>			
6		Bờ biển phía bắc cầu Trần Phú	3
<i>Ulva reticulata</i>			
7		Hòn Rùa	8
<i>Sargassum polycystum</i>			
8		Bờ biển phía bắc cầu Trần Phú	3
<i>Enteromorpha flexuosa</i>			

Bảng 3.2. Danh sách và đặc điểm hình thái của 38 chủng vi nấm biển được phân lập từ các mẫu rong biển

STT	Ký hiệu chủng	Hình ảnh nguồn phân lập	Hình ảnh chủng	Đặc điểm hình thái				
				Hình dạng	Màu sắc	Bề mặt	Độ dày	Viền
1	2104NT-1.1			Tròn	Hồng da	Mịn, tiết sắc tố hồng da	Phẳng	Liền
2	2104NT-1.2			Tròn	Xanh rêu oliu	Mịn, mọc dạng vòng tròn đồng tâm	Hơi lồi	Liền
3	2104NT-1.3			Tròn	Trắng xám	Mịn, hệ sợi nấm mọc dày và toï, tiết sắc tố vàng	Phẳng	Liền

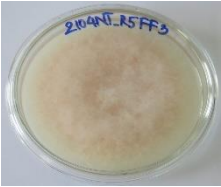
4	2104NT-1.4			Tròn	Hồng da	Mịn, mọc dạng vòng đồng tâm	Phẳng	Liên
5	2104NT-1.5			Tròn	Kem	Dạng sợi	Phẳng	Dạng sợi
6	2104NT-2.1			Vô định hình	Xám	Sợi bông mịn, tiết sắc tố xám đen	Lồi cao	Liên
7	2104NT-2.2			Tròn	Màu kem pha vàng	Mịn, tiết sắc tố vàng nhạt	Phẳng	Dạng sợi

8	2104NT-2.3			Vô định hình	Trắng	Mịn, tiết sắc tố vàng nhạt	Lồi	Liên
9	2104NT-3.1			Tròn	Hồng da	Sợi bông mịn	Phẳng	Dạng sợi
10	2104NT-3.2			Tròn	Xám xanh nhạt	Sợi bông mịn	Phẳng	Liên
11	2104NT-3.3			Tròn	Nâu da	Mịn, có vách chia thẳng	Phẳng	Liên

12	2104NT-3.4			Tròn	Xám	Mịn, tiết sắc tố xám đen	Phẳng	Liên
13	2104NT-4.1			Tròn	Xám xanh nhạt	Sợi bông mịn, tiết sắc tố vàng	Phẳng	Liên
14	2104NT-4.3			Tròn	Vàng oliu	Sợi bông mịn, mọc dạng vòng tròn đồng tâm	Phẳng	Dạng sợi
15	2104NT-4.4			Tròn	Nâu	Mịn, mọc dạng vòng tròn đồng tâm, có vách chia thẳng ở giữa	Phẳng	Liên

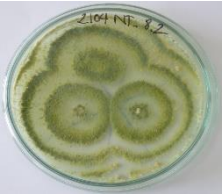
16	2104NT-4.5			Vô định hình	Vàng	Mịn, tiết sắc tố vàng tươi	Phẳng	Liên
17	2104NT-5.2			Tròn	Xám xanh pha vàng nhạt ở giữa	Mịn	Phẳng	Liên
18	2104NT-5.3			Tròn	Kem	Mịn, có vách ngăn ở giữa, tiết sắc tố vàng kem	Phẳng	Liên
19	2104NT-5.4			Tròn	Kem da	Mịn, tiết sắc tố vàng nhạt, có giọt tiết trắng trong	Phẳng	Liên

20	2104NT-5.6			Tròn	Trắng	Sợi bông mịn, có bào tử vàng nhạt	Phẳng	Liên
21	2104NT-5.7			Tròn	Xám xanh	Sợi bông mịn, tiết sắc tố vàng	Phẳng	Liên
22	2104NT-5.8			Tròn	Kem vàng	Sợi bông ngắn mịn, tiết sắc tố vàng nhạt	Phẳng	Liên
23	2104NT-5.9			Tròn	Hồng da	Mịn, có vách chia nhánh, tiết sắc tố nâu	Phẳng	Liên

24	2104NT-5.10			Tròn	Hồng nhạt	Dạng sợi bông dài, tiết sắc tố hồng sậm	Phẳng	Dạng sợi
25	2104NT-6.1			Tròn	Trắng kem	Mịn, tiết sắc tố vàng nhạt	Phẳng	Liên
26	2104NT-6.3			Tròn	Vàng nhạt	Mịn, tiết sắc tố vàng	Phẳng	Liên
27	2104NT-6.4			Tròn	Vàng kem	Mịn, có vách chia ở giữa, tiết sắc tố vàng nhạt	Phẳng	Liên

28	2104NT-7.1			Tròn	Hồng	Mịn, có vách chia ở giữa, tiết sắc tố nâu	Phẳng	Liên
29	2104NT-7.4			Tròn	Xám	Mịn, mọc dạng vòng tròn đồng tâm	Phẳng	Liên
30	2104NT-7.5			Tròn	Xám	Sợi bông mịn, mọc dạng vòng đồng tâm, hệ sợi bông dày và to	Phẳng	Liên
31	2104NT-7.6			Tròn	Xám	Mịn, tiết sắc tố vàng	Phẳng	Liên

32	2104NT-7.7			Tròn	Hồng da	Mịn, tiết sắc tổ vàng, có vách chia thẳng	Phẳng	Liên
33	2104NT-7.8			Tròn	Hồng nhạt	Mịn, mọc dạng vòng tròn đồng tâm, có vách chia nhẵn ở giữa, tiết sắc tổ nâu nhạt	Lõm	Liên
34	2104NT-7.9			Tròn	Trắng pha vàng ở giữa	Mịn, mọc dạng vòng tròn đồng tâm	Phẳng	Liên
35	2104NT-7.10			Tròn	Xám nhạt	Mịn, mặt dưới thạch xám đen, nứt thạch	Lõm sâu	Liên

36	2104NT-8.1			Tròn	Trắng pha vàng	Mịn, tiết sắc tố vàng,	Phẳng	Liên
37	2104NT-8.2			Tròn	Xanh rêu	Dạng sợi ngắn, mọc dạng vòng tròn đồng tâm	Phẳng	Liên
38	2104NT-8.3			Tròn	Xanh rêu	Mịn, có vách chia ở giữa, tiết sắc tố cam	Phẳng	Liên

Kết quả nghiên cứu bước đầu cho thấy số lượng chủng vi nấm phân lập từ rong nâu *Padina australis* và *Sargassum polycystum* chiếm tỷ lệ cao nhất (8 chủng/mẫu). Trong khi, số chủng thu nhận từ các mẫu rong lục chiếm tỷ lệ thấp hơn (3 chủng/mẫu). Theo báo cáo trước đây chỉ ra rằng có thể do thời gian sinh trưởng tương đối ngắn của các loài rong thuộc họ *Chlorophyceae* và sự phát triển chậm của các loài vi sinh vật nội sinh/cộng sinh do liên quan đến nguồn dinh dưỡng đã dẫn đến tính đa dạng của các loài vi nấm phân lập từ rong lục chiếm tỷ lệ thấp hơn so với các loài rong khác [164].

Theo kết quả mô tả đặc điểm hình thái cho thấy, các chủng vi nấm thu nhận có đặc điểm khuẩn lạc khá đa dạng với nhiều màu sắc và hình dạng khác nhau. Phần lớn các khuẩn lạc vi nấm có hình dạng tròn, chiếm 35/38 (92,1%), còn lại là dạng vô định hình, chiếm tỷ lệ thấp 3/38 (7,9 %). Màu sắc bề mặt khuẩn lạc cũng là một trong những đặc điểm thể hiện sự đa dạng của các chủng vi nấm thu nhận. Trong đó, khuẩn ty có màu xám, hồng nhạt chiếm tỷ lệ cao nhất, lần lượt 10/38 (26,3%) và 8/38 (21,1%), tiếp đến là các màu trắng, kem, xanh rêu, vàng và nâu. Bên cạnh màu sắc khuẩn lạc thì bề mặt và viền khuẩn lạc cũng là một trong những đặc điểm để mô tả hình thái đặc trưng của các chủng vi nấm. Các chủng vi nấm có bề mặt phẳng, mịn và viền liền chiếm đa số, chỉ có 5/38 (13,2%) chủng có viền dạng sợi, 2/38 (5,2%) chủng có bề mặt lõm và 2/38 (5,2%) chủng có bề mặt lồi.

Từ kết quả phân tích cho thấy rằng các chủng vi nấm được phân lập từ rong biển ở vịnh Nha Trang có đặc điểm hình thái khá đa dạng và phong phú. Bên cạnh đó, 23/38 (60,5%) chủng có khả năng tiết chất ra môi trường nuôi cấy. Đây là một trong những đặc điểm đáng lưu ý của các chủng vi nấm này để tuyển chọn là nguồn vi sinh có giá trị để nghiên cứu thu nhận các hợp chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính sinh học.

3.2. ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA CÁC DỊCH CHIẾT LÊN MEN TỪ CÁC CHỦNG VI NẤM ĐƯỢC PHÂN LẬP

Để nghiên cứu đánh giá hoạt tính sinh học của các chủng vi nấm được phân lập, 38 chủng vi nấm đã được lên men tĩnh riêng lẻ trong từng bình môi trường gạo ở 28°C trong 21 ngày. Sau đó, sinh khối và môi trường lên men được ngâm chiết bằng ethyl acetate (200 mL/bình) trong 48 giờ, tiến hành lọc, cô quay chân không ở 40°C và thu nhận cao chiết thô để sử dụng cho thử nghiệm

sàng lọc hoạt tính sinh học (Hình 3.1).



(a)

(b)

Hình 3.1. Các chủng vi nấm được lên men trên môi trường gạo (a) và ngâm chiết với ethyl acetate (b)

3.2.1. Hoạt tính kháng sinh

Cao chiết EtOAc thu nhận từ dịch chiết lên men của 38 chủng vi nấm được thử nghiệm hoạt tính kháng đối với 3 chủng vi khuẩn Gram-dương (*B. cereus* ATCC 11778, *S. faecalis* ATCC 19433, và *S. aureus* ATCC 259230) và 4 chủng vi khuẩn Gram-âm (*E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *P. aeruginosa* ATCC 27853, và *S. Typhimurium* ATCC 14028). Kết quả hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định được thể hiện ở Bảng 3.3 và Hình 3.2.

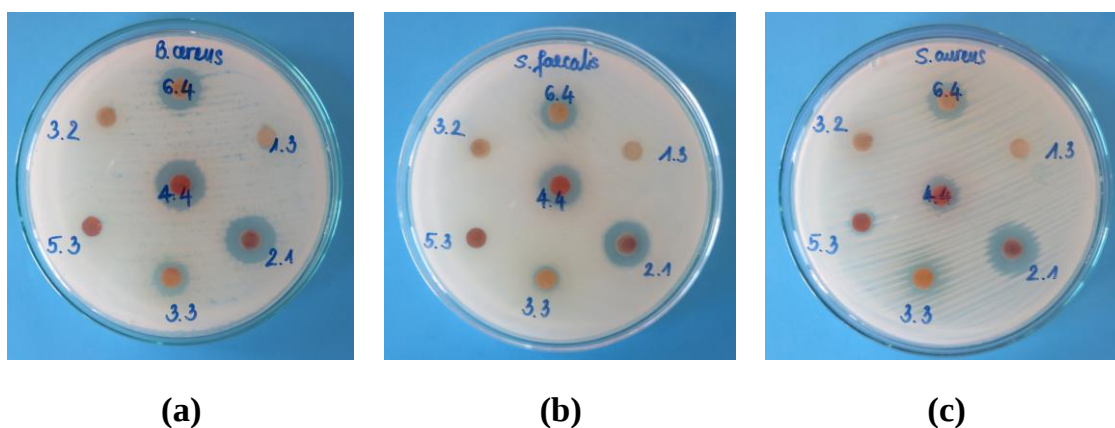
Bảng 3.3. Hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của 38 chủng vi nấm phân lập được

Stt	Chủng	Đường kính vòng kháng khuẩn (D, mm)						
		Gram (+)			Gram (-)			
		<i>BC</i>	<i>SA</i>	<i>SF</i>	<i>EC</i>	<i>KP</i>	<i>PA</i>	<i>ST</i>
1	2104NT-1.1	-	-	-	-	-	-	-
2	2104NT-1.2	-	-	-	-	-	-	-
3	2104NT-1.3	-	-	-	-	-	-	-
4	2104NT-1.4	12	18	8	-	12	-	-
5	2104NT-1.5	18	18	15	10	16	-	-
6	2104NT-2.1	15	15	13	8	12	-	-

Stt	Chủng	Đường kính vòng kháng khuẩn (D, mm)						
		Gram (+)			Gram (-)			
		<i>BC</i>	<i>SA</i>	<i>SF</i>	<i>EC</i>	<i>KP</i>	<i>PA</i>	<i>ST</i>
7	2104NT-2.2	-	8	8	-	8	-	8
8	2104NT-2.3	16	12	11	-	15	-	-
9	2104NT-3.1	-	-	-	-	-	-	-
10	2104NT-3.2	-	-	-	-	-	-	-
11	2104NT-3.3	10	-	-	-	-	-	-
12	2104NT-3.4	-	-	-	-	-	-	-
13	2104NT-4.1	-	-	-	-	-	-	-
14	2104NT-4.3	-	-	-	-	-	-	-
15	2104NT-4.4	15	10	12	-	-	-	-
16	2104NT-4.5	8	17	8	-	13	-	-
17	2104NT-5.2	-	-	-	-	-	-	-
18	2104NT-5.3	-	-	-	-	-	-	-
19	2104NT-5.4	8	-	-	-	-	-	-
20	2104NT-5.6	13	17	12	-	15	-	-
21	2104NT-5.7	-	-	-	-	-	-	-
22	2104NT-5.8	-	-	-	-	-	-	-
23	2104NT-5.9	-	-	-	-	-	-	-
24	2104NT-5.10	-	-	-	-	-	-	-
25	2104NT-6.1	-	15	12	-	13	-	-
26	2104NT-6.3	-	-	-	-	-	-	-
27	2104NT-6.4	13	12	11	-	15	-	-
28	2104NT-7.1	11	11	9	-	-	-	-
29	2104NT-7.4	-	-	-	-	-	-	-
30	2104NT-7.5	-	-	-	-	-	-	-
31	2104NT-7.6	-	-	-	-	-	-	-
32	2104NT-7.7	-	-	-	-	-	-	-
33	2104NT-7.8	10	18	10	-	13	-	-
34	2104NT-7.9	10	12	10	-	12	-	-

Stt	Chủng	Đường kính vòng kháng khuẩn (D, mm)						
		Gram (+)			Gram (-)			
		BC	SA	SF	EC	KP	PA	ST
35	2104NT-7.10	-	-	-	-	-	-	-
36	2104NT-8.1	-	-	-	-	-	-	-
37	2104NT-8.2	-	-	-	-	-	-	-
38	2104NT-8.3	-	10	-	-	-	-	-

Ghi chú: “_” : không có hoạt tính. BC (*B. cereus* ATCC 11778), SF (*S. faecalis* ATCC 19433), SA (*S. aureus* ATCC 259230), EC (*E. coli* ATCC 25922), KP (*K. pneumoniae* ATCC 700603), PA (*P. aeruginosa* ATCC 27853), và ST (*S. Typhimurium* ATCC 14028)



Hình 3.2. Hoạt tính kháng *B. cereus* (a), *S. faecalis* (b) và *S. aureus* (c) của một số chủng vi nấm phân lập

Kết quả sàng lọc cho thấy trong số 38 chủng vi nấm biến phân lập có 13/38 (34,2%) chủng kháng *B. cereus* ATCC 11778, 14/38 (36,8%) chủng kháng *S. aureus* ATCC 259230, 13/38 (34,2%) chủng kháng *S. faecalis* ATCC 19433, 9/38 (23,7%) kháng *E. coli* ATCC 25922 và 11/38 (28,9%) chủng kháng *K. pneumoniae* ATCC 700603. Khả năng kháng chủng *S. Typhimurium* ATCC 14028 chiếm tỷ lệ rất thấp, chỉ có 1/38 (2,63%) và không có chủng vi nấm nào có khả năng kháng *P. aeruginosa* ATCC 27853. Như vậy, khả năng kháng các chủng vi khuẩn Gram dương được ghi nhận chiếm tỷ lệ cao hơn so với vi khuẩn Gram-âm. Trong số đó, có 8/38 (21,1%) chủng thể hiện hoạt tính kháng đối với 4/7 chủng vi sinh vật kiểm định. Đặc biệt là chủng 2104NT-1.5 được phân lập từ rong *H. cuneiformis* và 2104NT-2.1 từ rong *S. oligocystum* có khả năng kháng 5/7 chủng vi sinh vật kiểm định. Như vậy, trong số 10 chủng vi nấm có

hoạt tính kháng khuẩn mạnh, có đến 8 chủng được phân lập từ các mẫu rong nâu, chỉ có 2 chủng được phân lập từ 2 mẫu rong lục thuộc chi *Ulva*.

Trong môi quan hệ cộng sinh với rong biển, vi nấm được báo cáo là có khả năng sinh tổng hợp các hợp chất chuyển hóa thứ cấp đóng vai trò bảo vệ vật chủ chống lại các tác nhân gây bệnh [9]. Chính vì vậy, vi nấm có nguồn gốc từ rong biển được đánh giá là nguồn tiềm năng để khai thác các hợp chất kháng sinh. Cụ thể, trong nghiên cứu gần đây, ba hợp chất mới có hoạt tính kháng khuẩn cao thuộc dẫn xuất xanthone – một nhóm chất rất phổ biến trong tự nhiên và có nhiều hoạt tính sinh học thú vị đã được phát hiện từ chủng vi nấm *Wardomyces anomalus* có nguồn gốc từ rong *Enteromorpha* sp. Bên cạnh đó, chủng vi nấm *A. wentii* pt-1 nội sinh ở rong đỏ *Gymnogongrus flabelliformis* cũng được báo cáo sinh tổng hợp ba hợp chất mới yicathin A-C thuộc nhóm xanthone thể hiện hoạt tính kháng đặc hiệu đối với *E. coli*, *S. aureus*, và *Colletotrichum lagenarium*. Hai hợp chất thuộc nhóm indoloditerpenes gồm asporyzin C và JBIR-03 được phát hiện từ chủng vi nấm *Aspergillus oryzae* phân lập từ mẫu rong đỏ *Heterosiphonia japonica* cũng được báo cáo là có hoạt tính kháng khuẩn và diệt côn trùng. Đáng lưu ý là nhóm nghiên cứu của Gao và cộng sự đã phân lập được hợp chất mới conidiogenone B và conidiogenol thuộc nhóm tetracyclic diterpene mới từ chủng vi nấm *P. chrysogenum* (QEN-24S) từ mẫu rong đỏ thuộc chi *Laurencia* có khả năng kháng hiệu quả *S. aureus* kháng methicillin, *S. epidermidis*, *Pseudomonas fluorescens*, và *P. aeruginosa* với giá trị MIC 8-16 µg/mL[165]. Từ các kết quả nghiên cứu cho thấy vi nấm phân lập từ rong biển là nguồn tiềm năng để khai thác các hợp chất kháng sinh nhằm tạo ra nguồn dược phẩm mới thay thế. Đặc biệt là tìm kiếm các hợp chất có khả năng kháng lại các chủng kháng kháng sinh để ứng phó với tình trạng kháng thuốc ngày càng trầm trọng và đang là mối nguy đe dọa sức khỏe toàn cầu hiện nay.

3.2.2. Hoạt tính chống oxy hóa

Hoạt tính chống oxy hóa của các cao chiết lên men thu nhận từ 38 chủng vi nấm được xác định bằng cách đánh giá khả năng bắt gốc tự do DPPH và ABTS. Kết quả ở Bảng 3.4 cho thấy có 14 chủng (36,8%) có khả năng bắt gốc tự do DPPH và ABTS đồng thời với giá trị SC% > 50%. Khả năng bắt gốc tự do ABTS được ghi nhận cao hơn đối với gốc tự do DPPH với tỷ lệ lần lượt là 78,9% (n=30) và 36,8% (n=14). Trong số 14 chủng có hoạt tính bắt gốc tự do

DPPH và ABTS, có 9 chủng được phân lập từ các mẫu rong nâu và 5 chủng từ các mẫu rong lục.

Bảng 3.4. Hoạt tính chống oxy hóa của 38 chủng vi nấm phân lập

STT	Ký hiệu chủng	Hoạt tính chống oxy hóa	
		% bắt gốc tự do DPPH	% bắt gốc tự do ABTS
1	2104NT-1.1	16,9 ± 2,52	48,71 ± 0,01
2	2104NT-1.2	30,68 ± 0,79	70,90 ± 0,68
3	2104NT-1.3	66,76 ± 0,36	74,78 ± 0,68
4	2104NT-1.4	58,81 ± 0,56	71,55 ± 0,68
5	2104NT-1.5	29,41 ± 1,77	54,09 ± 0,34
6	2104NT-2.1	38,35 ± 0,09	65,95 ± 0,33
7	2104NT-2.2	39,06 ± 0,73	67,02 ± 0,69
8	2104NT-2.3	2,13 ± 0,01	37,28 ± 0,80
9	2104NT-3.1	60,09 ± 0,45	68,32 ± 3,26
10	2104NT-3.2	34,94 ± 0,09	65,30 ± 0,33
11	2104NT-3.3	50,99 ± 0,53	72,41 ± 0,33
12	2104NT-3.4	19,60 ± 1,32	40,08 ± 0,42
13	2104NT-4.1	30,11 ± 0,17	60,13 ± 0,34
14	2104NT-4.3	53,27 ± 0,54	62,72 ± 0,98
15	2104NT-4.4	37,93 ± 0,51	68,53 ± 2,27
16	2104NT-4.5	59,80 ± 2,46	67,24 ± 0,33
17	2104NT-5.2	52,27 ± 1,38	68,96 ± 1,32
18	2104NT-5.3	30,26 ± 0,36	68,96 ± 0,23
19	2104NT-5.4	18,61 ± 0,27	48,92 ± 0,75
20	2104NT-5.6	48,01 ± 0,32	67,89 ± 0,33
21	2104NT-5.7	43,04 ± 0,11	67,24 ± 0,33
22	2104NT-5.8	27,70 ± 0,79	60,78 ± 0,34
23	2104NT-5.9	51,42 ± 0,75	62,07 ± 0,34
24	2104NT-5.10	40,06 ± 0,10	56,68 ± 0,40

STT	Ký hiệu chủng	Hoạt tính chống oxy hóa	
		% bắt gốc tự do DPPH	% bắt gốc tự do ABTS
25	2104NT-6.1	53,27 ± 0,32	72,20 ± 0,68
26	2104NT-6.3	35,65 ± 0,57	66,38 ± 0,70
27	2104NT-6.4	53,69 ± 0,32	71,77 ± 0,33
28	2104NT-7.1	59,80 ± 0,79	71,98 ± 0,51
29	2104NT-7.4	45,45 ± 0,55	69,85 ± 4,43
30	2104NT-7.5	41,62 ± 2,01	65,94 ± 2,50
31	2104NT-7.6	49,43 ± 0,75	68,32 ± 0,69
32	2104NT-7.7	54,97 ± 0,55	72,41 ± 0,33
33	2104NT-7.8	56,82 ± 0,21	72,63 ± 0,67
34	2104NT-7.9	37,07 ± 0,09	45,25 ± 2,00
35	2104NT-7.10	10,51 ± 0,67	40,30 ± 0,65
36	2104NT-8.1	9,38 ± 2,58	44,39 ± 1,36
37	2104NT-8.2	52,70 ± 0,33	68,53 ± 0,33
38	2104NT-8.3	18,33 ± 1,32	47,84 ± 0,99

Trong số các chủng có hoạt tính chống oxy hóa, chủng 2104NT-1.3 nổi bật với hoạt tính bắt gốc tự do DPPH cao nhất với 66,76% tiếp theo là 2104NT-3.1 (60,09%) và 2104NT-1.4 (58,81%). Đối với khả năng bắt gốc tự do ABTS, chủng 2104NT-1.3 cũng được ghi nhận với hoạt tính cao nhất (74,78%), tiếp theo là các chủng 2104NT-7.7 (72,41%), 2104NT-7.8 (72,63%) và 2104NT-3.3 (72,41%).

Từ kết quả sàng lọc cho thấy các chủng vi nấm được phân lập từ rong biển ở vịnh Nha Trang có hoạt tính chống oxy hóa khá cao. Kết quả này cũng tương đồng với khẳng định của các nghiên cứu trước đây rằng vi nấm nội sinh rong biển là một nguồn sinh tổng hợp chất chống oxy hóa đáng chú ý. Abdel-Lattef và cộng sự đã báo cáo về các hợp chất thuộc dẫn xuất hydroquinone thu nhận từ chủng vi nấm *Acremonium* sp. phân lập từ rong nâu *Cladostephus spongius* ở vùng biển Tây Ban Nha. Các hợp chất này thể hiện khả năng bắt gốc tự do DPPH đặc hiệu ở nồng độ 25,0 µg/mL và ức chế quá trình peroxid hóa của axit linolenic ở nồng độ 37,0 µg/mL. Chủng vi nấm *Epicoccum* sp.

phân lập từ rong *Fucus vesiculosus* cũng được báo cáo sinh tổng hợp chất có hoạt tính chống oxy hóa cao là epicoccone. Bên cạnh đó, khả năng sinh tổng hợp chất 2-hydroxycircumdatin C thuộc nhóm chất benzodiazepine với đặc tính chống oxy hóa đặc hiệu cũng được phát hiện ở chủng vi nấm *A. ochraceus* phân lập từ rong biển *S. kjellmanianum* [165].

Để hiểu sâu hơn về hoạt tính chống oxy hóa của các chủng vi nấm biển, việc nghiên cứu phân tích thành phần hóa học của cao chiết lên men từ các chủng vi nấm này là rất cần thiết. Các điều tra này sẽ cung cấp cơ sở dữ liệu về các hợp chất chống oxy hóa hiệu quả nhằm tạo ra các sản phẩm tự nhiên có hoạt tính cao, an toàn để ứng dụng trong thực phẩm, mỹ phẩm và y dược.

3.2.3. Hoạt tính gây độc tế bào

Cao chiết lên men của 38 chủng vi nấm được tiếp tục đánh giá hoạt tính gây độc đối với 03 dòng tế bào ung thư ở người gồm ung thư cổ tử cung (Hela), ung thư tuyến tiền liệt (PC-3), và ung thư vú (MCF-7) dựa trên phương pháp MTT. Các tế bào thử nghiệm có % mật độ tế bào sống sót < 50% thì cao chiết vi nấm được đánh giá là có hoạt tính gây độc tế bào. Kết quả ở Bảng 3.5 cho thấy khả năng gây độc của các cao chiết vi nấm đối với 03 dòng tế bào Hela, PC-3 và MCF-7 chiếm tỷ lệ lần lượt là 19/38 (50%), 19/38 (50%) và 26/38 (68,4%). Như vậy, các cao chiết vi nấm thể hiện hoạt tính gây độc hiệu quả hơn đối với dòng tế bào MCF-7.

Bảng 3.5. Hoạt tính gây độc tế bào của 38 chủng vi nấm phân lập

STT	Chủng vi nấm	% tế bào sống sót			
		HeLa	PC-3	MCF-7	H9c2
1	2104NT-1.1	9,0±0,9	46,1±6,6	39,8±9,1	63,7±1,9
2	2104NT-1.2	7,9±0,3	39,1±10,1	46,5±3,4	72,8±0,7
3	2104NT-1.3	47,9±7,7	78,9±9,6	43,0±9,0	106,0±1,9
4	2104NT-1.4	32,1±7,2	43,3±3,0	52,7±5,7	73,6±1,5
5	2104NT-1.5	8,7±0,3	8,6±0,3	11,3±0,1	80,4±3,4
6	2104NT-2.1	13,5±2,2	49,7±7,0	39,0±2,9	65,3±0,9
7	2104NT-2.2	10,7±1,1	12,5±0,6	22,3±3,6	75,6±0,9
8	2104NT-2.3	62,5±5,8	64,4±20,0	34,8±7,0	67,6±1,4

STT	Chủng vi nấm	% tế bào sống sót			
		HeLa	PC-3	MCF-7	H9c2
9	2104NT-3.1	14,6±2,6	11,5±0,7	20,4±1,4	69,3±0,6
10	2104NT-3.2	57,6±7,0	80,6±20,0	11,8±0,5	105,7±6,4
11	2104NT-3.3	62,7±7,6	53,9±3,8	55,5±4,7	83,1±4,9
12	2104NT-3.4	75,7±5,8	108,6±5,2	56,0±2,1	74,6±2,9
13	2104NT-4.1	56,5±2,3	37,7±12,4	54,6±2,7	82,1±0,7
14	2104NT-4.3	28,5±6,1	9,7±0,8	39,8±6,0	87,5±0,4
15	2104NT-4.4	53,1±1,4	66,4±4,3	67,4±1,1	85,3±1,5
16	2104NT-4.5	72,0±8,4	46,5±2,5	60,0±2,5	88,6±3,1
17	2104NT-5.2	23,5±1,4	45,3±17,8	28,7±3,8	72,4±0,3
18	2104NT-5.3	6,1±0,1	15,0±1,4	15,0±1,9	67,6±1,2
19	2104NT-5.4	42,2±0,6	40,3±6,8	33,6±2,9	74,3±3,1
20	2104NT-5.6	17,2±2,0	25,0±2,2	43,1±1,8	68,0±0,4
21	2104NT-5.7	76,1±8,3	83,7±4,3	50,6±5,6	91,3±0,5
22	2104NT-5.8	54,1±4,5	86,3±4,0	12,4±0,2	100,7±5,5
23	2104NT-5.9	53,0±5,1	49,2±3,8	42,7±2,5	63,4±1,2
24	2104NT-5.10	63,4±1,5	63,6±5,4	41,7±2,1	82,2±3,4
25	2104NT-6.1	14,4±0,2	35,3±4,0	12,5±0,4	117,5±3,6
26	2104NT-6.3	78,6±13,1	68,4±14,5	62,6±4,6	80,3±1,1
27	2104NT-6.4	52,3±8,9	63,8±8,1	13,5±0,7	84,4±1,0
28	2104NT-7.1	43,9±3,6	35,9±6,3	35,8±2,8	76,5±2,3
29	2104NT-7.4	61,6±1,7	68,8±20,3	60,4±12,7	73,7±0,6
30	2104NT-7.5	62,6±0,7	76,5±3,7	33,8±4,2	86,8±1,7
31	2104NT-7.6	50,5±5,0	61,5±3,4	21,4±3,6	88,7±5,5
32	2104NT-7.7	73,4±4,3	90,0±8,0	67,3±8,3	88,4±2,4
33	2104NT-7.8	63,9±7,9	80,6±5,2	62,9±3,5	74,1±0,6
34	2104NT-7.9	6,4±0,2	8,1±0,8	10,3±0,0	63,9±1,1
35	2104NT-7.10	41,4±6,9	66,2±16,9	36,7±7,3	84,2±6,1
36	2104NT-8.1	28,6±3,4	76,2±4,3	25,7±2,6	67,4±1,2
37	2104NT-8.2	10,4±0,2	12,3±1,7	13,5±1,1	80,4±1,9
38	2104NT-8.3	78,9±3,1	62,1±13,6	59,7±3,8	76,8±0,5

Kết quả sàng lọc cũng cho thấy rằng các mẫu cao chiết từ 38 chủng vi nấm biển thể hiện khả năng ức chế sự sống sót của 3 dòng tế bào ung thư thử nghiệm với giá trị khác nhau. Đối với tế bào ung thư cổ tử cung (Hela) thì cao chiết từ chủng vi nấm biển 2104NT-5.3 và 2104NT-7.9 có tác động gây độc khá mạnh, tỉ lệ sống sót của tế bào Hela rất thấp, lần lượt là 6,1% và 6,4%. Khả năng gây độc mạnh nhất đối với tế bào PC-3 được ghi nhận từ cao chiết chủng vi nấm 2104NT-1.5 và 2104NT-7.9, với % tế bào sống sót lần lượt là 8,6% và 8,1%. Trong khi hoạt tính gây độc cao nhất đối với tế bào MCF-7 được thể hiện bởi cao chiết từ chủng 2104NT-1.5, 2104NT-3.2 và 2104NT-7.9 với giá trị % mật độ tế bào sống lần lượt 11,3%, 11,8% và 10,3%. Theo số liệu nghiên cứu trên, hai chủng vi nấm 2104NT-1.5 và 2104NT-7.9 được ghi nhận có hoạt tính gây độc hiệu quả đối với cả 3 dòng tế bào ung thư thử nghiệm. Điều đáng lưu ý là các chủng có hoạt tính gây độc mạnh đều có nguồn gốc từ các mẫu rong nâu. Kết quả này tương đồng với kết luận của các báo cáo trước đây là số lượng các hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học được phát hiện từ đối tượng vi nấm phân lập từ rong nâu chiếm tỷ lệ cao hơn so với rong đỏ và rong lục [165].

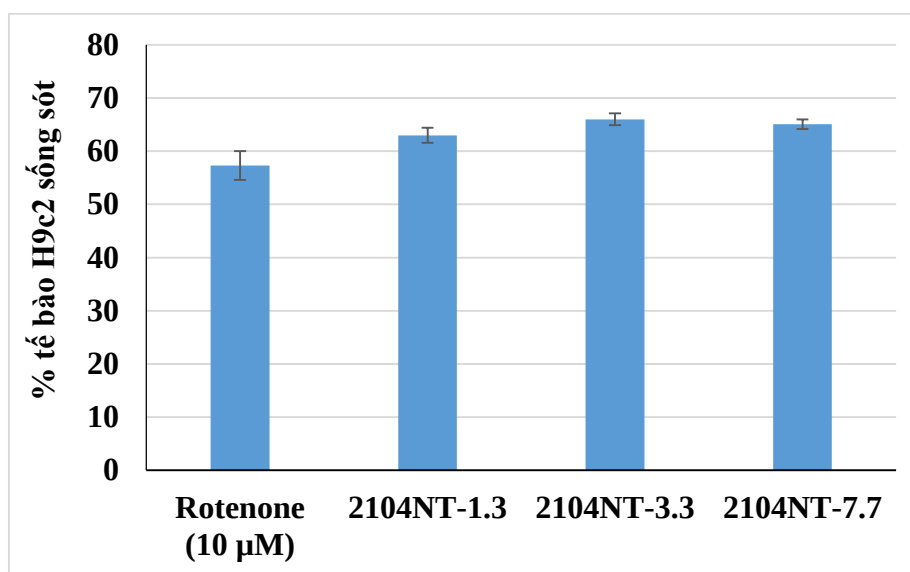
Theo báo cáo trước đây, 15 chủng vi nấm phân lập từ các mẫu rong *Kappaphycus cottonii*, *K. striatus*, *Gracilaria eucheumatoides* và *Betaphycus gelatinus* thu nhận ở vịnh Nha Trang cũng được đánh giá hoạt tính gây độc đối với 02 dòng tế bào ung thư Hep-G2 và MCF-7. Kết quả cho thấy 04 chủng có hoạt tính gây độc đối với cả 02 dòng tế bào ung thư thử nghiệm [166]. Chủng vi nấm *Penicillium citrinum* được phân lập từ mẫu rong nâu *Sargassum wightii* ở vùng biển Kanyakumari, Tamil Nadu, Ấn Độ được báo cáo là có khả năng bắt gốc tự do DPPH và gây độc hiệu quả đối với tế bào ung thư MCF-7 [98]. Bên cạnh đó, chủng vi nấm thuộc chi *Leptosphaeria* có nguồn gốc từ rong nâu *Sargassum tortile* được xác định có khả năng sinh tổng hợp chất leptosin A có hoạt tính gây độc mạnh đối với tế bào ung thư bạch cầu P-388 thông qua ức chế topoisomerase II [165].

Dựa trên kết quả sàng lọc cho thấy các chủng vi nấm phân lập từ các mẫu rong nâu và rong lục ở vịnh Nha Trang có hoạt tính độc cao đối với các dòng tế bào ung thư thử nghiệm. Bên cạnh đó, trong nghiên cứu này, hoạt tính gây độc đối với tế bào cơ tim chuột H9c2 cũng được tiến hành thử nghiệm. Các chủng không có khả năng gây độc hoặc gây độc không đáng kể đối với tế bào

H9c2, cụ thể là % tế bào H9c2 sống sót lớn hơn 80% sẽ được lựa chọn để đánh giá hoạt tính bảo vệ tế bào này. Kết quả cho thấy có 19/38 (50%) chủng vi nấm ức chế ít hơn 20% sự sống sót của tế bào H9c2.

3.2.4. Hoạt tính bảo vệ tế bào

Dựa trên kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào H9c2, 19 chủng vi nấm không có khả năng gây độc hoặc gây độc không đáng kể đối với tế bào H9c2 đã được lựa chọn để tiếp tục thử nghiệm hoạt tính bảo vệ tế bào H9c2 khi xử lý với chất gây độc là rotenone ở nồng độ 10 μ M. Khi tế bào H9c2 được ủ với rotenone (10 μ M) thì % mật độ tế bào sống sót là 57,3%. Khi thử nghiệm bổ sung dịch chiết vi nấm có nồng độ 10 μ g/mL được chuẩn bị trong DMSO 0,1% thì có 03 dịch chiết vi nấm có khả năng làm tăng giá trị % mật độ tế bào sống sót bao gồm 2104NT-1.3, 2104NT-3.3 và 2104NT-7.7 với % tế bào H9c2 sống sót lần lượt là 63,0; 66,0 và 65,1% (Hình 3.3).



Hình 3.3. Hoạt tính bảo vệ tế bào cơ tim H9c2

Mặc dù vi nấm biến được ghi nhận là nguồn tiềm năng để thu nhận các sản phẩm tự nhiên với nhiều hoạt tính sinh học thú vị, nhưng cho đến nay theo các tài liệu cho thấy chưa đề cập đến việc thử nghiệm khả năng bảo vệ tim mạch của các hợp chất tự nhiên này. Phần lớn các nghiên cứu theo hướng này chỉ mới tập trung ở đối tượng vi nấm trên cạn. Từ hai thập kỷ trước, hợp chất dạng polyketide là lovastatin đã được phân lập từ chủng vi nấm trên cạn *Aspergillus terreus* [167]. Với hoạt tính làm giảm nồng độ cholesterol trong máu dựa trên khả năng ức chế enzyme xúc tác chuyển hóa HMG-CoA thành mevalonat trong

con đường sinh tổng hợp [168], hợp chất lovastatin nhanh chóng được thử nghiệm lâm sàng trong điều trị rối loạn lipid máu và được cấp phép sử dụng làm thuốc giảm nguy cơ mắc bệnh tim mạch vào năm 1987 với nhiều thương hiệu khác nhau như Mevacor, Altacor, Altoprev và Advicor[169]. Đến năm 2001, hợp chất mevastatin tiếp tục được phân lập từ một số chủng vi nấm thuộc chi *Penicillium* và *Colletotrichum* và được ghi nhận có tác dụng giảm lipid trong máu và giảm tổn thương đột quy [170]. Nghiên cứu còn cho thấy hợp chất mevastatin có độ an toàn cao khi so sánh với các loại statin khác vì cấu trúc đơn giản nên ít gây ra các tác dụng phụ [171].

Vào năm 2012, nhóm nghiên cứu của Gazzerri đã phát hiện được hợp chất simvastatin từ chủng vi nấm nội sinh *Aspergillus terreus* có khả năng điều trị rối loạn lipid máu và ngăn ngừa các biến chứng liên quan đến xơ vữa động mạch. Dựa trên các hoạt tính có giá trị, hợp chất này đã được ứng dụng làm dược phẩm trong phòng ngừa đột quy, nhồi máu cơ tim hoặc đau tim ở những người có nguy cơ cao với tên thương mại là Zocor. Thống kê các thử nghiệm lâm sàng cũng cho thấy simvastatin giúp làm giảm đến 42% tỷ lệ tử vong do tim mạch [172]. Gần đây, hợp chất gliorosein phân lập từ chủng vi nấm *Lopadostoma pouzarii* 168CLC-57.3 phân lập từ mẫu hải miên ở đảo Cù Lao Chàm, Quảng Nam được báo cáo là có hoạt tính bảo vệ tế bào cơ tim H9c2 khi xử lý bằng chất gây độc là rotenone [36].

3.3. PHÂN LOẠI CHỦNG VI NẤM TUYỂN CHỌN CÓ HOẠT TÍNH SINH HỌC CAO

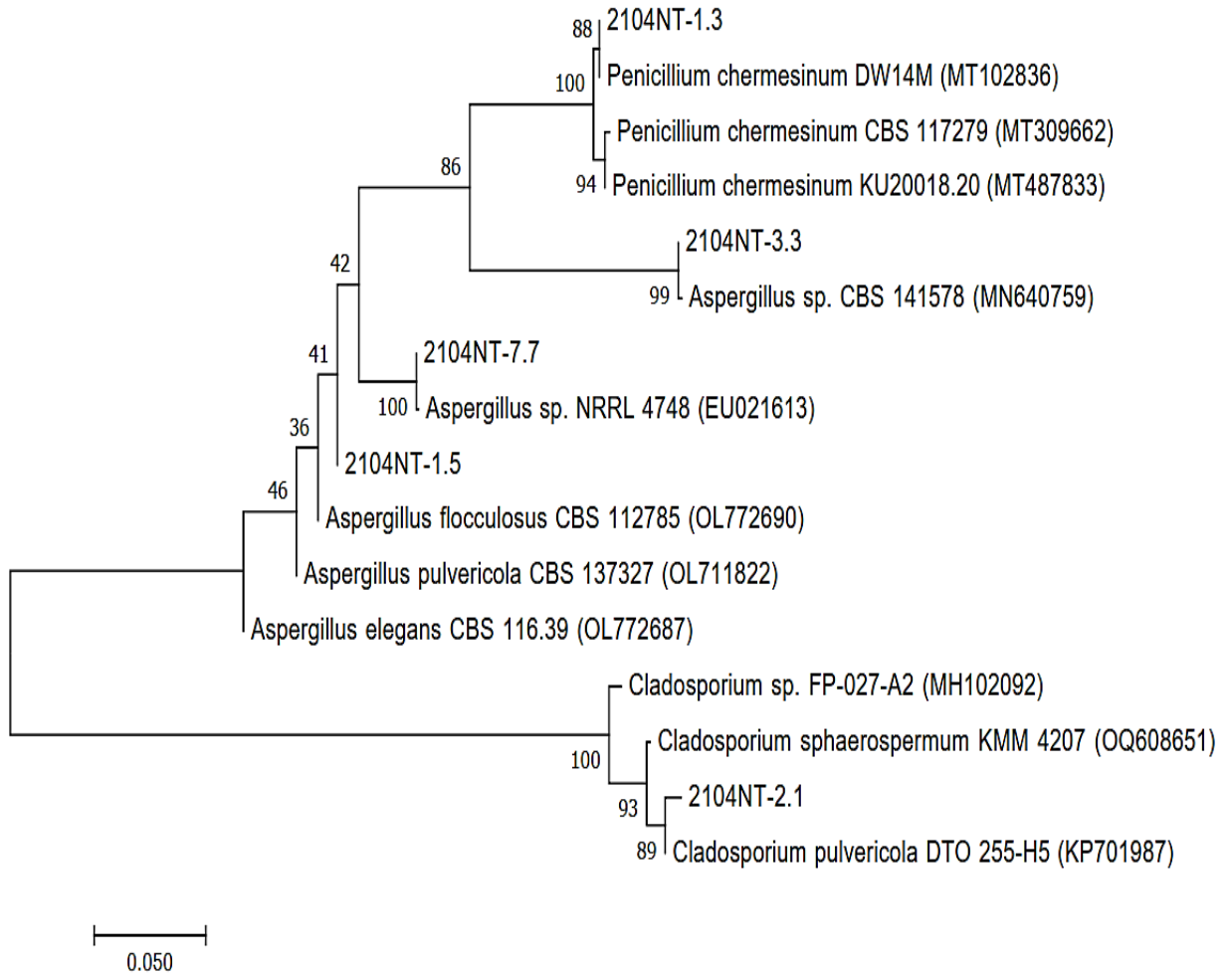
Dựa trên kết quả đánh giá hoạt tính sinh học của 38 chủng vi nấm biển phân lập đã xác định được chủng vi nấm 2104NT-1.5 thể hiện hoạt tính kháng khuẩn và gây độc tế bào ung thư cao, chủng 2104NT-1.3 có hoạt tính chống oxy hóa và bảo vệ tế bào H9c2, chủng 2104NT-2.1 có hoạt tính kháng khuẩn cao, chủng 2104NT-3.3 có hoạt tính chống oxy hóa và bảo vệ tế bào cơ tim, chủng 2104NT-7.7 có hoạt tính chống oxy hóa và bảo vệ tế bào cơ tim. Vì vậy, 05 chủng vi nấm có hoạt tính sinh học cao bao gồm 2104NT-1.3, 2104NT-1.5, 2104NT-2.1, 2104NT-3.3 và 2104NT-7.7 đã được tuyển chọn để tiến hành phân loại dựa trên phân tích trình tự gen vùng ITS.

Khi tiến hành so sánh với các trình tự gen tương ứng của các chủng vi nấm trên ngân hàng gen NCBI sử dụng công cụ BLAST cho thấy chủng

2104NT-1.3 tương đồng 99% với chủng *Penicillium chermesinum* CBS 117279 (MT309662), chủng 2104NT-1.5 tương đồng 99% với chủng *Aspergillus* sp. CBS112785 (OL772690), chủng 2104NT-2.1 tương đồng 99% với chủng *Cladosporium pulvericola* DTO255-H5 (KP701987), chủng 2104NT-3.3 tương đồng 99% với chủng *Aspergillus* sp. CBS 141578 (MN640759), và chủng 2104NT-7.7 có độ tương đồng 99% với chủng *Aspergillus* sp. NRRL 4748 (EU021613) (Bảng 3.6, Hình 3.4). Dựa trên kết quả phân tích trình tự gen, 05 chủng vi nấm tuyển chọn được xác định tên phân loài là *Penicillium chermesinum* 2104NT-1.3, *Aspergillus* sp. 2104NT-1.5, *Cladosporium* sp. 2104NT-2.1, *Aspergillus* sp. 2104NT-3.3, và *Aspergillus* sp. 2104NT-7.7.

Bảng 3.6. Phân loại 05 chủng vi nấm biển dựa trên phân tích trình tự gen vùng ITS

Chủng vi nấm	Nguồn phân lập	Tên phân loài	Chủng so sánh trên Ngân hàng Gen	Độ tương đồng
2104NT-1.3	<i>Hormorphysa cuneiformis</i>	<i>Penicillium chermesinum</i>	<i>Penicillium chermesinum</i> CBS 117279 (MT309662)	99%
2104NT-1.5	<i>Hormorphysa cuneiformis</i>	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp. CBS112785 (OL772690)	99%
2104NT-2.1	<i>Sagassum oligocystum</i>	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Cladosporium pulvericola</i> DTO255-H5 (KP701987)	99%
2104NT-3.3	<i>Turbinaria ornata</i>	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp. CBS 141578 (MN640759)	99%
2104NT-7.7	<i>Sagassum polycystum</i>	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp. NRRL 4748 (EU021613)	99%



Hình 3.4. Cây phát sinh chủng loại của các chủng vi nấm biển tuyển chọn xây dựng dựa trên trình tự đoạn gen vùng ITS theo phương pháp Neighbor Joining, bootstrap 1000 lần, scale bar = 0,05, được thực hiện bằng phần mềm MEGA7.0

Kết quả phân tích ở Bảng 3.6 cho thấy có 03 chủng vi nấm được xác định thuộc chi *Aspergillus*, 01 chủng thuộc chi *Penicillium* và 01 chủng thuộc chi *Cladosporium*. Như vậy, cả năm chủng vi nấm tuyển chọn đều thuộc ngành Ascomycota. Theo tài liệu báo cáo đây là ngành có số lượng chủng vi nấm lớn nhất trong số các ngành vi nấm ở biển [29]. Trong đó, có 04 chủng thuộc bộ *Eurotiales* và *Capnodiales*. Điều đáng lưu ý là cả năm chủng vi nấm này đều được phân lập từ các mẫu rong nâu.

Bên cạnh đó, theo tài liệu thống kê các kết quả nghiên cứu cũng chỉ ra rằng, việc sinh tổng hợp các hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học có liên quan đến phát sinh loài vi nấm biển [40]. Phần lớn các chủng vi nấm biển thuộc các chi *Aspergillus* và *Penicillium* được báo cáo có khả năng tạo ra nhiều nhóm chất có hoạt tính sinh học cao. Cụ thể, chủng vi nấm *Aspergillus wentii* EN-48

nội sinh ở rong biển *Sargassum* spp. có khả năng sinh tổng hợp 8 hợp chất, trong đó có một dẫn xuất anthraquinone mới (wentiquinone C) và một dẫn xuất benzamide mới (methyl 4-(3,4-dihydroxybenzamide) cùng với 6 hợp chất phenolic thể hiện khả năng bắt gốc tự do DPPH với giá trị IC_{50} từ 5,2 – 99,4 $\mu\text{g/mL}$ [101]. Các hợp chất thuộc nhóm polyketide được phân lập từ chủng vi nấm *Aspergillus* sp. XNM-4 có nguồn gốc từ rong nâu *Leathesia nana* cũng được báo cáo là có hoạt tính gây độc hiệu quả đối với các dòng tế bào ung thư gồm PANC-1, A-549, MDA-MB-231, Caco-2, SK-OV-3 và H1-7702 [173]. Bên cạnh đó, hợp chất penicitide A được thu nhận từ chủng vi nấm *Penicillium chrysogenum* QEN-24S phân lập từ mẫu rong *Laurencia* sp. thể hiện hoạt tính gây độc mạnh đối với dòng tế bào ung thư gan ở người (HepG2) [174]. Tương tự, hai hợp chất mới thuộc dẫn xuất steroid là 3β , 11α -dihydroxyergosta-8,24(28)-dien-7-one và 3β -hydroxyergosta-8,24(28)-dien-7-one đã được phát hiện từ chủng vi nấm *Aspergillus ochraceus* EN-31 nội sinh ở rong nâu *Sargassum kjellmanianum* thể hiện hoạt tính gây độc đối với dòng tế bào ung thư NCI-H460, SMMC-7721, SW1990, DU145, HepG2, HeLa và MCF-7 [175].

Cho đến nay, mặc dù đã có nhiều công trình nghiên cứu đề cập đến vi nấm nội sinh từ rong biển, nhưng chỉ mới tập trung vào quá trình sản xuất chất chuyển hóa thứ cấp của các vi sinh vật này. Chỉ có một số ít nghiên cứu về vai trò sinh thái của các vi sinh vật này đối với vật chủ là rong biển và ngược lại. Các điều tra cho thấy vi sinh vật thường nhận được nguồn dinh dưỡng và sự bảo vệ từ sinh vật chủ, đổi lại các vi sinh vật nội sinh sẽ đóng vai trò quan trọng trong sự thích nghi với điều kiện sinh thái của vật chủ, chẳng hạn như làm tăng khả năng chống chịu stress của môi trường, cải thiện sức sống và giảm sự tấn công của các động vật ăn cỏ hoặc các mầm bệnh bằng cách tạo ra các hợp chất chuyển hóa thứ cấp. Vì vậy, trong tương lai cần có những chương trình, dự án khoa học điều tra chi tiết để hiểu rõ hơn mối quan hệ cộng sinh đầy thú vị này [9].

Kết quả nghiên cứu của đề tài cho thấy rằng các chủng vi nấm phân lập từ rong biển ở vịnh Nha Trang là nguồn tiềm năng để tiếp tục nghiên cứu tìm kiếm, thu nhận các hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học thú vị như kháng sinh, chống oxy hóa, kháng ung thư và bảo vệ tế bào nhằm định hướng tạo ra

các sản phẩm bảo vệ và chăm sóc sức khỏe cộng đồng. Theo các tài liệu cập nhật được đến hiện tại, đây là nghiên cứu đầu tiên đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư và bảo vệ tế bào cơ tim của các chủng vi nấm được phân lập từ rong nâu và rong lục ở vùng biển Nha Trang.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Đề tài đã hoàn thành các nội dung nghiên cứu và thu được các kết quả chính như sau:

- Đã phân lập và mô tả đặc điểm hình thái của 38 chủng vi nấm được phân lập từ 08 mẫu rong biển thu nhận ở vịnh Nha Trang.

- Sàng lọc được 10/38 chủng vi nấm có hoạt tính kháng ít nhất 4/7 chủng vi sinh vật kiểm định, 14/38 chủng có khả năng bắt gốc tự do DPPH và ABTS, 19/38 chủng có hoạt tính gây độc tế bào ung thư cổ tử cung (Hela), 19/38 chủng có hoạt tính gây độc tế bào ung thư tuyến tiền liệt (PC-3), 26/38 chủng có hoạt tính gây độc tế bào ung thư vú (MCF-7), 3/38 chủng có hoạt tính bảo vệ tế bào cơ tim H9c2.

- Phân loại 05 chủng vi nấm có hoạt tính sinh học cao bao gồm: *Penicillium chermesinum* 2104NT-1.3, *Aspergillus* sp. 2104NT-1.5, *Cladosporium* sp. 2104NT-2.1, *Aspergillus* sp. 2104NT-3.3, và *Aspergillus* sp. 2104NT-7.7.

KIẾN NGHỊ

Tiếp tục nghiên cứu phân tách và thu nhận các hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học từ các chủng vi nấm tiềm năng đã được phân lập từ rong biển thu nhận ở vịnh Nha Trang.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ

TT	Tác giả	Tên kết quả công bố/ đăng ký	Tên tạp chí/ Nơi công bố	Năm công bố
1	Ngo Thi Duy Ngoc, Phan Thi Hoai Trinh, Ekaterina A. Yurchenko, Anton N. Yurchenko, Vo Thi Dieu Trang, Le Thi Hoa, Dinh Thanh Trung, Le Dinh Hung, Huynh Hoang Nhu Khanh, Pham Duc Thinh, Bui Thi Nam Phuong	Antibacterial and cytotoxic activities of marine fungi isolated from seaweeds in Nha Trang Bay	Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc 2023, Tiểu ban công nghệ sinh học vi sinh – Môi trường, trang 744-749	2023

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Simon C., Daniel R., 2011, Metagenomic analyses: past and future trends, *Applied and environmental microbiology*, 77(4), pp 1153-1161.
2. Carte B.K., 1996, Biomedical potential of marine natural products, *Bioscience*, 46(4), pp 271-286.
3. Gonçalves M.F., Esteves A.C., Alves A., 2022, Marine Fungi: Opportunities and Challenges, *Encyclopedia*, 2(1), pp 559-577.
4. Barbosa F. P.E., Kijjoa A., 2020, Targeting antimicrobial drug resistance with marine natural products, *Int J Antimicrob Agents*, 56(1), pp 1-29.
5. Singh P., Raghukumar C., Verma P., Shouche Y., 2011, Fungal community analysis in the deep-sea sediments of the Central Indian Basin by culture-independent approach, *Microbial ecology*, 61(3), pp 507-517.
6. Bugni T.S., Ireland C.M., 2004, Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms, *Natural Product Reports*, 21(1), pp 143-163.
7. Jones E.G., Pang K.-L., *Marine fungi: and fungal-like organisms*, 2012: Walter de Gruyter.
8. Gnavi G., Garzoli L., Poli A., Prigione V., Burgaud G., Varese G.C., 2017, The culturable mycobiota of *Flabellia petiolata*: First survey of marine fungi associated to a Mediterranean green alga, *PloS one*, 12(4), pp e0175941.
9. Teixeira T.R., Santos G.S.d., Armstrong L., Colepiccolo P., Debonisi H.M., 2019, Antitumor potential of seaweed derived-endophytic fungi, *Antibiotics*, 8(4), pp 205.
10. Godinho V.M., Furbino L.E., Santiago I.F., Pellizzari F.M., Yokoya N.S., Pupo D., Alves T., S Junior P.A., Romanha A.J., Zani C.L., 2013, Diversity and bioprospecting of fungal communities associated with endemic and cold-adapted macroalgae in Antarctica, *The ISME journal*, 7(7), pp 1434-1451.
11. Nguyễn X.H., Nguyễn N.N.T., Nguyễn T.H., 2015, Hiện trạng và xu thế biến động rừng ngập mặn, thảm cỏ biển trong vịnh Nha Trang [Current status and trends of mangroves and seagrasses in Nha Trang bay], pp.
12. Ly B.M., Buu N.Q., Nhut N.D., Thinh P.D., Van T.T.T., 2005, Studies on fucoidan and its production from Vietnamese brown seaweeds, *ASEAN Journal on Science and Technology for Development*, 22(4), pp 371-380.
13. Duc Thinh P., Menshova R.V., Ermakova S.P., Anastyuk S.D., Ly B.M., Zvyagintseva T.N., 2013, Structural characteristics and anticancer

- activity of fucoidan from the brown alga *Sargassum mcclurei*, *Marine Drugs*, 11(5), pp 1456-1476.
14. Thuy T.T.T., Ly B.M., Van T.T.T., Van Quang N., Tu H.C., Zheng Y., Seguin-Devaux C., Mi B., Ai U., 2015, Anti-HIV activity of fucoidans from three brown seaweed species, *Carbohydrate polymers*, 115, pp 122-128.
 15. Choi B.-K., Cho D.-Y., Choi D.-K., Trinh P.T.H., Shin H.J., 2021, Two new phomaligols from the marine-derived fungus *Aspergillus flocculosus* and their anti-neuroinflammatory activity in BV-2 microglial cells, *Marine Drugs*, 19(2), pp 65.
 16. Shin H.J., Anh C.V., Cho D.-Y., Choi D.-K., Kang J.S., Trinh P.T.H., Choi B.-K., Lee H.-S., 2021, New Polyenes from the Marine-Derived Fungus *Talaromyces cyanescens* with Anti-Neuroinflammatory and Cytotoxic Activities, *Molecules*, 26(4), pp 836.
 17. Johnson T., Sparrow F., *Fungi in oceans and estuaries*. J. Cramer, 1961, Weinheim.
 18. Jones E., Sakayaroj J., Suetrong S., Somrithipol S., Pang K.-L., 2009, Classification of marine Ascomycota, anamorphic taxa and Basidiomycota, *Fungal Diversity*, 35(1), pp 187.
 19. Pang K.-L., Overy D.P., Jones E.G., da Luz Calado M., Burgaud G., Walker A.K., Johnson J.A., Kerr R.G., Cha H.-J., Bills G.F., 2016, 'Marine fungi' and 'marine-derived fungi' in natural product chemistry research: toward a new consensual definition, *Fungal Biology Reviews*, 30(4), pp 163-175.
 20. Queirós B., Barreira J.C., Sarmiento A.C., Ferreira I.C., 2009, In search of synergistic effects in antioxidant capacity of combined edible mushrooms, *International journal of food sciences and nutrition*, 60(sup6), pp 160-172.
 21. Jones E.G., 2011, Are there more marine fungi to be described?, pp.
 22. Sarma V.V., 2019, Marine fungal diversity: Present status and future perspectives, *Microbial Diversity in Ecosystem Sustainability and Biotechnological Applications: Volume 1. Microbial Diversity in Normal & Extreme Environments*, pp 267-291.
 23. Quang T.H., Vien L.T., Anh L.N., Ngan N.T.T., Hanh T.T.H., Cuong N.X., Nam N.H., Van Minh C., 2021, Anti-inflammatory metabolites from a marine sponge-associated fungus *Aspergillus* sp. IMBC-FP2. 05, *Vietnam Journal of Chemistry*, 59(1), pp 52-56.
 24. Richards T.A., Leonard G., Mahé F., Del Campo J., Romac S., Jones M.D., Maguire F., Dunthorn M., De Vargas C., Massana R., 2015, Molecular diversity and distribution of marine fungi across 130

- European environmental samples, *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1819), pp 20152243.
25. Naranjo-Ortiz M.A., Gabaldón T., 2019, Fungal evolution: major ecological adaptations and evolutionary transitions, *Biological Reviews*, 94(4), pp 1443-1476.
 26. Ahmed R.N., Mercy B.O., Idris S.O., 2019, Evaluation of Secondary Metabolites of Some Fungi Isolated From Beach Soils of Lagos, Nigeria Against Some Pathogens, *Iraqi Journal of Science*, pp 2114-2122.
 27. Amend A., Burgaud G., Cunliffe M., Edgcomb V.P., Ettinger C.L., Gutiérrez M., Heitman J., Hom E.F., Ianiri G., Jones A.C., 2019, Fungi in the marine environment: Open questions and unsolved problems, *MBio*, 10(2), pp e01189-18.
 28. Suryanarayanan T., *Fungal endosymbionts of seaweeds*, in *Biology of marine fungi*, 2011, Springer, 53-69.
 29. Manohar C.S., Raghukumar C., 2013, Fungal diversity from various marine habitats deduced through culture-independent studies, *FEMS microbiology letters*, 341(2), pp 69-78.
 30. Ananda K., Sridhar K., 2004, Diversity of filamentous fungi on decomposing leaf and woody litter of mangrove forests in the southwest coast of India, *Current science*, pp 1431-1437.
 31. Jones E.G., Pang K.-L., Abdel-Wahab M.A., Scholz B., Hyde K.D., Boekhout T., Ebel R., Rateb M.E., Henderson L., Sakayaroj J., 2019, An online resource for marine fungi, *Fungal Diversity*, 96, pp 347-433.
 32. Dayarathne M., Phookamsak R., Hyde K., Manawasinghe I., To-Anun C., Jones E., 2016, Halodiatrype, a novel diatrypaceous genus from mangroves with *H. salinicola* and *H. avicenniae* spp. nov, *Mycosp*, 7(5), pp 612-627.
 33. Raghukumar C., Ravindran J., *Fungi and their role in corals and coral reef ecosystems*, in *Biology of marine fungi*, 2011, Springer, 89-113.
 34. Xu W., Gong L.-f., Pang K.-L., Luo Z.-H., 2018, Fungal diversity in deep-sea sediments of a hydrothermal vent system in the Southwest Indian Ridge, *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 131, pp 16-26.
 35. Imhoff J.F., 2016, Natural products from marine fungi—Still an underrepresented resource, *Marine drugs*, 14(1), pp 19.
 36. Trinh P.T.H., Yurchenko A.N., Khmel O.O., Dieu T.V.T., Ngoc N.T.D., Girich E.V., Menshov A.S., Kim N.Y., Chingizova E.A., Van T.T.T., 2022, Cytoprotective Polyketides from Sponge-Derived Fungus *Lopadostoma pouzarii*, *Molecules*, 27(21), pp 7650.

37. Gao Z., Li B., Zheng C., Wang G., 2008, Molecular detection of fungal communities in the Hawaiian marine sponges *Suberites zeteki* and *Mycale armata*, *Applied and Environmental Microbiology*, 74(19), pp 6091-6101.
38. Kiran G.S., Sekar S., Ramasamy P., Thinesh T., Hassan S., Lipton A.N., Ninawe A., Selvin J., 2018, Marine sponge microbial association: Towards disclosing unique symbiotic interactions, *Marine environmental research*, 140, pp 169-179.
39. Menezes C.B., Bonugli-Santos R.C., Miqueletto P.B., Passarini M.R., Silva C.H., Justo M.R., Leal R.R., Fantinatti-Garboggini F., Oliveira V.M., Berlinck R.G., 2010, Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state, Brazil, *Microbiological Research*, 165(6), pp 466-482.
40. Wiese J., Ohlendorf B., Blümel M., Schmaljohann R., Imhoff J.F., 2011, Phylogenetic identification of fungi isolated from the marine sponge *Tethya aurantium* and identification of their secondary metabolites, *Marine drugs*, 9(4), pp 561-585.
41. Ding B., Yin Y., Zhang F., Li Z., 2011, Recovery and phylogenetic diversity of culturable fungi associated with marine sponges *Clathrina luteoculcitella* and *Holoxea* sp. in the South China Sea, *Marine Biotechnology*, 13, pp 713-721.
42. Bovio E., Garzoli L., Poli A., Prigione V., Firsova D., McCormack G., Varese G., 2018, The culturable mycobiota associated with three Atlantic sponges, including two new species: *Thelebolus balaustiformis* and *T. spongiae*, *Fungal Systematics and Evolution*, 1(1), pp 141-167.
43. Paulino G.V., Félix C.R., Landell M.F., 2020, Diversity of filamentous fungi associated with coral and sponges in coastal reefs of northeast Brazil, *Journal of basic microbiology*, 60(2), pp 103-111.
44. Liu Y., Palaniveloo K., Alias S.A., Sathiya Seelan J.S., 2021, Species diversity and secondary metabolites of Sarcophyton-associated marine fungi, *Molecules*, 26(11), pp 3227.
45. El-Bondkly E.A.M., El-Bondkly A.A.M., El-Bondkly A.A.M., 2021, Marine endophytic fungal metabolites: A whole new world of pharmaceutical therapy exploration, *Heliyon*, 7(3), pp e06362.
46. Abd El-Rahman T.M., Tharwat N.A., Abo El-Souad S.M., El-Beih A.A., El-Diwany A.I., 2020, Biological activities and variation of symbiotic fungi isolated from Coral reefs collected from Red Sea in Egypt, *Mycology*, 11(3), pp 243-255.
47. Zeng Q., Chen Y., Wang J., Shi X., Che Y., Chen X., Zhong W., Zhang W., Wei X., Wang F., 2022, Diverse secondary metabolites from the

- coral-derived fungus *Aspergillus hiratsukae* SCSIO 5Bn1003, *Marine Drugs*, 20(2), pp 150.
48. Putri D.A., Radjasa O.K., Pringgienies D., 2015, Effectiveness of marine fungal symbiont isolated from soft coral *Sinularia* sp. from Panjang Island as antifungal, *Procedia Environmental Sciences*, 23, pp 351-357.
 49. Marchese P., Garzoli L., Gnani G., O'Connell E., Bouraoui A., Mehiri M., Murphy J., Varese G.C., 2020, Diversity and bioactivity of fungi associated with the marine sea cucumber *Holothuria poli*: disclosing the strains potential for biomedical applications, *Journal of Applied Microbiology*, 129(3), pp 612-625.
 50. Chen L., Wang X.-Y., Liu R.-Z., Wang G.-Y., 2021, Culturable microorganisms associated with sea cucumbers and microbial natural products, *Marine Drugs*, 19(8), pp 461.
 51. Rushdi M.I., Abdel-Rahman I.A., Saber H., Attia E.Z., Abdelraheem W.M., Madkour H.A., Hassan H.M., Elmaidomy A.H., Abdelmohsen U.R., 2020, Pharmacological and natural products diversity of the brown algae genus *Sargassum*, *RSC advances*, 10(42), pp 24951-24972.
 52. Suryanarayanan T., Johnson J., 2014, Fungal endosymbionts of macroalgae: need for enquiries into diversity and technological potential, *Oceanography*, 2(119), pp 1-3.
 53. Loque C.P., Medeiros A.O., Pellizzari F.M., Oliveira E.C., Rosa C.A., Rosa L.H., 2010, Fungal community associated with marine macroalgae from Antarctica, *Polar Biology*, 33, pp 641-648.
 54. Zuccaro A., Schoch C.L., Spatafora J.W., Kohlmeyer J., Draeger S., Mitchell J.I., 2008, Detection and identification of fungi intimately associated with the brown seaweed *Fucus serratus*, *Applied and Environmental Microbiology*, 74(4), pp 931-941.
 55. Lee S., Park M.S., Lee H., Kim J.-J., Eimes J.A., Lim Y.W., 2019, Fungal diversity and enzyme activity associated with the macroalgae, *Agarum clathratum*, *Mycobiology*, 47(1), pp 50-58.
 56. Panno L., Bruno M., Voyron S., Anastasi A., Gnani G., Miserere L., Varese G.C., 2013, Diversity, ecological role and potential biotechnological applications of marine fungi associated to the seagrass *Posidonia oceanica*, *New biotechnology*, 30(6), pp 685-694.
 57. Raghukumar S., *Fungi in coastal and oceanic marine ecosystems*, Vol, 378, 2017: Springer.
 58. Longford S.R., Tujula N.A., Crocetti G.R., Holmes A.J., Holmström C., Kjelleberg S., Steinberg P.D., Taylor M.W., 2007, Comparisons of diversity of bacterial communities associated with three sessile marine eukaryotes, *Aquatic microbial ecology*, 48(3), pp 217-229.

59. Thatoi H., Behera B.C., Mishra R.R., 2013, Ecological role and biotechnological potential of mangrove fungi: a review, *Mycology*, 4(1), pp 54-71.
60. Hyde K., Jones E., 1988, Marine mangrove fungi, *Marine Ecology*, 9(1), pp 15-33.
61. Xu L., Meng W., Cao C., Wang J., Shan W., Wang Q., 2015, Antibacterial and antifungal compounds from marine fungi, *Marine drugs*, 13(6), pp 3479-3513.
62. Wang Y.-T., Xue Y.-R., Liu C.-H., 2015, A brief review of bioactive metabolites derived from deep-sea fungi, *Marine drugs*, 13(8), pp 4594-4616.
63. Zhang T., Fei Wang N., Qin Zhang Y., Yu Liu H., Yan Yu L., 2015, Diversity and distribution of fungal communities in the marine sediments of Kongsfjorden, Svalbard (High Arctic), *Scientific reports*, 5(1), pp 1-11.
64. Luo Y., Wei X., Yang S., Gao Y.-H., Luo Z.-H., 2020, Fungal diversity in deep-sea sediments from the Magellan seamounts as revealed by a metabarcoding approach targeting the ITS2 regions, *Mycology*, 11(3), pp 214-229.
65. Xu X., Han J., Wang Y., Lin R., Yang H., Li J., Wei S., Polyak S.W., Song F., 2019, Two new spiro-heterocyclic γ -lactams from a marine-derived *Aspergillus fumigatus* strain CUGBMF170049, *Marine drugs*, 17(5), pp 289.
66. Hasan S., Ansari M.I., Ahmad A., Mishra M., 2015, Major bioactive metabolites from marine fungi: A Review, *Bioinformation*, 11(4), pp 176.
67. Ameen F., AlNadhari S., Al-Homaidan A.A., 2022, Marine fungi showing multifunctional activity against human pathogenic microbes and cancer, *Plos one*, 17(11), pp e0276926.
68. Orfali R., Aboseada M.A., Abdel-Wahab N.M., Hassan H.M., Perveen S., Ameen F., Alturki E., Abdelmohsen U.R., 2021, Recent updates on the bioactive compounds of the marine-derived genus *Aspergillus*, *RSC advances*, 11(28), pp 17116-17150.
69. Wong Chin J.M., Puchooa D., Bahorun T., Jeewon R., 2021, Antimicrobial properties of marine fungi from sponges and brown algae of Mauritius, *Mycology*, 12(4), pp 231-244.
70. Lee J., Lee J., Kim G.J., Yang I., Wang W., Nam J.-W., Choi H., Nam S.-J., Kang H., 2019, Mycousofurans A and B, antibacterial usnic acid congeners from the fungus *Mycosphaerella* sp., isolated from a marine sediment, *Marine drugs*, 17(7), pp 422.

71. Miao F.-P., Li X.-D., Liu X.-H., Cichewicz R.H., Ji N.-Y., 2012, Secondary metabolites from an algicolous *Aspergillus versicolor* strain, *Marine drugs*, 10(1), pp 131-139.
72. Yang G., Sandjo L., Yun K., Leutou A.S., Kim G.-D., Choi H.D., Kang J.S., Hong J., Son B.W., 2011, Flavusides A and B, antibacterial cerebrosides from the marine-derived fungus *Aspergillus flavus*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 59(9), pp 1174-1177.
73. Khalil A., Abdelaziz A., Khaleil M., Hashem A., 2021, Fungal endophytes from leaves of *Avicennia marina* growing in semi-arid environment as a promising source for bioactive compounds, *Letters in Applied Microbiology*, 72(3), pp 263-274.
74. Lee Y.M., Kim M.J., Li H., Zhang P., Bao B., Lee K.J., Jung J.H., 2013, Marine-derived *Aspergillus* species as a source of bioactive secondary metabolites, *Marine biotechnology*, 15, pp 499-519.
75. Attia E.Z., Farouk H.M., Abdelmohsen U.R., Mo'men H., 2020, Antimicrobial and extracellular oxidative enzyme activities of endophytic fungi isolated from alfalfa (*Medicago sativa*) assisted by metabolic profiling, *South African Journal of Botany*, 134, pp 156-162.
76. Hsiao G., Wang S.-W., Chiang Y.-R., Chi W.-C., Kuo Y.-H., Chen C.-Y., Lee T.-H., 2020, Anti-inflammatory effects of peptides from a marine algicolous fungus *Acremonium* sp. NTU492 in BV-2 microglial cells, *Journal of Food and Drug Analysis*, 28(2), pp 283.
77. Hateet R.R., 2020, GC-MS Analysis of extract for Endophytic fungus *Acremonium coenophialum* and its Antimicrobial and Antidiabetic, *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 13(1), pp 119-123.
78. Chen B., Sun Y., Luo F., Wang C., 2020, Bioactive metabolites and potential mycotoxins produced by *Cordyceps* fungi: a review of safety, *Toxins*, 12(6), pp 410.
79. Wang X., Wang M., Zhao Y., Li C., Li W., 2018, Diversity of cultivable fungi associated with marine macroalgae from coast of Qingdao, China, *Mycosystema*, 37(3), pp 281-293.
80. Dong J.-J., Bao J., Zhang X.-Y., Xu X.-Y., Nong X.-H., Qi S.-H., 2014, Alkaloids and citrinins from marine-derived fungus *Nigrospora oryzae* SCSGAF 0111, *Tetrahedron Letters*, 55(16), pp 2749-2753.
81. Keeler E., Burgaud G., Teske A., Beaudoin D., Mehiri M., Dayras M., Cassand J., Edgcomb V., 2021, Deep-sea hydrothermal vent sediments reveal diverse fungi with antibacterial activities, *FEMS Microbiology Ecology*, 97(8), pp fiab103.
82. An C., Ma S., Shi X., Xue W., Liu C., Ding H., 2020, Isolation, diversity, and antimicrobial activity of fungal endophytes from *Rohdea chinensis*

- (Baker) N. Tanaka (synonym *Tupistra chinensis* Baker) of Qinling Mountains, China, *PeerJ*, 8, pp e9342.
83. Hamed A., Abdel-Razek A.S., Araby M., Abu-Elghait M., El-Hosari D.G., Frese M., Soliman H.S., Stammer H.G., Sewald N., Shaaban M., 2021, Meleagrins from marine fungus *Emericella dentata* Nq45: crystal structure and diverse biological activity studies, *Natural product research*, 35(21), pp 3830-3838.
 84. Subramani R., Kumar R., Prasad P., Aalbersberg W., 2013, Cytotoxic and antibacterial substances against multi-drug resistant pathogens from marine sponge symbiont: Citrinin, a secondary metabolite of *Penicillium* sp, *Asian pacific journal of tropical biomedicine*, 3(4), pp 291-296.
 85. Trisuwan K., Khamthong N., Rukachaisirikul V., Phongpaichit S., Preedanon S., Sakayaroj J., 2010, Anthraquinone, cyclopentanone, and naphthoquinone derivatives from the sea fan-derived fungi *Fusarium* spp. PSU-F14 and PSU-F135, *Journal of natural products*, 73(9), pp 1507-1511.
 86. Craft J.C., Moriarty S.R., Clark K., Scott D., Degenhardt T.P., Still J.G., Corey G.R., Das A., Fernandes P., 2011, A randomized, double-blind phase 2 study comparing the efficacy and safety of an oral fusidic acid loading-dose regimen to oral linezolid for the treatment of acute bacterial skin and skin structure infections, *Clinical infectious diseases*, 52(suppl_7), pp S520-S526.
 87. Fernandes P., 2016, Fusidic acid: a bacterial elongation factor inhibitor for the oral treatment of acute and chronic staphylococcal infections, *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(1), pp a025437.
 88. Lv J.-M., Hu D., Gao H., Kushiro T., Awakawa T., Chen G.-D., Wang C.-X., Abe I., Yao X.-S., 2017, Biosynthesis of helvolic acid and identification of an unusual C-4-demethylation process distinct from sterol biosynthesis, *Nature communications*, 8(1), pp 1644.
 89. Kong F.-D., Huang X.-L., Ma Q.-Y., Xie Q.-Y., Wang P., Chen P.-W., Zhou L.-M., Yuan J.-Z., Dai H.-F., Luo D.-Q., 2018, Helvolic acid derivatives with antibacterial activities against *Streptococcus agalactiae* from the marine-derived fungus *Aspergillus fumigatus* HNMF0047, *Journal of natural products*, 81(8), pp 1869-1876.
 90. Pilevneli A.D., Ebada S.S., Kaşkatepe B., Konuklugil B., 2021, Penicacids H–J, three new mycophenolic acid derivatives from the marine-derived fungus *Rhizopus oryzae*, *RSC advances*, 11(55), pp 34938-34944.
 91. Liang W.-L., Le X., Li H.-J., Yang X.-L., Chen J.-X., Xu J., Liu H.-L., Wang L.-Y., Wang K.-T., Hu K.-C., 2014, Exploring the chemodiversity and biological activities of the secondary metabolites from the marine

- fungus *Neosartorya pseudofischeri*, *Marine Drugs*, 12(11), pp 5657-5676.
92. Abdel-Monem N.M., Abdel-Azeem A.M., El-Ashry E.-S.H., Ghareeb D.A., Nabil-Adam A., 2013, Pretreatment hepatoprotective effect of the marine fungus derived from sponge on hepatic toxicity induced by heavy metals in rats, *BioMed Research International*, 2013, pp.
 93. Belcastro M., Marino T., Russo N., Toscano M., 2006, Structural and electronic characterization of antioxidants from marine organisms, *Theoretical Chemistry Accounts*, 115, pp 361-369.
 94. Silva B.M., Andrade P.B., Valentão P., Ferreres F., Seabra R.M., Ferreira M.A., 2004, Quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit (pulp, peel, and seed) and jam: antioxidant activity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), pp 4705-4712.
 95. Tseng T.-H., Kao E.-S., Chu C.-Y., Chou F.-P., Wu H.-W.L., Wang C.-J., 1997, Protective effects of dried flower extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. against oxidative stress in rat primary hepatocytes, *Food and Chemical Toxicology*, 35(12), pp 1159-1164.
 96. Vitale G.A., Coppola D., Palma Esposito F., Buonocore C., Ausuri J., Tortorella E., de Pascale D., 2020, Antioxidant molecules from marine fungi: Methodologies and perspectives, *Antioxidants*, 9(12), pp 1183.
 97. Samanthi K., Wickramaarachchi S., Wijeratne E., Paranagama P., 2015, Two new antioxidant active polyketides from *Penicillium citrinum*, an endolichenic fungus isolated from *Parmotrema* species in Sri Lanka, pp.
 98. Hulikere M.M., Joshi C.G., Ananda D., Poyya J., Nivya T., 2016, Antiangiogenic, wound healing and antioxidant activity of *Cladosporium cladosporioides* (Endophytic Fungus) isolated from seaweed (*Sargassum wightii*), *Mycology*, 7(4), pp 203-211.
 99. Wang S., Li X.-M., Teuscher F., Li D.-L., Diesel A., Ebel R., Proksch P., Wang B.-G., 2006, Chaetopyranin, a benzaldehyde derivative, and other related metabolites from *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus derived from the marine red alga *Polysiphonia urceolata*, *Journal of Natural Products*, 69(11), pp 1622-1625.
 100. Yun K., Choi H.D., Kang J.S., Son B.W., 2012, New production of 5-bromotoluhydroquinone and 4-O-methyltoluhydroquinone from the marine-derived fungus *Dothideomycete* sp, *Journal of microbiology and biotechnology*, 22(1), pp 80-83.
 101. Li X., Li X.-M., Xu G.-M., Li C.-S., Wang B.-G., 2014, Antioxidant metabolites from marine alga-derived fungus *Aspergillus wentii* EN-48, *Phytochemistry Letters*, 7, pp 120-123.

102. Du X., Liu D., Huang J., Zhang C., Proksch P., Lin W., 2018, Polyketide derivatives from the sponge associated fungus *Aspergillus europaeus* with antioxidant and NO inhibitory activities, *Fitoterapia*, 130, pp 190-197.
103. König G.M., Kehraus S., Seibert S.F., Abdel-Lateff A., Müller D., 2006, Natural products from marine organisms and their associated microbes, *ChemBioChem*, 7(2), pp 229-238.
104. Couttolenc A., Medina M.E., Trigos Á., Espinoza C., 2022, Antioxidant capacity of fungi associated with corals and sponges of the reef system of Veracruz, Mexico, *Electronic Journal of Biotechnology*, 55, pp 40-46.
105. Ze-Hong W., Dong L., Ying X., Jian-Liang C., Wen-Han L., 2018, Antioxidant xanthenes and anthraquinones isolated from a marine-derived fungus *Aspergillus versicolor*, *Chinese journal of natural medicines*, 16(3), pp 219-224.
106. Zhu T., Chen Z., Liu P., Wang Y., Xin Z., Zhu W., 2014, New rubrolides from the marine-derived fungus *Aspergillus terreus* OUCMDZ-1925, *The Journal of Antibiotics*, 67(4), pp 315-318.
107. Du L., Feng T., Zhao B., Li D., Cai S., Zhu T., Wang F., Xiao X., Gu Q., 2010, Alkaloids from a deep ocean sediment-derived fungus *Penicillium* sp. and their antitumor activities, *The Journal of Antibiotics*, 63(4), pp 165-170.
108. Yamada T., Umebayashi Y., Kawashima M., Sugiura Y., Kikuchi T., Tanaka R., 2015, Determination of the chemical structures of tandiyukisins B–D, isolated from a marine sponge-derived fungus, *Marine Drugs*, 13(5), pp 3231-3240.
109. Amagata T., Rath C., Rigot J.F., Tarlov N., Tenney K., Valeriote F.A., Crews P., 2003, Structures and Cytotoxic Properties of Trichoverroids and Their Macrolide Analogues Produced by Saltwater Culture of *Myrothecium verrucaria*, *Journal of Medicinal Chemistry*, 46(20), pp 4342-4350.
110. Jenssen M., Rainsford P., Juskewitz E., Andersen J.H., Hansen E.H., Isaksson J., Rämä T., Hansen K.Ø., 2021, Lulworthinone, a new dimeric naphthopyrone from a marine fungus in the family Lulworthiaceae with antibacterial activity against clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates, *Frontiers in Microbiology*, 12, pp 730740.
111. Zhang P., Li X.-M., Mao X.-X., Mándi A., Kurtán T., Wang B.-G., 2016, Varioloid A, a new indolyl-6, 10b-dihydro-5aH-[1] benzofuro [2, 3-b] indole derivative from the marine alga-derived endophytic fungus *Paecilomyces variotii* EN-291, *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 12(1), pp 2012-2018.

112. Fang W., Lin X., Zhou X., Wan J., Lu X., Yang B., Ai W., Lin J., Zhang T., Tu Z., 2014, Cytotoxic and antiviral nitrobenzoyl sesquiterpenoids from the marine-derived fungus *Aspergillus ochraceus* Jcma1F17, *MedChemComm*, 5(6), pp 701-705.
113. Wijesekara I., Zhang C., Van Ta Q., Vo T.-S., Li Y.-X., Kim S.-K., 2014, Physcion from marine-derived fungus *Microsporum* sp. induces apoptosis in human cervical carcinoma HeLa cells, *Microbiological research*, 169(4), pp 255-261.
114. Sun H.-F., Li X.-M., Meng L., Cui C.-M., Gao S.-S., Li C.-S., Huang C.-G., Wang B.-G., 2012, Asperolides A–C, tetranorlabdane diterpenoids from the marine alga-derived endophytic fungus *Aspergillus wentii* EN-48, *Journal of Natural Products*, 75(2), pp 148-152.
115. Wang J., Wei X., Qin X., Lin X., Zhou X., Liao S., Yang B., Liu J., Tu Z., Liu Y., 2015, Arthpyrones A–C, pyridone alkaloids from a sponge-derived fungus *Arthrinium arundinis* ZSDS1-F3, *Organic Letters*, 17(3), pp 656-659.
116. Li H.-J., Jiang W.-H., Liang W.-L., Huang J.-X., Mo Y.-F., Ding Y.-Q., Lam C.-K., Qian X.-J., Zhu X.-F., Lan W.-J., 2014, Induced marine fungus *Chondrostereum* sp. as a means of producing new sesquiterpenoids chondrosterins I and J by using glycerol as the carbon source, *Marine drugs*, 12(1), pp 167-175.
117. Shin H.J., *Natural products from marine fungi*, 2020, MDPI, 230.
118. Meng L.-H., Li X.-M., Lv C.-T., Huang C.-G., Wang B.-G., 2014, Brocazines A–F, cytotoxic bithiodiketopiperazine derivatives from *Penicillium brocae* MA-231, an endophytic fungus derived from the marine mangrove plant *Avicennia marina*, *Journal of Natural Products*, 77(8), pp 1921-1927.
119. Zhou X., Lin X., Ma W., Fang W., Chen Z., Yang B., Liu Y., 2014, A new aromatic amine from fungus *Pestalotiopsis vaccinii*, *Phytochemistry letters*, 7, pp 35-37.
120. Kim D.-C., Cho K.-H., Ko W., Yoon C.-S., Sohn J.H., Yim J.H., Kim Y.-C., Oh H., 2016, Anti-inflammatory and cytoprotective effects of TMC-256C1 from marine-derived fungus *Aspergillus* sp. SF-6354 via up-regulation of heme oxygenase-1 in murine hippocampal and microglial cell lines, *International Journal of Molecular Sciences*, 17(4), pp 529.
121. Yurchenko A.N., Girich E.V., Yurchenko E.A., 2021, Metabolites of marine sediment-derived fungi: Actual trends of biological activity studies, *Marine Drugs*, 19(2), pp 88.

122. Martinez A., 2007, Marine-derived drugs in neurology, *Current Opinion in Investigational Drugs*, 8(7), pp 525.
123. Ryu B., Kim S.K., 2013, Potential beneficial effects of marine peptide on human neuron health, *Current Protein and Peptide Science*, 14(3), pp 173-176.
124. Calado M.d.L., Silva J., Alves C., Susano P., Santos D., Alves J., Martins A., Gaspar H., Pedrosa R., Campos M.J., 2021, Marine endophytic fungi associated with *Halopteris scoparia* (Linnaeus) Sauvageau as producers of bioactive secondary metabolites with potential dermocosmetic application, *Plos one*, 16(5), pp e0250954.
125. Yurchenko E.A., Menchinskaya E.S., Pislyagin E.A., Chingizova E.A., Girich E.V., Yurchenko A.N., Aminin D.L., Mikhailov V.V., 2021, Cytoprotective Activity of p-Terphenyl Polyketides and Flavuside B from Marine-Derived Fungi against Oxidative Stress in Neuro-2a Cells, *Molecules*, 26(12), pp 3618.
126. Kanno K., Tsurukawa Y., Kamisuki S., Shibasaki H., Iguchi K., Murakami H., Uchiyama J., Kuramochi K., 2019, Novel neuroprotective hydroquinones with a vinyl alkyne from the fungus, *Pestalotiopsis microspora*, *The Journal of antibiotics*, 72(11), pp 793-799.
127. Akashi S., Shirai K., Okada T., Konishi K., Takeuchi T., Kuramochi K., Takahashi M., Nakagawa T., Ogura Y., Fujieda S., 2012, Neoechinulin a imparts resistance to acute nitrosative stress in PC12 cells: a potential link of an elevated cellular reserve capacity for pyridine nucleotide redox turnover with cytoprotection, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 35(7), pp 1105-1117.
128. Akashi S., Kimura T., Takeuchi T., Kuramochi K., Kobayashi S., Sugawara F., Watanabe N., Arai T., 2011, Neoechinulin a impedes the progression of rotenone-induced cytotoxicity in PC12 cells, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 34(2), pp 243-248.
129. Zhao J., Li L., Ling C., Li J., Pang J.-Y., Lin Y.-C., Liu J., Huang R., Wang G.-L., Pei Z., 2009, Marine compound Xyloketal B protects PC12 cells against OGD-induced cell damage, *Brain research*, 1302, pp 240-247.
130. Li S., Shen C., Guo W., Zhang X., Liu S., Liang F., Xu Z., Pei Z., Song H., Qiu L., 2013, Synthesis and neuroprotective action of xyloketal derivatives in Parkinson's disease models, *Marine Drugs*, 11(12), pp 5159-5189.
131. Zhai A., Zhu X., Wang X., Chen R., Wang H., 2013, Secalonic acid A protects dopaminergic neurons from 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺)-induced cell death via the mitochondrial apoptotic pathway, *European journal of pharmacology*, 713(1-3), pp 58-67.

132. Jin L., Quan C., Hou X., Fan S., 2016, Potential pharmacological resources: Natural bioactive compounds from marine-derived fungi, *Marine drugs*, 14(4), pp 76.
133. Jiménez C., *Marine natural products in medicinal chemistry*, 2018, ACS Publications, 959-961.
134. Papon N., Copp B.R., Courdavault V., 2022, Marine drugs: Biology, pipelines, current and future prospects for production, *Biotechnology Advances*, 54, pp 107871.
135. Overy D.P., Bayman P., Kerr R.G., Bills G.F., 2014, An assessment of natural product discovery from marine (sensu strictu) and marine-derived fungi, *Mycology*, 5(3), pp 145-167.
136. Jaspars M., De Pascale D., Andersen J.H., Reyes F., Crawford A.D., Ianora A., 2016, The marine biodiscovery pipeline and ocean medicines of tomorrow, *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 96(1), pp 151-158.
137. Demain A.L., 2014, Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery, *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 41(2), pp 185-201.
138. Blunt J.W., Carroll A.R., Copp B.R., Davis R.A., Keyzers R.A., Prinsep M.R., 2018, Marine natural products, *Natural product reports*, 35(1), pp 8-53.
139. Zain ul Arifeen M., Ma Y.-N., Xue Y.-R., Liu C.-H., 2019, Deep-sea fungi could be the new arsenal for bioactive molecules, *Marine drugs*, 18(1), pp 9.
140. Singh R., Sharma M., Joshi P., Rawat D.S., 2008, Clinical status of anti-cancer agents derived from marine sources, *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 8(6), pp 603-617.
141. Osińska-Jaroszuk M., Jarosz-Wilkolazka A., Jaroszuk-Ścisiel J., Szałapata K., Nowak A., Jaszek M., Ozimek E., Majewska M., 2015, Extracellular polysaccharides from Ascomycota and Basidiomycota: production conditions, biochemical characteristics, and biological properties, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31, pp 1823-1844.
142. Youssef F.S., Ashour M.L., Singab A.N.B., Wink M., 2019, A comprehensive review of bioactive peptides from marine fungi and their biological significance, *Marine drugs*, 17(10), pp 559.
143. Chen Y., Mao W.-J., Yan M.-X., Liu X., Wang S.-Y., Xia Z., Xiao B., Cao S.-J., Yang B.-Q., Li J., 2016, Purification, chemical characterization, and bioactivity of an extracellular polysaccharide

- produced by the marine sponge endogenous fungus *Alternaria* sp. SP-32, *Marine Biotechnology*, 18, pp 301-313.
144. Cao D.T., Tran V.H., Vu V.N., Mai H.D.T., Le T.H.M., Vu T.Q., Nguyen H.H., Chau V.M., Pham V.C., 2019, Antimicrobial metabolites from a marine-derived Actinomycete *Streptomyces* sp. G278, *Natural product research*, 33(22), pp 3223-3230.
 145. Quyen V.T., Van Nam V., Van Hieu T., Huong D.T.M., Murphy B., Van Minh C., Van Cuong P., 2015, Secondary metabolites from marine bacterium *Streptomyces* sp. G039, *Vietnam Journal of Chemistry*, 53(2e), pp.
 146. Thi Q.V., Tran V.H., Mai H.D.T., Le C.V., Hong M.L.T., Murphy B.T., Chau V.M., Pham V.C., 2016, Secondary metabolites from an Actinomycete from Vietnam's East Sea, *Natural Product Communications*, 11(3), pp 1934578X1601100320.
 147. Trinh P.T.H., Ngoc N.T.D., Trang V.T.D., Tien P.Q., Ly B.M., Van T.T.T., 2017, Antimicrobial activity of marine fungi isolated from the Son Tra peninsula, Da Nang, Vietnam, *Academia Journal of Biology*, 39(4), pp 457-462.
 148. Quang T.H., Phong N.V., Hanh T.T.H., Cuong N.X., Ngan N.T.T., Oh H., Nam N.H., Van Minh C., 2021, Cytotoxic and immunomodulatory phenol derivatives from a marine sponge-derived fungus Ascomycota sp. VK12, *Natural Product Research*, 35(23), pp 5153-5159.
 149. Shin H.J., Choi B.-K., Trinh P.T.H., Lee H.-S., Kang J.S., Van T.T.T., Lee H.-S., Lee J.S., Lee Y.-J., Lee J., 2018, Suppression of RANKL-induced osteoclastogenesis by the metabolites from the marine fungus *Aspergillus flocculosus* isolated from a sponge *Stylissa* sp, *Marine Drugs*, 16(1), pp 14.
 150. Choi B.-K., Phan T.H.T., Hwang S., Oh D.-C., Kang J.S., Lee H.-S., Ngo T.D.N., Tran T.T.V., Shin H.J., 2019, Resorcinol glycosides A and B, glycosylated alkylresorcinols from a marine-derived strain of the fungus *Penicillium janthinellum*, *Journal of natural products*, 82(11), pp 3186-3190.
 151. Le H.M.T., Do Q.T., Doan M.H.T., Vu Q.T., Nguyen M.A., Vu T.H.T., Nguyen H.D., Duong N.T.T., Tran M.H., Chau V.M., 2019, Chemical composition and biological activities of metabolites from the marine fungi *Penicillium* sp. isolated from sediments of Co To Island, Vietnam, *Molecules*, 24(21), pp 3830.
 152. Minh L.T.H., Hue N.T., Linh N.T., Ngan T.B., Quyen V.T., Anh N.M., Tuan C.D., Van Minh C., Van Cuong P., Huong D.T.M., 2020, Antimicrobial secondary metabolites from the marine-derived fungus

- Aspergillus* sp. M28, *Chemistry of Natural Compounds*, 56, pp 1173-1175.
153. Teleanu R.I., Chircov C., Grumezescu A.M., Volceanov A., Teleanu D.M., 2019, Antioxidant therapies for neuroprotection—A review, *Journal of clinical medicine*, 8(10), pp 1659.
 154. Choi B.-K., Trinh P.T.H., Lee H.-S., Choi B.-W., Kang J.S., Ngoc N.T.D., Van T.T.T., Shin H.J., 2019, New ophiobolin derivatives from the marine fungus *Aspergillus flocculosus* and their cytotoxicities against cancer cells, *Marine drugs*, 17(6), pp 346.
 155. Luyen N.D., Huong L.M., Ha T.T.H., Cuong L.H., Yen D.T.H., Tai B.H., Nhiem N.X., Van Kiem P., 2019, Polyoxygenated polyketides from the marine-derived fungus *Aspergillus micronesiensis*, *Vietnam Journal of Chemistry*, 57(5), pp 654-660.
 156. Luyen N.D., Huong L.M., Thi Hong Ha T., Cuong L.H., Thi Hai Yen D., Nhiem N.X., Tai B.H., Gardes A., Kopprio G., Van Kiem P., 2019, Aspermicrones AC, novel dibenzospiroketal from the seaweed-derived endophytic fungus *Aspergillus micronesiensis*, *The Journal of Antibiotics*, 72(11), pp 843-847.
 157. Yurchenko E.A., Menchinskaya E.S., Pislyagin E.A., Trinh P.T.H., Ivanets E.V., Smetanina O.F., Yurchenko A.N., 2018, Neuroprotective activity of some marine fungal metabolites in the 6-hydroxydopamin- and paraquat-induced Parkinson's disease models, *Marine drugs*, 16(11), pp 457.
 158. Smetanina O.F., Yurchenko A.N., Girich E.V., Trinh P.T.H., Antonov A.S., Dyshlovoy S.A., von Amsberg G., Kim N.Y., Chingizova E.A., Pislyagin E.A., 2019, Biologically active echinulin-related indole diketopiperazines from the marine sediment-derived fungus *Aspergillus niveoglaucus*, *Molecules*, 25(1), pp 61.
 159. Handayani D., Murniati M., Rustini R., 2016, In vitro inhibitory activity of ethyl acetate extract of symbiotic bacteria isolated from the marine sponge *Haliclona fascigera* against multidrug resistant organism (MDRO), *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6(11), pp 218-222.
 160. Sobolevskaya M.P., Leshchenko E.V., Hoai T.P., Denisenko V.A., Dyshlovoy S.A., Kirichuk N.N., Khudyakova Y.V., Kim N.Y., Berdyshev D.V., Pislyagin E.A., 2016, Pallidopenillines: Polyketides from the alga-derived fungus *Penicillium thomii* Maire KMM 4675, *Journal of natural products*, 79(12), pp 3031-3038.
 161. Becerro M.A., Lopez N.I., Turon X., Uriz M.J., 1994, Antimicrobial activity and surface bacterial film in marine sponges, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 179(2), pp 195-205.

162. Lee K.J., Oh Y.C., Cho W.K., Ma J.Y., 2015, Antioxidant and anti-inflammatory activity determination of one hundred kinds of pure chemical compounds using offline and online screening HPLC assay, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, pp.
163. Jeong S.H., Kim H.K., Song I.-S., Lee S.J., Ko K.S., Rhee B.D., Kim N., Mishchenko N.P., Fedoryev S.A., Stonik V.A., 2014, Echinochrome A protects mitochondrial function in cardiomyocytes against cardiotoxic drugs, *Marine drugs*, 12(5), pp 2922-2936.
164. Dighton J., White J.F., *Fungal Communities of Seaweeds*, in *The Fungal Community*, 2005, CRC Press, 553-600.
165. Sarasan M., Puthumana J., Job N., Han J., Lee J.-S., Philip R., 2017, Marine algicolous endophytic fungi-a promising drug resource of the era, pp.
166. Hoang K.C., Tran T.H.H., Truong N.H., Tran T.N.H., Tran T.H.T., Le M.H., Le H.C.J.V.J.o.M.S., *Technology*, 2022, Screening of algae collected from Nha Trang bay, Vietnam, for potential cosmeceutical bioproducts, 22(4), pp 415-422.
167. Alberts A., Chen J., Kuron G., Hunt V., Huff J., Hoffman C., Rothrock J., Lopez M., Joshua H., Harris E.J.P.o.t.N.A.o.S., 1980, Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent, 77(7), pp 3957-3961.
168. Alberts A.W.J.T.A.j.o.c., 1988, Discovery, biochemistry and biology of lovastatin, 62(15), pp J10-J15.
169. Ozdín L., Galbavý Š.J.N., 1998, Dose-and time-dependent hypocholesterolemic effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in rats, 14(3), pp 282-286.
170. Amin-Hanjani S., Stagliano N.E., Yamada M., Huang P.L., Liao J.K., Moskowitz M.A.J.S., 2001, Mevastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, reduces stroke damage and upregulates endothelial nitric oxide synthase in mice, 32(4), pp 980-986.
171. Barrios-González J., Miranda R.U.J.A.m., *biotechnology*, 2010, Biotechnological production and applications of statins, 85, pp 869-883.
172. Gazzerro P., Proto M.C., Gangemi G., Malfitano A.M., Ciaglia E., Pisanti S., Santoro A., Laezza C., Bifulco M.J.P.r., 2012, Pharmacological actions of statins: a critical appraisal in the management of cancer, 64(1), pp 102-146.
173. Xu K., Guo C., Meng J., Tian H., Guo S., Shi D.J.M.d., 2019, Discovery of natural dimeric naphthopyrones as potential cytotoxic agents through ROS-mediated apoptotic pathway, 17(4), pp 207.

174. Gao S.-S., Li X.-M., Du F.-Y., Li C.-S., Proksch P., Wang B.-G.J.M.d., 2010, Secondary metabolites from a marine-derived endophytic fungus *Penicillium chrysogenum* QEN-24S, 9(1), pp 59-70.
175. Cui C.-M., Li X.-M., Meng L., Li C.-S., Huang C.-G., Wang B.-G.J.J.o.n.p., 2010, 7-Nor-ergosterolide, a pentalactone-containing norsteroid and related steroids from the marine-derived endophytic *Aspergillus ochraceus* EN-31, 73(11), pp 1780-1784.

PHỤ LỤC

Trình tự gen vùng ITS của 05 chủng vi nấm tuyển chọn

>2104NT-1.3

gtaacaaggt ttccgtaggt gaacctgcgg aaggatcatt actgagtgcg ggccctctgg
gtccaacctc ccaccctgtg ataccgtagg ttgttgcttc ggccgggccc ccagtctggc
cgccgggggg cacctgcccc cgggcccgcg cccgcccggg acatcattga acgctgtctg
aagattgcag tctgagcgat aagcacaat tagttaaac tttcaacaac ggatctcttg
gttccggcat cgatgaagaa cgcagcgaaa tgcgataagt aatgtgaatt gcagaattca
gtgaatcatc gagtctttga acgcacattg cggcccctgg tattccgggg ggcatgcctg
tccgagcgtc attgctgccc tcaagcccgg cttgtgtgtt gggcgccgtc ccccggggga
cgggcccgaagg aggcagcggc ggcaccgcgt ccggtcctcg agcgtatggg gctctgtcac
ccgctctgca ggcccggccg gcgccagccg accccctcaa

>2104NT-1.5

ggctcggtag ggcccttcgga ctggctcagg ggagttggca acgaccccc agagccggaa
agttggtcaa acccggtagt ttagaggaag taaaagtcgt aacaaggttt ccgtaggtga
acctgcggaa ggatcattac tgagttaggg ttcccttcggg gcccacctc ccacccttgt
atactgtacc aagttgcttc ggccgggccc ccggttcgcg ggccgcccgg ggggaacccc
tccccccggg cgagcgccc cgggagacct caacgtgaac actgtctgaa gttttgtcgt
ctgagttcga ttgtatcgca atcagttaaa actttcaaca atggatctct tggttccggc
atcgatgaag aacgcagcga aatgcgataa ttaatgtgaa ttgcagaatt cagtgaatca
tcgagttctt gaacgcacat tgcacccctt ggtattccgg ggggtatgcc tgtccgagcg
tcattgctgc cctcaagccc ggcttgtgtg ttgggtcctc gtcccccccg ggggacgggc
ccgaaaggca gcggcgccac cgcgtccggt cctcgagcgt atggggcttt gtcacaccgc
tctcgtaggc ccggccggcg ctggccgacg ctgaaaagca accattatct ctcagggttg
acctcggatc aggtagggat accgctgaa cttaagcata tcaataagcg gaggaaaaga
aaccaaccgg gattgcctca gtaacggcga gtgaagcggc aagagctcaa atttgaaatc
tggccccctc ggggtccgag ttgtaatttg cagaggatgc ttccgggtgc gccccgtct
aagtgccttg gaacgggccg tcatagaggg tgagaatccc gtctgggacg ggggtgtccg

>2104NT-2.1

ttgatggctc ggtgaggcct tcggactggc ccaggagggt cggcaacgac caccagggc
cgaaagttg gtcaaaccg gtcatctaga ggaagtaaaa gtcgtaacaa ggtctccgta
ggtgaacctg cggagggatc attaccagtg accccgggct ccggccgggg atgatcataa
ccctttgctg tccgactctg ttgcctccgg ggcgaccctg cctccggggc ggggccccgg
gtggacacat tcaaactctt gcgtaacttt gcagtctgag taaatttaat taataaatta
aaactttcaa caacggatct cttggttctg gcacgatga agaacgcagc gaaatgcgat
aagtaatgtg aattgcagaa ttcagtgaat catcgaatct ttgaacgcac attgcgcccc

ctggtattcc ggggggcatg cctgttcgag cgtcatttca ccaactcaagc ctcgcttggt
 attgggagac gcggtccgcc gcgcgcctca aatcgaccgg ctgggtcttc tgtcccctca
 gcgttggtga aactattcgc taaaggggtgc cacgggaggt cacgccgtaa aacaagccca
 tttctaaggt tgacctcgga tcaggtaggg ataccgctg aacttaagca tatcaataag
 cggaggaaaa gaaaccaaca gggattgctc tagtaacggc gagtgaagca gcaatagctc
 aaatttgaaa tctggcgtct tcggcgctcc agttgtaatt tgtagaggat gcttctgggc
 agccaccgac ctaagttcct tggaacagga cgtcatagag ggtgagaatc ccgtatgcgg
 tc

>2104NT-3.3

tggaagtaaa agtcgtaaca aggtttccgt aggtgaacct gcggaaggat cattaccgag
 tgcggggtctg cccccgggcg cccaacctcc cccccgtgaa tacgtgaccc tgttgcttcg
 gcggcgtggt cccccccggg gggtcgcgcg cgggggacca ttgaaccccg aaccgagtat
 gttgcagtct gagctttaat agcaaactcg tcaaaacttt caacaatgga tctcttggtt
 ccggcatcga tgaagaacgc agcgaactgc gataagtaat gtgaattgca gaattcaatg
 aatcatcgag tctttgaacg cacattgcgc cccctggcac tccggggggc atgcctgtcc
 gagcgtcatt gctgcccttc aagcccggct tgtgtgttgg gtcgtcgtcc cccccggggg
 acggggccga aaggcagcgg cggcaccgcg tccggtcctc gagcgtatgg ggcacgtcga
 cccgctcgat cagggccggc cgggcgcccg cggcgctctc caaccatttt cttcaggttg
 acctcggatc aggtagggat acccgctgaa cttaagcata tcaataagcg agtagagtga
 tcg

>2104NT-7.7

aaggatcatt actgagtga ggtccctcgg ggcccaacct cccaccgctg tataccgtac
 cttgttgctt cggcgagccc gccccctttt tcttaggggg gcacagcgt cgccggagac
 accaacgtga aactgtctg aagttttgtc gtctgagtcg attgtatcgc aatcagttaa
 aactttcaac aatggatctc ttggttccgg catcgatgaa gaacgcagcg aatgcgata
 attaattgta attgcagaat tcagtgaatc atcgagtctt tgaacgcaca ttgcaccccc
 tggattccg gggggtatgc ctgtccgagc gtcattgctg ccctcaagca cggcttggtg
 gttgggtcgt cgtccccccc gggggacggg cccgaaaggc agcggcgga cgcgtccgg
 tctcagcgg tatggggctt tgtcacaccg ctcttgtagg cccggcggc tgcggcgga
 cgctgaaaag caaccaacta tttctccagg ttgacctcgg atcaggtagg gatacccgct
 gaacttaagc atatcaataa gcggaggaaa agaaaccaac cgggattgcc tcagtaacgg
 cgagtgaagc ggcaagagct caaatttgaa atctggcccc ctcggggctc gagttgtaat
 ttgcagagga tgcttcgggt gcggcccccg tctaagtgcc ctggaacggg agtagagtga

ANTIBACTERIAL AND CYTOTOXIC ACTIVITIES OF MARINE FUNGI ISOLATED FROM SEAWEEDS IN NHA TRANG BAY

Ngô Thị Duy Ngọc¹, Phan Thi Hoai Trinh¹, Ekaterina A. Yurchenko², Anton N. Yurchenko², Vo Thi Dieu Trang¹, Le Thi Hoa¹, Dinh Thanh Trung¹, Le Dinh Hung¹, Huynh Hoang Nhu Khanh¹, Pham Duc Thinh¹, Bui Thi Nam Phuong³

¹Nha Trang Institute of Technology Research and Application, VAST, Vietnam

²G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Russia

³Graduate University of Sciences and Technology, VAST, Vietnam

SUMMARY

This study aims to evaluate the antimicrobial and cytotoxic activities of 47 marine fungal strains isolated from seaweed samples belonging to six genera including *Hormophysa*, *Sargassum*, *Padina*, *Turbinaria*, *Enteromorpha*, and *Ulva* in Nha Trang Bay. The fungal extracts were analyzed for antimicrobial activity against three Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 11778, and *Streptococcus faecalis* ATCC 19433) and four Gram-negative bacteria (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) by using the disk diffusion method. The study revealed that 29.7% (14/47) of fungal extracts showed antimicrobial activity against at least three test pathogens. In addition, 16 fungal extracts (34.0%) were found to perform cytotoxic activity against cervical cancer (Hela), breast cancer (MCF-7), and prostate cancer (PC-3) cells by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Five fungal isolates with significant antimicrobial and cytotoxic activities were identified as *Cladosporium* sp. 2104NT-1.2, *Aspergillus* sp. 2104NT-1.5, *Cladosporium* sp. 2104NT-2.1, *Penicillium* sp. 2104NT-3.1, and *Aspergillus* sp. 2104NT-5.6 based on the internal transcribed spacer (ITS) gene sequences analysis. Our investigation provided information on the antimicrobial and cytotoxic activities of seaweed-derived fungi from Nha Trang Bay and highlighted potential candidates for searching for new antibiotic and anticancer compounds.

Keywords: Antimicrobial activity, cytotoxic activity, marine fungi, seaweed.

INTRODUCTION

Metabolites from marine fungi have gained growing interest in the search for novel natural products in drug discovery because of their promise as therapeutic agents. The origin of these marine fungal metabolites is varied as their habitats have been reported from various sources such as sponges, algae, soft coral, and bottom sediments. The importance of these natural compounds is based on their related activities that emanate from the diversity in their chemical structures and functional groups present in them (Bugni, Ireland, 2004). Therefore, marine fungi are promising sources to investigate new antibiotic and anticancer compounds.

Recently, seaweed-derived fungi stood out as a new subject for an extensive investigation to find novel natural products, which makes them a potential source for new drug candidates. Unique seaweed-fungal interaction has attracted a large group of researchers to comprehend their chemical interactions and studies of microbial communities. Seaweed inhabiting marine ecosystems adapt to frequent and sporadic environmental changes such as high salinity, low oxygen content, nutrient limitation, excessively high light, and drought, which may stress fungi to produce distinct bioactive secondary metabolites to participate in the host's defense mechanisms (Zhang *et al.*, 2016). Because of the abundant fungal species diversity and their rich secondary metabolites, natural products from seaweed-derived fungi are considered a significant source of novel antibacterial and cytotoxic compounds (Singh *et al.*, 2015; Teixeira *et al.*, 2019). Therefore, studying seaweed-derived fungi to search for new compounds has increased broad expectations for medical research and development.

The search for natural compounds in Vietnam marine environments, specifically produced by marine-derived fungi, has been broadening. However, there are few studies about the potential of bioactive metabolites of marine fungi isolated from seaweeds, especially their antimicrobial and anticancer activities. Nha Trang Bay has a specific geographic location that impacts biodiversity with unique seaweed species and is attached to many valuable marine micro- and macro-organisms with diverse ecological functions and bioactive compounds. Hence, the present study aims to evaluate the antibacterial and cytotoxic activities of fungal strains isolated from seaweed samples in Nha Trang Bay and select potential isolates for further investigation of antibiotic and anticancer compounds.

MATERIALS AND METHODS

Seaweed material

Eight species of seaweeds (5 species of brown algae and 3 species of green algae) were collected at a deep of ± 5 -8m from Nha Trang Bay, Khanh Hoa, in April 2021. The seaweed samples were placed in sterilized plastic bags, stored in the ice box, and transferred to the laboratory. The seaweeds were identified by Dr. Vo Thanh Trung, Nha Trang Institute of Technology Research and Application, Vietnam Academy of Science and Technology (VAST).

Isolation of fungi

The seaweed samples were rinsed with sterile seawater thrice to eliminate surface debris. Approximately 1 g of the seaweed sample was homogenized with 10 mL of pure seawater using a sterile pestle and mortar. Then 0.1 mL of the suspension was spread on Petri dishes containing modified Sabouraud agar (peptone 10 g, glucose 40 g, agar 18 g dissolved in 1000 mL natural seawater, pH 6.0-7.0) and supplemented with streptomycin (0.03 mg/mL) (Handayani *et al.*, 2016). The plates were incubated at 28°C for 5 – 7 days. Colonies have different shapes and colors from others and could regard as different isolates. The pure strains were stored in 30% glycerol at -80°C at the Collection of Marine Microorganisms of the Nha Trang Institute of Technology Research and Application, VAST.

Cultivation of isolated fungi and extraction

The fungal strains were cultured in 500 mL Erlenmeyer flasks containing rice medium (20 g of rice, 20 mg of yeast extract, 10 mg of KH_2PO_4 , and 40 mL of natural seawater) and incubated at room temperature for 3 weeks. The fungal mycelia and medium were extracted with ethyl acetate (EtOAc) with three repetitions. The EtOAc extracts were collected and evaporated in a vacuum using a rotary evaporator at 40°C. The crude extracts were tested for antibacterial and cytotoxic activities.

Screening of antibacterial activity

Screening of antimicrobial activity of the fungal extracts was performed by the disk diffusion method (Becerro *et al.*, 1994). The test bacteria including three Gram-positive bacteria (*Bacillus cereus* ATCC 11778, *Streptococcus faecalis* ATCC 19433, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923), and four Gram-negative bacteria (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028) were purchased from ATCC (Manassas, USA) and stored at Nha Trang Institute of Technology Research and Application, VAST and maintained on tryptic soy broth (TSB). The crude extracts were dissolved in ethyl acetate and loaded onto 6 mm diameter sterile Whatman No1 paper discs at a concentration of 100 µg/disc and allowed to dry for solvent evaporation.

The test microorganisms were grown on Mueller Hinton Agar media, and the turbidity of microbe suspensions was adjusted to 10^8 cells/mL using a spectrophotometer at a wavelength of 625 nm. Standard streptomycin discs (10 µg/disc) served as the positive control, and discs containing only solvent (ethyl acetate) served as the negative control. The plates were incubated at 37 °C for 24 hours. The results were recorded as a diameter in millimeters of the zone of inhibition.

Screening of cytotoxic activity

The fungal extracts were evaluated for their cytotoxic activity based on MTT assay (Zhuravleva *et al.*, 2022). Three cancer cell lines were used in this study including cervical cancer (Hela), breast cancer (MCF-7), and prostate cancer (PC-3). The cells were cultured in DMEM medium (Biolot, St. Petersburg, Russia) containing 10% fetal bovine serum (Biolot, St. Petersburg, Russia) and 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) at 37°C in a humidified atmosphere with 5% (v/v) carbon dioxide (CO_2). Cell suspensions (5×10^3) were incubated with the fungal extracts (100 µg/mL) prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) for 24 h. The absorbance of the converted formazan was measured using a Multiskan FC microplate photometer (Thermo Scientific, USA) at $\lambda = 570$ nm. The experiments were performed in triplicate, and the results were presented as a percent of control data.

Identification of fungi

The selected fungi were identified based on sequence analysis of ITS region of ribosomal DNA. Sequences of fungal ITS-rDNA regions were compared with those in the NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Multiple alignments of the ITS gene region were generated using MUSCLE (default conditions for gap opening and gap extension penalties) and implemented in MEGA 7.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). The phylogenetic tree was generated using Neighbor-Joining (NJ) with bootstrap analysis using 1,000 replicates.

RESULTS AND DISCUSSION

In the present study, 47 fungal isolates were obtained from 8 different species of seaweeds belonging to six genera including *Hormophysa*, *Sargassum*, *Padina*, *Turbinaria*, *Enteromorpha*, and *Ulva* in Nha Trang Bay. Among them, 32 and 15 fungal strains were isolated from 5 brown and 3 green seaweed samples, respectively (Table 1). Observation of the fungus colony was done macroscopically (visual) based on the colony's color, surface, and edge. Higher isolation frequency was observed in *Sargassum polycystum* and the least in *Uval lactuca*. It means that the brown algal genera could be better sources of endophytic fungi than green algal. However, more examples and investigations are needed to support this deduction and to explain this phenomenon.

Table 1. A list of seaweed samples and the number of isolated fungi

Order	Seaweed samples	Number of isolated fungi
1	<i>Hormophysa cuneiformis</i>	6
2	<i>Sargassum oligocystum</i>	4
3	<i>Sargassum polycystum</i>	9
4	<i>Padina australis</i>	8
5	<i>Turbinaria ornata</i>	5
6	<i>Enteromorpha flexuosa</i>	5
7	<i>Uval lactuca</i>	4
8	<i>Uval reticulata</i>	6

The EtOAc extracts of seaweed-derived fungi were tested for their antimicrobial activity against seven bacterial pathogens by agar diffusion assay. As shown in Table 2, 17 strains of the 47 tested isolates showed activities against one or more of the test pathogens. Especially, 10 isolated strains exhibited activity against 4 test pathogens and 2 isolated strains exhibited activity against 5 tested test pathogens. Besides, it was observed that the fungal extracts showed more antimicrobial activity toward Gram-positive bacteria than Gram-negative bacteria. Fungal isolates were active against the *S. aureus* ATCC 25923 (31.9%), *B. cereus* ATCC 11778 (29.8%), and *S. faecalis* ATCC 19433 (43.7%). However, the antibacterial properties against were less to *K. pneumoniae* ATCC 700603 (27.7%), *E. coli* ATCC 25922 (4.3%), and *S. typhimurium* ATCC 14028 (2.1%). None of the extracts showed activity toward *P. aeruginosa* ATCC 27853. Differences in the ability of marine fungi to inhibit the growth of microbes might reason by the difference in the cell wall structure and

sensitivity to antimicrobial compounds contained in the extracts. Among the 17 isolates with antimicrobial activity, 3 isolates 2104NT-1.5, 2104NT-2.1, and 2104NT-5.6 showed significant antimicrobial activity against test pathogens.

Table 2. Antibacterial activity of ethyl acetate extracts of isolated fungal strains

Order	Strains	Zone of inhibition (D, mm)						
		Gram (+)			Gram (-)			
		BC	SA	SF	EC	KP	PA	ST
1	2104NT-1.4	12	18	8	-	12	-	-
2	2104NT-1.5	18	18	15	10	16	-	-
3	2104NT-2.1	15	15	13	8	12	-	-
4	2104NT-2.2	-	8	8	-	8	-	8
5	2104NT-2.3	16	12	11	-	15	-	-
6	2104NT-2.4	12	16	10	-	12	-	-
7	2104NT-3.3	10	-	-	-	-	-	-
8	2104NT-4.4	15	10	12	-	-	-	-
9	2104NT-4.5	8	17	8	-	13	-	-
10	2104NT-5.4	8	-	-	-	-	-	-
11	2104NT-5.6	13	17	12	-	15	-	-
12	2104NT-6.1	-	15	12	-	13	-	-
13	2104NT-6.4	13	12	11	-	15	-	-
14	2104NT-7.1	11	11	9	-	-	-	-
15	2104NT-7.8	10	18	10	-	13	-	-
16	2104NT-7.9	10	12	10	-	12	-	-
17	2104NT-8.2	-	10	-	-	-	-	-

Note: BC: “*B. cereus* ATCC 11778”; SA: “*S. aureus* ATCC 25923”; SF: “*S. faecalis* ATCC 19433”; EC: “*E. coli* ATCC 25922”; KP: “*K. pneumoniae* ATCC 700603”; PA: “*P. aeruginosa* ATCC 27853”; ST: “*S. typhimurium* ATCC 14028”.

According to the previous report, 40% of the fungal strains isolated from marine algal samples belonging to species *Kappaphycus cottonii*, *K. striatus*, *Gracilaria eucheumatoides*, and *Betaphycus gelatinus* collected in Nha Trang Bay exhibited antibacterial activity (Chi *et al.*, 2018). Recently, the marine fungus *Aspergillus micronesiensis* isolated from *Kappaphycus alvarezii* produced two novel dibenzospiroketal, aspermicrones B-C. Both compounds displayed antimicrobial activity against *S. aureus* (Luyen *et al.*, 2019b). These studies indicated that fungal communities associated with seaweeds are promising candidates for antimicrobial compounds.

Moreover, the cytotoxic activity of 47 crude fungal extracts were evaluated against three cancer cell lines, including cervical cancer (Hela), breast cancer (MCF-7), and prostate cancer (PC-3). The fungi extracts showed cytotoxicity with cell viability percentage ($\leq 50\%$) of the tested cell lines compared with the control. A higher number of fungal extracts exhibited cytotoxic activity toward the MCF-7 cells (63.8%, 30/47) than those for Hela cells (46.8%, 22/47) and PC-3 (42.5%, 20/47) observed. The proportion of isolates showing cytotoxic activity with viability percentage $< 20\%$ against the cancer cell lines Hela, MCF-7, and PC-3 were 12/47 (25.5%), 9/47 (19.1%), and 7/47 (14.9%), respectively (Table 3). The isolates 2104NT-1.2, 2104NT-1.5 and 2104NT-3.1 exhibited the highest cytotoxicity against three test cancer lines.

Table 3. Cytotoxic activity of ethyl acetate extracts of isolated fungal strains

Order	Strains	% cell viability		
		HeLa	PC-3	MCF-7
1	2104NT-1.1	9,0 $\pm$ 0,9	46,1 $\pm$ 6,6	39,8 $\pm$ 9,1
2	2104NT-1.2	6,1$\pm$0,1	15,0$\pm$1,4	15,0$\pm$1,9
3	2104NT-1.5	8,7$\pm$0,3	8,6$\pm$0,3	11,3$\pm$0,1
4	2104NT-2.1	13,5 $\pm$ 2,2	49,7 $\pm$ 7,0	39,0 $\pm$ 2,9
5	2104NT-2.2	10,7 $\pm$ 1,1	12,5 $\pm$ 0,6	22,3 $\pm$ 3,6
6	2104NT-3.1	6,4$\pm$0,2	8,1$\pm$0,8	10,3$\pm$0,0
7	2104NT-4.3	28,5 $\pm$ 6,1	9,7 $\pm$ 0,8	39,8 $\pm$ 6,0
8	2104NT-5.2	23,5 $\pm$ 1,4	45,3 $\pm$ 17,8	28,7 $\pm$ 3,8
9	2104NT-5.3	7,9 $\pm$ 0,3	39,1 $\pm$ 10,1	46,5 $\pm$ 3,4
10	2104NT-5.4	42,2 $\pm$ 0,6	40,3 $\pm$ 6,8	33,6 $\pm$ 2,9
11	2104NT-5.6	17,2 $\pm$ 2,0	25,0 $\pm$ 2,2	43,1 $\pm$ 1,8
12	2104NT-6.1	14,4 $\pm$ 0,2	35,3 $\pm$ 4,0	12,5 $\pm$ 0,4
13	2104NT-7.1	43,9 $\pm$ 3,6	35,9 $\pm$ 6,3	35,8 $\pm$ 2,8
14	2104NT-7.9	14,6 $\pm$ 2,6	11,5 $\pm$ 0,7	20,4 $\pm$ 1,4
15	2104NT-8.2	10,4 $\pm$ 0,2	12,3 $\pm$ 1,7	13,5 $\pm$ 1,1
16	2104NT-8.5	18,5 $\pm$ 1,0	28,0 $\pm$ 3,7	29,1 $\pm$ 0,6

Related to cytotoxic metabolites, previous studies released that seaweed-derived fungi represented a potential source of fascinating chemical structure variations and bioactivities. From the fungus *Aspergillus micronesiensis* isolated from seaweed *Kappaphycus alvarezii* in Van Phong Bay, Khanh Hoa, three natural compounds with high cytotoxic activity against Hep-G2, LU-1, and Vero cells were obtained, including epicoccolide A, epicoccolide B and NC3B (Luyen *et al.*, 2019a). Besides, five new sesterterpenes, 14,15-dehydro-6-epi-ophiobolin K, 14,15-dehydro-6-epi-ophiobolin G, 14,15-dehydro-6-epi-ophiobolin G and 14,15-dehydro-(Z)-14-ophiobolin G, together with four known ophiobolins were obtained from the fungus *Aspergillus flocculosus* 168ST-16.1 derived from the seaweed *Padina* sp. in Son Tra Peninsula, Da Nang also showed potent cytotoxicity against six cancer cell lines, HCT-15, NUGC-3, NCI-H23, ACHN, PC-3, and MDA-MB-231 (Choi *et al.*, 2019).

Based on the screening results, two strains (2104NT-2.1 and 2104NT-5.6) showed strong antibacterial activity against 4/7 test pathogens, two strains (2104NT-1.2 and 2104NT-3.1) displayed high cytotoxic activity towards 3 cancer cell lines. Especially, the strain 2104NT-1.5 not only exhibited strong antibacterial ability but also had effective cytotoxic activity on test cancer cells. Five potent isolates 2104NT-1.2, 2104NT-1.5, 2104NT-2.1, 2104NT-3.1, and 2104NT-5.6 obtained from *Hormorphysa cuneiformis*, *Sagassum oligocystum*, *Turbinaria ornata*, and *Padina australis*, respectively, were selected and identified. According to analysis of ITS gene sequences, the fungi were identified as *Cladosporium* sp. 2104NT-1.2 (OR234388), *Aspergillus* sp. 2104NT-1.5 (OR234391), *Cladosporium* sp. 2104NT-2.1 (OR234392), *Penicillium* sp. 2104NT-3.1 (OR234393), and *Aspergillus* sp. 2104NT-5.6 (OR234394) (Table 4). In this study, all five identified fungal strains belong to the phylum Ascomycota.

Table 4. Identification of selected fungal strains

Fungal strains	Sources of isolation	Scientific name	Closest identified relative	Precent identify
 2104NT-1.2	 <i>Hormorphysa cuneiformis</i>	<i>Cladosporium</i> sp. (OR234388)	<i>Cladosporium</i> sp. CMRP2840 (MT075636)	100%
 2104NT-1.5	 <i>Hormorphysa cuneiformis</i>	<i>Aspergillus</i> sp. (OR234391)	<i>Aspergillus</i> sp. CBS112785 (OL772690)	100%
 2104NT-2.1	 <i>Sagassum oligocystum</i>	<i>Cladosporium</i> sp. (OR234392)	<i>Cladosporium pulvericola</i> DT0255-H5 (KP701987)	99.5%
 2104NT-3.1	 <i>Turbinaria ornata</i>	<i>Penicillium</i> sp. (OR234393)	<i>Penicillium paxillin</i> NRRL2008 (AF033426)	99.6%
 2104NT-5.6	 <i>Padina australis</i>	<i>Aspergillus</i> sp. (OR234394)	<i>Aspergillus steynii</i> NRRL35100 (EF661415)	99.1%

Our previous study evaluated marine fungi from Nha Trang Bay for antimicrobial activity, and the result for 59% strains exhibited antimicrobial activity against at least two tested pathogens (Trinh *et al.*, 2018). In another research, 46.9 % of sponge-derived fungal strains obtained from Nha Trang Bay exhibited cytotoxic activity against Hela and MCF-7 cells (Trinh *et al.*, 2022). In addition, high proportions of antioxidant-having fungi isolated from Nha Trang Bay have also been reported. The antioxidative properties results indicated the capacity for free DPPH and ABTS radical scavenging of fungi isolates with 61.5% and 80.3%, respectively (Trinh *et al.*, 2019). Preliminary research results indicated that marine fungi initiated from Nha Trang Bay exhibited engaging biological activities and could be a potential source for new bioactive substance exploitation. To our best knowledge, seaweed-derived fungal strains from Nha Trang Bay were evaluated for cytotoxic activity against cancer cell lines for the first time.

CONCLUSION

The study indicated seaweed-derived fungi isolated from Nha Trang Bay are potential sources for discovering natural substances with antibiotic and cytotoxic activities. Among 47 fungal strains, 14 isolates showed antimicrobial activity against at least three test pathogens and 16 isolates exhibited cytotoxic activity against Hela, MCF-7, and PC-3 cell lines. Five fungal strains displayed significant bioactivities, were identified by ITS gene sequences belonging to three genera *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Cladosporium*. The data obtained here provided opportunities for the advanced research of bioactive secondary metabolites from potential fungal strains.

Acknowledgments: This research was supported by Vietnam Academy of Science and Technology (Grant VAST04.07/22–23).

REFERENCES

- Becerro MA, Lopez NI, Turon X, Uriz MJ (1994). Antimicrobial activity and surface bacterial film in marine sponges. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **179**(2): 195-205.
- Bugni TS, Ireland CM (2004). Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. *Natural Product Reports* **21**(1): 143-163.

- Chi HK, Ha TTH, Cuong LH, Hang TTN, Tuan ND, Nhung LTH, Huong LM (2018). Antimicrobial, Cytotoxic and Hemolytic Activities of Marine Algae-Associated Fungal Isolates in Vietnam. *Journal of Marine Science and Technology* **18**(4): 406-412.
- Choi BK, Trinh PTH, Lee HS, Choi BW, Kang JS, Ngoc NTD, Van TTT, Shin HJ (2019). New Ophiobolin Derivatives from the Marine Fungus *Aspergillus flocculosus* and Their Cytotoxicities against Cancer Cells. *Mar. Drugs* **17**(6): 346.
- Handayani D, Ornando R, Rustini (2016). Antimicrobial Activity Screening of Symbiotic Fungi from Marine Sponge *Petrosia nigrans* Collected from South Coast of West Sumatera, Indonesia. *IJPPR* **8**(4): 623-626.
- Luyen ND, Huong LM, Ha TTH, Cuong LH, Tai BH, Nhiem NX, Kiem PV (2019a). Polyoxygenated polyketides from the marine-derived fungus *Aspergillus micronesiensis*. *Vietnam Academy of Science and Technology* **57**(5): 654-660.
- Luyen ND, Huong LM, Ha TTH, Cuong LH, Yen DTH, Nhiem NX, Tai BH, Gardes A, Kopprio G, Kiem PV (2019b). Aspermicrones A-C, novel dibenzospiroketal from the seaweed-derived endophytic fungus *Aspergillus micronesiensis*. *The Journal of Antibiotics* **72**(11): 843-847.
- Singh RP, Kumari P, Reddy CRK (2015). Antimicrobial compounds from seaweeds-associated bacteria and fungi. *Applied microbiology and biotechnology* **99**: 1571-1586.
- Teixeira TR, Santos GSD, Armstrong L, Colepicolo P, Debonis HM (2019). Antitumor potential of seaweed derived-endophytic fungi. *Antibiotics* **8**(4): 205.
- Trinh PTH, Tien PQ, Ngoc NTD, Ly BM, Van TT (2018). Isolation and screening marine fungi with antimicrobial activity from samples collected in Nha Trang Bay, *Vietnam J Biotechnol* **16**(1): 181-187.
- Trinh PTH, Van TTT, Ngoc NTD, Hang CTT, Hoa LT, Trung DT, Khanh HHN, Hung LD (2019). Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of marine fungi isolated from Nha Trang sea. *Journal of Biology* **41**: 409-419.
- Trinh PTH, Yurchenko EA, Yurchenko AN, Ngoc NTD, Trang VTD, Hang CTT, Van TTT, Thinh PD, Khanh HHN, Hung LD, Nguyen Dung NHC (2022). Evaluation of cytotoxic activity of marine fungi isolated from sponges in Nha Trang Bay. *Vietnam Journal of Marine Science and Technology* **22**(1): 51-57.
- Zhuravleva OI, Belousova EB, Oleinikova GK, Antonov AS, Khudyakova YV, Raisin AB, Popov RS, Menchinskaya ES, Trinh PTH, Yurchenko AN, Yurchenko EA (2022). Cytotoxic Drimane-Type Sesquiterpenes from Co-Culture of the Marine-Derived Fungi *Aspergillus carneus* KMM 4638 and *Beauveria felina* (= *Isaria felina*) KMM 4639. *Mar. Drugs* **20**(9): 584.
- Zhang P, Li X, Wang BG (2016). Secondary metabolites from the marine algal-derived endophytic fungi: Chemical diversity and biological activity. *Planta Medica* **82**(9/10): 832-842.

HOẠT TÍNH GÂY ĐỘC TẾ BÀO VÀ KHÁNG KHUẨN CỦA CÁC CHỦNG VI NẤM PHÂN LẬP TỪ RONG BIỂN THU THẬP TỪ VỊNH NHA TRANG

Ngô Thị Duy Ngọc^{1,*}, Phan Thị Hoài Trinh¹, Ekaterina A. Yurchenko², Anton N. Yurchenko², Võ Thị Diệu Trang¹, Lê Thị Hoa¹, Đinh Thành Trung¹, Lê Đình Hùng¹, Huỳnh Hoàng Như Khánh¹, Phạm Đức Thịnh¹, Bùi Thị Nam Phương³

¹ Viện Nghiên cứu và Ứng dụng công nghệ Nha Trang, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

² Viện Hóa Sinh Hữu cơ Thái Bình Dương, Phân viện Viễn Đông, Viện Hàn lâm Khoa học Nga

³ Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Nghiên cứu này nhằm đánh giá hoạt tính kháng khuẩn và gây độc tế bào của 47 chủng vi nấm biển phân lập từ các mẫu rong biển thuộc 6 chi *Hormophysa*, *Sargassum*, *Padina*, *Turbinaria*, *Enteromorpha* và *Ulva* tại vịnh Nha Trang. Dịch chiết vi nấm được phân tích hoạt tính kháng khuẩn đối với ba chủng vi khuẩn Gram dương (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 11778, và *Streptococcus faecalis* ATCC 19433), và bốn chủng vi khuẩn Gram âm (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 và *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch. Nghiên cứu cho thấy 29,7% (14/47) dịch chiết từ vi nấm có hoạt tính kháng khuẩn đối với ít nhất ba chủng vi khuẩn kiểm định thử nghiệm. Ngoài ra, 16 dịch chiết vi nấm (34,0%) thể hiện hoạt tính gây độc đối với tế bào ung thư cổ tử cung (Hela), ung thư vú (MCF-7) và ung thư tuyến tiền liệt (PC-3) bằng phương pháp MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Năm chủng vi nấm có hoạt tính sinh học cao đã được định danh là *Cladosporium* sp. 2104NT-1.2, *Aspergillus* sp. 2104NT-1.5, *Cladosporium* sp. 2104NT-2.1, *Penicillium* sp. 2104NT-3.1, và *Aspergillus* sp. 2104NT-5.6 dựa trên giải trình tự gen vùng ITS. Khảo sát của chúng tôi đã cung cấp thông tin về các hoạt tính kháng khuẩn và gây độc tế bào của các chủng vi nấm được phân lập từ rong biển tại Vịnh Nha Trang và lựa chọn các chủng vi nấm tiềm năng để tìm kiếm các hợp chất kháng sinh và chống ung thư mới.

Từ khóa: Hoạt tính kháng khuẩn, hoạt tính gây độc tế bào, vi nấm biển, rong biển.

* Author for corresspondence: Tel: +84-933861854; Email: duyngoc@nitra.vast.vn

Số: 1046 /QĐ-HVKHCN

Hà Nội, ngày 18 tháng 09 năm 2023

QUYẾT ĐỊNH
Về việc thành lập Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ

GIÁM ĐỐC
HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

Căn cứ Quyết định số 303/QĐ-VHL ngày 01/03/2023 của Chủ tịch Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam về việc ban hành Quy chế tổ chức và hoạt động của Học viện Khoa học và Công nghệ;

Căn cứ Thông tư số 15/2014/TT-BGDĐT ngày 15/5/2014 của Bộ trưởng Bộ Giáo dục và Đào tạo ban hành Quy chế đào tạo trình độ thạc sĩ;

Căn cứ Quyết định số 775/QĐ-HVKHCN ngày 21/11/2016 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ ban hành Quy chế đào tạo trình độ thạc sĩ;

Căn cứ Quyết định số 1488/QĐ-HVKHCN ngày 01/11/2021 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc công nhận học viên cao học trúng tuyển đợt 2 năm 2021;

Căn cứ Quyết định số 145/QĐ-HVKHCN ngày 03/03/2023 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc công nhận đề tài và cử người hướng dẫn luận văn thạc sĩ;

Xét đề nghị của Trưởng khoa Khoa Công nghệ sinh học, Trưởng phòng Đào tạo.

QUYẾT ĐỊNH:

Điều 1. Thành lập Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ cho học viên Bùi Thị Nam Phương với đề tài: “Nghiên cứu tuyển chọn chủng vi nấm có hoạt tính sinh học được phân lập từ rong biển ở vịnh Nha Trang”.

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

Danh sách thành viên Hội đồng đánh giá luận văn kèm theo Quyết định này.

Điều 2. Hội đồng có trách nhiệm đánh giá luận văn thạc sĩ theo đúng quy chế hiện hành của Bộ Giáo dục và Đào tạo, Học viện Khoa học và Công nghệ. Quyết định này có hiệu lực trong thời hạn tối đa 60 ngày làm việc kể từ ngày ký.

Hội đồng tự giải thể sau khi hoàn thành nhiệm vụ.

Điều 3. Trưởng phòng Tổ chức - Hành chính và Truyền thông, Trưởng phòng Đào tạo, Trưởng phòng Kế toán, Trưởng Khoa Công nghệ sinh học, các thành viên có tên trong danh sách Hội đồng và học viên cao học có tên tại Điều 1 chịu trách nhiệm thi hành Quyết định này./.

Nơi nhận:

- Như Điều 3;
- Lưu hồ sơ học viên;
- Lưu: VT, ĐT, MT.14.

GIÁM ĐỐC



GS.TS. Vũ Đình Lâm

DANH SÁCH HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN VĂN THẠC SĨ

(Kèm theo Quyết định số 1046 /QĐ-HVKHCN ngày 18 / 09 /2023
của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ)



Cho luận văn của học viên: Bùi Thị Nam Phương

Tên đề tài: Nghiên cứu tuyển chọn chủng vi nấm có hoạt tính sinh học được phân lập từ rong biển ở vịnh Nha Trang.

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

Người hướng dẫn: TS. Phan Thị Hoài Trinh

- Viện Nghiên cứu và Ứng dụng công nghệ Nha Trang,
Viện Hàn lâm KHCNVN

TT	Họ và tên, học hàm, học vị	Chuyên ngành	Cơ quan công tác	Trách nhiệm trong Hội đồng
1.	PGS. TS. Đào Việt Hà	Hóa sinh học	Viện Hải dương học, Viện Hàn lâm KHCNVN	Chủ tịch
2.	TS. Vũ Việt Dũng	Vi sinh vật học	Chi nhánh ven biển, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga	Phản biện 1
3.	TS. Nguyễn Xuân Vy	Sinh học	Viện Hải dương học, Viện Hàn lâm KHCNVN	Phản biện 2
4.	TS. Cao Thị Thúy Hằng	Công nghệ sinh học	Viện Nghiên cứu và Ứng dụng công nghệ Nha Trang, Viện Hàn lâm KHCNVN	Ủy viên - Thư ký
5.	TS. Bùi Văn Nguyên	Hóa sinh học	Trường Đại học Khánh Hòa, Ủy ban Nhân dân tỉnh Khánh Hòa	Ủy viên

(Hội đồng gồm 05 thành viên)./. 

Nha Trang, ngày 24 tháng 10 năm 2023

BIÊN BẢN HỌP HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN VĂN THẠC SỸ

Thực hiện Quyết định số: 1046/QĐ -HVKHCN ngày 18/9/2023 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc thành lập Hội đồng đánh giá luận văn thạc sỹ của học viên **Bùi Thị Nam Phương**

Tên đề tài: Nghiên cứu tuyển chọn chủng vi nấm có hoạt tính sinh học được phân lập từ rong biển ở vịnh Nha Trang

Ngành/Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

Hôm nay, ngày 24/10/2023 Hội đồng đã họp tại Viện Nghiên cứu và Ứng dụng công nghệ Nha Trang vào lúc 8h00 Hội đồng gồm 05 thành viên:

1. PGS. TS. Đào Việt Hà
2. TS. Vũ Việt Dũng
3. TS. Nguyễn Xuân Vỵ
4. TS. Cao Thị Thúy Hằng
5. TS. Bùi Văn Nguyên

- Chủ tịch hội đồng
Phản biện 1
Phản biện 2
Ủy viên thư ký
Ủy viên hội đồng

Thành viên vắng mặt: 0/5 (Phản biện hoặc ủy viên, đã có bản nhận xét đồng ý cho phép học viên được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận văn thạc sỹ).

NỘI DUNG LÀM VIỆC

1. Đại diện cơ sở đào tạo đọc quyết định thành lập Hội đồng đánh giá luận văn
2. Chủ tịch Hội đồng, điều khiển phiên họp
3. Thư ký HĐ, đọc lí lịch khoa học và bảng điểm của học viên
4. Học viên trình bày luận văn trước Hội đồng
5. **Phản biện 1: TS. Vũ Việt Dũng** thông qua bản nhận xét của về luận văn và có những ý chính

Đề tài có ý nghĩa khoa học và ý nghĩa thực tiễn cao và mang tính cấp thiết cao.

Luận văn có tính kế thừa nhưng không bị trùng lặp kết quả nghiên cứu đối với các NCKH đã công bố trong và ngoài nước cho đến nay. Kết quả luận văn được trình bày, rõ ràng, trung thực và chính xác.

Nội dung nghiên cứu phù hợp với chuyên ngành và mã số đào tạo.

Nội dung nghiên cứu trình bày rõ ràng, đầy đủ, khoa học, thiết kế nghiên cứu là mô hình cắt ngang, phù hợp với nội dung nghiên cứu, phương pháp, vật liệu nghiên



cứu được trình bày chi tiết, đầy đủ cơ sở khoa học và phù hợp với các nội dung, mục tiêu nghiên cứu. Nghiên cứu mang tính khoa học và có độ tin cậy cao.

Kết quả nghiên cứu :

+ Đề tài đã phân lập và mô tả hình thái 38 chủng vi nấm được phân lập từ 08 mẫu rong biển thu nhận ở Vịnh Nha Trang.

+ Lên men, chiết tách và sàng lọc hoạt tính kháng sinh, chống oxy hóa, gây độc tế bào và bảo vệ tế bào từ 38 chủng vi nấm biển và đã tìm được 05 chủng tiềm năng có hoạt tính cao.

+ Đã định danh và xây dựng cây phát sinh loài của 05 chủng vi nấm biển tiềm năng.

Hạn chế thiếu sót: Rà soát lỗi kỹ thuật

Câu hỏi: Thời gian máy thu mẫu rong là khi nào trong năm?

* **Kết luận chung:** Luận văn đáp ứng đầy đủ yêu cầu của một luận văn thạc sỹ.

6. **Phản biện 2: TS. Nguyễn Xuân Vy** đã thông qua bản nhận xét của về luận văn với các ý chính:

Đề tài có ý nghĩa khoa học và ý nghĩa thực tiễn khi tìm kiếm các chủng vi nấm biển trong cùng rong biển có hoạt tính sinh học, đồng thời xác định vị trí phân loài của một số chủng có hoạt tính sinh học.

- Sự không trùng lặp: Đề tài cần tổng quan thêm hai công trình nghiên cứu của Việt Nam liên quan đến vi nấm biển để thấy rõ sự không trùng lặp hơn.

- Đề tài phù hợp với các nội dung nghiên cứu và chuyên ngành đào tạo.

- Đề tài sử dụng các phương pháp hiện hành, tham khảo từ các nguồn tài liệu đáng tin cậy.

- Kết quả: Đã phân lập được 38 chủng vi khuẩn từ 8 loài rong biển, 10 chủng có hoạt tính kháng sinh mạnh, hai chủng có hoạt tính gây độc tế bào mạnh và 3 chủng có hoạt tính bảo vệ tế bào mạnh. Tác giả đã chọn 5 chủng để định danh, trong đó 1 chủng đã ra tên *Penicillium chermessinum*, những chủng còn lại chưa xác định được.

- **Hạn chế thiếu sót:**

+ Bổ sung đầy đủ danh mục chữ viết tắt

+ Mở đầu: Xem xét cụm từ “vi nấm có nguồn gốc từ rong biển” hay “vi nấm phân lập từ rong biển”

+ Cách trích dẫn tài liệu: Theo số thì không đề năm

+ Chương tổng quan: Xem lại TLTK số 23 (nên cập nhật số liệu mới nhất)

+ ITS là vùng bảo thủ, cần nói rõ là phần nào hoặc nên nói là 1 phần ITS

+ Trang 17, nhiều nghiên cứu thì nên trích dẫn hơn 2 TLTK

+ Lý do chọn 05 chủng vi nấm cần nói rõ hơn

- + Đặc điểm hình thái có quan sát dưới kính hiển vi không?
- + Xem xét cây tiến hóa vi nấm nên xem xét so sánh với chủng phát hiện ở Việt Nam và xem xét chủng tìm được có phải là lần đầu xuất hiện ở Việt Nam không?

* **Đánh giá chung:** Luận văn đạt yêu cầu của một luận văn Thạc sỹ

7. Các thành viên HD và những người tham dự nêu câu hỏi

* **TS. Bùi Văn Nguyên** thông qua bản nhận xét luận văn và có các ý kiến:

- Xem xét cách diễn đạt một số câu theo đúng văn phong khoa học.
- Xem xét rút ngắn TLTK
- Thống nhất cách trích dẫn và cách viết đúng quy định

Câu hỏi:

Tại sao lại sử dụng dung môi etylacetate để trích xuất các hợp chất từ vi nấm?

Đánh giá chung: Luận văn đạt yêu cầu của một luận văn Thạc sỹ

* **TS. Cao Thị Thúy Hằng** thông qua bản nhận xét luận văn và có các câu hỏi.

- Học viên cần bổ sung đầy đủ thông tin ở phần phương pháp phân lập vi nấm biển như hình thái vi nấm biển được quan sát sau 3-5 ngày nuôi cấy như thế nào? Bằng mắt thường, hay bằng kính hiển vi? Làm sao để biết khi nào chủng vi nấm làm thuần chủng để tiến hành lưu giữ và thực hiện các bước nghiên cứu tiếp theo.

- Hoạt tính bảo vệ tế bào là hoạt tính mới, phần phương pháp cần nói rõ hơn mục đích của các hợp chất sử dụng huyết thanh thai bò, penicilin, streptomycin? Retenone dùng để làm gì?

- **Đánh giá chung:** Luận văn đạt yêu cầu của một luận văn Thạc sỹ

* **PGS.TS Đào Việt Hà**

- Thống nhất lại thuật ngữ sinh học: Xem xét lại từ ngữ “khả năng sinh tổng hợp”
- Đề xuất: Nên xuất phát từ kết quả của mình để đưa ra.
- **Đánh giá chung:** Luận văn đạt yêu cầu của một luận văn Thạc sỹ

8. Học viên trả lời

Câu 1. Thời điểm thu mẫu rong biển để phân lập vi nấm biển trong nghiên cứu này?

Trả lời: Các mẫu rong được thu nhận vào tháng 4, đây là thời điểm rong sinh trưởng và phát triển mạnh nhất trong năm.

Câu 2. Tại sao sử dụng dung môi ethyl acetate để ngâm chiết sinh khối và môi trường lên men các chủng vi nấm biển?

Trả lời: Đây là dung môi chiết được phần lớn các hợp chất chuyển hóa thứ cấp được sinh tổng hợp bởi các chủng vi nấm. Bên cạnh đó, phần lớn các tài liệu nghiên cứu về các hoạt chất sinh học từ vi nấm biển đều báo cáo sử dụng dung

môi ethyl acetate dễ ngấm chiết sinh khối và môi trường lên men các chủng vi nấm biến. Chính vì vậy, học viên đã sử dụng dung môi này trong nghiên cứu.

Câu 3. Từ một mẫu rong biển có thể phân lập được 3-8 chủng vi nấm biến. Các chủng vi nấm biến này đã thể hiện được tính đa dạng vi nấm biến trong mẫu rong biển hay chưa?

Trả lời: Trong quá trình phân lập, các chủng thu nhận từ các mẫu rong biển đều có các đặc điểm hình thái khác biệt nhau về hình dạng và màu sắc. Điều này bước đầu đã thể hiện được sự đa dạng của các chủng vi nấm được phân lập từ rong biển.

Câu 4. Cách chọn chủng vi nấm theo phổ hoạt tính rộng hay chọn chủng có hoạt tính cao nhất?

Trả lời: Lựa chọn ưu tiên cho chủng vi nấm có hoạt tính cao nhất theo từng mục đích nghiên cứu các hoạt chất sinh học.

Các thầy cô hội đồng nhất trí cao với các câu trả lời của học viên.

9. Nhận xét của thầy hướng dẫn về học viên

TS. Phan Thị Hoài Trinh đã đọc bản nhận xét của giáo viên hướng dẫn và có những đánh giá cao về quá trình làm việc nghiêm túc của học viên.

10. Hội đồng họp kín và cho điểm

- Hội đồng bầu ban kiểm phiếu gồm 3 thành viên:

1. Trưởng ban: TS. Vũ Việt Dũng
2. Ủy viên: TS. Nguyễn Xuân Vỵ
3. Ủy viên: TS. Cao Thị Thúy Hằng

- Kết quả kiểm phiếu như sau:

Số phiếu phát ra: 05

Số phiếu thu về: 05

Tổng số điểm: 42,7

Điểm trung bình: 8,54

Điểm thưởng công trình công bố: 0,75

Tổng điểm đánh giá luận văn và thưởng công trình công bố: 9,29

- Kết luận của Hội đồng: Đề tài đáp ứng yêu cầu của một luận văn thạc sĩ.

11. Chủ tịch Hội đồng, công bố kết quả, yêu cầu học viên chỉnh sửa luận văn với các nội dung sau:

Hình thức: Rà soát lỗi chính tả, thống nhất thuật ngữ khoa học sử dụng

Nội dung: Chỉnh sửa theo nhận xét của 02 phản biện

Kết luận: Luận văn có nội dung nghiên cứu đáp ứng được yêu cầu của một luận văn thạc sỹ, học viên chỉnh sửa theo góp ý của hội đồng và hoàn thiện hồ sơ gửi cơ sở đào tạo đúng hạn.

Buổi họp đã kết thúc vào 11 giờ 00 phút ngày 24/10/2023

Nha Trang, ngày 24 tháng 10 năm 2023

THƯ KÝ HỘI ĐỒNG



Cao Thị Thúy Hằng

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG



Đào Việt Hà

XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO
KT. GIÁM ĐỐC
PHÓ GIÁM ĐỐC



Nguyễn Thị Trung



CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

BẢN NHẬN XÉT PHẢN BIỆN LUẬN VĂN THẠC SĨ

Họ và tên người nhận xét: Vũ Việt Dũng Học hàm, học vị: TS

Chức danh trong Hội đồng: Phó biên tập

Cơ quan công tác: Chi nhánh Văn phòng Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Việt Nam

Họ và tên học viên: Bùi Thị Nam Phương

Tên đề tài: Nghiên cứu tuyển chọn chủng vi nấm có hoạt tính sinh học được phân lập từ rong biển ở vịnh Nha Trang

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm.

Mã số: 8 42 01 14

NỘI DUNG NHẬN XÉT

1. Tính cấp thiết, tính thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận văn:

Đề tài có tính cấp thiết có ý nghĩa khoa học ứng dụng trong điều trị bệnh lý nấm trên thực vật, như ung thư, viêm nhiễm, chống oxy hóa, bảo vệ môi trường. Các hoạt chất từ nấm biển được quan tâm nghiên cứu trên toàn cầu.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình khoa học, luận văn đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo:

Đề tài của luận văn không trùng lặp với các nghiên cứu khác. Luận văn có tính trung thực, rõ ràng, đầy đủ trong các trích dẫn, có hơn 150 tài liệu trích dẫn từ các nguồn uy tín.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung nghiên cứu cũng như với chuyên ngành và mã số đào tạo:

Tên đề tài phù hợp với nội dung nghiên cứu cũng như với chuyên ngành và mã số đào tạo.

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp nghiên cứu đã sử dụng để hoàn thành luận văn:

Các phương pháp nghiên cứu luận văn được sử dụng để nghiên cứu các đối tượng nấm biến đổi kết quả và độ tin cậy cao.

5. Kết quả nghiên cứu của luận văn:

Kết quả của luận văn đã phân lập được 38 chủng vi nấm. Trong đó có 10 chủng có hoạt tính kháng khuẩn. 14 chủng có khả năng bắt các gốc tự do, 19 chủng có hoạt chất gây độc tế bào ung thư, có tế bào ung thư chết tế bào ung thư tuyến tiền liệt. 16 chủng có hoạt tính gây độc đối với tế bào ung thư vú. 3 chủng có hoạt tính bảo vệ tế bào cả tim. 05 chủng vi nấm có hoạt tính sinh học cao thuộc các giống *penicillium* và *Aspergillus*.

6. Những hạn chế, thiếu sót của luận văn về nội dung, hình thức và câu hỏi:

Còn một số lỗi format máy. Sử dụng từ chất cấp 2. Còn thiếu chất thứ cấp. Chưa nêu lại các lỗi format máy trong luận văn.

7. Nếu tác giả chưa viết bài báo khoa học thì nội dung của luận văn có thể được viết thành các bài báo để gửi đăng trên tạp chí khoa học, sách chuyên ngành hoặc tuyển tập công trình hội nghị khoa học cấp quốc gia, quốc tế hay không?

Nếu chưa viết bài báo thì kết quả của luận văn có thể viết thành bài báo đăng trên các tạp chí chuyên ngành.

8. Kết luận chung (khẳng định mức độ đáp ứng các yêu cầu đối với một luận văn Thạc sĩ; luận văn có thể đưa ra bảo vệ để nhận học vị Thạc sĩ được hay không?):

Nội dung nghiên cứu đáp ứng được các yêu cầu đối với một luận văn Thạc sĩ, luận văn có thể đưa ra bảo vệ để nhận học vị Thạc sĩ.

Khánh hòa, ngày 23 tháng 10 năm 2023

Xác nhận của cơ quan công tác

PHÓ GIÁM ĐỐC



Thượng tá Đặng Văn Trung

Người nhận xét

(Ký, ghi rõ họ tên)

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Vu Viet Dung".

Vũ Việt Dũng

BẢN NHẬN XÉT PHẢN BIỆN LUẬN VĂN THẠC SĨ

Họ và tên người nhận xét: Nguyễn Xuân Vy. Học hàm, học vị: TS

Chức danh trong Hội đồng: UVPB 2

Cơ quan công tác: Viện Hải dương học, VAST

Họ và tên học viên: Bùi Thị Nam Phương

Tên đề tài: Nghiên cứu tuyển chọn chủng vi nấm có hoạt tính sinh học được phân lập từ rong biển ở vịnh Nha Trang

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm.

Mã số: 8 42 01 14

NỘI DUNG NHẬN XÉT

1. Tính cấp thiết, tính thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận văn:

Chất có hoạt tính sinh học từ sinh vật biển ngày càng được quan tâm do mức độ đa dạng của nó. Đề tài có ý nghĩa khoa học và thực tiễn khi tìm kiếm các chủng vi nấm biển sống cùng rong biển có hoạt tính sinh học, đồng thời xác định vị trí phân loại một số chủng có hoạt tính sinh học.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình khoa học, luận văn đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo:

Trên thế giới đã thực hiện việc phân lập vi nấm từ nhiều nguồn khác nhau, kể cả rong biển. Tại ĐH Nha Trang công bố 28 loài nghi nhận mới cho Việt Nam và một loài mới cho khoa học. Khác biệt ở đây là nguồn thu: môi trường nước và trên rong biển. Nhìn chung, đề tài đã tổng quan tương đối đầy đủ, nhưng thiếu hai công trình quan trọng thực hiện tại Nha Trang của nhóm tác giả ĐH Nha Trang.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung nghiên cứu cũng như với chuyên ngành và mã số đào tạo:

Đề tài thực hiện ba nội dung bao gồm: Phân lập, tuyển chọn và phân loại, nên tên đề tài thể hiện được tính khái quát nhất của ba nội dung này. Vì vậy tên đề tài là phù hợp.

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp nghiên cứu đã sử dụng để hoàn thành luận văn:

Phương pháp phân lập, lên men, thu nhận cao chiết, thử nghiệm hoạt tính sinh học (hoạt tính kháng sinh, chống oxy hóa, gây độc tế bào ung thư, bảo vệ tế bào), và đặc điểm hình thái ngoài đều thực hiện theo các phương pháp hiện hành.

5. Kết quả nghiên cứu của luận văn:

Tác giả đã phân lập được 38 chủng vi nấm có hình dạng ngoài khác nhau từ 8 loài rong biển. Trong 38 chủng được kiểm định, 10 chủng có hoạt tính kháng khuẩn sinh mạnh, trong đó nổi bật là 2104NT-2.1. 14 Chủng có hoạt tính bất gấc tự do, nổi bật có 2104NT-1.3. Về tính gây độc cho tế bào lại là hai chủng khác 5.3 và 7.9. Hoạt tính bảo vệ tế bào có chủng 1.3, 3.3, 7.7

Tổng hợp từ các đặc tính trên, tác giả đã chọn 1.5, 1.3, 2.1, 3.3 và 7.7. để xác định tên khoa học dựa trên chỉ thị ITS. Trong 5 chủng này, chủng 1.3 được xác định là *Penicillium chermessinum*, những chủng còn lại chưa xác định được.

6. Những hạn chế, thiếu sót của luận văn về nội dung, hình thức và câu hỏi:

Nhìn chung luận văn trình bày rõ ràng, logic giữa các phần, đẹp mắt và theo mẫu quy định. Tuy nhiên để hoàn thiện thêm, luận văn còn một số lỗi nhỏ, lỗi kỹ thuật khác

- Bổ sung thêm danh mục từ viết tắt: Ví dụ H9c2 (Tr71),
- Phần mở đầu: xem xét lại cụm từ “vi nấm có nguồn gốc từ rong biển”, vì dễ bị hiểu nhầm về tiến hóa, nên chẳng thay bằng “phân lập từ rong biển” cho rõ nghĩa. Cách trích dẫn lại liệu cần hiệu chỉnh lại cho phù hợp. Thông thường, nếu trích dẫn theo số thứ tự thì không để năm. Trích dẫn trực tiếp: Theo nghiên cứu của Huỳnh Hoàng Như Khánh và cộng sự [số thứ tự] cho rằng.....thay vì năm, trích dẫn gián tiếp: Ý/nội dung...[số thứ tự] (không để tên). Đề nghị chỉnh sửa lại.
- Chương Tổng quan: Nên xem lại trích dẫn tài liệu số 23 về thống kê đa dạng nấm biển, tìm kiếm xem hiện nay trên thế giới có cơ sở dữ liệu nào hay không. Nếu không có thì nên sử dụng thống kê của Calabon và cs, 2023. Chú ý có dấu . ở đơn vị hàng ngàn (Tr14). Ở chỉ thị 28S nói là vùng bảo thủ nhưng là vùng nào? D1-D3; D8D10 của 28S. Nếu không rõ thì ghi một phần của 28S. Trang 15: các loài vi nấm thay vì nấm. Trang 17, “Nhiều nghiên cứu” nhưng trích dẫn có một tài liệu là không hợp lý. Nhìn chung phần tổng quan rất chi tiết, nên khá dài, chiếm tới 40 trang. Theo tôi tác giả nên tập trung vào vi nấm phân lập từ rong biển, còn những nguồn khác mình ngắn gọn lại. Đồng thời xem những chất hoạt tính nào (định tính/định lượng) từ vi nấm đã được biết đến.
- Chương kết quả và thảo luận
Đề tài này thực hiện nội dung công việc rất nhiều. Việc chọn lựa 5 trên 38 chủng để phân tích cần được thể hiện rõ hơn, thang điểm nào, tiêu chí nào để chọn năm chủng này cần thể hiện rõ hơn nữa. Đặc điểm hình thái ở đây chỉ mới thực hiện trên trực quan bằng mắt thường, chưa có thể hiện được hình thái trong phân loại học (cấu trúc hiển vi). Về chỉ thị phân tử, chỉ thị đơn lẻ chưa đầy đủ để xác định đúng vị trí phân loại nhưng cũng có thể tham khảo được. Nên bổ sung loài *P. vietnamense* vào cây tiến hóa (MT102836). Nếu tác giả tham khảo kỹ hơn thì chủng 2104NT-3.3 là loài *Aspergillus collinsii*, 2014NT-7.7 là loài *A. petrakii*, 2104NT-2.1 là loài *Cladosporium pulvericola*. Chỉ có chủng 2104NT-1.5 là đề sp. Kiểm tra xem danh mục các loài đã công bố ở Việt Nam có hay chưa. nếu chưa mình có thể kết luận là loài ghi nhận mới cho Việt Nam. Đề xuất, các chủng này cần phân tích chi tiết hình thái về phân loại đồng thời kiểm nghiệm thêm các chỉ thị khác như 28S, BenA, CaM, and RPB2. Có thể nội dung này cho nghiên cứu tiếp theo.

7. Nếu tác giả chưa viết bài báo khoa học thì nội dung của luận văn có thể được viết thành các bài báo để gửi đăng trên tạp chí khoa học, sách chuyên ngành hoặc tuyển tập công trình hội nghị khoa học cấp quốc gia, quốc tế hay không?

Đã công bố trong Kỷ yếu hội thảo. Tiến hành thêm các phân tích để công bố nội dung số 3.

8. Kết luận chung (khẳng định mức độ đáp ứng các yêu cầu đối với một luận văn Thạc sĩ; luận văn có thể đưa ra bảo vệ để nhận học vị Thạc sĩ được hay không?):

Đề tài đáp ứng các yêu cầu đối với một luận văn Thạc sĩ; luận văn có thể đưa ra bảo vệ để nhận học vị Thạc sĩ được.

Khánh Hòa, ngày 23. tháng 10. năm 2023



Hồ Văn Thê

Người nhận xét
(Ký, ghi rõ họ tên)

NS
Nguyễn Xuân Vỹ

Lưu ý:

- Nhận xét được làm thành 02 bản, có chữ ký của người nhận xét và xác nhận của cơ quan công tác (nếu đang công tác) và gửi về phòng Đào tạo 02 ngày trước buổi bảo vệ.
- Địa chỉ liên hệ: CV. Nguyễn Thị Minh Tâm phòng Đào tạo, Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội. ĐT02438689977- 0946082099

**BẢN GIẢI TRÌNH CHỈNH SỬA LUẬN VĂN
THEO KẾT LUẬN CỦA HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN VĂN THẠC SĨ**

Họ tên học viên: Bùi Thị Nam Phương

Lớp: BIO 21B

Tên đề tài luận văn: Nghiên cứu tuyển chọn chủng vi nấm có hoạt tính sinh học được phân lập từ rong biển ở vịnh Nha Trang.

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8420114

Người hướng dẫn khoa học: TS. Phan Thị Hoài Trinh

Ngày bảo vệ luận văn: 24/10/2023

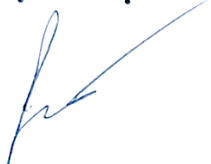
Căn cứ biên bản họp hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ, học viên đã chỉnh sửa luận văn như sau:

STT	Nội dung đề nghị bổ sung, chỉnh sửa	Nội dung đã bổ sung, chỉnh sửa
1	Bổ sung đầy đủ danh mục chữ viết tắt	Đã bổ sung đầy đủ danh mục chữ viết tắt (Trang 6)
2	Cần xem xét cụm từ “vi nấm có nguồn gốc từ rong biển” hay “vi nấm phân lập từ rong biển”	Đã sửa cụm từ “vi nấm có nguồn gốc từ rong biển” thành “vi nấm được phân lập từ rong biển” (Trang 11)
3	Cần nêu rõ mục đích sử dụng rotenone trong phần phương pháp thử nghiệm hoạt tính bảo vệ tế bào cơ tim	Đã bổ sung thông tin độc tố rotenone trong phần phương pháp thử nghiệm hoạt tính bảo vệ tế bào cơ tim (Trang 44)
4	Cần nêu rõ vì sao lựa chọn 05 chủng vi nấm để định danh	Đã nêu rõ lý do lựa chọn 05 chủng vi nấm để định danh dựa trên hoạt tính sinh học (Trang 69)

5	Thống nhất cách trích dẫn tài liệu tham khảo	Đã chỉnh sửa cách trích dẫn tài liệu tham khảo theo sổ trong luận văn
6	Rà soát, chỉnh sửa các lỗi chính tả, thuật ngữ khoa học trong luận văn	Đã rà soát, chỉnh sửa các lỗi chính tả, thuật ngữ khoa học trong luận văn

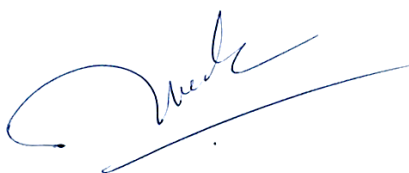
Hà Nội, ngày tháng năm 2023

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG



PGS.TS. Đào Việt Hà

CÁN BỘ HƯỚNG DẪN



TS. Phan Thị Hoài Trinh

HỌC VIÊN



Bùi Thị Nam Phương

XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO