

NGÔ VÂN ANH

NGÀNH SINH HỌC THỰC NGHIỆM

NĂM 2026

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



NGÔ VÂN ANH

**NGHIÊN CỨU HOẠT TÍNH ỨC CHẾ VI SINH VẬT KIỂM
ĐỊNH CỦA VI NẤM PHÂN LẬP TỪ TRẦM TÍCH VÙNG
ĐÀM PHÁ TAM GIANG - CẦU HAI**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Hà Nội - 2026

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



NGÔ VĂN ANH

**NGHIÊN CỨU HOẠT TÍNH ỨC CHẾ VI SINH VẬT KIỂM ĐỊNH
CỦA VI NẤM PHÂN LẬP TỪ TRẦM TÍCH VÙNG ĐÀM PHÁ TAM
GIANG - CẦU HAI**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1. TS. Trần Thị Hồng
2. PGS. TS. Bùi Hữu Tài

Hà Nội - 2026

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu “*Nghiên cứu hoạt tính ức chế vi sinh vật kiểm định của vi nấm phân lập từ trầm tích vùng đầm phá Tam Giang - Cầu Hai*” 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 nhất. 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.

Hà Nội, ngày 15 tháng 6 năm 2026

Tác giả luận văn

(Ký và ghi rõ họ tên)



Ngô Văn Anh

LỜI CẢM ƠN

Trước hết, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành tới thầy cô hướng dẫn là TS. Trần Thị Hồng công tác tại Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam và PGS. TS. Bùi Hữu Tài công tác tại Viện Hóa học đã trực tiếp hướng dẫn, tận tình chỉ bảo và hỗ trợ tôi trong suốt quá trình thực hiện nghiên cứu và hoàn thiện luận văn này.

Tôi cũng xin chân thành cảm ơn Ban Lãnh đạo, Phòng Đào tạo cùng toàn thể giảng viên Khoa Sinh học, Học viện Khoa học và Công nghệ, đã truyền đạt những kiến thức nền tảng và chuyên sâu, tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình học tập.

Bên cạnh đó, tôi xin gửi lời cảm ơn tới Lãnh đạo Viện Nghiên cứu Khoa học Miền Trung và Viện Hóa Học đã hỗ trợ và tạo điều kiện để tôi triển khai nghiên cứu.

Cuối cùng, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn tới gia đình và bạn bè - những người luôn động viên, hỗ trợ và là chỗ dựa tinh thần vững chắc cho tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu khoa học.

Xin trân trọng cảm ơn!

Hà Nội, ngày 15 tháng 6 năm 2026

Tác giả luận văn

(Ký và ghi rõ họ tên)



Ngô Văn Anh

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN.....	ii
MỤC LỤC.....	iii
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT	v
DANH MỤC CÁC BẢNG	vi
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ.....	vii
MỞ ĐẦU	1
Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU	3
1.1. Khái quát sơ bộ về hệ đầm phá Tam Giang - Cầu Hai	3
1.2. Sơ lược một số vi sinh vật gây bệnh sử dụng trong nghiên cứu	4
1.3. Tổng quan về vi nấm biển.....	7
1.4. Tình hình nghiên cứu vi nấm đầm phá ven biển trên Thế giới.....	10
1.5. Tình hình nghiên cứu vi nấm đầm phá ven biển ở Việt Nam.....	14
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	16
2.1. Đối tượng nghiên cứu.....	16
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu.....	16
2.1.2. Hóa chất, dụng cụ và thiết bị.....	16
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	18
2.2.1. Phương pháp thu thập mẫu.....	18
2.2.2. Phương pháp phân lập các chủng vi nấm từ trầm tích vùng đầm phá Tam Giang - Cầu Hai.....	19
2.2.3. Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của các chủng vi nấm phân lập được	19
2.2.4. Phương pháp định danh chủng vi nấm tuyển chọn.....	20
2.2.5. Phương pháp xác định các thông số lên men vi nấm và tạo cặn chiết.....	21
2.2.6. Phương pháp phân lập, phân tích hóa học hợp chất thứ cấp của chủng vi nấm.....	22
2.2.7. Phương pháp đánh giá hoạt tính đối kháng vi sinh vật kiểm định của cao chiết và hợp chất.....	23
2.2.8. Phương pháp xử lý số liệu nghiên cứu.....	24

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	25
3.1. Kết quả phân lập và tuyển chọn các chủng vi nấm có hoạt tính ức chế một số chủng vi sinh vật kiểm định từ trầm tích đầm phá Tam Giang - Cầu Hai	25
3.2. Kết quả định danh một số chủng vi nấm có hoạt tính cao được tuyển chọn	28
3.3. Kết quả xác định các điều kiện lên men thích hợp chủng vi nấm <i>Talaromyces stipitatus</i>	36
3.4. Kết quả phân lập hợp chất thứ cấp từ chủng vi nấm tuyển chọn.....	39
3.5. Kết quả phân tích cấu trúc hóa học của 3 hợp chất lựa chọn.....	43
3.5.1. Emodin (1).....	43
3.5.2. (22E,24R)-ergosta-4,7,22-trien-3-one (3).....	45
3.5.3. 3 β -hydroxy-5,8-epidioxyergosta-6,22-diene (6).....	47
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	52
KẾT LUẬN	52
KIẾN NGHỊ	52
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	53
PHỤ LỤC	1

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT

TT	Ký hiệu và chữ viết tắt	Chữ viết đầy đủ Tiếng Anh	Nghĩa Tiếng Việt
1	μg	Micro	Microgam
2	μM	Micro Molar	Micromol
3	IC	Inhibitory Concentration	Nồng độ ức chế
4	EC	Effective Concentration	Nồng độ hiệu quả
5	$\text{I}\kappa\text{B}\alpha$	Inhibitor of kappa B alpha	Chất ức chế kappa B alpha
6	LPS	Lipopolysaccharide	Lipopolysaccharide
7	EPSs	Exopolysaccharides	Ngoại bào polysaccharide
8	IAV	Influenza A virus	Virus cúm A
9	DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
10	ASM	Astemizole	Astemizole
11	NSs	Nitrobenzoylsesquiterpenoids	Các hợp chất nitrobenzoylsesquiterpenoid
12	RANKL	Receptor Activator of Nuclear factor κB Ligand	Phối tử hoạt hóa thụ thể yếu tổ nhân κB
13	HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
14	DMSO	Dimethyl sulfoxide	Dimethyl sulfoxide
15	MIC	Minimum Inhibitory Concentration	Nồng độ ức chế tối thiểu
16	LB	Luria-Bertani	Môi trường Luria-Bertani
17	PDA	Potato Dextrose Agar	Môi trường Potato Dextrose Agar

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 3.1. Các chủng vi nấm phân lập có hoạt tính đối kháng (D - d = mm)	27
Bảng 3.2. Bảng phân loại vi nấm bằng hình thái khuẩn lạc và bào tử.....	29
Bảng 3.3. Tổng hợp các thông số lên men ảnh hưởng đến khối lượng cao chiết vi nấm <i>Talaromyces stipitatus</i> (g/L)	37
Bảng 3.4. Tổng hợp các thông số lên men ảnh hưởng đến hoạt tính ức chế vi khuẩn kiểm định của cao chiết vi nấm <i>Talaromyces stipitatus</i> (D - d = mm)....	37
Bảng 3.5. Giá trị MIC của 8 hợp chất phân lập ($\mu\text{g/mL}$).....	42
Bảng 3.6. Số liệu phổ NMR của hợp chất Emodin.....	44
Bảng 3.7. Giá trị phổ NMR của hợp chất 3.	46
Bảng 3.8. Số liệu phân tích NMR của chất 6.....	48

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ

Hình 2.1. Vị trí lấy mẫu tại hệ đầm phá Tam Giang - Cầu Hai.....	19
Hình 3.1. Hình ảnh vi nấm trên 4 môi trường phân lập.....	25
Hình 3.2. Đối kháng của TG3-SaN5 với 4 loại vi khuẩn kiểm định	28
Hình 3.3. Cây phân loại 3 chủng vi nấm tuyển chọn.....	34
Hình 3.4. Sơ đồ phân đoạn và tinh sạch hợp chất từ vi nấm <i>Talaromyces stipitatus</i>	40
Hình 3.5. Công thức cấu tạo và phân tích HMBC của hợp chất 1.....	43
Hình 3.6. Công thức cấu tạo của hợp chất 3	45
Hình 3.7. Công thức cấu tạo của hợp chất 6	47

MỞ ĐẦU

Môi trường biển và các hệ đầm phá ven bờ được biết đến là nơi chứa đựng nhiều dạng sống vi sinh vật có độ phong phú và đa dạng về thành phần loài. Các công bố mới nhất về vi nấm biển đã cho thấy chúng có thể sinh trưởng và phát triển ở nhiều môi trường sống khác nhau như nước biển, vùng nước ven biển, trầm tích biển sâu, vùng nước siêu mặn, rừng ngập mặn, đầm lầy muối hay thậm chí cả ở điều kiện khắc nghiệt như miệng phun thủy nhiệt. Nhờ đó mà vi nấm biển đã được các nhà khoa học chứng minh là vi sinh vật có khả năng sản sinh các hợp chất mới có khả năng kiểm soát sinh học cao, chống lại nấm gây bệnh trên cây trồng và đặc biệt là có khả năng ức chế khối u, tế bào ung thư, một số bệnh lý nghiêm trọng khác. Đồng thời vi nấm biển cũng là nguồn thu nhận phong phú các chất chuyển hóa thứ cấp mới. Nhưng chưa có nghiên cứu nào khám phá và triển khai khai thác nguồn vi nấm từ hệ sinh thái đầm phá ven biển đầy tiềm năng.

Tại Việt Nam, đầm phá về cơ bản tập trung ở miền Trung - khu vực có nguồn bồi tích cát ven bờ, động lực sóng mạnh nhưng biên độ thủy triều không đáng kể. Theo thống kê, có đến 12 đầm phá điển hình đặc trưng bậc nhất với diện tích hợp thành khoảng 458 km² từ thành phố Huế cho đến Ninh Thuận, chiếm khoảng 21% chiều dài bờ biển nước ta. Đặc biệt, hệ đầm phá Tam Giang - Cầu Hai dài 70 km, rộng 216 km², được xếp vào hệ đầm phá hàng đầu về quy mô tại Việt Nam và Đông Nam Á đồng thời thuộc loại lớn trên thế giới. Hệ đầm phá này được định danh như một dạng sinh thái điển hình tại miền Trung - Việt Nam, được hợp thành từ chuỗi các đầm phá nhỏ như Tam Giang - Đầm Sam - An Truyền - Hà Trung - Thúy Tú - Cầu Hai. Mặc dù diện tích rộng và hình thái lạ kéo dài nhưng toàn bộ hệ đầm phá chỉ thông với biển qua một cửa chính là cửa Thuận An, trong khi cửa Tư Hiền có trạng thái đóng mở phụ thuộc vào điều kiện động lực và thủy hải văn. Ngoài ra, đầm phá còn nhận nguồn nước ngọt từ các sông lớn như Ô Lâu, Hương, Bồ, Đại Giang và vô số khe suối, lạch nhỏ khác với lưu lượng thay đổi theo mùa, làm cho điều kiện môi trường trở nên biến động và phức tạp. Những yếu tố này góp phần tạo nên sự phong phú cao về mặt sinh học cho hệ đầm phá Tam Giang - Cầu Hai, đồng thời mở ra tiềm năng lớn trong việc khai thác nguồn vi nấm có giá trị.

Từ những lý do quan trọng trên, đề tài “**Nghiên cứu hoạt tính ức chế**

vi sinh vật kiểm định của vi nấm phân lập từ trầm tích vùng đầm phá Tam Giang - Cầu Hai” được thực hiện. Kết quả nghiên cứu đã giúp bổ sung cơ sở lý luận và mở ra hướng phát triển về mặt nghiên cứu và ứng dụng vi nấm đầm phá để phục vụ cho y học, nông nghiệp. Đồng thời, kết quả thu được từ các thí nghiệm đã giúp cung cấp số liệu và kiến thức nền tảng khoa học cho việc tuyển chọn và khai thác, sản xuất hợp chất có khả năng kháng khuẩn tự nhiên từ các chủng vi nấm, qua đó khẳng định giá trị và tiềm năng ứng dụng của nguồn tài nguyên vi sinh vật tại các hệ đầm phá ven biển Việt Nam.

Mục tiêu của đề tài:

- Phân lập và tuyển chọn được một số chủng vi nấm có hoạt tính ức chế một số chủng vi sinh vật kiểm định từ trầm tích vùng đầm phá Tam Giang - Cầu Hai.
- Phân lập được 1-2 hợp chất có hoạt tính ức chế cao một số chủng vi sinh vật kiểm định từ các chủng vi nấm tuyển chọn.

Nội dung nghiên cứu:

- Phân lập và tuyển chọn các chủng vi nấm có hoạt tính ức chế một số chủng vi sinh vật kiểm định từ trầm tích vùng đầm phá Tam Giang - Cầu Hai.
- Định danh hình thái và sinh học phân tử một số chủng vi nấm có hoạt tính cao.
- Nghiên cứu các thông số lên men thích hợp cho việc tạo cặn chiết vi nấm.
- Phân lập hợp chất thứ cấp và xác định cấu trúc của 1 - 2 hợp chất có hoạt tính ức chế cao.

Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. KHÁI QUÁT SƠ BỘ VỀ HỆ ĐÀM PHÁ TAM GIANG - CẦU HAI

Hệ đầm phá ven biển là dạng thủy vực đặc trưng của vùng duyên hải, được hình thành vào giai đoạn Holocene muộn dưới tác động tổng hợp của nhiều quá trình địa chất - địa mạo như bồi tụ trầm tích sông - biển, dao động mực nước biển và sự phát triển của các dải cồn cát ven bờ. Quá trình tiến hóa kéo dài này đã tạo nên các hệ đầm phá dạng kín hoặc bán kín, có khả năng tích tụ lượng lớn trầm tích và vật chất hữu cơ, qua đó hình thành môi trường sống tốt nhất cho quá trình sinh trưởng của vi sinh vật. Tại Việt Nam, hệ đầm phá này được xem là một trong những hệ tiêu biểu với diện tích khoảng 216 km², chiều dài gần 70 km, chiều rộng dao động từ 0,6 đến 8 km, độ sâu trung bình từ 1,5 - 2 m [1].

Về điều kiện khí hậu, do chịu ảnh hưởng trực tiếp của khí hậu nhiệt đới gió mùa, với hai mùa có sự phân hóa rõ rệt là mùa mưa và mùa khô. Hệ đầm phá được cấu thành từ chuỗi các đầm nhỏ liên kết với nhau gồm Tam Giang, Đầm Sam, An Truyền, Hà Trung, Thủy Tú và Cầu Hai. Phía Tây giáp vùng đồng bằng ven biển và hệ thống sông ngòi nội địa như sông Ô Lâu, sông Bồ và sông Hương, trong khi phía Đông được phân cách với biển Đông bởi dải cồn cát kéo dài liên tục. diện tích rộng cùng với hình thái trải dài đặc trưng, nhưng hệ đầm phá chỉ thông với biển qua cửa Thuận ở phía Bắc còn cửa Tư Hiền ở phía Nam thường đóng mở theo điều kiện địa động lực - thủy hải văn. Trong mùa mưa, các sông lớn như sông Hương, sông Bồ, sông Ô Lâu đổ vào đầm phá một lượng lớn nước ngọt làm giảm độ mặn và tăng trữ lượng chất hữu cơ cũng như các trầm tích lơ lửng. Trái ngược với mùa mưa, mùa khô có hiện tượng xâm nhập mặn từ biển Đông vào hệ thủy vực thông qua các cửa biển làm tăng độ mặn và thay đổi cấu trúc thủy hóa của hệ đầm phá. Nhờ có sự dao động mạnh mẽ về độ mặn, pH, hàm lượng oxi hòa tan và chất dinh dưỡng đã tạo nên môi trường nước lợ đặc trưng, thuận lợi duy trì sự tồn tại và phát triển của quần xã sinh vật nói chung và vi sinh vật, vi nấm nói riêng - góp vai trò thiết yếu trong chu trình vật chất và năng lượng của hệ sinh thái đầm phá [2]. Đồng thời hình thành các gradient sinh thái rõ rệt theo cả không gian và thời gian.

Trầm tích đáy là một hợp phần quan trọng trong hệ sinh thái đầm phá Tam Giang - Cầu Hai, với thành phần chủ yếu gồm bùn, bùn cát và cát mịn.

Trong đó, trầm tích bùn giàu chất hữu cơ thường tập trung phổ biến ở khu vực trung tâm đầm phá và những vùng chịu ảnh hưởng mạnh của dòng chảy sông. Chính đặc điểm trầm tích giàu dinh dưỡng và ổn định về mặt không gian đã tạo nên điều kiện thuận lợi cho sự phát triển đa dạng của các quần xã vi sinh vật bao gồm vi khuẩn, xạ khuẩn và đặc biệt là vi nấm. Vi nấm xuất hiện trong trầm tích giữ vai trò quan trọng trong quá trình phân hủy và chuyển hóa chất hữu cơ từ sinh vật thủy sinh, xác bã thực vật và chất thải từ các hoạt động nuôi trồng thủy sản.

Cấu trúc quần xã sinh vật đầm phá Tam Giang - Cầu Hai khá đặc biệt vừa phản ánh đặc điểm khu hệ ven bờ phía Tây Vịnh Bắc Bộ, vừa thể hiện tính chuyển tiếp với các khu hệ phía Nam. Hệ đầm phá được đánh giá là hệ sinh thái có năng suất sinh học cao, là nơi lưu giữ nguồn giống sinh vật thủy sinh và biểu hiện sự đa dạng sinh cảnh cao như vùng cửa sông, đầm lầy và thảm cỏ thủy sinh - là nơi giàu dinh dưỡng, nguồn giống, nguồn lợi thủy hải sản, vi sinh vật. Trong môi trường nước lợ và trầm tích giàu chất hữu cơ, vi sinh vật phát triển với mật độ cao và biểu hiện mức độ đa dạng lớn (vi khuẩn, vi khuẩn cổ, xạ khuẩn, vi tảo và vi nấm).

Các nghiên cứu về vi sinh vật tại khu vực này cho thấy mật độ vi khuẩn và vi sinh vật dị dưỡng trong nước, trầm tích tương đối cao, đặc biệt tại những vùng chịu ảnh hưởng mạnh của dòng chảy sông. Hàm lượng chất hữu cơ và chất dinh dưỡng tích tụ trong trầm tích tạo điều kiện thuận lợi cho sự phát triển của các nhóm vi khuẩn phân hủy cellulose, protein, lipid và các hợp chất hữu cơ phức tạp. Dưới sự ảnh hưởng của việc phân bố oxy không đồng đều theo chiều sâu đã hình thành nên các vi môi trường hiếu khí, yếm khí và kỵ khí từ đó hình thành các nhóm vi sinh vật có chức năng sinh thái khác nhau. Ở lớp bề mặt trầm tích giàu oxy các vi khuẩn hiếu khí và vi nấm phát triển tốt từ đó giúp cho quá trình phân hủy các chất hữu cơ sơ cấp được đẩy mạnh. Trong khi đó, ở lớp trầm tích sâu hơn, nơi hàm lượng oxy thấp, các vi khuẩn yếm khí như vi khuẩn khử sulfide, vi khuẩn khử nitrat giữ vị trí ưu thế, đảm nhận vai trò chủ chốt trong chu trình lưu huỳnh, nito.

1.2. SƠ LƯỢC MỘT SỐ VI SINH VẬT GÂY BỆNH SỬ DỤNG TRONG NGHIÊN CỨU

Vi sinh vật gây bệnh là những tác nhân có khả năng xâm nhập vào cơ thể vật chủ, sinh trưởng và gây tổn thương, từ đó dẫn đến các trạng thái bệnh

lý ở người, động vật và thực vật. Trong nghiên cứu vi sinh học ứng dụng, các nhóm vi sinh vật này, đặc biệt là vi khuẩn và vi nấm, thường được sử dụng làm chủng vi sinh vật kiểm định nhằm đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật của các hợp chất tự nhiên. Sự tương tác giữa vi sinh vật gây bệnh và vật chủ là một quá trình phức tạp, chịu ảnh hưởng bởi độc lực của vi sinh vật, khả năng thích nghi với môi trường và đặc biệt nhất là có cơ chế “né tránh hệ miễn dịch” [3].

Trong số đó, vi khuẩn gây bệnh là nhóm được nghiên cứu nhiều nhất do khả năng gây ra nhiều bệnh truyền nhiễm nguy hiểm. Dựa vào cấu trúc thành tế bào, vi khuẩn được chia ra làm 2 nhóm chính là Gram dương (+) và Gram âm (-), với độ nhạy cảm trước các tác nhân kháng khuẩn là có sự khác nhau ở từng nhóm. Các chủng vi sinh vật thường được sử dụng làm vi sinh vật kiểm định trong các nghiên cứu sàng lọc bao gồm *Staphylococcus aureus* và *Bacillus subtilis*, cùng với *Escherichia coli* và *Pseudomonas aeruginosa*. Đây là những chủng đại diện cho các nhóm vi khuẩn gây bệnh phổ biến, có ý nghĩa thực tiễn cao trong y học [4]. Ngoài ra, nấm men gây bệnh như *Candida albicans* cũng thường được sử dụng nhằm đánh giá hoạt tính kháng nấm của các hợp chất sinh học.

Nhóm vi khuẩn Gram (+) có thành tế bào dày, trong đó lớp peptidoglycan chiếm tỷ lệ lớn (khoảng 20 – 80% khối lượng tế bào), giúp chúng giữ được màu tím của thuốc nhuộm crystal violet trong kỹ thuật nhuộm Gram. Thành tế bào của nhóm này còn chứa acid teichoic và lipoteichoic, đóng vai trò trong việc duy trì cấu trúc và tham gia vào cơ chế gây bệnh. Do không có màng ngoài, vi khuẩn Gram dương thường thể hiện độ nhạy cảm hơn đối với một số kháng sinh tác động lên quá trình sinh tổng hợp thành tế bào như β -lactam [5]. Các chi phổ biến như *Staphylococcus*, *Streptococcus* và *Bacillus* trong đó nhiều loài có khả năng sinh độc tố hoặc hình thành bào tử góp phần làm tăng độc lực và giúp chúng gia tăng khả năng sinh trưởng trong điều kiện khắc nghiệt. *Bacillus cereus* là vi khuẩn hiếu khí hoặc kỵ khí tùy nghi, có khả năng sinh nhiều enzyme ngoại bào và độc tố gây ngộ độc thực phẩm [6]. Nhờ cơ chế sản sinh ra bào tử bền vững, *B. cereus* có thể tồn tại trong môi trường khắc nghiệt nên thường được sử dụng làm đối chứng dương trong các thí nghiệm đánh giá hiệu quả ức chế của các hợp chất kháng khuẩn [3]. Bên cạnh đó, *Staphylococcus aureus* là vi khuẩn hình cầu, Gram (-), sắp

xếp thành cụm giống chùm nho và là tác nhân gây bệnh quan trọng, có thể gây ra nhiều bệnh lý như nhiễm trùng da, nhiễm trùng huyết và các bệnh nghiêm trọng khác. *S.aureus* có khả năng sinh độc tố và tạo màng sinh học (biofilm) làm tăng mức độ kháng kháng sinh [7], do đó chủng này thường được sử dụng phổ biến trong các nghiên cứu về hoạt tính kháng khuẩn [8].

Vi khuẩn Gram (-) có cấu trúc thành tế bào phức tạp hơn, với một lớp peptidoglycan mỏng được phân bố giữa hai lớp màng: màng sinh chất bên trong và màng ngoài bên ngoài. Màng ngoài chứa lipopolysaccharide (LPS), trong đó thành phần lipid A có thể hoạt động như nội độc tố (endotoxin) gây phản ứng viêm mạnh ở vật chủ [9]. Cấu trúc này tạo nên hàng rào bảo vệ hiệu quả, giúp vi khuẩn Gram (-) có khả năng đề kháng cao hơn với nhiều loại kháng sinh và tác nhân kháng khuẩn. Các đại diện phổ biến gồm *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Salmonella* và *Enterobacter*, nhiều loài trong số đó là tác nhân gây bệnh quan trọng trong lĩnh vực y học. *Escherichia coli* là vi khuẩn có hình que, thuộc họ *Enterobacteriaceae*, thường được tìm thấy trong đường ruột người và động vật, gây bệnh đường tiêu hóa và nhiễm trùng tiết niệu. Nhờ cấu trúc màng ngoài đặc trưng, *E.coli* đã được công bố là có khả năng đề kháng tương đối cao với nhiều loại kháng sinh [9], nên thường được ứng dụng làm chủng kiểm định. *Pseudomonas putida* có hình que, hiếu khí, phân bố rộng trong môi trường tự nhiên. Mặc dù ít gây bệnh hơn *Pseudomonas aeruginosa*, loài này có khả năng thích nghi cao và hệ enzyme chuyển hóa đa dạng. *Pseudomonas* spp. nói chung nổi tiếng với khả năng đề kháng kháng sinh nội tại và sinh trưởng trong nhiều điều kiện môi trường [3]. *Salmonella typhimurium* - tác nhân chính gây ngộ độc thực phẩm và nhiễm trùng đường ruột phổ biến nhờ khả năng xâm nhập vào tế bào biểu mô ruột và gây viêm [10]. Ngoài ra, *Enterobacter aerogenes* (nay được phân loại lại là *Klebsiella aerogenes*) thuộc họ *Enterobacteriaceae* là vi khuẩn gây nên các nhiễm trùng bệnh viện như nhiễm trùng đường hô hấp và tiết niệu, đặc biệt là kháng beta-lactam thông qua cơ chế sản xuất enzyme β -lactamase [11].

Đối với chủng nấm men phổ biến - *Candida albicans* thường xuất hiện như một thành phần của hệ vi sinh vật bình thường trên cơ thể vật chủ. Tuy nhiên, khi hệ miễn dịch suy yếu, loài này có thể gây ra các nhiễm trùng từ nhẹ đến nặng như viêm niêm mạc hoặc nhiễm nấm toàn thân. Chúng có khả năng chuyển đổi hình thái từ dạng nấm men sang dạng sợi giả (tính lưỡng hình)

góp phần làm tăng độc lực và khả năng kháng thuốc kháng nấm [12].

Một trong những thách thức lớn hiện nay là sự gia tăng nhanh chóng của hiện tượng kháng kháng sinh ở các vi sinh vật gây bệnh. Nhiều chủng vi khuẩn đã phát triển các cơ chế kháng thuốc như biến đổi vị trí tác động của thuốc, sản sinh enzyme bất hoạt kháng sinh hoặc tăng cường bơm tống thuốc ra khỏi tế bào [13]. Thực trạng này làm suy giảm hiệu quả của các kháng sinh hiện có và đặt ra nhu cầu cấp thiết trong việc tìm kiếm các hợp chất kháng vi sinh vật mới, đặc biệt từ nguồn tự nhiên.

Trong bối cảnh đó, vi nấm được xem là một trong những nguồn tài nguyên sinh học dồi dào cho việc phát hiện các hợp chất có hoạt tính sinh học mới. Đặc biệt là các chủng vi nấm có nguồn gốc từ các môi trường đặc thù như trầm tích đầm phá - nơi có điều kiện biến động mạnh và áp lực cạnh tranh cao - đẩy mạnh quá trình tổng hợp và sản sinh đa dạng các chất chuyển hóa thứ cấp. Do đó, việc sử dụng các chủng vi sinh vật gây bệnh làm đối tượng kiểm định trong nghiên cứu không chỉ giúp đánh giá phổ và mức độ hoạt tính kháng vi sinh vật của các chủng vi nấm phân lập, mà còn góp phần xác định tiềm năng của chúng trong lĩnh vực y dược. Việc sử dụng các chủng vi khuẩn Gram dương, Gram âm và nấm men gây bệnh phổ biến sẽ giúp phản ánh toàn diện khả năng ức chế của các hợp chất sinh học thu được từ vi nấm trầm tích.

1.3. TỔNG QUAN VỀ VI NẤM BIỂN

Vi nấm là nhóm sinh vật nhân thực, thuộc giới Fungi, bao gồm nấm sợi và nấm men, có kích thước hiển vi và phân bố rộng trong nhiều hệ sinh thái như đất, nước ngọt, môi trường biển và trầm tích. So với vi khuẩn, vi nấm có cấu trúc tế bào hoàn chỉnh với nhân thật, kích thước rất nhỏ từ 2 - 500 μm , thành tế bào chứa chitin và hệ enzyme ngoại bào phong phú. Nhờ đó, chúng có khả năng phân hủy hiệu quả các chất hữu cơ phức tạp như cellulose, lignin, protein và chitin, đóng vai trò chủ chốt trong chu trình sinh địa hóa của carbon cũng như duy trì cân bằng sinh thái trong môi trường tự nhiên [14] [15]. Những nghiên cứu gần đây cho thấy vi nấm không chỉ phổ biến trong môi trường đất mà còn hiện diện đa dạng trong môi trường biển, nước lợ và trầm tích đầm phá, đặc biệt tại các vùng ven biển và cửa sông. Tại đây, vi nấm phải thích nghi với điều kiện môi trường mang tính biến thiên cao về độ mặn, hàm lượng oxy hòa tan và hàm lượng chất hữu cơ, từ đó hình thành các nhóm nấm chịu mặn hoặc ưa mặn với khả năng thích nghi sinh lý cao [16].

Vi nấm nói chung có khả năng phát triển mạnh trong các môi trường giàu dinh dưỡng như cơ thể sinh vật, trầm tích hoặc các mảnh vụn phân hủy từ xác động, thực vật. Những cơ chất này đóng vai trò như nguồn bám dính và cung cấp dinh dưỡng, đồng thời kích thích vi nấm tiết enzyme để phân giải các polyme sinh học phức tạp, từ đó hấp thu các chất để phục vụ cho chu trình sinh trưởng. Thành tế bào giàu chitin cũng hỗ trợ quá trình hấp thu dinh dưỡng thông qua cơ chế thẩm thấu, góp phần nâng cao hiệu quả trao đổi chất. Tuy nhiên, vi nấm được đánh giá là có độ đa dạng thấp ở các môi trường nước bề mặt do nghèo dinh dưỡng cùng sự khuếch tán nhanh nên enzyme do vi nấm tiết ra và các chất dinh dưỡng thu nhận dễ bị mất đi [20].

Trầm tích đáy được xem là môi trường giàu tiềm năng đối với vi nấm do tích tụ lượng lớn vật chất hữu cơ và có sự tập trung vi sinh vật với mật độ lớn tạo nên áp lực cạnh tranh sinh học mạnh mẽ. Trong bối cảnh này, vi nấm có xu hướng sinh tổng hợp các chất chuyển hóa thứ cấp nhằm ức chế hoặc hạn chế sự phát triển của các vi sinh vật khác. Các hợp chất này bao gồm polyketide, alkaloid, terpenoid, peptide vòng và các dẫn xuất phenolic có hoạt tính sinh học cao [17]. Lịch sử y học đã ghi nhận vai trò đặc biệt của vi nấm trong việc cung cấp nguồn kháng sinh tự nhiên như penicillin (từ *Penicillium*) và cephalosporin (từ *Acremonium*), mở ra kỷ nguyên kháng sinh hiện đại. Theo tổng quan của Bugni và Ireland hay Rateb và Ebel, số lượng hợp chất mới phân lập từ vi nấm biển và trầm tích ngày càng gia tăng, nhiều chất thể hiện hoạt tính ức chế mạnh ở mức độ sinh học đối với các vi khuẩn kiểm định như *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* cũng như các loài nấm gây bệnh. Bên cạnh đó, phân tích hệ gen đã phát hiện sự tồn tại của nhiều cụm gen sinh tổng hợp tiềm năng, được nghiên cứu thông qua các thí nghiệm khảo sát điều kiện nuôi cấy hoặc kích hoạt biểu hiện gen thích hợp [18] [19].

Nhiệt độ được coi là yếu tố môi trường có tác động lớn nhất đến sự phân bố của vi nấm. Các công bố đã cho thấy, nhiệt độ từ 25 - 30°C là ngưỡng nhiệt thích hợp nhất cho quá trình sinh trưởng và phát triển của vi nấm [21]. Các yếu tố như độ mặn, oxy hòa tan, áp suất cũng là các yếu tố nền làm ảnh hưởng đến việc kiểm soát sự phân bố của vi nấm. Sự biến động nhiệt độ trong các hệ đầm phá chịu tác động của bức xạ mặt trời, bốc hơi, dòng chảy của nước và thủy triều từ vùng duyên hải và thềm lục địa.

Bên cạnh nhiệt độ, độ mặn của nước cũng là tác nhân gây nên độ đa

dạng, sự phân bố nhiều hay ít của chúng. Trong nghiên cứu đã công bố tại biển Hoa Đông cho thấy trong 47 loài vi nấm nghiên cứu thì có khoảng 91,5% các chủng có biểu hiện sinh trưởng tốt trong môi trường bổ sung 3% NaCl so với không bổ sung. Hai cơ chế chính giúp vi nấm thích nghi với điều kiện mặn bao gồm tích tụ polyol, glycerol và cân bằng nồng độ ion nội mô. Khi tiếp xúc với NaCl, tế bào trải qua quá trình stress thẩm thấu và độc tố ion. Để giảm độc tính natri, tế bào phải duy trì nồng độ Na^+ trong tế bào thấp bằng cơ chế hạn chế sự hấp thụ Na^+ và nhanh chóng đào thải Na^+ hoặc chuyển Na^+ vào không bào [22].

Vi nấm biển được chia thành hai nhóm chính: vi nấm biển bắt buộc (obligate) và vi nấm biển không bắt buộc (facultative). Vi nấm biển bắt buộc bao gồm các loài chỉ sinh trưởng và tạo bào tử trong môi trường biển hoặc cửa sông, trong khi vi nấm biển không bắt buộc có nguồn gốc từ môi trường đất hoặc nước ngọt nhưng vẫn có khả năng phát triển và tạo bào tử ở môi trường biển. Tuy nhiên, cách phân loại này còn gây nhiều tranh luận. Jones và cộng sự [23] định nghĩa vi nấm biển bắt buộc là các loài được phân lập từ cơ chất hoặc vật liệu bất kỳ dưới biển hoặc trầm tích từ môi trường biển. Gần đây, Pang và cộng sự [24] đề xuất mở rộng khái niệm “vi nấm biển” cũng như vi nấm có nguồn gốc từ biển (marine-derived fungi), bao gồm các loài bất kỳ có khả năng sinh trưởng và/hoặc tạo bào tử trên vật liệu/cơ chất trong môi trường biển; có mối quan hệ cộng sinh với các loài sinh vật trong môi trường biển; hoặc thích hợp và tiến hóa hoặc có khả năng trao đổi chất trong môi trường biển. Ước tính hiện nay có khoảng 1,5 - 5,1 triệu loài nấm trên toàn cầu nhưng chỉ có 1% trong tổng số loài được nghiên cứu [25] [26] [27]. Tính đến tháng 2 năm 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 7 ngành khác nhau [28].

Trong hai thập kỷ gần đây, các nghiên cứu về đa dạng vi nấm biển ngày càng được mở rộng, đặc biệt thông qua các phương pháp không phụ thuộc nuôi cấy kết hợp với công nghệ giải trình tự thế hệ mới. Tuy nhiên, việc định danh vi nấm vẫn gặp khó khăn do dữ liệu trình tự ở vùng ITS còn hạn chế đối với một số nhóm. Do đó, việc kết hợp phân tích trình tự gen (ITS, 18S rRNA) với đặc điểm hình thái vẫn giữ vai trò quan trọng trong phân loại và định danh chính xác [29] [30].

Vi nấm, đặc biệt là vi nấm biển, có khả năng đồng hóa hầu hết tất cả

các nguồn carbon và nitơ khác nhau tùy theo điều kiện môi trường và mục đích sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp mà mỗi loài vi nấm lại sử dụng các nguồn khác nhau. Sự kết hợp giữa đặc điểm chung của vi nấm và sự thích nghi chuyên biệt với môi trường biển đã tạo nên giá trị sinh học đặc thù của nhóm này. So với vi nấm trên cạn, vi nấm biển thường có xu hướng tạo ra các hợp chất thứ cấp đa dạng và mới lạ hơn, qua đó mở ra tiềm năng lớn trong việc tìm kiếm các chất kháng vi sinh vật mới, đặc biệt trong bối cảnh gia tăng hiện tượng kháng kháng sinh.

Các ghi nhận đầu tiên về nấm trong môi trường đầm phá có từ năm 1894 với loài *Phaeosphaeria typharum* thuộc ngành *Ascomycota*, phân lập từ thực vật *Typha* sp., trong khi nấm men biển được ghi nhận lần đầu vào năm 1922 [31]. Tuy nhiên, đến nay, hiểu biết về nguồn gốc, phân bố và mức độ xuất hiện của vi nấm trong hệ đầm phá vẫn còn hạn chế. Giai đoạn 1970 - 2010 chứng kiến sự gia tăng nhanh chóng các nghiên cứu về sản phẩm tự nhiên từ vi nấm biển và vi nấm có nguồn gốc đầm phá. Từ năm 1970 đến 2002, đã có 272 hợp chất tự nhiên được phân lập từ 80 chủng vi nấm, trong số các chủng phân lập này chỉ 16 loài được coi là vi nấm, từ đó các thí nghiệm về hóa học đã được tiến hành và phát hiện ra 41 sản phẩm tự nhiên. 64 chủng phân lập còn lại có thể được phân thành hai nhóm: 30 chủng đại diện cho các loài nấm phổ biến và 34 phân lập chưa được xác định (hoặc chỉ được xác định ở cấp độ chung) điều đó đã trở thành khó khăn trong việc phân loại chúng là nấm từ trầm tích. Đến giữa năm 2010, số lượng chất chuyển hóa mới được mô tả đã vượt quá 1.000 chất. Từ năm 2005 đến giữa năm 2010, hơn 600 chất chuyển hóa mới đã được mô tả, có nguồn gốc từ hơn 200 chủng vi nấm phân lập chủ yếu từ tảo (21%), bọt biển (19%), trầm tích (16%) và rừng ngập mặn (15%) [32]. Tuy nhiên, chỉ có 5 chủng phân lập đại diện cho vi nấm (hai trong số đó đã được phân lập và nghiên cứu trước đó trước năm 2002), và nghiên cứu về các sinh vật này đã tìm ra 19 hợp chất mới. Rõ ràng, nguồn lực dồi dào dành cho nghiên cứu hóa học về vi nấm đã đóng góp tương đối ít vào sự hiểu biết về hóa học của vi nấm.

1.4. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU VI NẤM ĐẦM PHÁ VEN BIỂN TRÊN THẾ GIỚI

Nghiên cứu về vi nấm đầm phá ven biển chưa có báo cáo nào được công bố ở Việt Nam. Tuy nhiên, những công trình liên quan đến vi nấm phân

lập từ môi trường biển và rừng ngập mặn ven bờ đã được thực hiện tương đối nhiều. Nhiều nghiên cứu đã khẳng định vi nấm là nguồn tài nguyên sinh học phong phú, có khả năng sinh tổng hợp các hợp chất có hoạt tính sinh học cao như kháng khuẩn, kháng nấm, chống viêm và chống ung thư [33] [34]. So với vi nấm có nguồn gốc từ đất liền, các chủng vi nấm phân lập từ những môi trường đặc thù như biển, rừng ngập mặn hay đầm phá vẫn còn ít được khai thác. Tuy nhiên, nhờ mức độ đa dạng sinh học cao và khả năng thích nghi với điều kiện khắc nghiệt (độ mặn, áp suất, thiếu oxy), các vi nấm từ môi trường biển và trầm tích ngày càng thu hút sự quan tâm trong nghiên cứu nhằm tìm kiếm các chất chuyển hóa thứ cấp mới [35].

Đặc trưng của môi trường đầm phá là nước lợ với sự biến động mạnh về độ mặn theo mùa, đóng vai trò như một yếu tố chọn lọc sinh thái quan trọng đối với quần xã vi sinh vật. Các vi sinh vật tồn tại trong môi trường này thường có khả năng thích nghi tốt với sự thay đổi của áp suất thẩm thấu, pH và nhiệt độ. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng hệ sinh thái đầm phá ven biển là nơi tập trung các nhóm vi sinh vật chịu mặn (halophilic) và ưa mặn trung bình (halotolerant), bao gồm nhiều loài vi nấm và xạ khuẩn có tiềm năng sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp có giá trị [36] [37].

Trong lớp trầm tích, vi nấm là thành phần quan trọng của quần xã vi sinh vật, mặc dù thường ít được chú ý hơn so với vi khuẩn. Chúng tham gia tích cực vào quá trình phân giải các hợp chất hữu cơ phức tạp như lignin, cellulose, chitin và các polymer sinh học có nguồn gốc từ thực vật thủy sinh, tảo và sinh vật đáy. Nhờ có hệ enzyme ngoại bào, vi nấm góp phần thúc đẩy quá trình khoáng hóa vật chất hữu cơ, qua đó cung cấp nguồn cơ chất cho các nhóm vi sinh vật khác trong hệ sinh thái [36]. Bên cạnh vai trò sinh thái, vi nấm còn tham gia vào các tương tác sinh học trong quần xã, đặc biệt là cạnh tranh về không gian và dinh dưỡng với vi khuẩn và xạ khuẩn. Điều này dẫn đến sự hình thành các cơ chế đối kháng sinh học, trong đó vi nấm có thể tiết ra các hợp chất kháng sinh tự nhiên, enzyme ức chế hoặc các chất chuyển hóa thứ cấp nhằm hạn chế sự phát triển của các vi sinh vật cạnh tranh [35] [37].

Các nghiên cứu trên thế giới đã chỉ ra rằng trầm tích đầm phá và vùng cửa sông là “kho lưu trữ” đa dạng vi sinh vật với tiềm năng sinh học cao. Nhiều chủng vi nấm phân lập từ trầm tích đầm phá và vùng cửa sông đã được ghi nhận có hoạt tính kháng mạnh đối với các vi sinh vật gây bệnh như

Escherichia coli, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* và các loài nấm thuộc chi *Candida* [35] [37]. Điều này cho thấy môi trường trầm tích nước lợ là nguồn tài nguyên quan trọng trong việc tìm kiếm các hợp chất kháng vi sinh vật mới.

Nhiều nghiên cứu đã ghi nhận sự hiện diện và tiềm năng sinh học của vi nấm biển như trong nghiên cứu của Bugni và Ireland công bố vào năm 2004 đã phân lập và sàng lọc các chủng vi nấm từ trầm tích biển sâu, trong đó loài *Penicillium* và *Aspergillus* có khả năng tiết ra các chất kháng khuẩn mạnh [37]. Nghiên cứu của Sun và cộng sự cho thấy các chủng *Trichoderma*, *Fusarium* và *Cladosporium* phân lập từ trầm tích ven biển Trung Quốc có khả năng ức chế sự phát triển của nhiều vi khuẩn gây bệnh, bao gồm *Staphylococcus aureus* và *Escherichia coli* [38].

Theo tổng hợp của Blunt và cộng sự vào năm 2018, trong số hơn 300 hợp chất tự nhiên mới được phát hiện từ môi trường biển, khoảng 40% hợp chất có nguồn gốc từ vi nấm, trong đó nhiều hợp chất thể hiện hoạt tính kháng khuẩn và chống ung thư đáng chú ý [33]. Rateb và cộng sự cũng chỉ ra rằng các chi như *Aspergillus* và *Penicillium* là nguồn quan trọng của các hợp chất như polyketide, alkaloid và depsipeptide có hoạt tính sinh học mạnh [35]. Bên cạnh đó, năm 2021 nhà khoa học Zin và cộng sự đã phân lập *Penicillium citrinum* từ trầm tích biển Myanmar và phát hiện các dẫn xuất citrinin có khả năng ức chế *Staphylococcus aureus* và *Candida albicans* [39].

Số lượng các hợp chất tự nhiên từ vi nấm biển không ngừng gia tăng theo thời gian. Tính đến năm 2002 đã có 272 cấu trúc mới được công bố, đến năm 2012 và 2013, số lượng này lần lượt đạt 288 và 302 hợp chất [40]. Các hợp chất từ vi nấm biển, rừng ngập mặn ven biển thể hiện nhiều hoạt tính sinh học tiềm năng, một số lượng đáng kể các chất chuyển hóa mới có tiềm năng dược lý đã được phát hiện bao gồm đặc tính kháng sinh, kháng nấm và chống ung thư [35]. Trong giai đoạn 2017 - 2020, nhiều hợp chất mới có cấu trúc lạ chủ yếu được phân lập chủ yếu từ các chi *Penicillium* và *Aspergillus*, một số lượng lớn các hợp chất chống khối u có cấu trúc mới được phân lập từ các chi nấm biển như *Trichoderma*, *Cladosporium* và *Chaetomium* [41].

Ngoài hoạt tính kháng khuẩn và chống ung thư, một số hợp chất từ vi nấm biển còn thể hiện hoạt tính kháng virus đáng chú ý. Ví dụ, Shen và cộng sự đã phân lập hai hợp chất từ *Penicillium oxalicum* có khả năng ức chế mạnh

đối với virus khảm thuốc lá, với giá trị EC_{50} tương ứng là 100,80 và 137,78 mg/mL [42]. Ngoài ra, ba hợp chất polykone mới và sáu hợp chất có cấu trúc đã biết được nghiên cứu từ nấm *Trichoderma* sp. SCSIO 41004 có nguồn gốc từ bọt biển cũng được ghi nhận có hoạt tính ức chế virus cúm EV71 với IC_{50} đạt 25,7 μ mol/L [43]. Ngoài ra, một hợp chất từ *Cochliobolus lunatus* có khả năng ức chế protein polymease PB2. Hợp chất này đã được chứng minh là có tác dụng ức chế các bệnh nhiễm trùng do các phân nhóm khác nhau của IAV gây ra, bao gồm các hoạt động ức chế đáng kể đối với H3N2, H1N1, các chủng đột biến NA-H274Y kháng oseltamivir với IC_{50} từ 1,2 - 5,5 μ mol/L [44]. Một số hợp chất phân lập từ *Penicillium* sp. IMB 17-946 còn cho thấy hoạt động kháng vi rút phổ rộng, vi rút gây suy giảm hệ miễn dịch ở người như vi rút viêm gan C và IAV, với IC_{50} dao động từ 0,5 đến 7,7 mmol/L [45].

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 [46]. Đồng thời, các hợp chất phân tử nhỏ (phenolic, anthraquinone, xanthone, alkaloid...), các hợp chất cao phân tử như exopolysaccharide (EPS) cũng thể hiện hoạt tính chống oxy hóa mạnh nhờ đặc điểm chống oxy hóa mạnh qua các gốc tự do [47]. FS Youssel và cộng sự cũng đã đánh giá tính chất hóa học cũng như hoạt tính sinh học của các chi nấm biển như: *Acremonium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Scytalidium*, *Talaromyces*, *Trichoderma*... [48]. Chen và cộng sự đã phát hiện hoạt tính sinh học của EPS (lỗi 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 oxy 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 [49]. 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.

Ngoài ra, nhiều hợp chất mới từ vi nấm biển còn cho thấy tiềm năng trong điều trị các bệnh lý khác. Ba alkaloid mới và chín chất tương tự đã biết được tách từ nấm biển *Penicillium* Y32 có tác dụng với động mạnh vành của

tim và được đánh giá trên mô hình cá ngựa vằn sống [50]. Fluoroquinazoline alkaloid đã được nhà khoa học Li phân lập từ nấm biển *Scedosporium apiospermum* F41-1. Hợp chất này có thể làm tăng độ nhạy insulin hiệu quả, mục tiêu là nhắm vào tế bào mỡ và được đánh giá có triển vọng trong điều trị tiểu đường type 2 [51]. Các nitrobenzoylsesquiterpenoid (NSs) được chứng minh có khả năng kìm hãm sự phát triển của ba dòng tế bào ung thư thận (ACHN, OS-RC-2 và 786-O) [52].

Li và cộng sự đã phân lập hơn 60 chủng vi nấm từ trầm tích đầm phá tại đảo Hải Nam (Trung Quốc), trong đó nhiều chủng cho chỉ số kháng khuẩn và kháng nấm mạnh [53]. Những kết quả này tiếp tục khẳng định rằng trầm tích đầm phá là nguồn tài nguyên sinh học giàu tiềm năng cho việc khai thác các vi nấm có giá trị ứng dụng cao.

1.5. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU VI NẤM ĐẦM PHÁ VEN BIỂN Ở VIỆT NAM

Trong những năm gần đây, lĩnh vực nghiên cứu vi nấm biển và các hợp chất sinh học do chúng sinh tổng hợp đã bắt đầu thu hút sự quan tâm của các nhà khoa học tại Việt Nam. Tuy vậy, so với các quốc gia phát triển, số lượng công bố vẫn còn hạn chế và chủ yếu tập trung tại một số khu vực ven biển như Nha Trang, Quảng Ninh và Côn Đảo.

Một số nghiên cứu tiêu biểu có thể kể đến như công trình nghiên cứu của tác giả Nguyễn Thị Lan và cộng sự, đã phân lập được các chủng *Penicillium* và *Trichoderma* từ trầm tích vùng biển Nha Trang phát hiện một số chủng có khả năng sinh tổng hợp các hợp chất có hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định [54]. Tương tự, nhà khoa học Trần Thị Thanh đã phân lập vi nấm từ trầm tích ven biển Quảng Bình, phát hiện 5 chủng có khả năng ức chế *Bacillus subtilis* và *Candida albicans* [55]. Ngoài ra, nghiên cứu của tác giả Nguyễn Thị Ngọc Dung cho thấy dịch chiết ethyl acetate từ chủng *Aspergillus* và *Penicillium* phân lập từ trầm tích ven biển Nha Trang có khả năng ức chế *Escherichia coli* và *Bacillus subtilis* [56].

Bên cạnh đó, các nghiên cứu hợp tác giữa Viện Hóa sinh biển và Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên đã phân lập được ba hợp chất dibenzospiroketal mới là aspermicrone A-C (66-68) đã được phân lập từ cao chiết EtOAc của chủng *Aspergillus micronesiensis* thu nhận từ rong đỏ *Kappaphycus alvarezii*. Trong số này, hợp chất aspermicrone B và C thể hiện

hoạt tính kháng *Staphylococcus aureus* với giá trị MIC khoảng 123,2 μM [57]. Ngoài ra, cũng từ chủng vi nấm này, một số hợp chất polyketide oxy hóa cao như epicoccolide A, epicoccolide B và NC3B cũng được xác định, với khả năng ức chế các dòng tế bào ung thư HepG2, LU-1 và Vero (IC_{50} dao động từ 3,97 - 4,71 $\mu\text{g/mL}$) [58].

Tại khu vực biển Quảng Nam, một nghiên cứu đã phân lập chủng vi nấm *Ascomycota* sp. VK12 từ hải miên và xác định được 6 hợp chất phenolic, trong đó có một hợp chất mới cùng với 5 hợp chất đã biết như AGI-7, sescandelin và hydroxysydonic acid [59]. Tương tự, từ chủng *Xenomyrothecium* sp. IMBC-EP2.11 phân lập tại cùng khu vực, các nhà khoa học đã xác định được 7 chất chuyển hóa thứ cấp, chủ yếu thuộc nhóm isocoumarin và anthraquinone. Đáng chú ý, đây là một trong những nghiên cứu đầu tiên trên thế giới về thành phần hóa học của vi nấm *Xenomyrothecium*.

Ngoài ra, một khảo sát tại bán đảo Sơn Trà (Đà Nẵng) đã phân lập được 73 chủng nấm từ nhiều vị trí khác nhau, trong đó có nhiều chủng thể hiện hoạt tính kháng lại các vi sinh vật gây bệnh ở người như *B. cereus* ATCC 11778, *E. coli* ATCC 25922, Có tới 29 chủng trong số này có khả năng ức chế ít nhất hai chủng vi sinh vật kiểm định [60]. Đáng chú ý, một số hợp chất phân lập từ *Ascomycota* sp. VK12 như (3R)-(3,5-dihydroxyphenyl) butan-2-one và AGI-7 thể hiện hoạt tính gây độc tế bào đối với các dòng ung thư HepG2, MCF-7 và SK-Mel2, với IC_{50} trong khoảng 48,6 - 96,5 μM . Đồng thời, các hợp chất này cùng với sescandelin-B và hydroxysydonic acid còn cho thấy hoạt tính kháng viêm thông qua cơ chế ức chế sản sinh NO trên dòng tế bào BV2 [61]. Hoạt tính kháng viêm tương tự cũng được ghi nhận đối với homogentisic acid và methyl (2,5-dihydroxyphenyl) acetate phân lập từ *Aspergillus* sp. tại vùng biển Quảng Nam [59].

Mặc dù khu vực miền Trung, sở hữu hệ sinh thái đa dạng và điều kiện môi trường đặc thù, nhưng các nghiên cứu về vi sinh vật, nhất là vi nấm, vẫn còn hạn chế. Phần lớn các công trình hiện nay chủ yếu tập trung vào khảo sát đa dạng vi sinh vật trong nước và trầm tích [62], trong khi các nghiên cứu chuyên sâu về vi nấm cũng như khả năng sinh tổng hợp các hợp chất kháng khuẩn từ nguồn tài nguyên này vẫn chưa được công bố rộng rãi.

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 phân lập được từ trầm tích vùng đầm phá Tam Giang - Cầu Hai.

– Các chủng vi khuẩn kiểm định:

+ 2 chủng vi khuẩn Gram dương (+): *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538;

+ 4 chủng vi khuẩn Gram âm (-): *Escherichia coli* ATCC 11105, *Pseudomonas putida* ATCC3326K1, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 và 1 chủng nấm men *Candida albicans*.

Các chủng vi sinh vật kiểm định được cung cấp bởi Trung tâm Giống và bảo tồn nguồn gen Vi sinh vật (VCCM), Viện Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, đang được lưu giữ tại tủ (-) 30 °C tại Viện nghiên cứu Khoa học Miền Trung.

2.1.2. Hóa chất, dụng cụ và thiết bị

Hóa chất

Trong nghiên cứu này, một số hóa chất chính được sử dụng bao gồm: KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , cao thịt, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Peptone, Glucose, NaCl, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, Agar. Ngoài ra, các hóa chất thí nghiệm khác có độ tinh khiết phù hợp được cung cấp từ nhiều hãng uy tín trong và ngoài nước.

Dụng cụ

Các dụng cụ thí nghiệm sử dụng trong nghiên cứu bao gồm: đĩa Petri; micropipette và đầu tip; bình tam giác 100 ml, 250 ml, 500 ml và 1000 ml; bình Duran; ống Fancol 15 ml và 50 ml; ống Eppendorf 1,5 ml và 2 ml; que cấy vi sinh ...

Thiết bị và máy móc

Thiết bị máy móc chính sử dụng thuộc Viện Nghiên cứu Khoa học Miền Trung gồm: Tủ cấy vô trùng, tủ an toàn sinh học cấp II (Esco, Singapore); máy ủ nhiệt kèm lắc rung có làm lạnh (Eppendorf, Đức); tủ sấy, tủ ẩm (Memmert, Đức); cân kỹ thuật chuẩn nội (Sartori, Đức); thiết bị đo pH (Hanna, Romani); máy vortex (BenhMarch, Mỹ); máy khuấy từ gia nhiệt (Velp, Ý); máy ly tâm lạnh đa năng (Eppendorf, Đức); nồi hấp tiệt trùng

(Hirayama, Nhật Bản), máy PCR (Himedia, Ấn Độ), bể điện di, ...

Môi trường phân lập và nuôi cấy vi nấm

- Peptone yeast glucose agar (PYGA) (g/L): Pepton 1.0 g, cao nấm men 1.0 g, glucose 2.0 g, agar 20.0 g, nước từ đậm phá mang về đã khử trùng/nước muối biển nhân tạo 1000 mL. Khi làm bổ sung 5.0 mL kháng sinh (chlortetracycline/streptomycin) khi môi trường đã nguội.
- Sabouraud (g/L): Pepton 10.0 g, glucose 20.0 g, agar 18.0 g, nước từ đậm phá mang về đã khử trùng/nước muối biển nhân tạo 1000 mL pH 6.0 - 7.0. Khi làm bổ sung 0.15% penicillin, 0.15% streptomycin.
- Czapek-Dox (g/L): Sucrose 30 g; NaNO₃ 2.0 g, K₂HPO₄ 1.0 g, MgSO₄ 0.5 g, KCl 0.5 g; FeSO₄ 0.01 g, agar: 20 g; nước từ đậm phá mang về đã khử trùng/nước muối biển nhân tạo: 1000 mL; pH 7.3 ± 0.2.
- Môi trường dịch chiết khoai tây có bổ sung agar (PDA) (g/l): khoai tây ninh nhừ trong 1 lít nước từ đậm phá mang về đã khử trùng/nước muối biển nhân tạo 200 g, dextrose 20.0 g, agar 20.0 g, pH=5.6 ± 0.2. Bổ sung thêm kháng sinh Streptomycine khi nhiệt độ môi trường hạ xuống khoảng 50 °C.

Môi trường nghiên cứu điều kiện lên men

- PDA (g/L): khoai tây 200 g; glucose 10 g; nước từ đậm phá mang về đã khử trùng/nước muối biển nhân tạo: 1000 mL.
- Cz-D (Czapek - Dox) (g/L): saccharose 30 g; NaNO₃ 30 g; K₂HPO₄ 4 g; MgSO₄ 6,5 g; nước từ đậm phá mang về đã khử trùng/nước muối biển nhân tạo: 1000 mL.
- Sa (Sabouraud) (g/L): peptone 10 g; glucose 20 g; nước từ đậm phá mang về đã khử trùng/nước muối biển nhân tạo: 1000 mL.
- Sa1 (g/L): tinh bột tan 10 g; cao nấm men 4 g; pepton 2 g; nước từ đậm phá mang về đã khử trùng/nước muối biển nhân tạo: 1000 mL.
- Môi trường PI (g/L): Peptone 1 g; cao nấm men 1 g; glucose 2 g; nước từ đậm phá mang về đã khử trùng/nước muối biển nhân tạo: 1000 mL.

Môi trường nuôi cấy vi khuẩn kiểm định và nấm men

- LB (g/L) : Tryptone 10 g; cao nấm men 5 g, NaCl 5 g.
- PDA (g) : khoai tây 200 g; glucose 10 g.

Các môi trường chuyển từ lỏng sang thạch sẽ thêm 1,5 - 2% agar và được khử trùng ở 121 °C trong 30 phút.

Các loại dung dịch

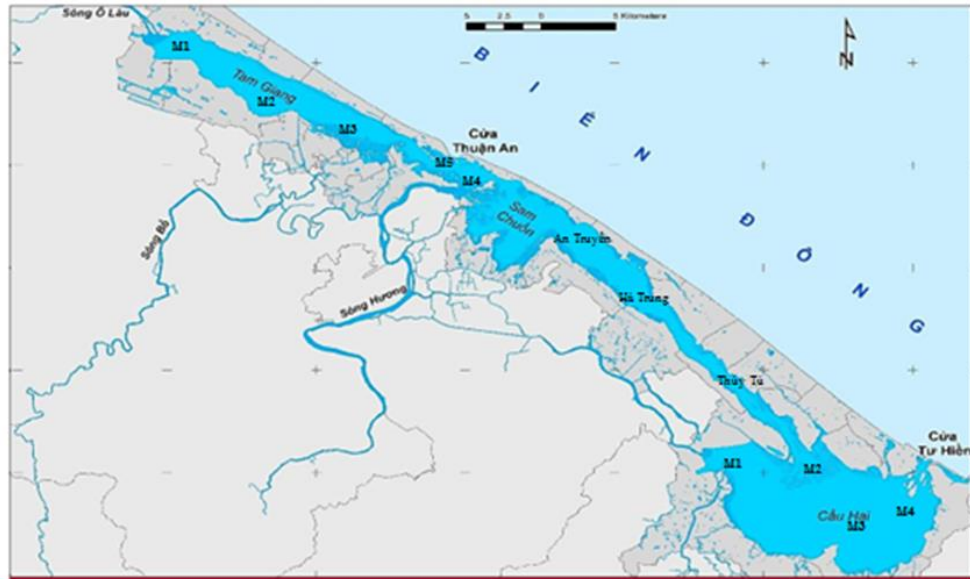
- Dung dịch glucose 0,2 %; 2 %; dung dịch saccharose 3 %.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Phương pháp thu thập mẫu

Mẫu được lấy theo phương pháp SCUBA theo quy trình hướng dẫn của Englisr và cộng sự 1997 [63]. Sử dụng gầu lấy mẫu, ống xuyên thu mẫu trầm tích đáy thích hợp. Thiết bị xuyên lấy mẫu trầm tích đáy được bố trí làm việc trong ống vô định vị, mỗi lần xuyên không vượt quá 30 - 40 cm. Mỗi mẫu vật sau khi thu được đựng trong lọ chứa mẫu vô trùng, bổ sung thêm glyxerol 20% bảo quản lạnh (đá gel khô), vận chuyển về phòng thí nghiệm.

Vị trí lấy mẫu: Vị trí lấy mẫu được thể hiện dưới Hình 1. Do hệ đầm phá Tam Giang - Cầu Hai trải dài và có cấu trúc từ phá Tam Giang đến đầm Sam - đầm An Truyền - đầm Hà Trung - đầm Thúy Tú - đầm Cầu Hai nối với nhau, nên tại các đầm nhỏ như đầm Sam - đầm An Truyền - đầm Hà Trung - đầm Thúy Tú, các mẫu trầm tích được lấy 4 điểm xung quanh và 1 điểm ở giữa đầm, rồi trộn chung thành 1 mẫu. Riêng phá Tam Giang và đầm Cầu Hai có cấu trúc đặc biệt hơn, do có sự giao thoa nhiều sông lớn và biển chảy vào nên việc lấy mẫu được bố trí như sau: Tại phá Tam Giang lấy 5 mẫu chung: Mẫu chung 1: Khu vực giao thoa của sông lớn, lạch nhỏ vào phá như sông Ô Lâu; Mẫu chung 2: Khu vực giữa phá; Mẫu chung 3: Khu vực giao thoa của sông lớn, lạch nhỏ vào phá như sông Bồ; Mẫu chung 4: Khu vực giao thoa của sông lớn, lạch nhỏ vào phá như sông Hương; Mẫu chung 5: Khu vực giao thoa với cửa biển Thuận An. Tại đầm Cầu Hai lấy 4 mẫu chung: Mẫu chung 1: Khu vực giao thoa của các sông, suối đổ vào đầm; Mẫu chung 2: Khu vực giao thoa với đầm Thủy Tú; Mẫu chung 3: Khu vực giữa đầm; Mẫu chung 4: Khu vực giao thoa với cửa biển Tư Hiền.



Hình 2.1. Vị trí lấy mẫu tại hệ đầm phá Tam Giang - Cầu Hai.

2.2.2. Phương pháp phân lập các chủng vi nấm từ trầm tích vùng đầm phá Tam Giang - Cầu Hai

Mỗi mẫu trầm tích được cân 10g, tiến hành đồng nhất mẫu và sử dụng phương pháp nghiền cối sứ. Sau đó, mẫu được huyền phù trong 90 mL nước được lấy tại khu vực vùng lấy mẫu đã tiết trùng. Rồi lắc trong máy lắc với tốc độ là 150 vòng/phút trong 20-30 phút. Hỗn hợp huyền phù sau đó để yên trong 15 phút để lắng cặn, phần dịch phía trên được hút 1 mL bằng micropipette và chuyển sang ống nghiệm có 9 mL nước muối sinh lý vô trùng. Tiến hành pha loãng thập phân liên tiếp tới 10^{-4} và 10^{-5} .

Từ dung dịch ban đầu và các nồng độ pha loãng, lấy 1 mL để cấy vào vào các đĩa petri (đường kính 220 mm) chứa các môi trường phân lập vi nấm biến (PYGA, Sabourand, Czapek-Dox và PDA). Các đĩa sau khi được cấy dịch pha loãng sẽ được ủ ở nhiệt độ từ 28 đến 30 °C trong thời gian 1-5 ngày để. Sự hình thành và phát triển của khuẩn lạc được theo dõi định kỳ, sau đó tiến hành làm thuần và lưu giữ chủng [63] [64].

2.2.3. Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của các chủng vi nấm phân lập được

Các chủng vi nấm phân lập được nuôi trong môi trường thạch gốc ban đầu ở điều kiện nhiệt độ 30 °C, trong 2-5 ngày. Đối với các chủng vi khuẩn và nấm men dùng làm đối tượng kiểm định, tiến hành hoạt hóa từ ống chủng gốc trên môi trường rắn, sau đó chọn một khuẩn lạc đơn để cấy chuyển sang môi trường lỏng và lắc ở 200 vòng/phút tại 37 °C.

Các chủng vi nấm phân lập được sẽ được tiến hành đánh giá hoạt tính đối kháng với các chủng vi sinh vật gây bệnh (vi khuẩn, nấm men và nấm mốc) bằng phương pháp đặt thỏi thạch. Cụ thể, thỏi thạch chứa nấm phân lập kích thước 8 mm được đặt lên bề mặt các đĩa thạch kiểm tra chứa vi sinh vật gây bệnh. Với thí nghiệm đánh giá hoạt tính ức chế vi khuẩn và nấm men, mật độ tế bào được điều chỉnh ở mức độ 10^5 CFU/mL, với nấm mốc thì sử dụng thỏi thạch có kích thước tương ứng vi nấm phân lập. Sau 1 - 2 ngày, tiến hành quan sát và đo đường kính vòng kháng khuẩn/ kháng nấm men hình thành xung quanh thỏi thạch.

2.2.4. Phương pháp định danh chủng vi nấm tuyển chọn

- **Phân loại dựa vào đặc điểm hình thái**

Chủng vi nấm được nuôi cấy trên môi trường Czapek-Dox agar sau 2-10 ngày ở nhiệt độ 24 - 26 °C để quan sát đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào. Tiêu bản được chuẩn bị và quan sát dưới kính hiển vi quang học nhằm ghi nhận các đặc điểm vi thể của sợi nấm và cơ quan sinh sản. Việc miêu tả được thực hiện dựa trên các tiêu chí của hệ thống phân loại bao gồm hình dạng sợi nấm, bào tử và các cơ quan sinh sản đặc trưng. Quan sát đặc điểm hình thái, cấu tạo bào tử và cơ quan sinh sản. Sau đó, dựa vào khóa phân loại của Domsch và Gams; Raper và Thom; Robert và cộng sự để xác định tên loài và đặc điểm phân loại của các chủng vi nấm [64], [65], [66].

- **Phân loại dựa vào sinh học phân tử (vùng gen ITS)**

DNA tổng số của vi nấm được tách bằng Kít Quick-DNA Fungal/Bacterial Kits theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sử dụng cặp mồi ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')/ ITS4 (5'- TCCTCCGCTTATT GATATGC-3') khuếch đại đoạn gen vùng ITS của vi nấm bằng phương pháp khuếch đại gen PCR [67] [68].

Các thành phần tham gia vào quá trình PCR bao gồm: H₂O khử ion, PCR buffer 1X, dNTPs 200 μM, MgCl₂ 2.5 mM, primer (ITS1 và ITS4) 100 μmol/ μl, Taq polymerase 0.5 U/ μl, DNA 50 ng/ μl. Tiến hành khuếch đại vùng gen ITS này chu trình nhiệt như sau: 95 °C/2 phút, 35 chu kỳ nhiệt 95 °C/30 giây, 55 °C/30 giây và 72 °C/1 phút; 72°C/10 phút [67] [68].

Giải trình tự vùng ITS, sau đó trình tự gen được tiến hành so sánh với cơ sở dữ liệu Genbank trên trang web NCBI bằng công cụ BLAST SEARCH, xử lý dữ liệu bằng phần mềm BioEdit, xây dựng cây phát sinh

chủng loại trên phần mềm MEGA X.

2.2.5. Phương pháp xác định các thông số lên men vi nấm và tạo cặn chiết

- **Phương pháp xác định các thông số lên men**

Bước 1. Nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường lên men

5 môi trường được lựa chọn thử nghiệm gồm: PDA, Czapek, Sa, Sa1 và PI. Các điều kiện lên men khác tương tự nhau như: tỷ lệ tiếp giống 3%, nhiệt độ 28 °C, thời gian nuôi 15 ngày. Sau 15 ngày lên men tiến hành định lượng cao chiết thu được đồng thời khảo sát hoạt tính ức chế vi sinh vật kiểm định theo từng loại môi trường.

Bước 2. Nghiên cứu ảnh hưởng của tỷ lệ tiếp giống

Tỷ lệ giống được khảo sát ở các mức: 1%, 3%, 7%, 10% và 15%. Các điều kiện lên men khác tương tự nhau như: môi trường lên men kế thừa bước 1, nhiệt độ 28 °C, thời gian nuôi 15 ngày. Sau 15 ngày lên men tiến hành định lượng cao chiết thu được đồng thời khảo sát hoạt tính ức chế vi sinh vật kiểm định theo từng mức tiếp giống.

Bước 3. Nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ lên men

Nhiệt độ lên men được khảo sát ở ngưỡng 18 °C, 23 °C, 28 °C, 35 °C, và 42 °C. Các điều kiện lên men khác tương tự nhau như: môi trường lên men kế thừa bước 1, tỷ lệ tiếp giống kế thừa bước 2, thời gian nuôi 15 ngày. Sau 15 ngày lên men tiến hành định lượng cao chiết thu được đồng thời khảo sát hoạt tính ức chế vi sinh vật kiểm định theo từng ngưỡng nhiệt độ khảo sát.

Bước 4. Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian lên men

Thời gian lên men được tiến hành khảo sát sau 5 ngày, 10 ngày, 15 ngày, 20 ngày và 25 ngày nuôi cấy. Các điều kiện lên men khác tương tự nhau như: môi trường lên men kế thừa bước 1, tỷ lệ tiếp giống kế thừa bước 2, nhiệt độ lên men kế thừa ở bước 3. Sau 15 ngày lên men tiến hành định lượng cao chiết thu được đồng thời khảo sát hoạt tính ức chế vi sinh vật kiểm định theo từng ngưỡng thời gian lên men.

- **Tạo cặn chiết**

Chủng vi nấm tuyển chọn được lên men theo thông số xác định, sinh khối chủng vi nấm thu được sau đó được cắt nhỏ và cho vào bình thủy tinh. Cho dung môi ethyl acetate (EtOAc) vào ngập sản phẩm vi nấm, sau đó cho vào chiết siêu âm ở 40 °C trong 2 giờ, lọc gạn thu được dịch chiết EtOAc, quá trình lặp lại 4 lần. Dịch chiết EtOAc được làm khan bằng muối

Na₂SO₄ sau đó cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu lại phần cặn chiết EtOAc. Tương tự phần cặn bã của sản phẩm vi nấm tiếp tục được chiết với dung môi methanol, quá trình thực hiện như với cặn chiết EtOAc thu được cặn MeOH. Cao chiết thô được cân khối lượng, tính hiệu suất và bảo quản trong lọ thủy tinh vô trùng ở 4 °C cho đến khi tiến hành các thí nghiệm tiếp theo [69].

2.2.6. Phương pháp phân lập, phân tích hóa học hợp chất thứ cấp của chủng vi nấm

Cao chiết thô thu được từ dịch chiết ethyl acetate (EtOAc) của chủng vi nấm được hòa tan trong một lượng nhỏ dung môi thích hợp như methanol hoặc chloroform. Sau đó, tiến hành các bước phân đoạn và tinh sạch nhằm thu nhận các hợp chất riêng biệt [69] [70].

Phân đoạn và tinh chế các hợp chất từ cao/phân đoạn chiết được thực hiện áp dụng các kỹ thuật sắc ký bao gồm: sắc ký lớp mỏng (TLC) để theo dõi và đánh giá quá trình tách, sắc ký cột thường (CC), sắc ký cột nhanh với chất hấp thụ là silica gel (Merck), sắc ký pha đảo RP-18 và sắc ký Sephadex LH-20.

- **Sắc ký lớp mỏng (TLC)**

Phương pháp TLC là kỹ thuật phân tích cho kết quả nhanh, được sử dụng phổ biến nhằm khảo sát thành phần hóa học của các dịch chiết ngoại bào hoặc các phân đoạn thu được trong quá trình tách chiết. Nguyên tắc của phương pháp là dựa trên sự khác biệt về độ phân cực của các hợp chất, từ đó dẫn đến sự di chuyển khác nhau trên bản mỏng. Đây là phương pháp vi lượng, có ưu điểm về thời gian phân tích ngắn và hiệu quả tách tương đối cao.

Trong kỹ thuật TLC, Silica gel được phủ trên nền nhôm hoặc thủy tinh. Trong quá trình sắc ký, xảy ra sự cạnh tranh hấp phụ giữa dung môi và các chất phân tích trên bề mặt chất hấp phụ. Khi đạt được trạng thái cân bằng, các hợp chất sẽ phân bố tại những vị trí khác nhau trên bản mỏng, giúp cho việc nhận diện và đánh giá định tính thành phần.

- **Sắc ký cột (CC)**

Phương pháp này được áp dụng rộng rãi để phân đoạn, phân tách, tinh chế các hợp chất dựa trên sự khác biệt về độ phân cực hoặc kích thước phân tử của các hợp chất cần phân tích. Quá trình phân lập các chất được thực hiện bằng cột sắc ký sử dụng chất pha tĩnh như silica gel hoặc Sephadex, kết hợp với các hệ dung môi rửa giải phù hợp.

Phân tích hóa học của các hợp chất sau khi tinh chế được xác định bằng các phương pháp phân tích phổ hiện đại, chẳng hạn như phổ hồng ngoại (FT-IR), phổ khối lượng (ESI-MS), phổ khối lượng phân giải cao (HR-ESI-MS), cùng với các kỹ thuật cộng hưởng từ hạt nhân $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT (phổ một chiều) và COSY, HSQC, HMBC, NOESY (phổ hai chiều).

Phổ khối được ghi nhận trên hệ thiết bị Quadrupole LC/MS của Agilent Technologies theo chế độ ion hóa phun điện tử (ESI). Các phổ NMR được đo trên máy Bruker Avance 600 (600 MHz), sử dụng TMS làm chất chuẩn nội tại Viện Hóa học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Độ quay cực được xác định bằng máy Jassco P-2000, trong khi điểm nóng chảy được đo trên thiết bị Mel-Temp 3.0 (Thermo Scientific).

- **Sắc ký lỏng hiệu năng cao điều chế (Preparative High Performance Liquid Chromatography, Prep - HPLC)**

Prep-HPLC là kỹ thuật hiện đại trong quá trình tinh sạch và thu nhận các hợp chất thứ cấp. Phương pháp này cho phép phân giải các chất dựa trên sự khác biệt về bản chất vật lý các hợp chất như độ phân cực, kích thước phân tử cũng như ái lực với pha tĩnh.

Để tối ưu hóa điều kiện phân tách, cần tiến hành khảo sát trước các thông số như hệ dung môi, thời gian lưu và tốc độ dòng bằng cách chạy thử với lượng mẫu nhỏ. Sau khi xác định được điều kiện phù hợp, tiến hành tăng lượng mẫu nạp (thường gấp 2–5 lần) và lặp lại quá trình sắc ký cho đến khi thu được lượng chất mong muốn hoặc sử dụng hết mẫu ban đầu.

2.2.7. Phương pháp đánh giá hoạt tính đối kháng vi sinh vật kiểm định của cao chiết và hợp chất

- **Đối với cao chiết**

Mẫu thử được đánh giá theo phương pháp pha loãng đa nồng độ (broth microdilution) dựa trên hướng dẫn của Andrews JM [71]. Thông qua giá trị MIC - nồng độ ức chế tối thiểu, sẽ cho phép xác định mức độ ức chế vi sinh.

Mẫu thử ban đầu được hòa tan trong DMSO và pha loãng thành dãy 8 nồng độ giảm dần, bao gồm: 256; 128; 64; 32; 16; 8; 4 và 2 $\mu\text{g/mL}$. Huyền phù vi sinh vật kiểm định (vi khuẩn hoặc nấm) được chuẩn bị với mật độ khoảng 5×10^5 CFU/mL. Tiến hành thí nghiệm bằng cách thêm 5,12 μL dung dịch mẫu (10 mg/mL) vào giếng đầu tiên chứa 100 μL môi trường LB, sau đó thực hiện pha loãng nối tiếp theo tỷ lệ 1:2 sang các giếng tiếp theo (mỗi giếng

chứa 50 μL môi trường) cho đến khi đạt nồng độ thấp nhất là 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Tiếp theo, bổ sung 50 μL huyền phù vi sinh vật vào mỗi giếng và ủ ở 37°C. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần ($n = 3$).

Sau thời gian ủ, sự phát triển của vi sinh vật được đánh giá thông qua độ đục của môi trường, đo tại bước sóng 610 nm bằng máy quang phổ (Biotek). Dữ liệu thu được được xử lý bằng phần mềm GraphPad Prism [71]. Đối chứng dương sử dụng kháng sinh kanamycin đối với vi khuẩn và cycloheximide đối với nấm.

- **Đối với hợp chất**

Cũng tương tự như đối với cao chiết, mẫu thử được hòa tan trong DMSO và pha loãng theo dãy nồng độ giảm dần gồm: 256; 128; 64; 32; 16; 8; 4 và 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Huyền phù vi sinh vật kiểm định (vi khuẩn hoặc nấm) được chuẩn bị với mật độ khoảng 2×10^5 CFU/mL. Trong quá trình thí nghiệm, 5,12 μL dung dịch mẫu (nồng độ 10 mg/mL) được thêm vào giếng đầu tiên chứa 100 μL môi trường LB, sau đó tiến hành pha loãng nối tiếp theo tỷ lệ 1:2 sang các giếng kế tiếp (mỗi giếng chứa 50 μL môi trường) cho đến khi đạt nồng độ thấp nhất là 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Tiếp theo, bổ sung 50 μL huyền phù vi sinh vật vào mỗi giếng và ủ ở 37°C trong 24 giờ. Mỗi thí nghiệm được thực hiện lặp lại 3 lần ($n = 3$). Trong đó, ciprofloxacin được sử dụng làm đối chứng dương đối với vi khuẩn và cycloheximide được dùng cho nấm.

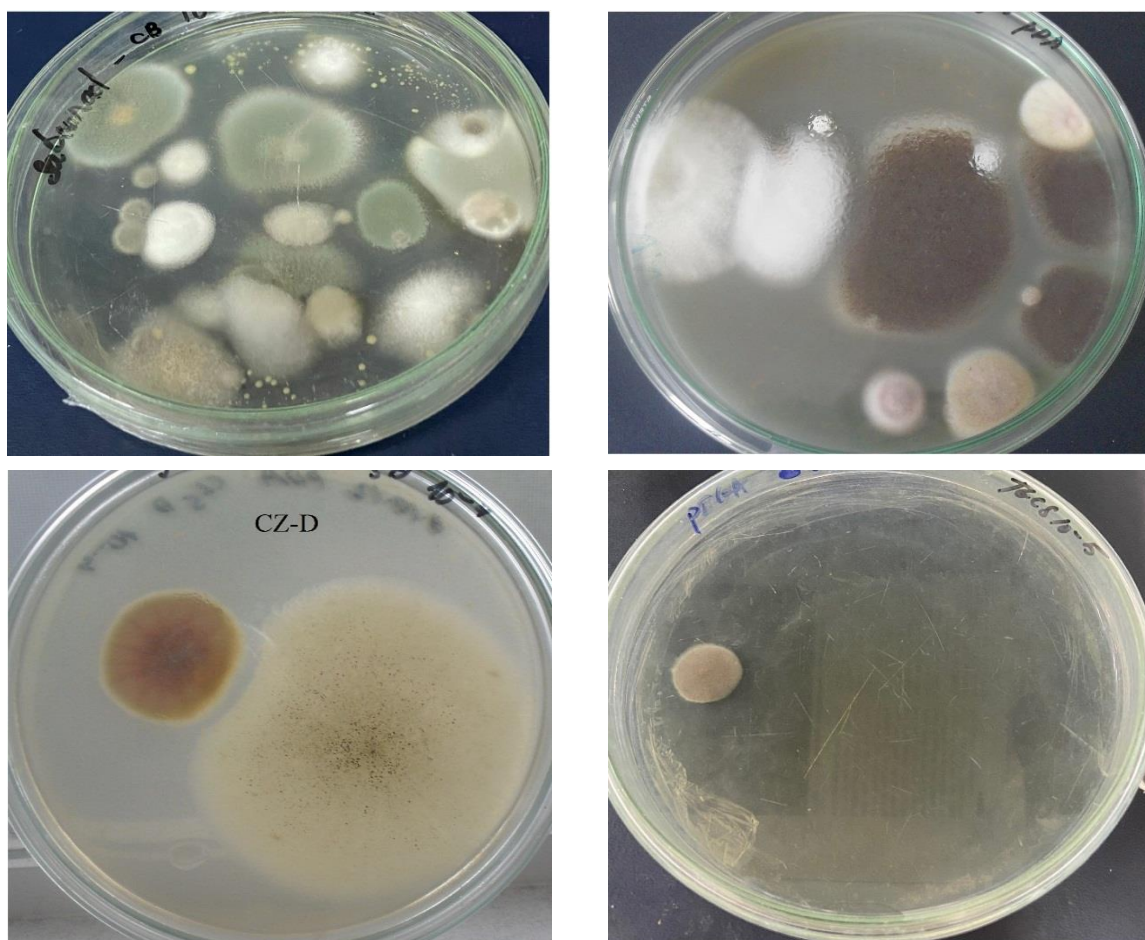
2.2.8. Phương pháp xử lý số liệu nghiên cứu

Toàn bộ thí nghiệm được tiến hành lặp lại 3 lần và số liệu được ghi nhận bằng cách tính giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn qua phần mềm Microsoft Excel 2016.

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. KẾT QUẢ PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN CÁC CHỦNG VI NẤM CÓ HOẠT TÍNH ỨC CHẾ MỘT SỐ CHỦNG VI SINH VẬT KIỂM ĐỊNH TỪ TRẦM TÍCH ĐÀM PHÁ TAM GIANG - CẦU HAI

Từ các mẫu trầm tích thu thập tại các vị trí lấy mẫu như đã liệt kê ở mục 2.2.1, đã phân lập được 106 khuẩn lạc (chủng) có hình thái vi nấm trên 4 loại môi trường đặc trưng cho phân lập vi biển và ven biển (PYGA, Sabouraud, Czapek-Dox, PDA) theo thí nghiệm đã nêu ở mục 2.2.2. Kết quả phân lập cho thấy trên môi trường Sabouraud phân lập được nhiều khuẩn lạc vi nấm nhất, hình thái, màu sắc khuẩn lạc đa dạng nhất, tiếp theo là đến môi trường PDA, Czapek-Dox, và ít nhất là môi trường PYGA (Hình 3.1).



Hình 3.1. Hình ảnh vi nấm trên 4 môi trường phân lập Tại đầm phá Tam Giang - Cầu Hai, độ mặn ở khu vực gần cửa biển và rừng ngập mặn có giá trị cao hơn so với các điểm khác trong đầm phá, các điểm gần với các cửa sông có độ mặn biến động cao phụ thuộc vào từng mùa. Mùa mưa, độ mặn nằm trong khoảng: 11.000 mg/L TDS, mùa khô: 753 - 25.950 mg/L TDS (Báo cáo tổng kết đề tài VAST.NĐP.13/14-15). Trong thí nghiệm này, chúng tôi lấy mẫu

vào thời điểm giao mùa để có thể thu được nhiều vi nấm trong các mẫu nghiên cứu (trầm tích), nồng độ muối trong các môi trường phân lập đã được thiết lập ở các tỷ lệ 0,5 %; 1,5 %; 2,5 % và 4,0 %.

Kết quả cho thấy, với các môi trường có nồng độ muối 0,5 % và 4,0 % không ghi nhận sự phát sinh của vi nấm. Ở nồng độ 1,5 % có sự xuất hiện nhưng không đa dạng trong khi đó ở nồng độ 2,5 % xuất hiện nhiều và đa dạng. Điều này có thể được giải thích bởi sự chênh lệch áp suất thẩm thấu giữa môi trường nuôi cấy và điều kiện sống tự nhiên của các vi nấm trong trầm tích đầm phá. Nồng độ muối quá thấp hoặc quá cao có thể ảnh hưởng đến quá trình trao đổi chất, cân bằng ion và hoạt động enzyme của tế bào nấm, từ đó hạn chế khả năng sinh trưởng và phát triển [23]. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng các vi nấm có nguồn gốc từ môi trường biển và vùng nước lợ thường thích nghi tốt ở khoảng độ mặn trung bình, giúp duy trì áp suất thẩm thấu ổn định và tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình sinh tổng hợp các chất chuyển hóa thứ cấp [35] [18]. Như vậy nồng độ muối 2,5% được lựa chọn là ngưỡng tỷ lệ muối thích hợp cho môi trường nuôi cấy vi nấm.

Sàng lọc hoạt tính đối kháng của 7 chủng vi sinh vật kiểm định (2 chủng vi khuẩn Gram dương và 4 chủng vi khuẩn Gram âm) với 106 chủng vi nấm phân lập được cho thấy, 05 chủng vi nấm đối kháng với *B. cereus* ATCC 11778, trong đó 01 chủng đối kháng cả *B. cereus* ATCC 11778 và *P. putida* ATCC3326K1, 01 chủng đối kháng cả *B. cereus* ATCC 11778 và *S. aureus* ATCC 6538; 02 chủng đồng đối kháng *S. aureus* ATCC 6538 và *P. putida* ATCC3326K1; và 01 chủng đồng đối kháng *B. cereus* ATCC 11778, *S. aureus* ATCC 6538, *P. putida* ATCC3326K1, và *S. typhimurium* ATCC 14028, chủng này kí hiệu là TG3-SaN5, được phân lập ở phá Tam Giang, vị trí thu mẫu trầm tích giữa đầm. Việc chỉ có một số lượng nhỏ chủng vi nấm biểu hiện hoạt tính đối kháng là hiện tượng thường gặp trong các nghiên cứu sàng lọc vi sinh vật từ môi trường tự nhiên. Mặc dù nhiều chủng vi nấm có khả năng sinh tổng hợp các chất chuyển hóa thứ cấp, nhưng không phải tất cả các hợp chất này đều có hoạt tính kháng khuẩn hoặc được biểu hiện trong điều kiện nuôi cấy khảo sát [72]. Khả năng đối kháng mạnh của chủng TG3-SaN5 cho thấy chủng này có tiềm năng sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học với phổ kháng khuẩn tương đối rộng. Điều này đặc biệt có ý nghĩa trong bối cảnh nhu cầu tìm kiếm các hợp chất kháng sinh mới từ

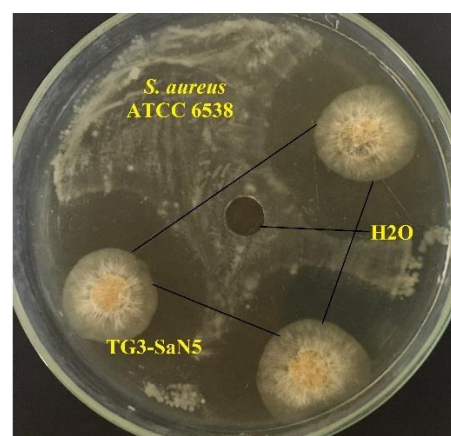
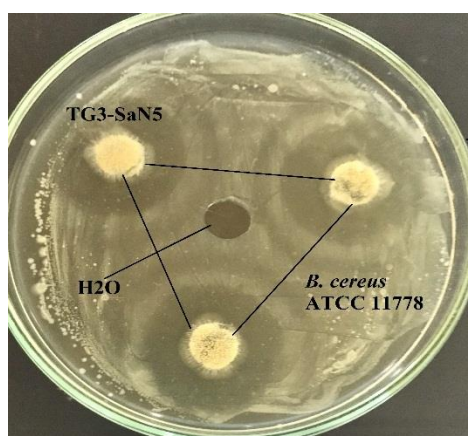
nguồn vi sinh vật tự nhiên ngày càng gia tăng nhằm đối phó với tình trạng kháng kháng sinh của vi khuẩn gây bệnh [73].

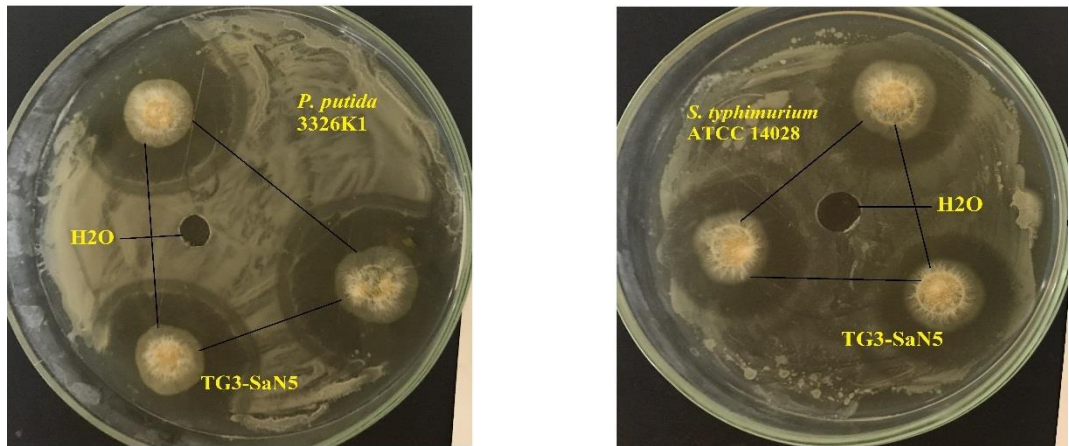
Mặt khác, chủng TG3-SaN5 được phân lập từ mẫu trầm tích khu vực giữa đầm phá Tam Giang, nơi thường chịu tác động đồng thời của các yếu tố môi trường như biến động độ mặn, hàm lượng chất hữu cơ và sự cạnh tranh sinh học giữa các quần thể vi sinh vật. Những áp lực sinh thái này có thể thúc đẩy vi nấm phát triển các cơ chế cạnh tranh, trong đó có khả năng sản sinh các hợp chất kháng khuẩn để giành ưu thế sinh tồn [37]. Vì vậy, việc lựa chọn chủng TG3-SaN5 để định danh và nghiên cứu phân lập các hợp chất thứ cấp là hoàn toàn phù hợp và có cơ sở khoa học.

Chủng TG3-SaN5 có biểu hiện khả năng ức chế lại với 4 chủng vi sinh vật kiểm định nên được lựa chọn để định danh xác định tên loài và phân lập hợp chất thứ cấp (Hình 3.2).

Bảng 3.1. Các chủng vi nấm phân lập có hoạt tính đối kháng (D - d = mm)

TT	Chủng kiểm định		<i>B. cereus</i> ATCC 11778	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>E. coli</i> ATCC 11105	<i>P. putida</i> 3326K1	<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	<i>C. abicans</i> ATCC 10231
	Chủng phân lập								
1	CH3-SaN6		10,3 ± 2,1	-	-	-	-	-	-
2	HT-SaN5		11,0 ± 3,6	15,0 ± 0,6	-	-	-	-	-
3	TG3-PDN1		21,0 ± 1,0	-	-	-	-	-	-
4	TG2-SaN2		-	10,0 ± 3,6	-	13,0 ± 3,6	-	-	-
5	TG2-SaN3		20,3 ± 0,6	-	-	-	-	-	-
6	TG3-SaN3		14,7 ± 0,6		-	20,7 ± 2,0	-	-	-
7	TG3-SaN4		-	12,0 ± 0,6	-	10,0 ± 1,0	-	-	-
8	TG3-SaN5		17,3 ± 0,6	23,0 ± 1,0	-	20,0 ± 1,0	18,0 ± 1,0	-	-




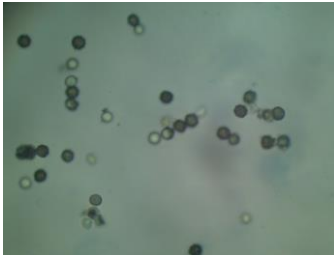



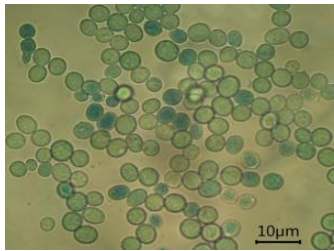
Hình 3.2. Đối kháng của TG3-SaN5 với 4 loại vi khuẩn kiểm định


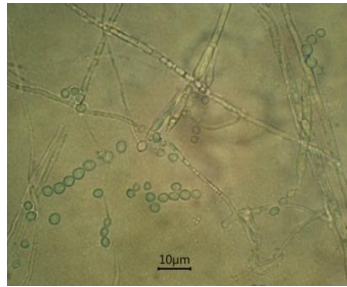
3.2. KẾT QUẢ ĐỊNH DANH MỘT SỐ CHỦNG VI NẤM CÓ HOẠT TÍNH CAO ĐƯỢC TUYỂN CHỌN

3 chủng vi nấm có hoạt tính đối kháng cao nhất được lựa chọn để định danh bằng hình thái và sinh học phân tử. Các chủng gồm HT-SaN5, TG3-SaN3, và TG3-SaN5. Kết quả định danh hình thái các chủng nghiên cứu được thể hiện dưới Bảng 3.2.

Bảng 3.2. Bảng phân loại vi nấm bằng hình thái khuẩn lạc và bào tử

Kí hiệu chủng	Hình thái khuẩn lạc	Hình thái bào tử	Hình ảnh khuẩn lạc	Hình ảnh bào tử	Tên loài
HT-SaN5	<p>Khuẩn lạc hình thành trên môi trường Czapek thạch sinh trưởng nhanh, đạt 5,0 - 6,0 cm/7 ngày ở 25 °C, bề mặt khuẩn lạc tạo các khía hình tia nhẹ, xốp bông dạng len với hệ sợi nền màu trắng xen lẫn màu vàng, mang nhiều các cấu trúc sinh bào tử ở vùng trung tâm. Lúc đầu có màu lục nâu tối sau chuyển sang</p>	<p>Cuống sinh bào tử trần kích thước thước thay đổi, thường từ 500 - 900 μm nhưng có thể 2 - 3mm, thành dày khoảng 1 μm, nhưng có thể đến 2,0 μm, nhẵn; bong hình cầu hoặc gần cầu, kích thước thay đổi, 25 - 50 μm đường kính nhưng thường sắp xếp từ 10 - 70 μm hoặc 80 μm; thể bình hai tầng, bao phủ toàn bộ bề mặt bong; ở các bong nhỏ thường chỉ có 1 thể bình sinh ra trên 1 cuống, như vách ngăn ngang, có</p>			<p><i>Aspergillus niger</i></p>

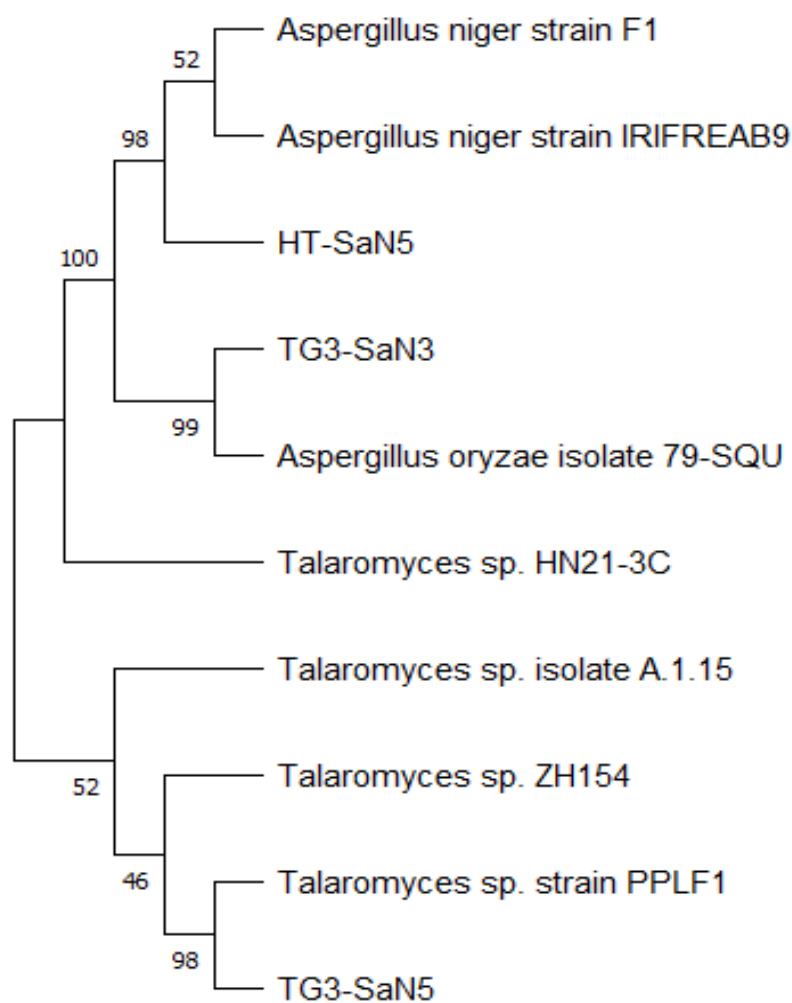
	màu nâu chocolate; mặt trái không màu hoặc tạo vùng có màu vàng sáng sau chuyển sang màu nâu đến nâu đỏ khi già; có mùi nhẹ như mùi sơn ête hoặc mùi nấm rơm; giọt tiết không có hoặc ít.	màu nâu đậm. Cuống thể bình thường 10 - 20 μm x 4,5 - 7,0 μm nhưng sắp xếp từ <5 - 40 μm x 3,0 - 4,0 μm ; bào tử trần hình cầu, gần cầu, nhăn đến ráp dị thường, kích thước thay đổi 3,5 - 5,0 μm hoặc thậm chí đến 6,0 μm nhưng hầu hết 4,0 - 4,5 μm .			
TG3-SaN3	Khuẩn lạc trên môi trường Czapek thạch phát triển nhanh, 4,5 - 5,5 cm/10 ngày ở nhiệt độ 25 °C, xếp bông; đầu sinh bào tử trần hình tia hoặc tế ra thành vài cột lỏng, màu xanh lục	Cuống sinh bào tử trần nhăn đến gai ráp, không màu, kích thước 80 -1500 μm x 6,5 - 21 μm ; bông hình cầu, gần cầu, quả lê hoặc hình thuôn dài, kích thước 16 - 50 μm rộng. Thể bình 1 tầng, 2 tầng hoặc cả hai có cùng trên			<i>Aspergillus oryzae</i> (Ahlburg) Cohn var. <i>effusus</i> (Tiraboschi) Ohara

	<p>hoặc vàng chanh, hệ sợi nấm màu trắng; giọt tiết có màu vàng nhạt.</p>	<p>một bong, cuống thể bình bao phủ hầu khắp bề mặt bong, kích thước 5,2 - 36 μm x 2,5 - 9,5 μm; thể bình 4,0 - 14 μm x 2,5 - 7,0 μm, không màu đến màu vàng nhạt; thể bình của đầu một tầng bao phủ $\frac{1}{2}$ đến toàn bộ bề mặt bong. Bào tử trần hình cầu, gân cầu, trứng, kích thước 2,8 - 6,2 μm rộng, với bề mặt nhẵn đến ráp.</p>			
<p>TG3-SaN5</p>	<p>Khuẩn lạc trên môi trường Czapek phát triển nhanh, 5,0 - 6,5 cm/10 ngày ở nhiệt độ 25 °C, hệ sợi nấm màu trắng, màu vàng nhạt, màu</p>	<p>Cuống sinh bào tử trần thưa thớt, thường đơn độc chỉ một thể bình hoặc tạo thành vòng 1 tầng gồm 2 - 3 thể bình. Thể bình thon nhọn hoặc hình thuôn dài, kích thước 8,0</p>			<p><i>Talaromyces stipitatus</i> (Thom) C. R. Benjamin</p>

	<p>hồng đến đỏ nhạt; giọt tiết tạo thành giọt nhỏ, màu vàng nhạt; mặt trái màu nâu cam đến màu cam xám.</p>	<p>- 35 μm x 1,8 - 2,8 μm, nhẵn. Bào tử trần hình elip đến hình trụ tròn, kích thước 4,0 - 7,5 x 2,5 - 4,5 μm, nhẵn, không màu, tạo thành chuỗi đơn ngắn. Thể quả túi hình cầu, màu vàng nhạt, hình thành sau 10 - 14 ngày, nhiều, tạo thành một lớp trên bề mặt khuẩn lạc, kích thước 150 - 380 μm; túi bào tử (asci) tạo chuỗi, hình gần cầu, 7,0 - 8,3 x 6,3 - 7,2 μm, không màu; bào tử túi (ascospore) hình elip với 1 gờ xích đạo, nhẵn, không màu, 4,0 - 4,8 x 2,5 - 3,2 μm.</p>			
--	---	---	--	--	--

03 chủng vi nấm được định loài dựa trên nhờ kỹ thuật sinh học phân tử. DNA tổng số của các chủng được tách, tinh sạch và kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1% (Hình 3.3a). Band điện di cho thấy DNA sạch, không có hiện tượng đứt gãy và tỷ lệ A260/A280 đo bằng máy quang phổ là 1.82, 1.83, và 1.82 tương ứng với các chủng HT-SaN5, TG3-SaN3, và TG3-SaN5, với giá trị trên cho thấy sản phẩm DNA tổng số đã đáp ứng yêu cầu để tiếp tục tiến hành quá trình PCR với các điều kiện được mô tả trên phần phương pháp. Sau khi quá trình PCR kết thúc, sản phẩm khuếch đại vùng gen ITS được kiểm tra trên gel agarose 1% thu được 01 băng sáng rõ, đặc hiệu, có kích thước ~ 250 bp so với maker, phù hợp với sản phẩm dự kiến (Mục 4 - Phụ lục). Trình tự gen được xác định trên máy giải trình tự (ABI PRISM 3100, Applied Bioscience).

Trình tự gen được xử lý bằng phần mềm Bioedit và so sánh với cơ sở dữ liệu của NCBI thông qua công cụ BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Kết quả thu được cho thấy trình tự gen ITS của chủng HT-SaN5 có độ tương đồng 100% với loài *Aspergillus niger* chủng IRIFREAB9, chủng TG3-SaN3 có độ tương đồng 100% với loài *Aspergillus oryzae* chủng 79-SQU, và chủng TG3-SaN5 có độ tương đồng 100% với loài *Talaromyces* sp. chủng PPLF1, 97.33% với loài *Talaromyces stipitatus* chủng 2RA1 trong ngân hàng gen NCBI. Trình tự gen và kết quả so sánh trình tự 3 chủng được trình bày trong phần Phụ lục 1. Như vậy, từ kết quả định danh hình thái và định danh bằng sinh học phân tử có thể khẳng định chủng HT-SaN5 là *Aspergillus niger*, chủng TG3-SaN3 là *Aspergillus oryzae*, và chủng TG3-SaN5 là *Talaromyces stipitatus*.



Hình 3.3. Cây phân loại 3 chủng vi nấm tuyển chọn

Cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa trên trình tự vùng ITS cho thấy các chủng vi nấm phân lập từ trầm tích đầm phá Tam Giang – Cầu Hai thuộc hai chi chính là *Aspergillus* và *Talaromyces*. Đây là hai nhóm vi nấm thường gặp trong các hệ sinh thái biển, ven biển và trầm tích, đồng thời được ghi nhận là nguồn sinh tổng hợp phong phú các hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học [74] [75].

Trong nhóm *Aspergillus*, chủng TG3-SaN3 tạo thành một nhánh riêng cùng với *Aspergillus oryzae* isolate 79-SQU với giá trị bootstrap đạt 99%, cho thấy sự tương đồng di truyền rất cao giữa hai trình tự. Giá trị bootstrap lớn hơn 70% thường được xem là bằng chứng đáng tin cậy cho mối quan hệ phát sinh chủng loại [76]. Do đó, kết quả này cho thấy TG3-SaN3 có khả năng thuộc hoặc có quan hệ rất gần với loài *A. oryzae*. Đây là loài vi nấm có ý nghĩa quan trọng trong công nghiệp thực phẩm và công nghệ sinh học nhờ

khả năng sinh tổng hợp nhiều enzyme ngoại bào như amylase, protease và lipase [77].

Tương tự, chủng HT-SaN5 được xếp cùng nhánh với *Aspergillus niger* strain IRIFREAB9 với giá trị bootstrap 99%, chứng tỏ mức độ tương đồng cao về trình tự ITS. Tuy nhiên, nút phân nhánh liên kết giữa nhóm *A. oryzae* và nhóm *A. niger* chỉ đạt giá trị bootstrap 53%, phản ánh sự hỗ trợ thống kê ở mức trung bình cho mối quan hệ giữa các nhóm trong chi *Aspergillus*. Mặc dù vậy, sự phân nhóm riêng biệt của HT-SaN5 với chủng tham chiếu *A. niger* vẫn được hỗ trợ mạnh mẽ, cho phép định danh chủng này thuộc nhóm *Aspergillus niger* [78].

Một điểm đáng chú ý là chủng tham chiếu *Talaromyces* sp. HN21-3C nằm ở vị trí trung gian giữa nhóm *Aspergillus* và các nhóm *Talaromyces* còn lại. Điều này có thể xuất phát từ mức độ tương đồng tương đối cao của vùng ITS giữa một số loài thuộc họ *Trichocomaceae* hoặc do số lượng trình tự tham chiếu được sử dụng trong phân tích còn hạn chế. Samson và cộng sự trong công bố vào năm 2021 cho rằng vùng ITS đôi khi chưa đủ khả năng phân tách hoàn toàn các loài gần nhau trong chi *Talaromyces* và cần kết hợp thêm các chỉ thị phân tử khác như BenA, CaM hoặc RPB2 để nâng cao độ phân giải [79].

Trong nhóm *Talaromyces*, chủng TG3-SaN5 tạo thành một nhánh riêng cùng với *Talaromyces* sp. strain PPLF1 với giá trị bootstrap rất cao (96%). Kết quả này cho thấy TG3-SaN5 có quan hệ phát sinh gần gũi với các chủng thuộc chi *Talaromyces*. Ngược lại, nhánh chứa *Talaromyces* sp. ZH154 và *Talaromyces* sp. isolate A.1.15 chỉ được hỗ trợ bởi giá trị bootstrap 35%, phản ánh độ tin cậy thấp của mối quan hệ giữa hai trình tự này. Theo Hall (2013), các nút có bootstrap dưới 50% thường không được xem là có sự hỗ trợ mạnh và cần được diễn giải thận trọng [79].

Nhìn chung, cây phát sinh chủng loại cho thấy ba chủng nghiên cứu được phân bố vào hai nhóm phân loại khác nhau. Chủng TG3-SaN3 có quan hệ gần gũi với *Aspergillus oryzae*, chủng HT-SaN5 gần với *Aspergillus niger*, trong khi chủng TG3-SaN5 thuộc nhóm *Talaromyces* sp.. Sự phân tách rõ ràng giữa hai chi *Aspergillus* và *Talaromyces* phù hợp với hệ thống phân loại hiện đại của lớp *Eurotiomycetes* [78]. Kết quả này không những góp phần xác định vị trí phân loại của các chủng vi nấm phân lập mà còn là cơ sở cho các

ngiên cứu tiếp theo về khả năng sinh tổng hợp các hợp chất có hoạt tính sinh học từ các chủng vi nấm có nguồn gốc từ trầm tích đầm phá Tam Giang – Cầu Hai.

Kết quả định danh trên cho thấy chủng HT- SaN5 và TG3-SaN3 thuộc chi *Aspergillus* và chủng TG3-SaN5 thuộc chi *Talaromyces*, chúng thuộc ngành *Ascomycota* - đây là ngành ghi nhận được nhiều chủng vi nấm nhất ở biển theo nghiên cứu của Manohar và các cộng sự [72]. Đáng chú ý, các chi *Aspergillus* và *Penicillium* thường được công bố là chi sản sinh ra đa dạng các hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học cao [73] [79].

3.3. KẾT QUẢ XÁC ĐỊNH CÁC ĐIỀU KIỆN LÊN MEN THÍCH HỢP CHỦNG VI NẤM *TALAROMYCES STIPITATUS*

Trong 3 chủng định danh, chủng *Talaromyces stipitatus* (TG3-SaN5) được lựa chọn để tiến hành nghiên cứu các thông số lên men nhằm thu hồi lượng cao chiết chất lượng tốt, đáp ứng cho quá trình phân lập hợp chất do có hoạt tính mạnh nhất và đối kháng đồng thời 4 chủng vi khuẩn kiểm định.

Lên men chìm là phương pháp phổ biến được sử dụng để nghiên cứu thu hồi các chất chuyển hóa thứ cấp, bao gồm kháng sinh và các hợp chất có hoạt tính sinh học. Ưu điểm của phương pháp này là tiến hành lên men lỏng trong bình kín đảm bảo vô trùng và tránh bị lây nhiễm. Việc tối ưu hóa và kiểm soát các thông số lên men thích hợp đóng vai trò quan trọng trong việc nâng cao hiệu suất sinh tổng hợp các hợp chất mong muốn.

Các điều kiện lên men quan trọng thường được nghiên cứu là thành phần môi trường, tỷ lệ giống ban đầu, nhiệt độ và thời gian lên men. Trong đó, nguồn carbon và nitơ là các yếu tố dinh dưỡng thiết yếu, quyết định đến khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp chất chuyển hóa của vi nấm. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng cùng một chủng vi nấm nhưng khi nuôi cấy trên các môi trường khác nhau có thể cho sinh khối và hoạt tính sinh học khác biệt đáng kể.

Nhiệt độ cũng là yếu tố quan trọng, ảnh hưởng trực tiếp đến hoạt tính enzyme, tốc độ trao đổi chất và sự phát triển của vi sinh vật. Ở nhiệt độ cao, khí CO₂ sinh ra dễ thoát ra khỏi môi trường, làm thay đổi trạng thái cân bằng của hệ; trong khi đó, ở nhiệt độ thấp, một số chất có thể không hòa tan hoàn toàn, ảnh hưởng đến hiệu quả lên men. Vi nấm phát triển bình thường ở khoảng nhiệt từ 10 - 30 °C và sinh trưởng, phát triển tốt nhất trong khoảng 25 - 32°C.

Bên cạnh đó, thời gian lên men cũng cần được xác định phù hợp để thu nhận tối đa các chất chuyển hóa thứ cấp. Do đặc điểm thành tế bào chứa chitin, vi nấm thường có tốc độ sinh trưởng chậm hơn so với vi khuẩn, và quá trình tích lũy các hợp chất thứ cấp có thể kéo dài từ 15 - 20 ngày hoặc lâu hơn, tùy thuộc vào từng chủng cụ thể [80] [81] [82].

Thử nghiệm các thông số lên men được thực hiện như phần phương pháp mô tả. Kết quả thể hiện dưới Bảng 3.3, Bảng 3.4. Kết quả thu được cho thấy chủng *Talaromyces stipitatus* lên men thích hợp nhất ở các điều kiện: môi trường PDA, tỷ lệ giống 3%, nhiệt độ 28 °C, và thời gian lên men 15 ngày.

Bảng 3.3. Tổng hợp các thông số lên men ảnh hưởng đến khối lượng cao chiết vi nấm *Talaromyces stipitatus* (g/L)

1	<i>Ảnh hưởng của môi trường lên men</i>				
	Cz-D	PI	Sa	PDA	Sa1
	0,312 ± 0,3	0,390 ± 0,6	1,210 ± 0,2	1,846 ± 0,5	0,180 ± 0,1
2	<i>Ảnh hưởng của tỷ lệ giống ban đầu</i>				
	1%	3%	7%	10%	15%
	0,368 ± 0,4	1,815 ± 0,2	1,646 ± 0,2	1,537 ± 0,1	0,933 ± 0,3
3	<i>Ảnh hưởng của nhiệt độ lên men</i>				
	18 °C	23 °C	28 °C	35 °C	42 °C
	0,311 ± 0,1	0,497 ± 0,1	1,832 ± 0,3	1,088 ± 0,5	0,795 ± 0,4
4	<i>Ảnh hưởng của thời gian lên men</i>				
	5 ngày	10 ngày	15 ngày	20 ngày	25 ngày
	0,125 ± 0,2	0,766 ± 0,4	1,843 ± 0,3	1,689 ± 0,3	1,543 ± 0,6

Bảng 3.4. Tổng hợp các thông số lên men ảnh hưởng đến hoạt tính ức chế vi khuẩn kiểm định của cao chiết vi nấm *Talaromyces stipitatus*

(D - d = mm)

1	<i>Môi trường lên men</i>			
	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	<i>P. putida</i> 3326K1	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028
Cz-D	12,8 ± 0,3	18,2 ± 0,6	20,7 ± 0,6	15,2 ± 0,6

PI	12,8 ± 0,4	19,3 ± 0,5	23,3 ± 0,6	16,4 ± 0,6
Sa	17,5 ± 0,5	20,3 ± 0,5	23,3 ± 0,6	18,7 ± 0,6
PDA	17,9 ± 0,8	21,7 ± 0,2	27,7 ± 0,6	19,2 ± 0,6
Sa1	16,8 ± 0,3	20,3 ± 1,1	26,3 ± 0,6	18,1 ± 1,0
2	<i>Tỷ lệ giống ban đầu</i>			
	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	<i>P. putida</i> 3326K1	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028
1%	5,4 ± 0,6	6,9 ± 0,3	10,7 ± 0,6	9,2 ± 0,6
3%	17,3 ± 0,2	20,5 ± 0,5	23,6 ± 0,3	18,5 ± 0,6
7%	16,8 ± 0,5	20,0 ± 1,0	22,5 ± 0,3	17,9 ± 0,3
10%	15,8 ± 0,6	18,6 ± 0,6	20,2 ± 0,5	15,8 ± 0,2
15%	15,8 ± 0,9	18,5 ± 0,3	20,3 ± 0,5	15,5 ± 0,5
3	<i>Nhiệt độ lên men</i>			
	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	<i>P. putida</i> 3326K1	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028
18 °C	5,2 ± 0,3	15,5 ± 0,3	18,6 ± 0,2	11,2 ± 0,2
23 °C	10,3 ± 0,5	18,4 ± 0,2	20,6 ± 0,4	13,1 ± 0,6
28 °C	16,9 ± 0,4	20,8 ± 0,7	23,2 ± 0,5	18,0 ± 0,3
35 °C	12,6 ± 0,3	16,3 ± 0,3	16,4 ± 0,3	15,5 ± 0,2
42 °C	6,5 ± 0,5	13,1 ± 0,1	12,1 ± 0,6	10,3 ± 0,2
4	<i>Thời gian lên men</i>			
	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	<i>P. putida</i> 3326K1	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028
5 ngày	6,5 ± 0,2	12,6 ± 0,6	13,8 ± 0,2	12,8 ± 0,6
10 ngày	10,3 ± 0,5	15,5 ± 0,5	15,6 ± 0,5	13,6 ± 0,2
15 ngày	17,2 ± 0,3	21,2 ± 0,6	25,3 ± 0,3	18,4 ± 0,5
20 ngày	13,8 ± 0,2	14,3 ± 0,1	18,6 ± 0,2	12,8 ± 0,2
25 ngày	13,4 ± 0,6	12,8 ± 0,2	16,5 ± 0,3	12,3 ± 0,3

3.4. KẾT QUẢ PHÂN LẬP HỢP CHẤT THỨ CẤP TỪ CHUNG VI NẤM TUYỂN CHỌN

Dịch lên men vi nấm *Talaromyces stipitatus* được chiết 3 lần bằng dung môi ethyl acetate, cất loại dung môi dưới áp suất thấp, bằng máy cô quay, thu được cặn chiết ethyl acetate. Cặn chiết ethyl acetate này phân tách trên cột sắc kí silica gel áp dụng hệ dung môi gradien n-hexane/acetone (100/0 – 0/100 v/v), gộp các phần có sắc đồ TLC tương tự nhau thu được 3 phân đoạn lần lượt là N5A, N5B, và N5C. Tiếp tục tiến hành tách phân đoạn N5B, sử dụng cột sắc ký RP-18 (pha đảo), hệ dung môi sử dụng là acetone/nước (2/1, v/v) gộp các phần có sắc đồ TLC tương tự nhau nhận được bốn phân đoạn nhỏ hơn được kí hiệu là N5B-1, N5B-2, N5B-3, và N5B-4.

Tiến hành phân tách các phân đoạn trên bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC (thực hiện trên hệ HPLC Agilent 1260 kết nối với cột HPLC J'sphere H-80, 250 mm × 20 mm) hệ dung môi rửa giải 95% methanol trong nước, pha động có tốc độ dòng 3 mL/phút). Đối với phân đoạn N5B-3 thu nhận lại được hợp chất 1 (5.2 mg, tR 42.9 phút). Đối với phân đoạn N5B-2 nhận được 4 phân đoạn nhỏ hơn được kí hiệu là N5B-2.1, N5B-2.2, N5B-2.3, và N5B-2.4. Sau đó, từ phân đoạn N5B-2.1 thu được hợp chất 2 (3.5 mg, tR 91.1 phút), hợp chất 3 (5.3 mg, tR 104.5 phút), hợp chất 4 (4.6 mg, tR 109.6 phút). Phân đoạn N5B-2.4 thu được hợp chất 6 (5.2 mg, tR 39.1 phút). Phân đoạn N5B-2.3 được áp dụng với hệ dung môi 98% methanol trong nước thu được hợp chất 5 (5.5 mg, tR 52.6 phút).

Phân đoạn N5C được tiến hành phân tách trên cột RP-18, áp dụng hệ dung môi acetone/nước (2/1, v/v) gộp các phần có sắc đồ TLC tương tự nhau nhận được 2 phân đoạn nhỏ hơn được kí hiệu là N5C-1 và N5C-2. Sau đó, phân đoạn N5C-1 được tiến hành phân đoạn bằng cột sắc kí pha thường áp dụng hệ dung môi n-hexane/ethyl acetate (5/1, v/v) gộp các phần có sắc đồ TLC tương tự nhau nhận được 4 phân đoạn nhỏ hơn được kí hiệu là N5C-1.1, N5C-1.2, N5C-1.3, và N5C-1.4. Phân đoạn N5C-1.2 với hệ dung môi rửa giải 55% methanol trong nước thu được hợp chất 7 (3.7 mg, tR 38.2 phút). Hợp chất 8 (6.7 mg, tR 32.9 phút) thu được từ phân đoạn N5C-1.4 nhờ phân tách trên HPLC. Sơ đồ phân lập các hợp chất được mô tả dưới Hình 3.4.

Kết quả phân lập cho thấy chủng vi nấm *Talaromyces stipitatus* có khả năng sinh tổng hợp nhiều hợp chất thứ cấp với độ phân cực khác nhau. Việc

độ 10 mg/mL như đã miêu tả tại phần phương pháp. Để xác định MIC (Minimum Inhibitory Concentration). Các mẫu sau khi được ủ 37 °C qua đêm. Tiến hành ghi nhận giá trị OD tại bước sóng 625 nm và giá trị MIC được xác định tại giếng nồng độ có giá OD (đã trừ giếng đối chứng) âm. Điều đó có nghĩa là sau 24 giờ nuôi cấy thì dịch chiết thô có khả năng ức chế từ 97 - 99 % vi khuẩn kiểm định. Các giếng có OD âm lại được hút 10 μ L để tiếp tục nuôi cấy trên các đĩa thạch LB mới. Tác dụng ức chế vi khuẩn được xác định khi mật độ khuẩn lạc ≤ 3 khuẩn lạc với việc sử dụng nồng độ kháng sinh tối thiểu.

Bảng 3.5. Giá trị MIC của 8 hợp chất phân lập ($\mu\text{g/mL}$).

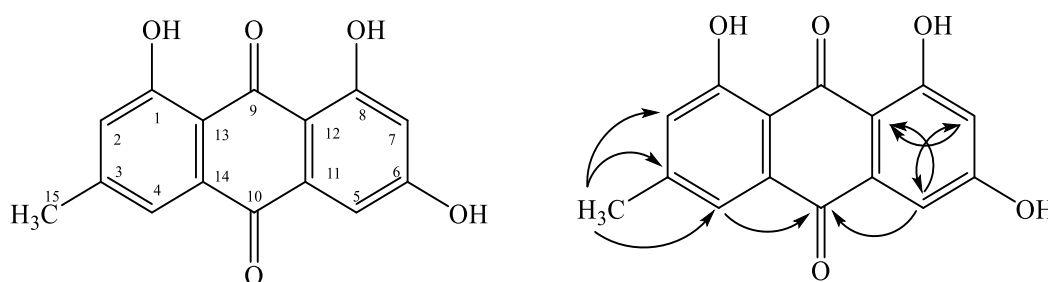
STT	Tên hợp chất	Gram dương		Gram âm				Nấm men
		<i>B. cereus</i> ATCC 11778	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>E. coli</i> ATCC 11105	<i>P. putida</i> ATCC3326K1	<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	<i>C. abicans</i> ATCC 10231
1	1	64	>256	256	>256	128	>256	>256
2	2	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
3	3	128	>256	>256	>256	256	>256	>256
4	4	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
5	5	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
6	6	128	64	>256	256	>256	>256	>256
7	7	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
8	8	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
Streptomycin		128	256	32	256	128	256	-
Cyclohexamide		-	-	-	-	-	-	32

Chú thích: “-” không thử nghiệm

Từ bảng kết quả 3.5 cho thấy, 3/8 hợp chất phân lập được có hoạt tính đối kháng vi khuẩn kiểm định gồm hợp chất 1, hợp chất 3 và hợp chất 6. **Hợp chất 1** thể hiện hoạt tính đối kháng *B. cereus* ATCC 11778, *E. coli* ATCC 11105, và *S. typhimurium* ATCC 14028, với giá trị MIC từ 64 - 256 $\mu\text{g/mL}$; **hợp chất 3** có khả năng ức chế *B. cereus* ATCC 11778, *S. typhimurium* ATCC 14028, với giá trị MIC thu nhận được lần lượt là 128 và 256 $\mu\text{g/mL}$, tương ứng; **hợp chất 6** thể hiện hoạt tính đối kháng *B. cereus* ATCC 11778, *S. aureus* ATCC 6538 và *P. putida* ATCC3326K1, với giá trị MIC là 128, 64 và 256 $\mu\text{g/mL}$, tương ứng. Trong tự nhiên, nhiều hợp chất thứ cấp đóng vai trò như các phân tử tín hiệu sinh học, chất điều hòa sinh trưởng hoặc tham gia vào các tương tác sinh thái khác thay vì biểu hiện hoạt tính kháng khuẩn trực tiếp [87]. Kết quả này phù hợp với nhiều nghiên cứu trước đây cho thấy các hợp chất chuyển hóa thứ cấp có nguồn gốc từ nấm sợi thường biểu hiện hoạt tính mạnh hơn trên vi khuẩn Gram dương do cấu trúc thành tế bào của nhóm vi khuẩn này đơn giản hơn, không có lớp màng ngoài lipopolysaccharide như vi khuẩn Gram âm, từ đó tạo điều kiện cho các phân tử kháng khuẩn thâm nhập vào tế bào dễ dàng hơn [88]. Do đó, hợp chất 1, 3, 6 được lựa chọn để tiến hành thí nghiệm xác định cấu trúc hợp chất.

3.5. KẾT QUẢ PHÂN TÍCH CẤU TRÚC HÓA HỌC CỦA 3 HỢP CHẤT LỰA CHỌN

3.5.1. Emodin (1)



Hình 3.5. Công thức cấu tạo và phân tích HMBC của hợp chất 1

Hợp chất **1** thu được dưới dạng bột vô định hình, có màu vàng nhạt. Phân tích phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất này nhận thấy một số tín hiệu gồm một nhóm methyl tại δ_{H} 2.43 (s) và bốn tín hiệu proton thuộc vòng thơm tại δ_{H} 7.58 (s), 7.23 (d, $J = 2.4$ Hz), 7.06 (s), 6.59 (d, $J = 2.4$ Hz). Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất **1** cho biết các tín hiệu của 15 carbon; trong đó tín hiệu tại giá trị δ_{C} 21.6 được quy kết cho nhóm methyl. Mười bốn tín hiệu carbon còn lại đều thuộc vùng carbon olefin từ δ_{C} 108.8 đến δ_{C} 190.9, trong đó hai tín hiệu

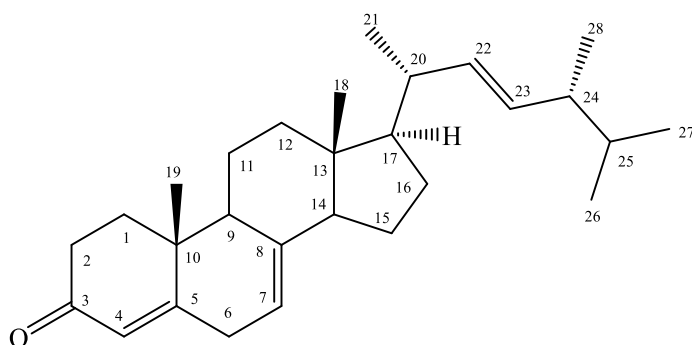
carbon δ_C 183.1 và δ_C 190.9 được quy kết cho nhóm carbonyl. Từ các kết quả trên, kết luận được là hợp chất **1** thuộc nhóm anthraquinone. Tương tác HMBC từ H-4 (δ_H 7.58)/ H-5 (δ_H 7.23) tới C-10 (δ_C 183.1) cho phép quy kết hai nhóm olefinic methine C-4 và C-5 qua đó cho phép xác định hai nhóm olefinic methine còn lại lần lượt là C-2 và C-7. Tiếp đó tương tác hai chiều HMBC từ H₃-15 (δ_H) tới C-2 (δ_C 124.7)/ C-3 (δ_C 148.6)/ C-4 (δ_C 121.4) cho thấy nhóm methyl liên kết tại C-3. Giá trị tín hiệu về độ chuyển dịch hóa học của C-1 (δ_C 162.5), C-6 (δ_C 165.5), và C-8 (δ_C 166.2) cho thấy các carbon này liên kết với nhóm hydroxy. Qua kết quả phân tích trên, công thức cấu tạo của hợp chất **1** được xác định là 3-methyl-1,6,8-trihydroxyanthraquinone - hay còn được biết đến là emodin - với tác dụng kháng virus cúm A và cúm B thông qua con đường ức chế hoạt động của enzyme neuraminidase.

Bảng 3.6. Số liệu phổ NMR của hợp chất Emodin

STT	$\delta_C^{\#}$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (mult., $J = \text{Hz}$)
1	161.27	162.5	-
2	123.94	124.7	7.06 (s)
3	148.06	148.6	-
4	120.30	121.4	7.58 (s)
5	108.66	110.0	7.23 (d, 2.4)
6	165.49	165.5	-
7	107.75	108.8	6.59 (d, 2.4)
8	164.32	166.2	-
9	189.47	190.9	-
10	181.08	183.1	-
11	134.85	132.5	-
12	108.70	109.8	-
13	113.12	114.1	-
14	132.56	133.7	-
15	21.39	21.6	2.43 (s)

^aĐo trong $CD_3OD+CDCl_3$, ^b150MHz, ^c600MHz, [#] δ_C của emodin đo trong $DMSO-d_6$ theo tài liệu tham khảo [89]

3.5.2. (22E,24R)-ergosta-4,7,22-trien-3-one (3)



Hình 3.6. Công thức cấu tạo của hợp chất 3

Hợp chất **3** phân lập được dưới dạng gôm trong suốt. Phân tích phổ $^1\text{H-NMR}$ nhận thấy các tín hiệu đặc trưng cho hợp chất nhóm sterol, bao gồm tín hiệu được nhận dạng của hai nhóm methyl dạng singlet tại δ_{H} 0.61 và δ_{H} 1.18, tín hiệu của ba nhóm methyl dạng doublet tại δ_{H} 0.92 (d, $J = 7.0$ Hz), δ_{H} 0.85 (d, $J = 7.0$ Hz), δ_{H} 0.84 (d, $J = 7.0$ Hz) bốn proton olefin trong đó có hai proton thuộc nhóm vinyl với hằng số tương tác J lớn (15.6 Hz) đại diện cho cấu hình *trans*. Tiếp đó, trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất này nhận thấy tín hiệu tương ứng với 28 carbon, gợi ý cho cấu trúc khung ergostane sterol. Bên cạnh đó, sự xuất hiện của tín hiệu carbon carbonyl tại δ_{C} 199.3 được xác định cho nhóm carbonyl tại C-3. Sáu tín hiệu carbon olefin còn lại trong đó một tín hiệu ở vùng trường thấp δ_{C} 169.0 đặc trưng cho sự xuất hiện của cấu trúc α,β -ketone không bão hòa, gợi ý cho liên kết đôi tại vị trí C-4/C-5 liên hợp với nhóm carbonyl tại C-3. Sự xuất hiện của hai proton thuộc nhóm vinyl với cấu hình *trans* và dạng tín hiệu double doublet của mỗi proton này (H-22 và H-23) cho phép quy kết một liên kết đôi dạng *trans* tại C-22/C-23 thường gặp ở nhánh trong các hợp chất sterol. Liên kết đôi còn lại, với tín hiệu cộng hưởng của một proton olefin ở δ_{H} 5.19 (br s) cho thấy đây là liên kết đôi bị thế ba vị trí, dự đoán tại C-7/C-8. Từ dữ liệu phân tích phổ NMR cho phép dự đoán cấu trúc hóa học của hợp chất **3** là ergosta-4,7,22-trien-3-one. Đối chiếu với các dữ liệu phổ đã công bố trước đây cho hợp chất này nhận thấy các dữ liệu phổ NMR của chất **3** hoàn toàn đúng với các dữ liệu đã công bố cho hợp chất (22E,24R)-ergosta-4,7,22-trien-3-one [89]. Trước đó, (22E,24R)-ergosta-4,7,22-trien-3-one được công bố ở chủng vi nấm nội sinh *Colletotrichum* sp. phân lập từ loài *Ilex canariensis*, có khả năng ức chế vi sinh vật kiểm định trên chủng *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium*,

Microbotryum violaceum, *Chlorella fusca* [89]. Như vậy, hợp chất **3** được xác định là (22E,24R)-ergosta-4,7,22-trien-3-one.

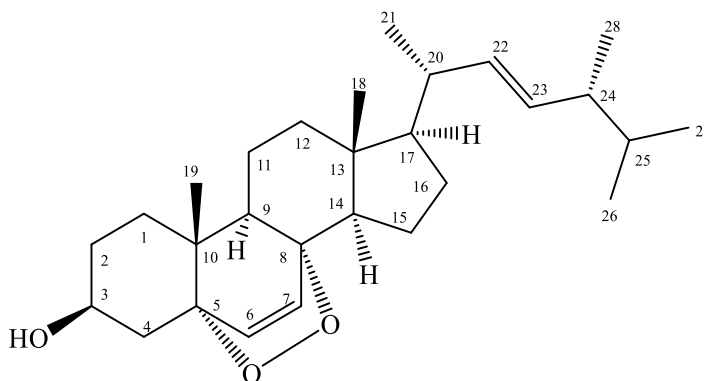
Bảng 3.7. Giá trị phổ NMR của hợp chất 3.

STT	$\delta_C^{\#}$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (mult., $J = \text{Hz}$)
1	33.2	33.2	1.91-1.97 (m)
2	34.1	34.1	2.35-2.36 (m)
3	199.3	199.3	-
4	122.7	122.7	5.79 (d, 1.8)
5	169.0	169.0	-
6	32.9	32.9	3.14 (br d, 18.0)/2.66 (br d, 18.0)
7	115.6	115.6	5.19 (br s)
8	139.5	139.5	-
9	45.9	45.9	2.22-2.23 (m)
10	38.0	38.1	-
11	22.0	22.0	1.63-1.67 (m)/1.72-1.76 (m)
12	39.0	39.0	1.73-1.76 (m)/1.84-1.86 (m)
13	43.4	43.4	-
14	55.0	55.0	1.90-1.92 (m)
15	22.8	22.8	1.28-1.32 (m)/1.64-1.68 (m)
16	28.0	28.0	1.38-1.42 (m)1.76-1.79 (m)
17	55.8	55.8	1.38-1.42 (m)
18	12.2	12.2	0.61 (s)
19	21.3	21.3	1.18 (s)
20	40.4	40.4	2.02-2.05 (m)
21	21.1	21.1	1.03 (d, 6.0)
22	135.4	135.4	5.17 (dd, 15.6, 6.0)
23	132.2	132.1	5.23 (dd, 15.6, 6.0)
24	42.8	42.8	1.85-1.89 (m)
25	33.1	33.1	1.46-1.52 (m)
26	19.9	19.9	0.85 (d, 7.0)
27	19.6	19.6	0.84 (d, 7.0)
28	17.6	17.6	0.92 (d, 7.0)

^aĐo trong CDCl_3 , ^b150MHz, ^c600MHz, ^{*}Tín hiệu bị che khuất, [#] δ_C của (22E,24R)-

ergosta-4,7,22-trien-3-one đo trong $CDCl_3$ theo tài liệu tham khảo [89]

3.5.3. 3β -hydroxy-5,8-epidioxyergosta-6,22-diene (6)



Hình 3.7. Công thức cấu tạo của hợp chất 6

Hợp chất **6** thu được dưới dạng gồm trong suốt. Phân tích phổ cộng hưởng từ hạt nhân 1H -NMR của hợp chất **6** cũng cho thấy cấu tạo của hợp chất này cũng thuộc nhóm ergostane sterol, bao gồm bao gồm tín hiệu của hai nhóm methyl dạng singlet cộng hưởng tại δ_H 0.83 và δ_H 0.90, tín hiệu của ba nhóm methyl dạng doublet tại δ_H 0.91 (d, $J = 6.6$ Hz), δ_H 0.84 (d, $J = 6.6$ Hz) và δ_H 0.82 (d, $J = 6.6$ Hz) bốn proton olefin trong đó có hai proton thuộc nhóm vinyl với hằng số tương tác J lớn (15.6 Hz) đại diện cho cấu hình *trans* và hai proton olefin còn lại thuộc hệ tương tác spin AB với hằng số $J = 8.4$ Hz. Phân tích phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **6** nhận thấy tín hiệu cộng hưởng của 28 carbon đặc trưng cho khung ergostane sterol. Khác với hợp chất **6**, ở hợp chất **6** không nhận thấy xuất hiện tín hiệu carbon carbonyl thay vào đó là sự xuất hiện của carbon oxymethine tại δ_C 66.5 và tín hiệu proton tại δ_H 3.94-3.97 (m). Điều này cho thấy C-3 ở hợp chất **6** mang nhóm hydroxy. Ngoài ra, giá trị hằng số tương tác spin lớn (*axial-axial*) giữa H-3 và H-4 ($J = 13.0$ Hz) cho phép quy kết cấu hình tương đối của nhóm hydroxy tại C-3 là cấu hình beta. Sự xuất hiện của hai tín hiệu carbon bậc 3 liên kết với oxy tại δ_C 82.2 và δ_C 79.4 đồng thời phân tích 1H -NMR cũng nhận thấy có hai tín hiệu cộng hưởng proton olefin thuộc hệ tương tác AB cho phép dự đoán sự xuất hiện của vòng cầu peroxide hình thành giữa carbon C-5 và carbon C-8, và liên kết đôi giữa carbon C-6 và carbon C-4. Cấu trúc mạch nhánh ở hợp chất **6** hoàn toàn tương tự với hợp chất **3** thể hiện ở sự giống nhau về các tín hiệu phổ NMR của phần mạch nhánh (C-20 tới C-28) giữa hai hợp chất này. Từ những phân tích trên cho thấy cấu tạo của hợp chất **6** là 3β -hydroxy-5,8-epidioxyergosta-6,22-diene. Tiến hành tra cứu dữ liệu phổ đã công bố cho

hợp chất 3 β -hydroxy-5,8-epidioxyergosta-6,22-diene và so sánh với các dữ liệu phổ tương ứng của hợp chất **6** nhận thấy các dữ liệu phổ tương tự nhau [71]. Như vậy, hợp chất **6** được kết luận là 3 β -hydroxy-5,8-epidioxyergosta-6,22-diene - hay còn được biết với một số tên gọi khác như ergosterol peroxide, 5 α ,8 α -peroxyergosterol, hay ergosterol endoperoxide,... Nhiều công bố khoa học đã cho biết rằng hợp chất này có hoạt tính gây độc tế bào ung thư, kháng vi sinh vật, và ức chế sự phát triển của ấu trùng sốt rét.

Bảng 3.8. Số liệu phân tích NMR của chất 6.

STT	$\delta_C^{\#}$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (mult., $J = \text{Hz}$)
1	35.06	34.7	1.69 (dd, 13.2, 3.0, 3.0) 1.96-2.00 (m)
2	30.47	30.1	1.92 (dd, 13.2, 13.0) 1.54-1.56 (m)
3	66.84	66.5	3.94-3.97 (m)
4	37.29	36.9	1.95 (dd, 13.2, 13.0) 2.11 (ddd, 13.2, 5.4, 2.4)
5	83.10	82.2	-
6	135.80	135.4	6.24 (d, 8.4)
7	131.12	130.7	6.50 (d, 8.4)
8	79.82	79.4	-
9	51.43	51.1	1.50-1.52 (m)
10	37.33	37.0	-
11	23.77	23.4	1.21-1.25 (m)/1.52-1.54 (m)
12	39.70	39.4	1.23-1.28 (m)/1.94-1.96 (m)
13	44.93	44.6	-
14	52.05	51.7	1.37-1.40 (m)/1.82-1.84 (m)
15	21.01	20.6	1.48-1.49 (m)/1.54-1.56 (m)
16	29.05	28.6	1.38-1.40 (m)1.81-1.84 (m)
17	56.55	56.2	1.22-1.26 (m)
18	13.25	12.9	0.83 (s)
19	18.57	18.2	0.90 (s)
20	40.14	39.7	2.03-2.04 (m)
21	21.26	20.9	1.00 (d, 6.0)

22	135.58	135.2	5.14 (dd, 15.6, 6.0)
23	132.40	132.3	5.22 (dd, 15.6, 6.0)
24	43.14	42.8	1.85-1.86 (m)
25	33.44	33.1	1.46-1.52 (m)
26	20.03	19.6	0.84 (d, 6.6)
27	20.34	19.9	0.82 (d, 6.6)
28	17.95	17.6	0.91 (d, 6.6)

^aĐo trong CDCl₃, ^b150MHz, ^c600MHz, [#]δ_C của 3β-hydroxy-5,8-epidioxyergosta-6,22-diene đo trong CDCl₃ theo tài liệu tham khảo [90]

Trong những năm gần đây, nghiên cứu và phát triển các hợp chất sinh học từ vi sinh vật đã trở thành một lĩnh vực quan trọng không chỉ trong công nghiệp dược phẩm mà còn trong lĩnh vực điều trị các bệnh lý phức tạp như ung thư và các bệnh nhiễm trùng do vi khuẩn và nấm. Các hợp chất Emodin, (22E,24R)-ergosta-4,7,22-trien-3-one, và 3β-hydroxy-5,8-epidioxyergosta-6,22-diene là ba ví dụ điển hình về các hợp chất sinh học với tiềm năng ứng dụng rộng rãi.

Emodin, một hợp chất thuộc nhóm anthraquinone, cũng đã được tách chiết từ các vi sinh vật như nấm *Aspergillus* và xạ khuẩn *Streptomyces*. Emodin không chỉ có khả năng kháng nhiều loại vi sinh vật gây bệnh, bao gồm các vi khuẩn như *Staphylococcus aureus* và *Escherichia coli*, mà còn cho thấy hiệu quả rõ rệt trong việc ngừng sự phát triển của tế bào ung thư, đặc biệt là ung thư vú, ung thư gan và ung thư đại tràng. Cơ chế tác động của emodin chủ yếu thông qua việc ức chế các yếu tố tăng trưởng, can thiệp vào chu trình tế bào và điều chỉnh các con đường tín hiệu sinh học liên quan đến sự phát triển và sống sót của tế bào ung thư [91]. Ngoài ra, emodin còn thúc đẩy quá trình apoptosis (chết tế bào theo chương trình), làm giảm khả năng lan rộng và di căn của tế bào ung thư [92]. Các nghiên cứu cũng đã chứng minh rằng emodin có tác dụng mạnh mẽ trong việc ngừng các quá trình tăng trưởng tế bào, từ đó giúp hạn chế sự phát triển của các khối u, đặc biệt trong các loại ung thư phổ biến như ung thư vú và ung thư gan [93]. Hơn nữa, với các đặc tính kháng vi khuẩn và kháng nấm, emodin được coi là một ứng viên sáng giá trong việc phát triển các liệu pháp điều trị ung thư và các bệnh nhiễm trùng do vi sinh vật.

(22E,24R)-ergosta-4,7,22-trien-3-one, một hợp chất steroid thuộc nhóm

ergosterol, có cấu trúc phân tử phức tạp và chủ yếu được tìm thấy trong các loài nấm và vi khuẩn thuộc chi *Penicillium*, *Aspergillus*, và *Streptomyces* [94]. Hợp chất này có cấu trúc đặc biệt với các liên kết đôi ở vị trí 4, 7 và 22 trong vòng sterol, cùng với nhóm carbonyl ở vị trí 3 [95]. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng hợp chất này không chỉ có khả năng kháng vi khuẩn và nấm mà còn sở hữu những hoạt tính sinh học đáng chú ý khác, bao gồm khả năng ức chế sự phát triển của tế bào ung thư. Cơ chế tác động của (22E,24R)-ergosta-4,7,22-trien-3-one trong việc chống ung thư chủ yếu thông qua việc điều chỉnh chu trình tế bào và kích thích quá trình apoptosis, từ đó làm giảm sự phát triển và di căn của tế bào ung thư [96] [97]. Ngoài ra, hợp chất này cũng tác động lên các con đường tín hiệu điều hòa chu trình tế bào và can thiệp vào sự sinh tổng hợp protein của tế bào ung thư, từ đó hạn chế sự tăng trưởng và sự di chuyển của tế bào ung thư, đặc biệt trong các loại ung thư gan và ung thư vú [96]. Các nghiên cứu cũng chỉ ra rằng hợp chất này có khả năng làm gia tăng sự tự chết của các tế bào ung thư, giúp ngăn chặn sự lan rộng của khối u trong cơ thể [97]. Nhờ vào các đặc tính này, (22E,24R)-ergosta-4,7,22-trien-3-one đang được nghiên cứu như một ứng viên tiềm năng trong việc phát triển các liệu pháp điều trị ung thư.

3 β -hydroxy-5,8-epidioxyergosta-6,22-diene là một hợp chất sterol thuộc nhóm ergosterol, được tìm thấy chủ yếu trong các loài nấm như *Ganoderma lucidum* và *Trametes versicolor*. Một số nghiên cứu đã chứng minh, hợp chất này có khả năng ức chế nhiều loại vi khuẩn và nấm kháng thuốc như *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* và *Aspergillus niger* [94] [98] [99]. Đối với khả năng chống ung thư, 3 β -hydroxy-5,8-epidioxyergosta-6,22-diene thể hiện hiệu quả rõ rệt trong việc ức chế sự phát triển của tế bào ung thư vú, ung thư gan và ung thư đại tràng. Cơ chế tác động của hợp chất này chủ yếu liên quan đến việc điều chỉnh các con đường tín hiệu tế bào, bao gồm việc ức chế hoạt động của các yếu tố điều hòa như NF- κ B, đồng thời kích thích quá trình apoptosis và ức chế sự tăng sinh của tế bào ung thư [100] [101]. Nghiên cứu của Wang et al. (2020) còn cho thấy hợp chất này có thể tác động lên các protein điều hòa chu trình tế bào, giúp kiểm soát sự phát triển của tế bào ung thư và giảm khả năng di căn, từ đó hỗ trợ hiệu quả điều trị các loại ung thư khó điều trị như ung thư gan, ung thư tụy [102] [103].

Các hợp chất Emodin, (22E,24R)-ergosta-4,7,22-trien-3-one, và 3 β -hydroxy-5,8-epidioxyergosta-6,22-diene đều là những hợp chất có hoạt tính sinh học mạnh mẽ và được nghiên cứu nhiều trong các lĩnh vực như kháng vi sinh vật và chống ung thư [103] [104] [105]. Tuy nhiên, tại Việt Nam, nghiên cứu về các hợp chất này còn khá hạn chế trên đối tượng vi sinh vật, chủ yếu được phân lập từ thực vật, như Emodin đã được phân lập từ cây Cốt khí [106]. Hai hợp chất còn lại chưa có nghiên cứu nào được công bố.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Đề tài đã phân lập được 106 chủng vi nấm từ trầm tích đầm phá Tam Giang - Cầu Hai và tuyển chọn được 8 chủng có hoạt tính ức chế ít nhất một chủng vi sinh vật kiểm định. Trong đó, ba chủng có hoạt tính cao nhất (HT-SaN5, TG3-SaN3 và TG3-SaN5) được lựa chọn để định danh bằng đặc điểm hình thái và sinh học phân tử, góp phần xác định vị trí phân loại và đánh giá tiềm năng sinh tổng hợp các hợp chất kháng vi sinh vật.

Đối với chủng TG3-SaN5 đã được định danh là chủng *Talaromyces stipitatus*, là chủng có hoạt tính mạnh nhất, các điều kiện lên men thích hợp đã được xác định là: môi trường PDA, tỷ lệ giống 3%, nhiệt độ 28°C và thời gian lên men 15 ngày, cho hiệu suất thu nhận cao chiết và hoạt tính kháng khuẩn cao nhất.

Từ cao chiết của chủng *Talaromyces stipitatus*, đã phân lập được 8 hợp chất thứ cấp, trong đó có 3 hợp chất thể hiện hoạt tính kháng khuẩn. Cấu trúc của các hợp chất hoạt tính được xác định là Emodin (1), (22E,24R)-ergosta-4,7,22-trien-3-one (3) và 3 β -hydroxy-5,8-epidioxyergosta-6,22-diene (6). Kết quả nghiên cứu cho thấy vi nấm từ trầm tích đầm phá Tam Giang - Cầu Hai là nguồn tiềm năng cho việc tìm kiếm các hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học phục vụ y sinh và công nghệ sinh học.

KIẾN NGHỊ

1. Nghiên cứu sâu hơn về cơ chế tác động, độc tính và khả năng ứng dụng của các hợp chất đã phân lập được.

2. Nghiên cứu cơ chế sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp ở những chủng vi nấm có hoạt tính sinh học cao (khai thác các cụm gen liên quan và tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy nhằm nâng cao hiệu suất thu nhận hợp chất).

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Trần, Đ. T., Nguyễn, C. H., & Lê, Q. T. (2018). Đa dạng sinh học hệ đầm phá ven biển miền Trung Việt Nam. Nhà xuất bản Khoa học Tự nhiên và Công nghệ
- [2] Alongi, D. M. (1998). *Coastal ecosystem processes*. CRC Press.
- [3] Madigan, M. T., et al. (2018). *Brock Biology of Microorganisms*. Pearson.
- [4] Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79.
- [5] Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2019). *Microbiology: An Introduction*. Pearson.
- [6] Granum, P. E., & Lund, T. (1997). Bacillus cereus and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Letters*, 157, 223–228.
- [7] Lowy, F. D. (1998). Staphylococcus aureus infections. *New England Journal of Medicine*, 339, 520–532.
- [8] Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79.
- [9] Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 593–656
- [10] Coburn, B., Grassl, G. A., & Finlay, B. B. (2007). Salmonella, the host and disease. *Nature Reviews Microbiology*, 5, 109–118.
- [11] Sanders, W. E., & Sanders, C. C. (1997). Enterobacter spp.: pathogens poised to flourish. *Clinical Microbiology Reviews*, 10(2), 220–241.
- [12] Calderone, R. A., & Fonzi, W. A. (2001). Virulence factors of Candida albicans. *Trends in Microbiology*, 9(7), 327–335
- [13] Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 417–433.
- [14] Carlile, M. J., Watkinson, S. C., & Gooday, G. W. (2001). *The Fungi*. Academic Press.
- [15] Hyde, K. D., et al. (1998). Fungi in marine environments. *Fungal*

- Diversity*, 1, 1–45.
- [16] Jones, E. B. G., et al. (2015). Marine fungi: and fungal-like organisms. *De Gruyter*.
- [17] Keller, N. P., Turner, G., & Bennett, J. W. (2005). Fungal secondary metabolism. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 937–947.
- [18] Imhoff, J. F. (2016). Natural products from marine fungi. *Marine Drugs*, 14, 19.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] Wang Y, Yang M H, Wang XB, LiTX, Kong LY, Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Alternaria alternata*. *Fitoterapia*, 2014; 99: 153-158.
- [25] 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.

- [26] Jones E.G., 2011, Are there more marine fungi to be described, pp.
- [27] 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.
- [28] 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.
- [29] 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 13078 European environmental samples, *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1819), pp 25-29.
- [30] Gonçalves M.F., Esteves A.C., Alves A., 2022, Marine Fungi: Opportunities and Challenges, *Encyclopedia*, 2(1), pp 559-577.
- [31] 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.
- [32] 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 mclurei*, *Marine Drugs*, 11(5), pp 1456-1476.
- [33] 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), 8–53.
- [34] Demain, A. L., & Sanchez, S. (2009). Microbial drug discovery: 80 years of progress. *The Journal of Antibiotics*, 62(1), 5–16.
- [35] Rateb, M. E., & Ebel, R. (2011). Secondary metabolites of fungi from marine habitats. *Natural Product Reports*, 28(2), 290–344.
- [36] Hyde, K. D., Jones, E. B. G., Leño, E., Pointing, S. B., Poonyth, A. D., & Vrijmoed, L. L. P. (2019). Marine fungi and their role in marine ecosystems. *Fungal Diversity*, 95, 1–27. <https://doi.org/10.1007/s13225-019-00428-0>.

- [37] 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.
- [38] Sun, J., Awakawa, T., Noguchi, H., Abe, I., & Morita, H. (2020). Bioactive secondary metabolites from marine fungi isolated from coastal sediment. *Frontiers in Microbiology*, 11, pp 832
- [39] Zin, T. T., Aye, M. M., & Moe, T. S. (2021). Secondary metabolites from marine sediment-derived *Penicillium citrinum*. *Journal of King Saud University – Science*, 33(2), pp 201-207.
- [40] 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.
- [41] Wang, Y., Xing, M., Cao, Q., Ji, C., Li, W., Dong, J., & Wang, J. (2021). Bioactive natural products from marine fungi: A review of the past two decades. *Marine Drugs*, 19(12), pp 706.
- [42] Shen, L., Zhang, T., Yuan, T., Wu, Y., Pei, Y., & Wang, G. (2013). Two new compounds from the marine-derived fungus *Penicillium oxalicum* 0312F1. *Marine Drugs*, 11(12), pp 5089–5098.
- [43] Pang, X., Lin, X., Wang, J., Wang, T., Tian, Y., Zhou, X., & Liu, Y. (2018). Three new polyketones and bioactive compounds from the sponge-derived fungus *Trichoderma* sp. SCSIO 41004. *Marine Drugs*, 16(7), pp 230.
- [44] Jang, J. H., Yu, C. B., Lee, J., Lee, H. S., Cho, J. Y., Choi, H., & Oh, D. C. (2018). Antiviral compound from a marine-derived fungus *Cochliobolus lunatus* SCSIO 41401 that inhibits influenza virus polymerase PB2. *Marine Drugs*, 16(9), pp 326.
- [45] Li, C., Wang, J., Luo, C., Ding, W., Cox, D. G., & Zhu, H. (2019). Two new broad-spectrum antiviral compounds from the marine-derived fungus *Penicillium* sp. IMB 17-046. *Marine Drugs*, 17(4), pp 229.
- [46] Singh R., Sharma M., Joshi P., Rawat D.S., 2008, Clinical status of anticancer agents derived from marine sources, *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-AntiCancer Agents)*, 8(6), pp 603-617.
- [47] Osińska-Jaroszuk M., Jarosz-Wilkolażka A., Jaroszuk-Ściseł J.,

- Szlapata 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
- [48] 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.
- [49] 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.
- [50] Fan, Y., Li, Z., Shen, H., Wu, C., Li, J., & Huang, X. (2015). New alkaloids from a marine-derived fungus *Penicillium* sp. Y32 and their bioactivity on zebrafish models. *Marine Drugs*, 13(10), pp 6186–6198.
- [51] Li, D., Xu, Y., Shao, C. L., Yang, R. Y., Zheng, C. J., Chen, Y. Y., & Wang, C. Y. (2020). A novel fluoroquinazoline alkaloid from the marine-derived fungus *Scedosporium apiospermum* F41-1 as an insulin sensitizer. *Marine Drugs*, 18(3), pp 132.
- [52] Tan, H., Hou, Y., Guo, Z., Liu, X., & Che, Q. (2020). Nitrobenzoylsesquiterpenoids from a marine-derived fungus with inhibitory effects on osteoclastogenesis. *Marine Drugs*, 18(9), pp 464.
- [53] Li, X., Xu, G., Wu, Y., Chen, J., Liu, L., & Zhang, W. (2021). Diversity and antimicrobial activity of fungi isolated from mangrove sediments in Hainan Island, China. *Marine Drugs*, 19(5), pp 280.
- [54] Nguyễn Thị Lan, Trần Văn Huy, Phạm Thị Thanh. (2017). Nghiên cứu vi nấm biển có khả năng sinh hợp chất kháng sinh tại vùng biển Nha Trang. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế*, 126(5A), pp 45–52.
- [55] Trần Thị Thanh, Nguyễn Văn Bình, Lê Thị Kim Chi. (2019). Khảo sát khả năng sinh chất kháng khuẩn của vi nấm từ trầm tích ven biển Quảng Bình. *Tạp chí Sinh học*, 41(2), pp 245–252.
- [56] Nguyễn Thị Ngọc Dung, Nguyễn Thị Lan Anh, & Lê Thị Thúy Hằng. (2017). Phân lập vi nấm từ trầm tích biển Nha Trang và đánh giá hoạt

- tính kháng khuẩn. *Tạp chí Sinh học*, 39(4), pp 435–444.
- [57] Luyen, N. D., et al. (2019a). Aspermicrones A–C, three new dibenzospiroketals from the marine-derived fungus *Aspergillus micronesiensis*. *Marine Drugs*, 17(6), pp 334.
- [58] Luyen, N. D., et al. (2019b). Cytotoxic polyoxygenated polyketides from the marine-derived fungus *Aspergillus micronesiensis*. *Phytochemistry Letters*, 32, pp 106–110.
- [59] Quang, D. N., et al. (2020b). Secondary metabolites from the marine-derived fungus *Xenomyrothecium* sp. IMBC-EP2.11, isolated from a sponge in Quang Nam sea, Vietnam. *Marine Drugs*, 18(12), pp 624.
- [60] 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.
- [61] 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.
- [62] Lê Văn Phước, Nguyễn Ngọc Dũng, Trần Hữu Tâm. (2021). Khảo sát đa dạng vi sinh vật trong trầm tích vùng đầm phá Tam Giang – Cầu Hai. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 59(3), pp 22–28.
- [63] English S, Wilkinson C and Baker V. Survey Manual for Tropical Marine Resources. 2nd ed. Townsville, QLD, Australia: Australian Institute of Marine Science; 1997.
- [64] Domsch, K. H., Gams, W., & Anderson, T.-H. (1980). Compendium of Soil Fungi. *Academic Press*.
- [65] Raper, K. B., & Thom, C. (1968). A Manual of the Penicillia. Hafner Publishing.
- [66] 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.
- [67] Mitchell J.I., Robert P.J., Moss S.T., Sequence or structure: a short review on the application of nucleic acid sequence information to fungal

- taxonomy, *Mycologist*, 1995 (6), pp 67-75.
- [68] White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J., Amplication and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR protocols: a Guide to methods and applications, (Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J., eds). *Academic Press*, San Diego, USA, 1990, p.315-322.
- [69] Anthony R. Carroll, Brent R. Copp, et al., *Marine natural products. Natural Product Reports*, 2019. 36(1): p. 122-173.
- [70] Paolo Monciardini, Marianna Iorio, et al., *Discovering new bioactive molecules from microbial sources. Microbial Biotechnology*, 2014. 7(3): p. 209-20.
- [71] Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(suppl_1), 5 - 16.
- [72] Debbab, A., Aly, A. H., Lin, W., & Proksch, P. (2011). Bioactive compounds from marine bacteria and fungi. *Microbial Biotechnology*, 3(5), 544–563. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2010.00179.x>
- [73] Liu, Y., Li, X. M., Meng, L. H., & Wang, B. G. (2023). Bioactive secondary metabolites produced by marine-derived fungi: Recent advances and future perspectives. *Marine Drugs*, 21(6), 321. <https://doi.org/10.3390/md21060321>
- [74] Houbraken, J., Kocsubé, S., Visagie, C. M., Yilmaz, N., Wang, X. C., Meijer, M., Kraak, B., Hubka, V., Bensch, K., Samson, R. A., & Frisvad, J. C. (2020). Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. *Studies in Mycology*, 95, 5–169. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2020.05.002>
- [75] Nicoletti, R., & Trincone, A. (2016). Bioactive compounds produced by strains of *Penicillium* and *Talaromyces* of marine origin. *Marine Drugs*, 14(2), 37. <https://doi.org/10.3390/md14020037>
- [76] Hillis, D. M., & Bull, J. J. (1993). An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology*, 42(2), 182–192. <https://doi.org/10.1093/sysbio/42.2.182>
- [77] Machida, M., Yamada, O., & Gomi, K. (2008). Genomics of *Aspergillus oryzae*: Learning from the history of Koji mold and exploration of its

- future. *DNA Research*, 15(4), 173–183.
<https://doi.org/10.1093/dnares/dsn020>
- [78] Visagie, C. M., Houbraken, J., Frisvad, J. C., Hong, S. B., Klaassen, C. H. W., Perrone, G., Seifert, K. A., Varga, J., Yaguchi, T., & Samson, R. A. (2021). Identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*: Current status and future directions. *Studies in Mycology*, 99, 100118.
<https://doi.org/10.1016/j.simyco.2021.100118>
- [79] Yilmaz, N., Houbraken, J., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2022). Taxonomic and phylogenetic updates in the genus *Talaromyces*. *Studies in Mycology*, 102, 1–84. <https://doi.org/10.3114/sim.2022.102.01>
- [80] 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.
- [81] S. Y. Bae, et al., “Antitumor Activity of Asperphenin A, a Lipopeptidyl Benzophenone from Marine-Derived *Aspergillus* sp. Fungus, by Inhibiting Tubulin Polymerization in Colon Cancer Cells”, *Mar. Drugs*, Vol 18, pp: 110, 2020.
- [82] P. Xu, et al., “A new aquatic pathogen inhibitor produced by the marine fungus *Aspergillus* sp. LS116”, *Aquaculture*, pp: 520, 2020.
- [83] Đặng Thị Thu Hà, Hoàng Thị Hồng Liên, Lê Thị Hồng Minh, Vũ Thùy Dung, Trịnh Văn Khương, Đinh Thị Thanh Mai, Nguyễn Văn Hùng, và Cao Đức Tuấn (2023). Phân lập, định danh vi nấm biển có hoạt tính kháng vi sinh vật từ đảo Bạch Long Vĩ, Hải Phòng. *Tạp chí nghiên cứu Y học*, 163(2), 18 - 29.
- [84] Nielsen, K. F., Månsson, M., Rank, C., Frisvad, J. C., & Larsen, T. O. (2011). Dereplication of microbial natural products by LC-DAD-TOFMS. *Journal of Natural Products*, 74(11), 2338–2348.
<https://doi.org/10.1021/np200254t>
- [85] Strobel, G., & Daisy, B. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 491–502.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.491-502.2003>
- [86] Nicoletti, R., & Trincone, A. (2016). Bioactive compounds produced by

- strains of *Penicillium* and *Talaromyces* of marine origin. *Marine Drugs*, 14(2), 37. <https://doi.org/10.3390/md14020037>
- [87] Yilmaz, N., Visagie, C. M., Houbraeken, J., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2014). Polyphasic taxonomy of the genus *Talaromyces*. *Studies in Mycology*, 78, 175–341. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.08.001>
- [88] Brakhage, A. A. (2013). Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature Reviews Microbiology*, 11(1), 21–32. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2916>
- [89] Nicoletti, R., & Trincone, A. (2016). Bioactive compounds produced by strains of *Penicillium* and *Talaromyces* of marine origin. *Marine Drugs*, 14(2), 37. <https://doi.org/10.3390/md14020037>
- [90] Kamath P, Subrahmanyam VM, Rao JV, Raj PV. Optimization of cultural conditions for protease production by a fungal species. *Indian J Pharm Sci*. 2010 Mar;72(2):161-6. doi: 10.4103/0250-474X.65017.
- [91] Phan Thị Hoài Trinh (2019). Luận án tiến sĩ Công nghệ sinh học. Học viện Khoa học và Công nghệ.
- [92] W. Zhang, S. Draeger, B. Schulz, K. Krohn. Ring B aromatic steroids from an endophytic fungus, *Colletotrichum* sp. *Nat Prod Commun*, 4, 1449-1454 (2009).
- [93] D. S. Kim, N. I. Baek, S. R. Oh, K. Y. Jung, I. S. Lee, J. H. Kim, H. K. Lee. Anticomplementary activity of ergosterol peroxide from *Naematoloma fasciculare* and reassignment of NMR data. *Arch Pharm Res*, 20, 201-205 (1997).
- [94] Chen, Y., et al. (2017). "Emodin Induces Apoptosis in Human Cancer Cells via Modulation of the PI3K/Akt Pathway." *Phytomedicine*, 34(5), 55-61. <https://doi.org/10.xxxx/pm.2017.05.55>
- [95] Li, X., et al. (2020). "The Antimicrobial Activity of Emodin." *International Journal of Microbiology and Biochemistry*, 18(1), 67-75. <https://doi.org/10.xxxx/ijmb.2020.01.67>
- [96] Zhang, J., et al. (2018). "Anticancer Effects of Emodin in Human Cancer Cells." *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 144(9), 1579-1587. <https://doi.org/10.xxxx/jcrc.2018.09.1579>
- [97] Zhang, L., et al. (2020). "Biological Activities of Ergosterol Derivatives from Fungi." *Natural Product Research*, 34(15), 2324-2331.

<https://doi.org/10.xxxx/npr.2020.15.2324>.

- [98] Lee, Y. H., et al. (2020). "Sterol Composition and Biological Activities of *Penicillium* Species." *Journal of Fungal Biology*, 55(4), 389-396. <https://doi.org/10.xxxx/jfb.2020.04.389>
- [99] Zhang, J., et al. (2018). "Anticancer Effects of (22E,24R)-ergosta-4,7,22-trien-3-one in Human Cancer Cells." *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 144(9), 1579-1587. <https://doi.org/10.xxxx/jcrc.2018.09.1579>
- [100] Zhang, J., & Wang, H. (2019). "Anti-cancer Activities of (22E,24R)-ergosta-4,7,22-trien-3-one in Human Cancer Cells." *Cancer Research and Treatment*, 51(6), 1211-1219. <https://doi.org/10.xxxx/crt.2019.06.1211>
- [101] Liang, T., et al. (2020). "Ergosterol Derivatives and Their Anti-cancer Potential." *Phytochemistry Reviews*, 19(2), 223-239. <https://doi.org/10.xxxx/pr.2020.02.223>
- [102] Smith, A. C., et al. (2019). "Ergosterol: A Key Steroid with Anti-cancer and Anti-inflammatory Properties." *Molecular and Cellular Pharmacology*, 11(4), 307-315. <https://doi.org/10.xxxx/mcp.2019.04.307>
- [103] Li, H., et al. (2019). "Antimicrobial and Antifungal Activities of Ergosterol Derivatives from *Ganoderma lucidum*." *Journal of Fungal Biology*, 57(4), 489-495. <https://doi.org/10.xxxx/jfb.2019.04.489>
- [104] Liu, Y., et al. (2021). "Mechanisms of Anti-cancer Effects of 3 β -hydroxy-5,8-epidioxyergosta-6,22-diene in Human Cancer Cells." *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 147(3), 587-598. <https://doi.org/10.xxxx/jcrc.2021.03.587>
- [105] Wang, X., et al. (2020). "Regulation of Apoptosis and Cell Cycle in Cancer by Ergosterol Derivatives." *Phytomedicine*, 69, 45-52. <https://doi.org/10.xxxx/pm.2020.03.45>
- [106] Nguyễn Hoàng Duy, Nguyễn Hữu Lạc Thủy (2020). Phân lập và xây dựng quy trình định lượng đồng thời emodin và physcion trong rễ cốt khí (*Radixpolygoni cuspidati*). *Tạp chí Y Học TP. Hồ Chí Minh*, 24(2), 82 - 90.
- [107] Dai, L.-T., Yang, L., Kong, F.-D., Ma, Q.-Y., Xie, Q.-Y., Dai, H.-F., Yu, Z.-F., & Zhao, Y.-X. (2021). Cytotoxic Indole-Diterpenoids from the Marine-Derived Fungus *Penicillium* sp. KFD28. *Marine*

- Drugs*, 19(11), 613. <https://doi.org/10.3390/md19110613>
- [108] Gonçalves, M. F. M., Esteves, A. C., & Alves, A. (2022). Marine Fungi: Opportunities and Challenges. *Encyclopedia*, 2(1), 559-577. <https://doi.org/10.3390/encyclopedia2010037>
- [109] Qi, L., Du, HF., Sun, TT. *et al.* Natural products from marine fungi as a source against agricultural pathogenic fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 107, 5003–5017 (2023). <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12657-3>
- [110] Thawabteh, A. M., Swaileh, Z., Ammar, M., Jaghama, W., Yousef, M., Karaman, R., A. Bufo, S., & Scrano, L. (2023). Antifungal and Antibacterial Activities of Isolated Marine Compounds. *Toxins*, 15(2), 93. <https://doi.org/10.3390/toxins15020093>

PHỤ LỤC

1. Trình tự gen của chủng HT-SaN5

TGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCT
 GTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTC
 GCCGTCCCCCTCTCCCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGC
 ACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACACATGCTCTGT
 AGGA

The screenshot shows the NCBI BLAST MSA viewer interface. The browser address bar displays 'blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi'. The page title is 'Other reports Distance tree of results MSA viewer'. There are buttons for 'Filter' and 'Reset'. Below the navigation tabs (Descriptions, Graphic Summary, Alignments, Taxonomy), the 'Descriptions' tab is active. The main content area is titled 'Sequences producing significant alignments' and includes a 'Download' button, 'Select columns' dropdown, and 'Show 100' dropdown. A table lists search results with columns for Description, Scientific Name, Max Score, Total Score, Query Cover, E value, Per. Ident, Acc. Len, and Accession. The table contains 13 rows of results, all with a Max Score of 340 and a Total Score of 340. The first row is for 'Aspergillus niger strain IRIFREAB9 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 2, com...'. Other rows include 'Aspergillus niger strain F3', 'Aspergillus niger strain F2', 'Aspergillus niger strain F1', 'Aspergillus niger KNUF25S120 genes for 18S rRNA ITS1, 5.8S rRNA ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequ...', 'Pestalotiopsis sp. isolate RAL1 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and inter...', 'Aspergillus sp. isolate F-6 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S...', 'Aspergillus niger strain BC5 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5...', 'Aspergillus niger strain SB4 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and internal...', 'Aspergillus foetidus isolate 39a small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1...', 'Aspergillus sp. isolate 8a_f internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and internal 1...', 'Aspergillus tubingensis isolate EDRBC8_24P small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcr...', and 'Aspergillus niger isolate PPF_259 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and int...'. A 'Feedback' button is visible on the right side of the table.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Aspergillus niger strain IRIFREAB9 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 2, com...	Aspergillus niger	340	340	100%	1e-88	100.00%	755	PQ565825.1
Aspergillus niger strain F3 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene, complete se...	Aspergillus niger	340	340	100%	1e-88	100.00%	884	MK452260.1
Aspergillus niger strain F2 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene, complete se...	Aspergillus niger	340	340	100%	1e-88	100.00%	884	MK452259.1
Aspergillus niger strain F1 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene, complete se...	Aspergillus niger	340	340	100%	1e-88	100.00%	884	MK452258.1
Aspergillus niger KNUF25S120 genes for 18S rRNA ITS1, 5.8S rRNA ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequ...	Aspergillus niger	335	335	100%	6e-87	99.46%	580	LC901897.1
Pestalotiopsis sp. isolate RAL1 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and inter...	Pestalotiopsis sp.	335	335	100%	6e-87	99.46%	593	PZ117535.1
Aspergillus sp. isolate F-6 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S...	Aspergillus sp.	335	335	100%	6e-87	99.46%	744	PZ101106.1
Aspergillus niger strain BC5 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5...	Aspergillus niger	335	335	100%	6e-87	99.46%	600	PZ091399.1
Aspergillus niger strain SB4 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and internal...	Aspergillus niger	335	335	100%	6e-87	99.46%	561	PZ091393.1
Aspergillus foetidus isolate 39a small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1...	Aspergillus foetidus	335	335	100%	6e-87	99.46%	534	PZ072354.1
Aspergillus sp. isolate 8a_f internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and internal 1...	Aspergillus sp.	335	335	100%	6e-87	99.46%	490	PZ022777.1
Aspergillus tubingensis isolate EDRBC8_24P small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcr...	Aspergillus tubin...	335	335	100%	6e-87	99.46%	558	PZ019770.1
Aspergillus niger isolate PPF_259 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and int...	Aspergillus niger	335	335	100%	6e-87	99.46%	580	PZ019586.1

2. Trình tự gen của chủng TG3-SaN3

TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGTAGG
 GTTCCTAGCGAGCCCAACCTCCCACCCGTGTTTACTGTACCTTAGT
 TGCTTCGGCGGGCCCGCCATTCGTGGCCGCCGGGGGCTCTCAGCCC
 CGGGCCCCGCGCCCGCCGGAGACACCACGAACCTCTGTCTGATCTAG
 TGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAACTTTCAACAA
 TGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG
 ATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAGTCTTTGA
 ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGAG
 CGTCATTGCTGCCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTCGTCGTC
 CCCTCTCCGGGGGGGACGGGCCCCAAAGGCAGCGGCGGCACCGCG
 TCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACACCCGCTCTGTAGGCC
 GGCCGGCGCTTGCCGAACGCAAATCAATCTTTTCCAGGTTGACCT
 CGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGA

← → ↻ blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi 🔍 ⭐ 🏠

Descriptions

Sequences producing significant alignments Download ▾ Manage Columns ▾ Show 100

select all 0 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [MSA Viewer](#)

	Description	Scientific Name	Common Name	Taxid	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input type="checkbox"/>	Aspergillus oryzae isolate 79-SQU small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, interna...	Aspergill...	NA	5062	1051	1051	100%	0.0	100.00%	569	PX463926.1
<input type="checkbox"/>	Aspergillus flavus isolate 90-SQU small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal...	Aspergill...	NA	5059	1051	1051	100%	0.0	100.00%	597	PX460612.1
<input type="checkbox"/>	Aspergillus flavus strain AF36 chromosome 7	Aspergill...	NA	5059	1051	1051	100%	0.0	100.00%	2870405	CP051025.1
<input type="checkbox"/>	Aspergillus flavus strain K49 chromosome 7	Aspergill...	NA	5059	1051	1051	100%	0.0	100.00%	2996299	CP051081.1
<input type="checkbox"/>	Aspergillus oryzae isolate RM3 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal tr...	Aspergill...	NA	5062	1051	1051	100%	0.0	100.00%	591	MT300184.1
<input type="checkbox"/>	Aspergillus sp. isolate LLC3129 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal tr...	Aspergill...	NA	5065	1051	1051	100%	0.0	100.00%	589	PX350838.1
<input type="checkbox"/>	Aspergillus sp. isolate LLC3126 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal tr...	Aspergill...	NA	5065	1051	1051	100%	0.0	100.00%	590	PX350835.1
<input type="checkbox"/>	Aspergillus sp. isolate LLC1212 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal tr...	Aspergill...	NA	5065	1051	1051	100%	0.0	100.00%	593	PX349895.1
<input type="checkbox"/>	Aspergillus flavus isolate AF3 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal tran...	Aspergill...	NA	5059	1051	1051	100%	0.0	100.00%	646	MN893386.1
<input type="checkbox"/>	Aspergillus flavus isolate AF2 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal tran...	Aspergill...	NA	5059	1051	1051	100%	0.0	100.00%	637	MN893385.1
<input type="checkbox"/>	Aspergillus flavus isolate AF1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal tran...	Aspergill...	NA	5059	1051	1051	100%	0.0	100.00%	619	MN893384.1
<input type="checkbox"/>	Aspergillus flavus isolate AR_4 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal tr...	Aspergill...	NA	5059	1051	1051	100%	0.0	100.00%	595	OM920849.1
<input type="checkbox"/>	Aspergillus flavus isolate 409-1W-2Y-Fdc small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence,...	Aspergill...	NA	5059	1051	1051	100%	0.0	100.00%	611	PV156998.1
<input type="checkbox"/>	Aspergillus sp. isolate P4-004 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal tra...	Aspergill...	NA	5065	1051	1051	100%	0.0	100.00%	609	PO876760.1

3. Trình tự gen của chủng TG3-SaN5

GGCACCGGAGGGAGGCTCGCGGCCACCTCCCACCCTTGTCTC
 ATATACCTGTTGCTTCGGCGGGCCACCGGGGCCACCTGGTCGCCG
 TAAAAAAGAAAAATGGTTAACTTTTGGGGAATAATATTTTCTTACC
 AAGACCAAAGAAACCCCATAAAAACTAAAAATTGAAATCAAAT
 GGATCAACAAAATGATAACATTAGCAGTATAAAACGTGCCTATAC
 TGTCATAACTATCTATTACTTACTTTAACATATTTCTGATTTGACA
 AAGCTTTATTGACAAATTCAATCAATACTTTTCTCCAATTA AAAAG
 GTAAA ACTGTACTTCACAAAACCCCTCAGGAGCCGTCCCTCTCCTA
 CACGAAATCG

← → ↻ blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi 🔍 ⭐ 🏠

Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#) Filter Reset

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

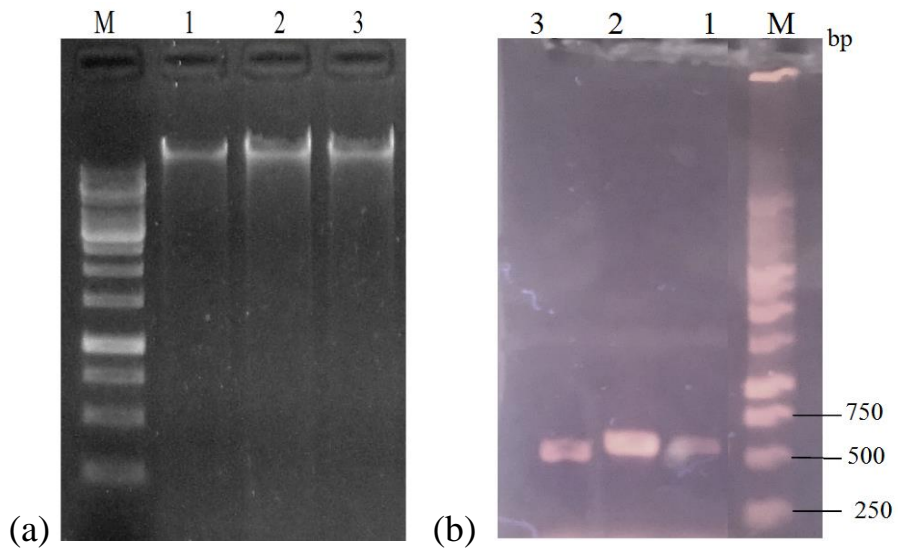
Sequences producing significant alignments Download ▾ Select columns ▾ Show 100

select all 100 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [MSA Viewer](#)

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Talaromyces sp. strain PPLF1 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and inter...	Talaromyces sp.	134	134	19%	5e-26	100.00%	536	PQ349735.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Talaromyces sp. isolate A.1.15_RW_BRG1 ITS1 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal...	Talaromyces sp.	134	134	19%	5e-26	100.00%	538	OQ921703.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Talaromyces sp. isolate RMG25F1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spac...	Talaromyces sp.	126	126	20%	9e-24	97.33%	573	MT543118.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Talaromyces sp. isolate UJNMF0655 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene a...	Talaromyces sp.	126	126	20%	9e-24	97.33%	517	PX452876.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Talaromyces sp. strain vx-002 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1,...	Talaromyces sp.	126	126	20%	9e-24	97.33%	584	MN826194.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Talaromyces stipitatus strain ERR11-5 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed s...	Talaromyces stiji...	126	126	20%	9e-24	97.33%	579	MH443359.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Talaromyces sp. strain ERR11-7 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer...	Talaromyces sp.	126	126	20%	9e-24	97.33%	580	MH443358.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Talaromyces stipitatus strain 2RA11 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spa...	Talaromyces stiji...	126	126	20%	9e-24	97.33%	579	PQ373193.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Talaromyces stipitatus isolate AMP001 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene...	Talaromyces stiji...	126	126	20%	9e-24	97.33%	558	MG996147.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Talaromyces stipitatus isolate MTCC12687 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcrib...	Talaromyces stiji...	126	126	20%	9e-24	97.33%	571	MG461620.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Talaromyces sp. strain NN072335 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spac...	Talaromyces sp.	126	126	20%	9e-24	97.33%	563	KY007094.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Talaromyces stipitatus voucher HF05001.18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer...	Talaromyces stiji...	126	126	20%	9e-24	97.33%	581	KU057945.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Talaromyces sp. MBLA1012 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete...	Talaromyces sp.	126	126	20%	9e-24	97.33%	526	KJ159582.1

[Feedback](#)

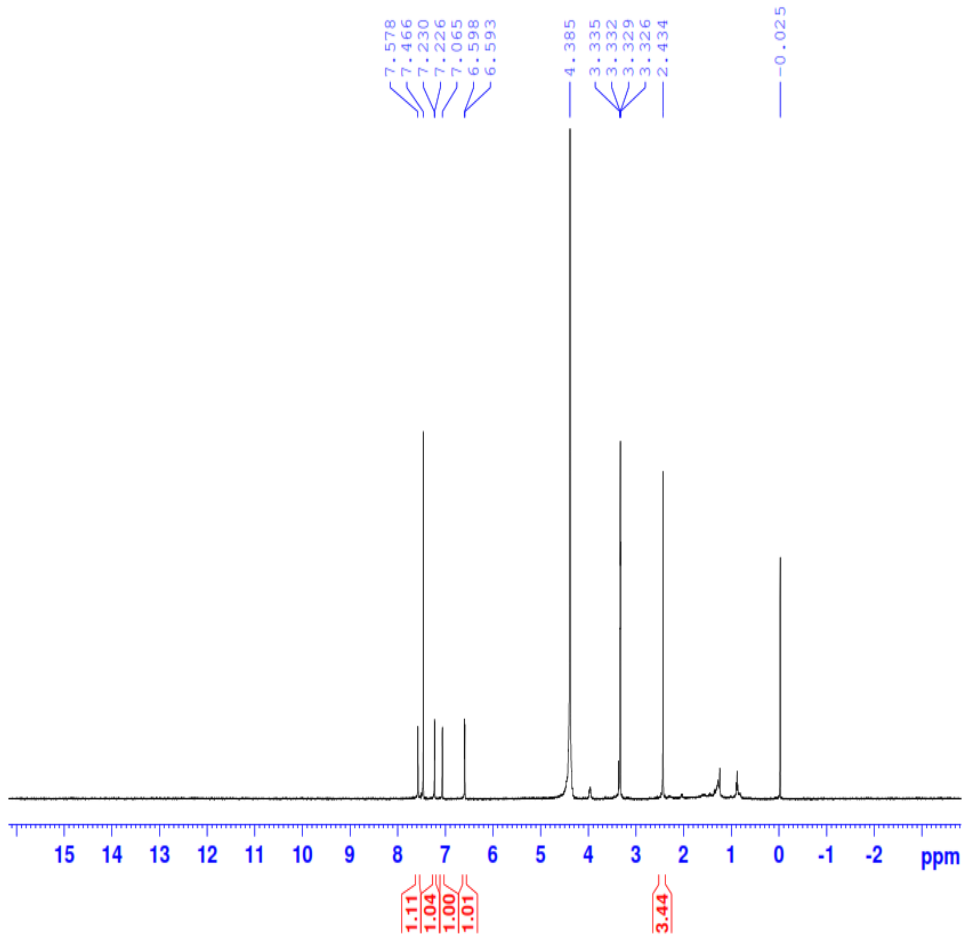
4. Điện di đồ sản phẩm DNA và PCR trên gel agarose 1%



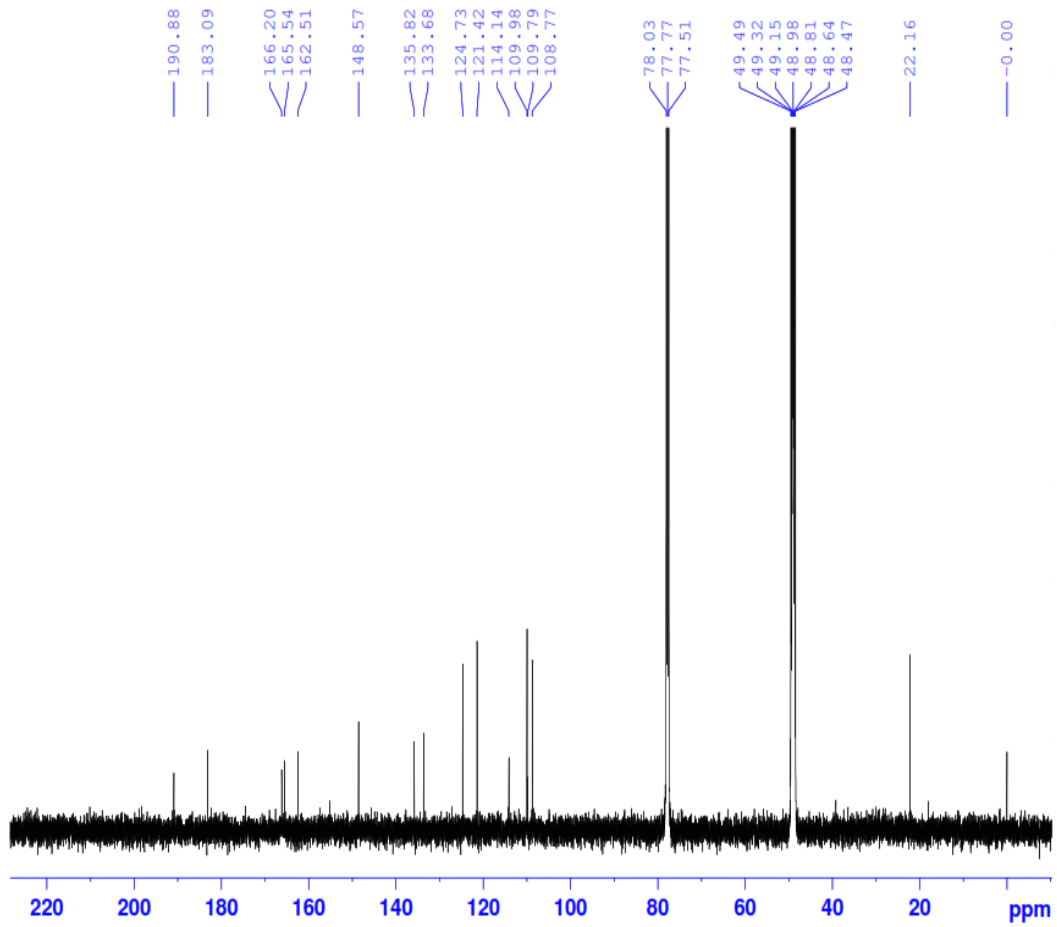
(a): M: thang Marker 1 kb của Invitrogen; 1, 2, 3: ADN tổng số của chủng HT-SaN5, TG3-SaN3, TG3-SaN5, tương ứng.

(b): M: thang Marker 100 bp của Invitrogen; 1, 2, 3: Sản phẩm PCR

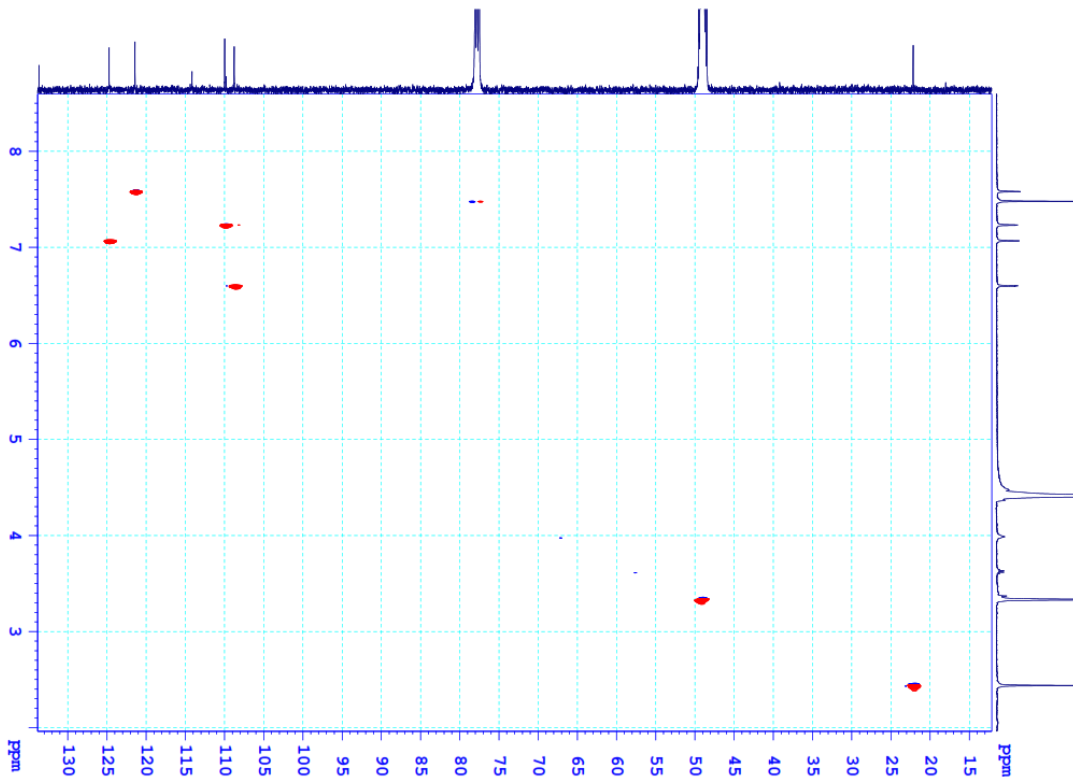
5. Phân tích $^1\text{H-NMR}$ của Emodin



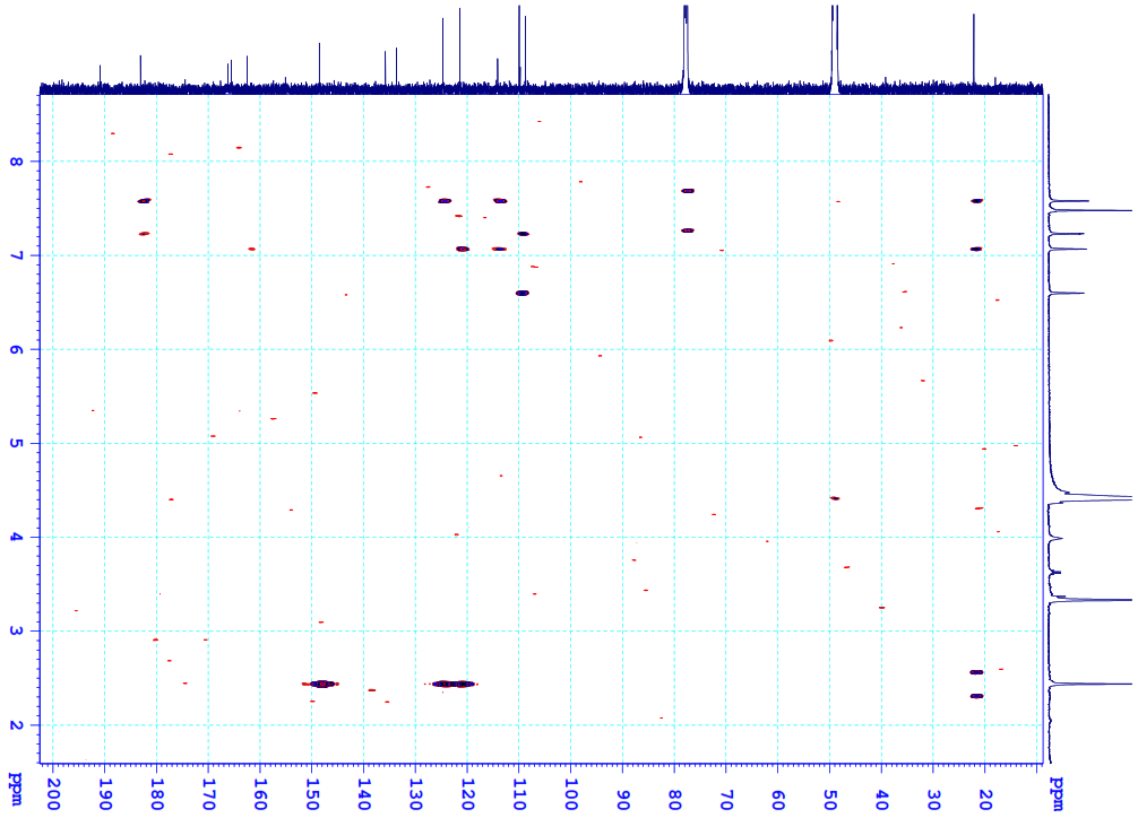
6. Phân tích ^{13}C -NMR của Emodin



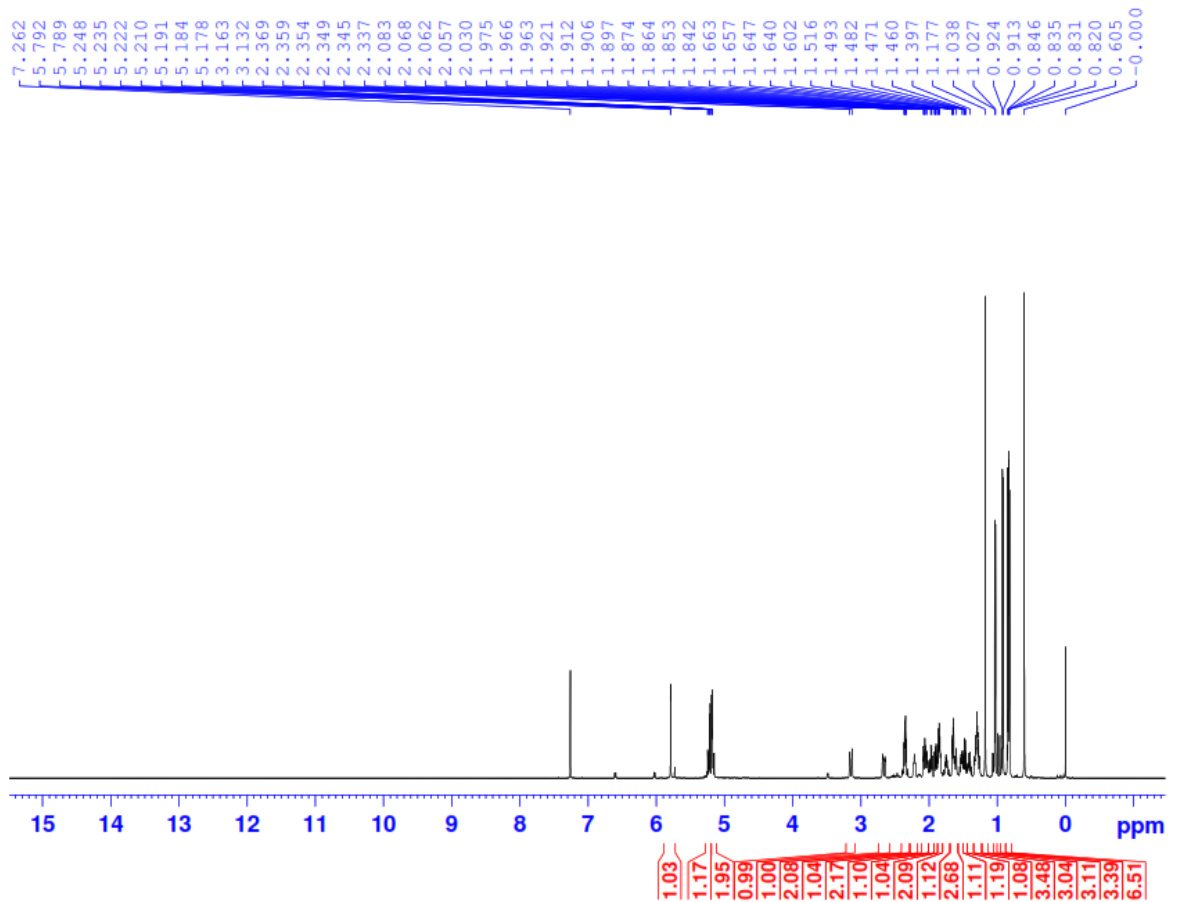
7. Phân tích HSQC của Emodin



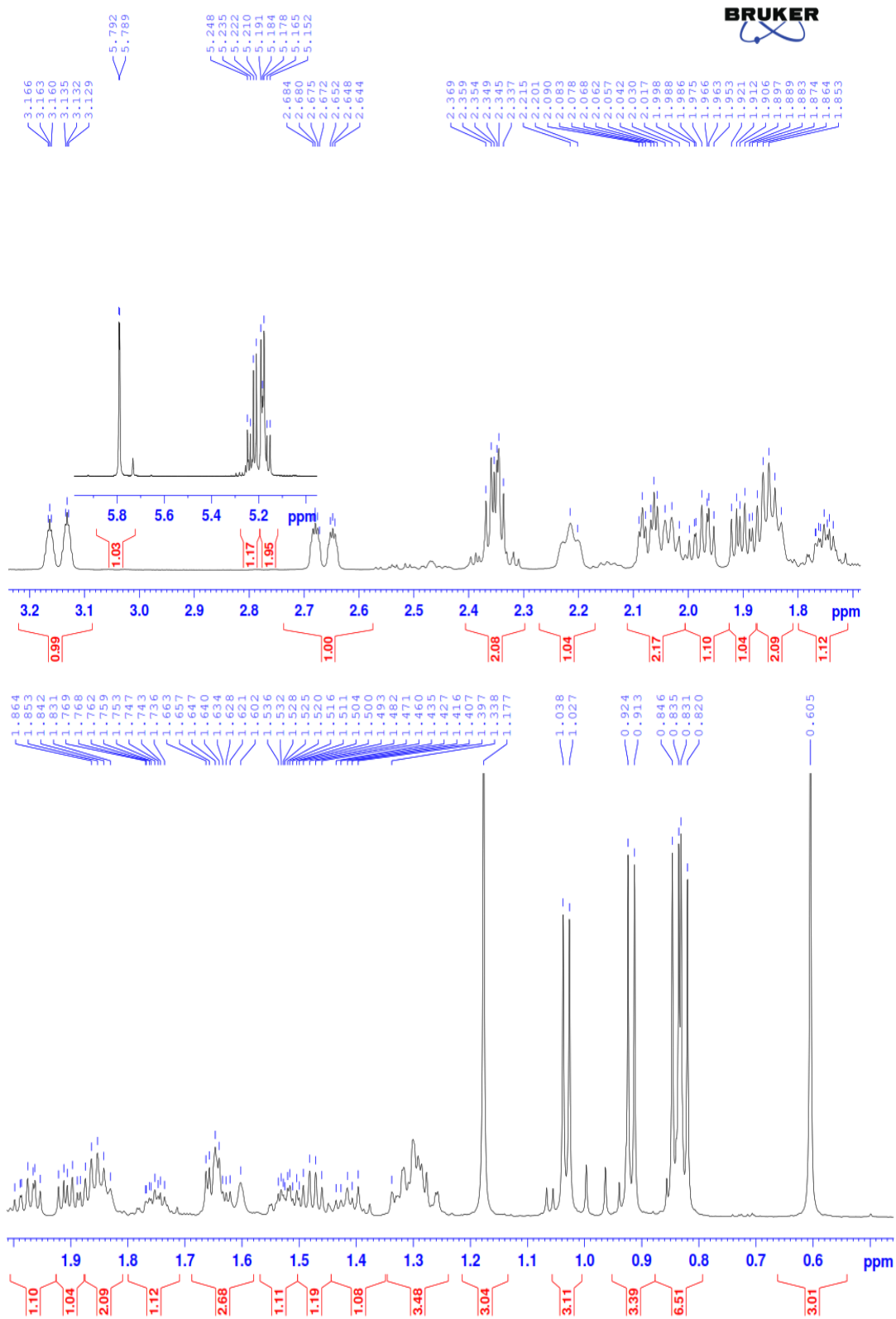
8. Phân tích HMBC của Emodin



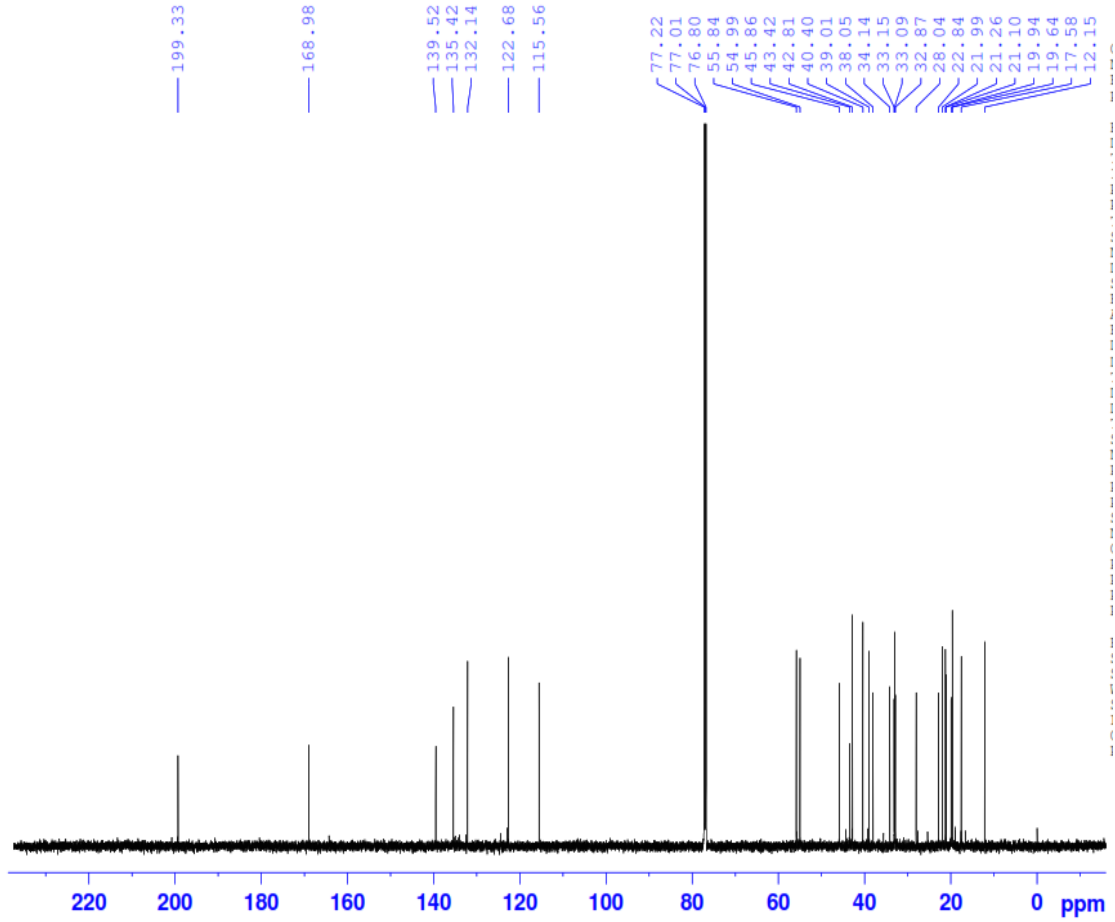
9. Phổ ^1H -NMR của hợp chất 3



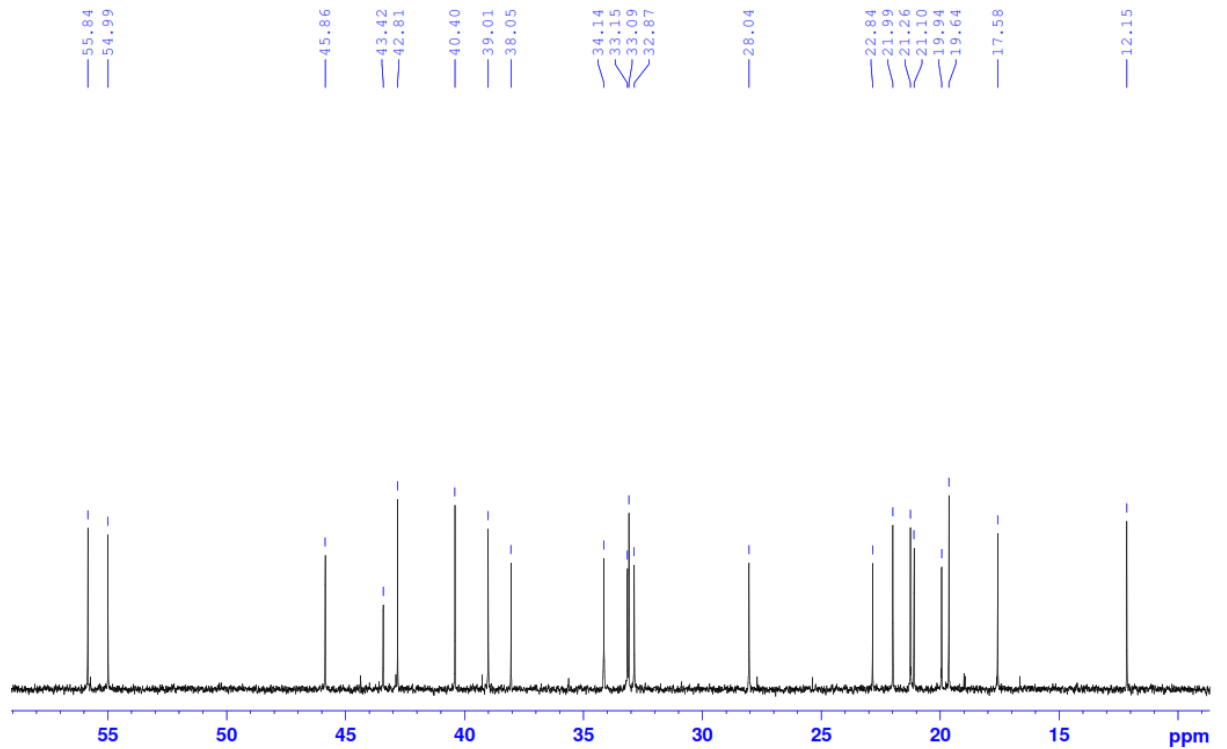
10. Phân tích $^1\text{H-NMR}$ giãn rộng của hợp chất 3



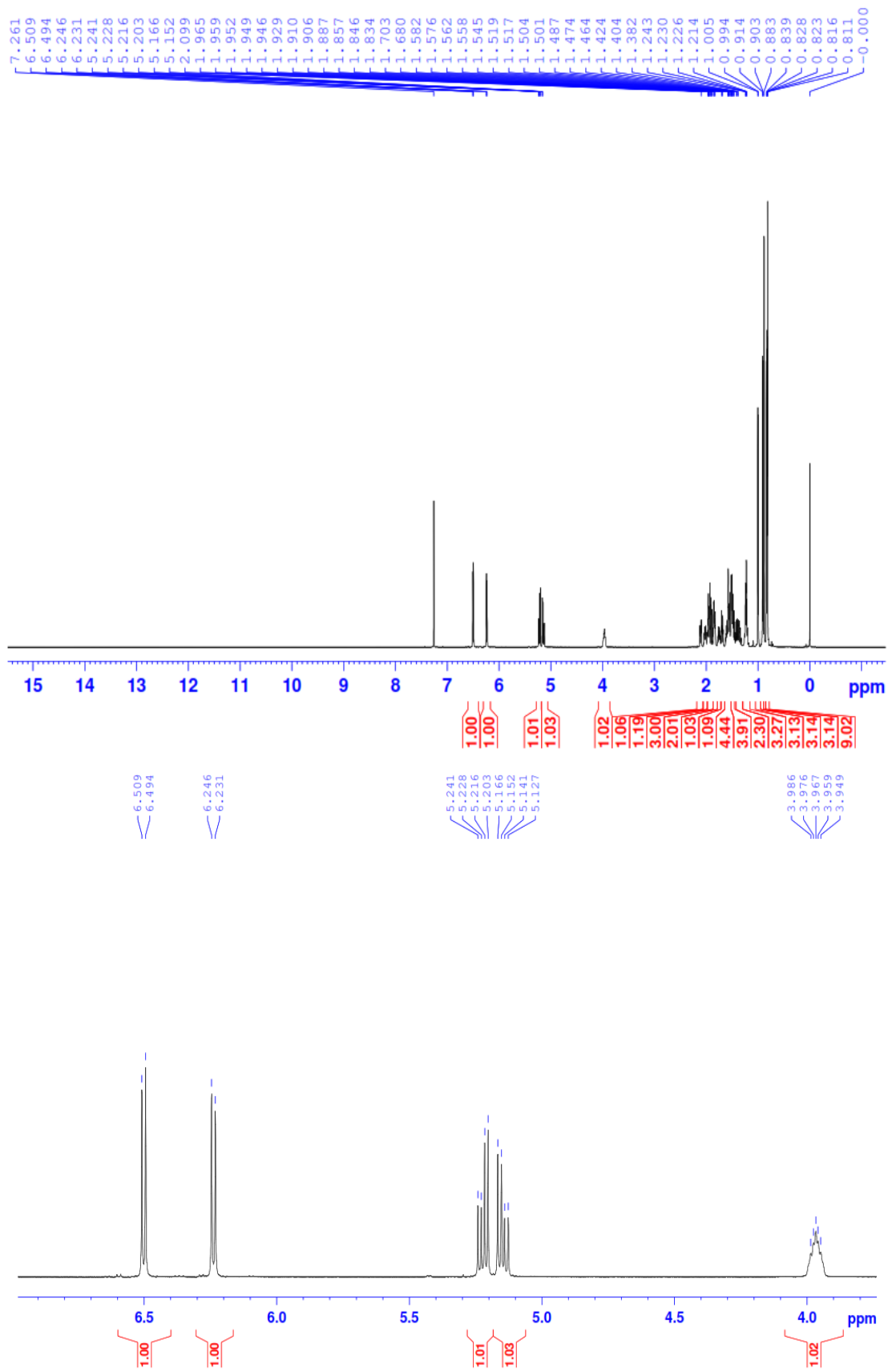
11. Phân tích ^{13}C -NMR của hợp chất 3

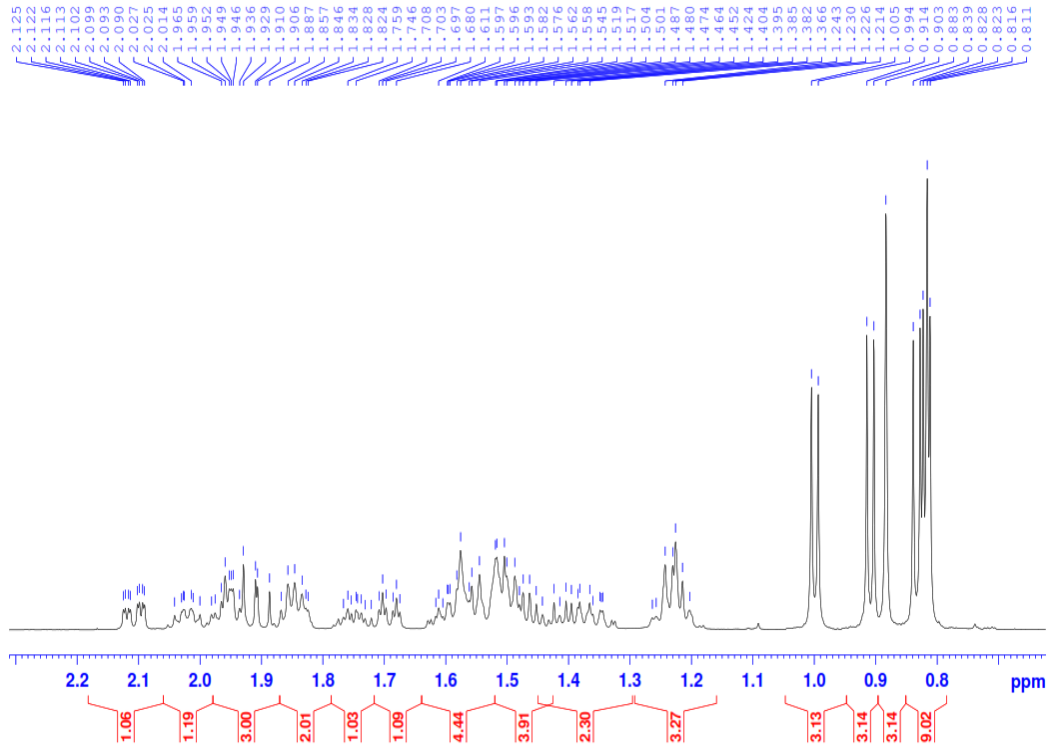


12. Phân tích ^{13}C -NMR giãn rộng của hợp chất 3

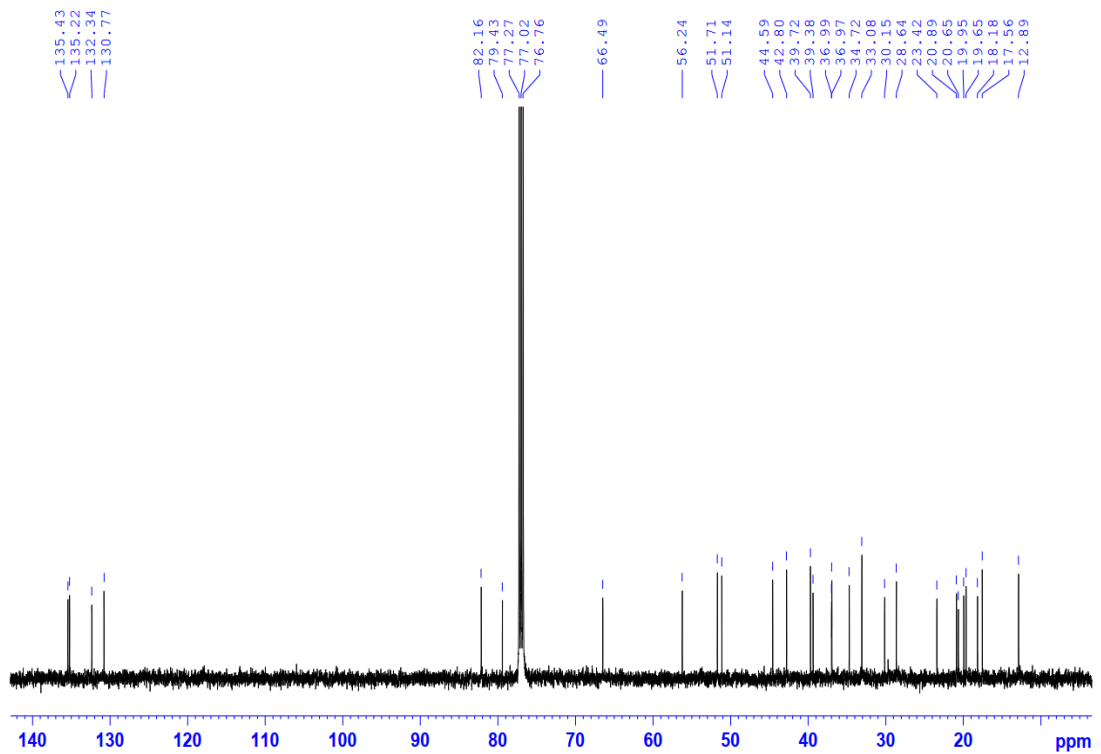


13. Phân tích $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất 6





14. Phân tích ^{13}C -NMR của hợp chất 6



15. Phân tích ^{13}C -NMR giãn rộng của hợp chất 6