

KHẢ NĂNG GÂY ĐỘC TẾ BÀO UNG THƯ VÀ KHÁNG KHUẨN CỦA DỊCH CHIẾT *GANODERMA LUCIDUM* VÀ *HUMPHREYA ENDERTII* TỪ VƯỜN QUỐC GIA PHƯỚC BÌNH

NGUYỄN THỊ DIỆU HẠNH¹, NGUYỄN NGỌC AN¹, LƯU VĂN LUÔNG², NGUYỄN CÔNG VÂN²,
HỒ NGUYỄN HOÀNG YẾN¹, PHẠM TẤN VIỆT^{1*}

¹Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp Tp. Hồ Chí Minh,

²Vườn Quốc gia Phước Bình, xã Phước Bình, huyện Bác Ái, tỉnh Ninh Thuận

phamtanviet@iuh.edu.vn

Tóm tắt. Các loài nấm Linh chi được sử dụng nhiều trong y học cổ truyền và việc xác định các hoạt tính sinh học của các loài nấm Linh chi mới là cần thiết cho sự phát triển các sản phẩm từ dược liệu. Năm 2016, nấm quý Linh chi, *Humphreya endertii*, thuộc họ Ganodermataceae, đã được phát hiện ở Vườn quốc gia Phước Bình, tỉnh Ninh Thuận, Việt Nam. Nghiên cứu này đã khảo sát khả năng gây độc tế bào ung thư phổi NCI H460 và tế bào ung thư gan HepG2 của dịch chiết hai loài nấm Linh chi *Ganoderma lucidum* và *H. endertii* có nguồn gốc từ Vườn quốc gia Phước Bình, IC₅₀ tương ứng cho dịch chiết *G. lucidum* và *H. endertii* là $1,78 \pm 0,35$ và $2,25 \pm 0,28$ mg/ml trên tế bào NCI H460; và $4,53 \pm 0,48$ và $4,13 \pm 1,05$ mg/ml trên tế bào HepG2. Bên cạnh đó, dịch chiết hai loài nấm này cũng thể hiện khả năng kháng 5 chủng vi khuẩn gây bệnh *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis* và *Salmonella typhimurium*; dịch chiết nấm *G. lucidum* còn thể hiện sự kìm hãm với *Escherichia coli* trong khi dịch chiết *H. endertii* thì không có hoạt tính này.

Từ khóa. Gây độc tế bào ung thư, kháng khuẩn, *Ganoderma lucidum*, *Humphreya endertii*.

ANTICANCER AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF *GANODERMA LUCIDUM* AND *HUMPHREYA ENDERTII* FROM PHUOC BINH NATIONAL PARK

Abstract. Lingzhi mushrooms are widely used in traditional medicine and bioactivity characterization of new lingzhi mushroom species are necessary for the development of pharmaceutical technology. In 2016, a new species of the family Ganodermataceae, *Humphreya endertii* was discovered in Phuoc Binh National Park, Ninh Thuan Province, Vietnam. This study investigated the cytotoxic effect of *Ganoderma lucidum* and *H. endertii* extracts on lung cancer cell line NCI H460 and liver cancer cell line Hep G2. IC₅₀ value of *G. lucidum* and *H. endertii* extracts, were 1.78 ± 0.35 and 2.25 ± 0.28 mg/ml against NCI H460; 4.53 ± 0.48 and 4.13 ± 1.05 mg/ml against HepG2, respectively. In addition, the extracts of these two fungi also showed antibacterial activity against 5 bacterial pathogens *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*; *G. lucidum* extract also showed antagonistic effect against *Escherichia coli*.

Key words. Cytotoxic, antibacterial, *Ganoderma lucidum*, *Humphreya endertii*.

1. GIỚI THIỆU

Nấm Linh chi thuộc họ Ganodermataceae (họ Linh chi) là loài nấm dược liệu quan trọng trong nền y học cổ truyền ở nhiều quốc gia như Trung Quốc, Nhật Bản, Hàn Quốc, Ấn Độ, Mỹ và nhiều quốc gia Châu Á khác cho việc cải thiện sức khỏe và kéo dài tuổi thọ. Các loại nấm thuộc họ Linh chi có giá trị được nuôi trồng và thương mại hóa từ năm 1970. Trong y học cổ truyền, nấm Linh chi dùng điều trị trong bệnh lý tim mạch, đái tiêu đường, viêm gan và ung thư [1, 2]. Nhiều nghiên cứu đã ghi nhận hoạt tính sinh học của Linh chi bao gồm khả năng kháng viêm, kháng virus, kháng khuẩn, kháng oxy hóa, chống lão hóa và kháng khối u [3-5]. Các hợp chất có hoạt tính sinh học như các protein điều chỉnh miễn dịch FIPs (Fungal Immunomodulation Proteins), các polysaccharide, các triterpenoid trong nấm Linh chi có vai trò quan trọng trong hỗ trợ điều trị các loại bệnh khác nhau [1, 6].

Theo Thần nông bản thảo, nấm Linh chi được xếp vào nhóm thượng dược, có giá trị dược liệu hơn cả nhân sâm và đã được sử dụng hàng ngàn năm. Hiện nay, các loại nấm Linh chi được ghi nhận có tác dụng dược lý thực nghiệm như *G. lucidum*, *G. sinensis*, *G. applanatum*, *G. tsugae*, *G. atrum*, và *G. formosanum* đã được chứng minh trong nhiều nghiên cứu khác nhau, trong đó *G. lucidum* và *G. sinensis* được ghi nhận trong Dược điển Trung Quốc (ChP2015) và *G. lucidum* được ghi nhận trong Dược điển Hoa kỳ (USP40-NF35) [7]. Ở Việt Nam, với đặc trưng khí hậu nhiệt đới ẩm, môi trường thuận lợi cho sự phát triển của nhiều loài nấm khác nhau, trong đó có các loài thuộc chi nấm Linh chi *Ganoderma*. Các nghiên cứu về nuôi trồng và giá trị dược liệu của các loài nấm Linh chi có nguồn gốc Việt Nam cũng đã được thực hiện [8-12]. Năm 2016, Tsivileva và cộng sự đã xác định thành phần hóa học của hệ sợi nấm của 5 loài nấm Linh chi có nguồn gốc từ Việt Nam và 3 loài nấm Linh chi từ Châu Âu và vùng Siberia. Kết quả cho thấy các chất hóa học thuộc nhóm acid béo tự do, các alcohol béo được tìm thấy trong hệ sợi nấm có nhiều tiềm năng ứng dụng trong công nghệ sinh học thực phẩm, trong hệ thống phân phối thuốc dựa trên chất béo [9]. Các chất có hoạt tính sinh học quý như lucidenic N acid, ganoderic acid, ganodermanontriol được ghi nhận ở các loài Linh chi ở Tam Đảo [10], triterpenoid và steroid hiện diện trong quả thể của nấm Linh chi *G. applanatum* [8]. Như vậy, các loài Linh chi ở Việt Nam có giá trị dược liệu quý nhưng các nghiên cứu chuyên sâu vẫn còn hạn chế.

Ngoài ra, sự phong phú đa dạng về chủng loại nấm ở Việt Nam đang được quan tâm và các loài nấm mới cần được nghiên cứu để bổ sung vào nguồn dược liệu tiềm năng. Năm 2009, Lê Xuân Thám và cộng sự đã ghi nhận đầu tiên về sự hiện diện của chi *Humphreya* Stey. ở Vườn quốc gia Cát Tiên (Đồng Nai – Lâm Đồng) với tên loài *Humphreya endertii* và các tên gọi thông thường khác nhau như nấm Quế linh, quế Linh chi, nấm Linh chi tím. Sau đó, loài nấm này tiếp tục được phát hiện ở Vườn quốc gia Phước Bình (Ninh Thuận) vào năm 2016 [13, 14]. Các nghiên cứu về đặc điểm sinh học của loài nấm này hiện vẫn chưa được thực hiện.

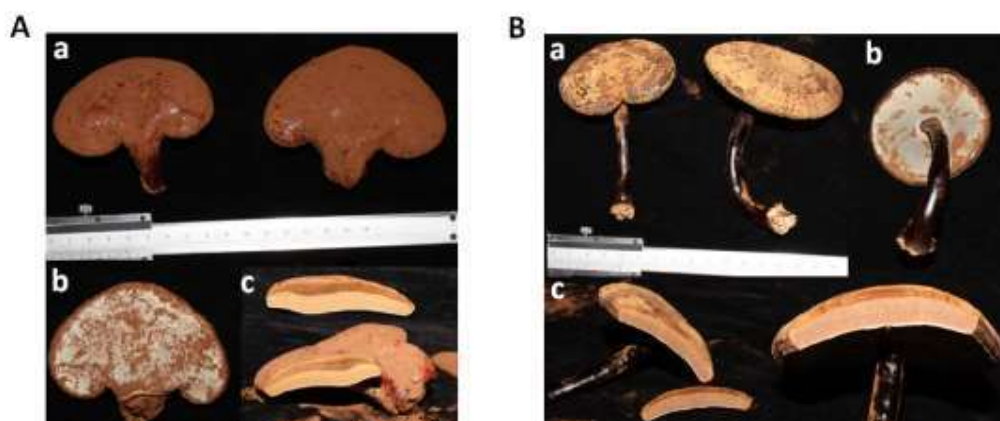
Trong nhiệm vụ bảo tồn nguồn gen quốc gia, Vườn quốc gia Phước Bình - Ninh Thuận đã tiến hành nuôi trồng thử nghiệm các loài nấm Linh chi trong họ Ganodermataceae và việc xác định các hoạt tính sinh học là rất cần thiết. Trong nghiên cứu này, hai loài nấm Linh chi có nguồn gốc từ Vườn quốc gia Phước Bình, *G. lucidum* và *H. endertii*, đã được khảo sát khả năng gây độc tế bào ung thư và kháng khuẩn, tạo cơ sở cho việc phát triển nguồn dược liệu trong tương lai cũng như góp phần bảo vệ các nguồn gen quý của Việt Nam.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

2.1.1. Mẫu nấm *Ganoderma lucidum* và *Humphreya endertii*

Hai mẫu nấm Linh chi, Linh chi đỏ *Ganoderma lucidum* và quế Linh chi *Humphreya endertii* được thu nhận tại Vườn quốc gia Phước Bình, Ninh Thuận, Việt Nam và tiến hành nuôi trồng để thu nhận quả thể cho các thí nghiệm tiếp theo (Hình 1). Các mẫu nấm được phơi khô với độ ẩm dưới 12% và bảo quản ở nhiệt độ thường $30 \pm 2^\circ\text{C}$ cho các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 1: *Ganoderma lucidum* (A) và *Humphreya endertii* (B). (a) Mặt trên tai nấm; (b) Mặt dưới tai nấm; (c) Thụ tầng dạng lỗ trên tai nấm cắt dọc.

2.1.2. Mẫu tế bào ung thư

Dòng tế bào ung thư phổi (NCI H460) và tế bào ung thư gan (HepG2) do ATCC (Hoa Kỳ) cung cấp, được nuôi cấy trong môi trường E'MEM có bổ sung L-glutamine (2 mM), HEPES (20 mM), amphotericin B (0,025 µg/ml), penicillin G (100 UI/ml), streptomycin (100 µg/ml), 10% (v/v) huyết thanh bào thai bò FBS và ủ ở 37°C, 5% CO₂ trong 24 giờ thì tiến hành thử nghiệm độc tính.

2.1.3. Chủng vi khuẩn

Sáu chủng vi khuẩn được sử dụng để xác định hoạt tính kháng khuẩn trong nghiên cứu này gồm 2 chủng gram dương là *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* và 4 chủng gram âm gồm *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076); *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311). Các chủng này được lưu giữ tại Bộ môn Công nghệ Sinh học, Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Công Nghiệp Tp. HCM ở điều kiện - 20°C và được hoạt hoá qua đêm trong môi trường Luria-Bertani broth (LB Broth) ở 37°C trước khi thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Phương pháp thu dịch chiết mẫu nấm

Dịch chiết của quả thể nấm Linh chi khô được tách chiết trong nước nóng và cô đặc từ bằng cách đun sôi nhẹ ở 80°C với 25g quả thể nấm được cô đặc còn 100ml. Dịch chiết được khử trùng bằng phương pháp lọc bằng màng lọc 0,2 µm. Dịch chiết này được sử dụng để kiểm tra độc tính trên các dòng tế bào ung thư phổi (NCI H460), ung thư gan (HepG2) và khả năng kìm hãm với các chủng vi khuẩn kiểm định. Dịch chiết nấm được tách chiết bằng nước nóng thay vì bằng các dung môi khác là căn cứ trên thói quen sử dụng nấm như nước uống hằng ngày của hầu hết người dân, việc kiểm tra hoạt tính sinh học của dịch chiết trong nước nóng góp phần làm sáng tỏ những lợi ích của việc uống nấm Linh chi như uống trà của người Việt Nam.

2.2.2. Phương pháp xác định độc tính trên tế bào ung thư của dịch chiết nấm Linh chi

Khả năng gây độc tế bào ung thư của dịch chiết nấm Linh chi được xác định bằng phương pháp SRB (Sulforhodamine B) [15]. Tế bào ung thư được cấy trên những đĩa nuôi cấy 96 giếng với mật độ là 10⁴ tế bào/giếng (đối với dòng HepG2) và 7,5x10³ tế bào/giếng (đối với dòng NCI-H460). Sau 24 giờ nuôi cấy, quần thể tế bào được ủ với dịch chiết nấm Linh chi ở các nồng độ khác nhau trong 48 giờ. Sau đó, protein tổng từ tế bào thử nghiệm được cố định bằng dung dịch Trichloroacetic acid (Sigma) 50% lạnh và nhuộm với dung dịch Sulforhodamine B 0,2% (Sigma). Kết quả được đọc bằng máy ELISA reader ở hai bước sóng 492 nm và 620 nm. Tỷ lệ ức chế tế bào được tính theo công thức: % IC = [1- (OD mẫu/OD chứng

âm)] x 100. Trong đó, giá trị OD mẫu và chứng âm được tính bằng công thức $OD_{492nm} - OD_{620nm}$. Các thí nghiệm được lặp lại ba lần và kết quả được trình bày và xử lý với phần mềm Prism để xác định nồng độ ức chế 50% (IC₅₀) với phương pháp hồi quy không tuyến tính đa thông số ($f(x) = ae^{-bx}$, khi a = 1 và b là hằng số phân ly) và $R^2 > 0,95$.

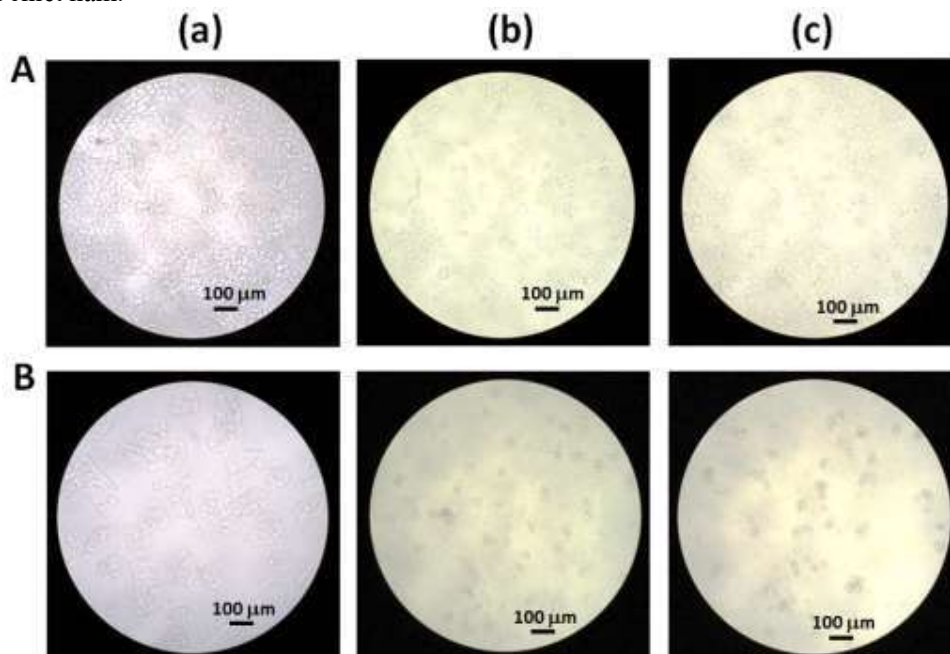
2.2.3. Phương pháp xác định hoạt tính kháng khuẩn

Phương pháp xác định khả năng kháng khuẩn của dịch chiết nấm Linh chi được thực hiện theo Bauer và cộng sự (1966) [16]. Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường LB Broth đến khi đạt được độ đục là 0,5 theo tiêu chuẩn McFarland. Dịch vi khuẩn (0,1 ml) được trải trên đĩa môi trường MHA (Mueller Hinton Agar). Các đĩa giấy thấm vô trùng (6mm) chứa 20ul dịch chiết nấm Linh chi được đặt lên bề mặt đĩa Petri đã dàn đều vi khuẩn. Tiếp theo, các đĩa Petri được để yên ở 4°C trong 2 giờ cho dịch chiết nấm Linh chi thấm vào môi trường thạch và sau đó đem ủ ở 37°C trong 16-18 giờ. Đĩa giấy kháng sinh Gentamycin (Nam Khoa, Việt Nam) được sử dụng như mẫu đối chứng dương cho các thí nghiệm và mẫu đối chứng âm được thực hiện với nước cất vô trùng. Khả năng kháng khuẩn của các dịch chiết nấm Linh chi đối với các chủng vi khuẩn kiểm định được đo bằng đường kính vòng vô khuẩn sau 16-18 giờ nuôi ủ ở 37°C.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Độc tính tế bào ung thư của dịch chiết nấm Linh chi *G. lucidum* và *H. endertii*

Độc tính của dịch chiết nấm Linh chi *G. lucidum* và *H. endertii* lên sự phát triển của hai dòng tế bào HepG2 và NCI H460 được xác định khi ủ các dòng tế bào ung thư với 10% dịch chiết nấm (25 mg/ml) trong 48 giờ. Quan sát sự phát triển của tế bào ung thư dưới kính hiển vi (độ phóng đại 100 lần) sau khi ủ với dịch chiết nấm.



Hình 2: Độc tính tế bào NCI H460 (A) và tế bào HepG2 (B) của dịch chiết nấm Linh chi *G. lucidum* và *H. endertii* (X100). (a) Tế bào NCI H460 và HepG2 bình thường; (b) Độc tính của dịch chiết nấm *G. lucidum* lên tế bào ung thư; (c) Độc tính của dịch chiết nấm *H. endertii* lên tế bào ung thư.

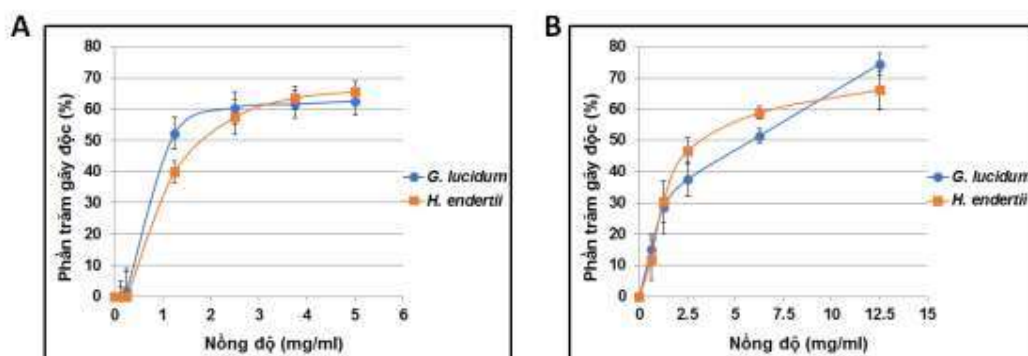
Kết quả quan sát hai dòng tế bào NCI H460 và tế bào HepG2 cho thấy dịch chiết nấm *G. lucidum* và *H. endertii* có ảnh hưởng lên sự phát triển của hai dòng tế bào thử nghiệm (Hình 2). Căn cứ vào số lượng và hình dạng tế bào sau khi ủ dịch chiết nấm, cho thấy dịch chiết nấm *G. lucidum* ảnh hưởng lên sự phát

triển của tế bào NCI H460 mạnh hơn so với dịch chiết của nấm *H. endertii* (hình 2-b,c) với mật độ tế bào giảm nhiều hơn và hình dạng tế bào bị biến dạng so với đối chứng (hình 2-a), trong khi dịch chiết nấm *H. endertii* chỉ cho thấy sự giảm thiểu về mật độ tế bào nhưng hình dạng tế bào thì không có sự thay đổi so với các tế bào NCI H460 đối chứng (hình 2c). Bên cạnh đó, ảnh hưởng của dịch chiết nấm *G. lucidum* và *H. endertii* lên sự phát triển của dòng tế bào HepG2 cũng thể hiện trong hình 2B. Mật độ tế bào giảm rõ rệt dưới tác động của dịch chiết cả hai loại nấm và quan sát sơ bộ ban đầu cho thấy dịch chiết nấm *G. lucidum* có độc tính mạnh hơn so với dịch chiết của nấm *H. endertii* lên sự phát triển của dòng tế bào HepG2.

Đã có nhiều nghiên cứu ức chế tế bào ung thư gan HepG2 và tế bào thận khi Vero của Fathima và cộng sự (2016) [17], ức chế tế bào ung thư vú MDA-MB-231 của Zhao và cộng sự (2010) [18, 19], ức chế tế bào ung thư phổi A549 [20], ức chế tế bào ung thư da B16F10, các hoạt chất cũng như con đường hoạt động cũng đã được xác định [19, 21]. Như vậy, khả năng gây độc tế bào HepG2 và NCI H460 của dịch chiết nấm Linh chi *G. lucidum* có nguồn gốc từ Vườn quốc gia Phước Bình, Ninh Thuận cũng được khẳng định, đồng thời hoạt tính của nấm quế linh chi *H. endertii* lần đầu tiên được xác nhận trong nghiên cứu này.

3.2. Xác định giá trị IC₅₀ của dịch chiết nấm Linh chi trên 2 dòng tế bào ung thư HepG2 và NCI H460

Phần trăm gây độc của dịch chiết nấm Linh chi lên các dòng tế bào ung thư được kiểm tra ở các nồng độ khác nhau nhằm xác định nồng độ ức chế 50% (IC₅₀). Sau 48 giờ ủ với dịch chiết nấm, protein tổng từ tế bào thử nghiệm được nhuộm bằng Sulforhodamine 0,2%. Tỷ lệ gây độc tế bào của dịch chiết nấm Linh chi được thể hiện ở hình 3.



Hình 3: Phần trăm gây độc của dịch chiết nấm Linh chi lên dòng tế bào NCI H460 (A) và tế bào HepG2 (B) ở các nồng độ khác nhau.

Trong thí nghiệm với tế bào NCI H460, dịch chiết nấm Linh chi *G. lucidum* thể hiện khả năng gây độc cao ở nồng độ 1,25 mg/ml với 52,17% tế bào chết, trong khi dịch chiết nấm *H. endertii* thể hiện độc tính thấp hơn với 39,84% tế bào NCI H460 bị tác động. Với nồng độ dịch chiết nấm tăng dần trong các thử nghiệm, phần trăm gây độc lên tế bào NCI H460 của cả hai dịch chiết cũng tăng lên, đạt 60,45% và 57,39% tương ứng với dịch chiết của *G. lucidum* và *H. endertii* ở nồng độ thử nghiệm 2,50 mg/ml. Phần trăm gây độc của dịch chiết *H. endertii* cao hơn so với dịch chiết nấm *G. lucidum* trên tế bào NCI H460 trong các nồng độ thử nghiệm 3,75 và 5,00 mg/ml (Hình 3A). Kết quả cho thấy dịch chiết 2 loài nấm Linh chi có tiềm năng trong hướng ức chế tế bào NCI H460.

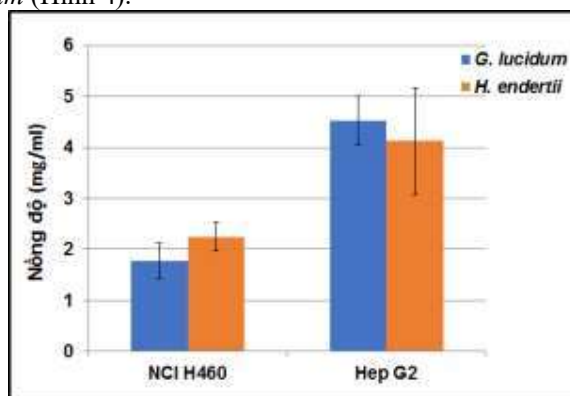
Tuy nhiên, trong thử nghiệm trên tế bào HepG2, dịch chiết của cả hai loại nấm Linh chi đều thể hiện hoạt tính gây độc thấp hơn so với thử nghiệm trên tế bào NCI H460. Với nồng độ thử nghiệm 2,50 mg/ml, phần trăm gây độc lên tế bào HepG2 được ghi nhận tương ứng cho hai loại dịch chiết *G. lucidum* và *H. endertii* là 37,44% và 46,57% trong khi đạt hơn 50% với thử nghiệm tế bào NCI H460. Để dò tìm nồng độ gây độc 50% cho các thử nghiệm, nồng độ dịch chiết được tăng dần, hiệu quả gây độc hơn 50% được ghi nhận ở nồng độ thử nghiệm 6,25 mg/ml với 51,43% và 58,83% tương ứng cho dịch chiết *G. lucidum* và *H. endertii* (Hình 3B). Kết quả thử nghiệm cũng cho thấy dịch chiết *H. endertii* có hiệu lực mạnh hơn dịch chiết *G. lucidum* ở các nồng độ thử nghiệm 1,25, 2,50, 6,25 mg/ml nhưng đạt hiệu lực thấp hơn khi

thử nghiệm ở nồng độ 12,50 mg/ml. Hiệu lực ức chế tế bào HepG2 của dịch chiết nấm *G. lucidum* cũng được ghi nhận trong nghiên cứu của Fathima và cộng sự [17] với các dịch chiết được thu nhận trong các dung môi khác nhau (methanol, ethanol) và cho thấy hiệu lực ức chế cao với 53,96% ở nồng độ 15,60 µg/ml của dịch chiết trong methanol, 52,38% ở nồng độ 31,20 µg/ml của dịch chiết trong ethanol [17].

Bảng 1: Giá trị IC₅₀ của các mẫu dịch chiết nấm trên dòng tế bào NCI H460 và HepG2 bằng phương pháp SRB

Dịch chiết nấm	Giá trị IC ₅₀ (mg/ml)	
	NCI H460	HepG2
<i>G. lucidum</i>	1,78 ± 0,35	4,53 ± 0,48
<i>H. endertii</i>	2,25 ± 0,28	4,13 ± 1,05

Nồng độ ức chế 50% (IC₅₀) của hai loại dịch chiết trên hai dòng tế bào ung thư được xác định bằng cách sử dụng phần mềm Prism, kết quả thể hiện ở bảng 1 cho thấy IC₅₀ của dịch chiết 2 loại nấm Linh chi trong thử nghiệm với tế bào NCI H460 thấp hơn trong thử nghiệm tế bào HepG2. IC₅₀ của *G. lucidum* và *H. endertii* trên tế bào NCI H460 lần lượt là 1,78 ± 0,35 mg/ml và 2,25 ± 0,28 mg/ml cho thấy dịch chiết *G. lucidum* có tác dụng hiệu quả hơn so với dịch chiết *H. endertii*. Tuy nhiên, kết quả ngược lại trong thử nghiệm trên tế bào HepG2, IC₅₀ ghi nhận lần lượt là 4,53 ± 0,48 mg/ml và 4,13 ± 1,05 mg/ml tương ứng cho dịch chiết của *G. lucidum* và *H. endertii*, khẳng định hiệu lực gây độc của dịch chiết của *H. endertii* cao hơn dịch chiết *G. lucidum* (Hình 4).



Hình 4: Giá trị IC₅₀ của dịch chiết nấm Linh chi lên dòng tế bào NCI H460 và tế bào HepG2.

3.3. Hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết nấm *G. lucidum* và *H. endertii*

Khả năng kháng khuẩn của dịch chiết nấm Linh chi được kiểm tra trên 6 chủng vi khuẩn gây bệnh bao gồm 2 chủng vi khuẩn Gram dương (*B. cereus* và *S. aureus*) và 4 chủng vi khuẩn Gram âm (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium*). Sau 24 giờ nuôi ủ, hoạt tính kháng khuẩn được kiểm tra thông qua vòng kháng khuẩn hình thành xung quanh các đĩa giấy có thấm dịch chiết nấm. Kết quả được thể hiện trong bảng 2 và hình 5.

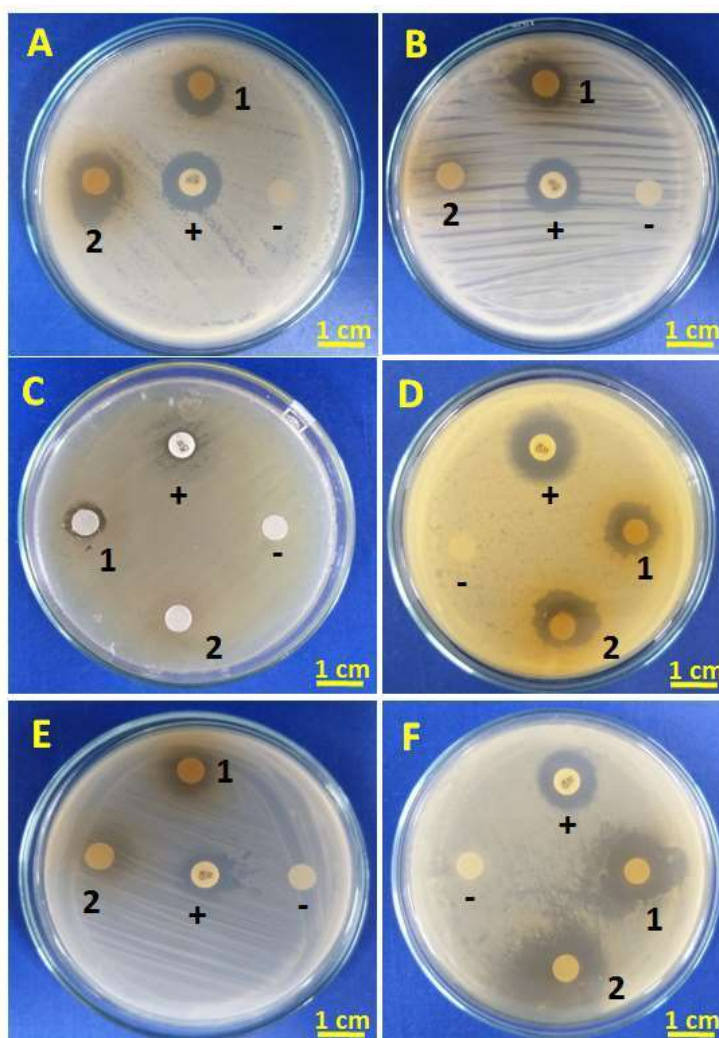
Bảng 2: Kích thước vòng kháng khuẩn của dịch chiết nấm Linh chi đối với 6 chủng vi khuẩn kiểm định

Vi khuẩn kiểm định	Kích thước vòng kháng khuẩn (mm)	
	Mẫu <i>G. lucidum</i>	Mẫu <i>H. endertii</i>
<i>B. cereus</i>	9,5 ± 1,0	12,0 ± 2,0
<i>S. aureus</i>	8,0 ± 1,0	6,0 ± 1,0
<i>E. coli</i>	8,0 ± 1,0	Không kháng
<i>P. aeruginosa</i>	11,0 ± 1,0	11,0 ± 1,5
<i>S. enteritidis</i>	8,0 ± 0,5	6,0 ± 0,5
<i>S. typhimurium</i>	16,0 ± 2,5	18,0 ± 3,0

Dịch chiết nấm Linh chi *G. lucidum* thể hiện khả năng kháng khuẩn với cả 6 chủng vi khuẩn gây bệnh kiểm định Gram âm và Gram dương với các độ mạnh yếu khác nhau, trong đó hoạt tính kìm hãm thể hiện mạnh nhất đối với chủng vi khuẩn *S. typhimurium* với đường kính vòng kháng khuẩn $16,0 \pm 2,5$ mm, tiếp theo là khả năng kìm hãm đối với chủng *P. aeruginosa* với kích thước vòng kháng khuẩn $11,0 \pm 1,0$ mm. Dịch chiết *G. lucidum* ức chế các chủng vi khuẩn còn lại yếu hơn với kích thước lần lượt $9,5 \pm 1,0$ mm đối với *B. cereus* và $8,0 \pm 1,0$ mm đối với các chủng *S. aureus*, *E. coli*, *S. enteritidis*. Hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết Linh chi *G. lucidum* đã ghi nhận với các vi khuẩn *P. fluorescens* và *E. coli* [17] với các vi khuẩn *E. coli*, *S. typhimurium* và *B. subtilis* [22]. Ngoài ra, khả năng kháng khuẩn cũng được ghi nhận trong hệ sợi nấm *G. lucidum* với sự ức chế *S. aureus*, *B. subtilis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi* và *Pseudomonas P₁₈* [23], đồng thời dịch chiết *G. lucidum* cũng có khả năng ức chế sự phát triển của một số virus gây bệnh [24] cho thấy hoạt tính kháng khuẩn của loài nấm này được ghi nhận khá phổ biến.

Ngoài ra, dịch chiết nấm *H. endertii* cho thấy khả năng kháng với 5 chủng vi khuẩn kiểm định và không thể hiện khả năng kìm hãm đối với vi khuẩn *E. coli* (Bảng 2). Trong số các chủng vi khuẩn kiểm định, dịch chiết *H. endertii* thể hiện khả năng kháng mạnh nhất trên chủng vi khuẩn *S. typhimurium* với vòng kháng khuẩn $18,0 \pm 3,0$ mm, trong khi vòng kháng khuẩn *B. cereus* và *P. aeruginosa* tương ứng $12,0 \pm 2,0$ mm và $11,0 \pm 1,5$ mm. Hoạt tính kháng khuẩn *S. aureus* và *S. enteritidis* chỉ thể hiện ở các vị trí vi khuẩn tiếp xúc trực tiếp với dịch chiết nấm và thể hiện vòng kháng khuẩn chỉ đạt $6,0 \pm 1,0$ mm. *H. endertii* là loại nấm Linh chi mới được thu thập ở Vườn quốc gia Cát Tiên (Đồng Nai - Lâm Đồng) [13] và Vườn quốc gia Phước Bình (Ninh Thuận) [14], việc ghi nhận hoạt tính sinh học về khả năng kháng khuẩn có ý nghĩa khoa học.

Bên cạnh kết quả kiểm tra khả năng kháng khuẩn của các dịch chiết nấm Linh chi, dịch chiết của các loại nấm khác cũng được thử nghiệm và ghi nhận trong nhiều nghiên cứu khác. Dịch chiết nấm *A. bisporus* cho thấy phổ kìm hãm rộng trên cả vi khuẩn Gram âm và Gram dương với vòng kháng khuẩn trong khoảng 12 – 22 mm cho các vi khuẩn được kiểm định tương tự như *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* và không thể hiện khả năng đối kháng với chủng vi khuẩn Gram âm *E. coli* [25], trong khi dịch chiết nấm *Pleurotus* sp. thể hiện hoạt tính kháng khuẩn tốt với các chủng vi khuẩn Gram dương *B. subtilis*, *B. cereus* và nấm men *S. cerevisiae*, *Candida* sp. [26]. Dịch chiết nấm *Lignosus rhinocerus* được kiểm tra kháng khuẩn trên các vi sinh vật gây bệnh cho người và ghi nhận khả năng ức chế trên phổ vi sinh vật rộng gồm cả vi khuẩn Gram âm, Gram dương và nấm men gây bệnh [27]. Cùng với các nghiên cứu về khả năng kháng khuẩn của dịch chiết các loại nấm khác nhau, dịch chiết nấm Linh chi đỏ *G. lucidum* và quế Linh chi *H. endertii* thu nhận từ Vườn quốc gia Ninh Thuận đã cho thấy khả năng ức chế sự phát triển của 6 loài vi khuẩn gây bệnh, bổ sung dữ liệu khoa học về giá trị dược liệu của hai loài nấm này.



Hình 5: Khả năng kháng khuẩn của dịch chiết nấm Linh chi trên các vi khuẩn kiểm định khác nhau. (A) *B. cereus*, (B) *S. aureus*, (C) *E. coli*, (D) *P. aeruginosa*, (E) *S. enteritidis*, (F) *S. typhimurium*. (+) đối chứng dương với đĩa kháng sinh Gentamycin; (-) đối chứng âm với nước cất; (1) dịch chiết nấm Linh chi *G. lucidum*; (2) dịch chiết nấm Linh chi *H. endertii*.

4. KẾT LUẬN

Hai loài nấm Linh chi *G. lucidum* và *H. endertii* có nguồn gốc từ Vườn quốc gia Phước Bình (Ninh Thuận) có hiệu lực gây độc trên hai dòng tế bào ung thư phổi NCI H460 và tế bào ung thư gan HepG2, với giá trị IC_{50} được xác định tương ứng trên tế bào NCI H460 là $1,78 \pm 0,35$ mg/ml và $2,25 \pm 0,28$ mg/ml và trên tế bào HepG2 là $4,53 \pm 0,48$ mg/ml và $4,13 \pm 1,05$ mg/ml. Bên cạnh đó, khả năng kháng khuẩn của dịch chiết hai loại nấm này cũng được xác nhận với khả năng kim hãm sinh trưởng của 6 chủng vi khuẩn gây bệnh kiểm định *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium* đối với dịch chiết *G. lucidum* và trong thử nghiệm với dịch chiết của *H. endertii*, không kháng *E. coli*.

LỜI CẢM ƠN

Kết quả nghiên cứu này là một phần trong đề tài nghiên cứu khoa học “Bảo tồn nguồn gen nấm Linh chi” của Vườn quốc gia Phước Bình, tỉnh Ninh Thuận. Do đó, chúng tôi xin chân thành cảm ơn Vườn

quốc gia Phước Bình, Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Ninh Thuận đã hỗ trợ kinh phí cho các thí nghiệm trong đề tài nghiên cứu khoa học này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Xuanwei Zhou, J.L., Yizhou Yin, Jingya Zhao, Xiaofen Sun, Kexuan Tang, Ganodermataceae: natural products and their related pharmacological functions. *The American Journal of Chinese Medicine*, 2007. 35(4): p. 559-574.
2. Haou-Tzong Ma, J.-F.H., Shui-Tein Chen, Anti-diabetic effects of *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*, 2015. 114: p. 109-113.
3. Horng-Huey Ko, C.-F.H., Jih-Pyang Wang, Chun-Nan Lin, Antiinflammatory triterpenoids and steroids from *Ganoderma lucidum* and *G. tsugae*. *Phytochemistry*, 2008. 69(1): p. 234-239.
4. Wenjing Zhang, J.T., Xiaoping Yang, Zhuliang Yang, Li Zhang, Hongsheng Liu, Kailang Wu, Jianguo Wu, Antiviral effects of two *Ganoderma lucidum* triterpenoids against enterovirus 71 infection. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2014. 449(3): p. 307-312.
5. Bhagwan S. Sanodiya, G.S.T., Rakesh K. Baghel, G. B.K.S. Prasad, P. S. Bisen., *Ganoderma lucidum*: A Potent Pharmacological Macrofungus. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2009. 10(8): p. 717-742.
6. Yu Cao, X.X., Shujing Liu, Linfang Huang, Jian Gu, *Ganoderma*: A Cancer Immunotherapy Review. *Frontiers in Pharmacology*, 2018. 9(1217).
7. Yihuai Gao, E.C., Shufeng Zhou, Immunomodulating Activities of *Ganoderma*, a Mushroom with Medicinal Properties. *Food Reviews International*, 2004. 20(2): p. 123-161.
8. Hoang Van Trung, N.T.T., Nguyen Ngoc Tuan, Doan Manh Dung, Tran Dinh Thang, The triterpenoid and steroid from the fruiting body of *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. in Viet Nam. *Vietnam Journal of Science and Technology*, 2018. 56(5): p. 550-556.
9. Olga Tsivileva, T.N., Long Vu, Nikolay Yurasov, Marina Chernyshova, Alexander Petrov, Viktor Galushka, Alexei Markin, Oleg Kofitin. , Vietnamese *Ganoderma*: growth, peculiarities, and low-molecular composition compared to European and Siberian strains. *Turkish Journal of Botany*, 2016. 40: p. 269-286.
10. Ngo Xuan Nghien, N.T.B.T., Le Van Ve, Nguyen Thi Luyen, Nguyen Thi Thu, Nguyen Dinh Quan, Morphological Characteristics, Yield Performance, and Medicinal Value of Some Lingzhi Mushroom (*Ganoderma lucidum*) Strains Cultivated in Tam Dao, Vietnam. *Vietnam Journal of Agricultural Sciences*, 2019. 2(1): p. 321-331.
11. Dam Sao Mai, T.T.T.A., Tu Thai Binh, Nguyen Dac Anh Comparison of the effect of using cellulase, microwave and ultra-sonication on crude polysaccharides extraction from Vietnamese Lingzhi (*Ganoderma lucidum*). *Journal of Food and Nutrition Sciences*, 2015. 3(1-2): p. 49-53.
12. Dao Ngoc Quang, T.T.N., Lê Xuan Tham Chemical Composition of Vietnamese Black Lingzhi *Amauroderma subresinosum* Murr. *Research Journal of Phytochemistry*, 2011. 5(4): p. 216-221.
13. Lê Xuân Thám, N.L.Q.H., Phạm Ngọc Dương, J. M. Moncalvo, Phát hiện đại diện đầu tiên của chi *Humphreya* stey. mới được phát hiện ở vườn quốc gia Cát tiên (Đồng Nai-Lâm Đồng)-loài nấm Linh chi endertii: *Humphreya endertii*. *Tạp chí sinh học*, 2009. 31(1): p. 39-45.
14. Bảo tồn nguồn gen nấm Linh chi Vườn Quốc gia Phước Bình. *Báo tin tức*, 2019. Ngày 9/9/2019(<https://baotintuc.vn/kinh-te/bao-ton-nguon-gen-nam-linh-chi-vuon-quoc-gia-phuoc-binh-20190909084816058.htm>).
15. Hoang Le Son, N.P.A., Phytochemical composition, in vitro antioxidant and anticancer activities of quercetin from methanol extract of *Asparagus cochinchinensis* (LOUR.) Merr. tuber. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2013. 7(46): p. 3360-3366.

16. Bauer AW, K.W., Sherris JC, Turck M., Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. American Society of Clinical Pathologists, 1966. 45(4): p. 493-496.
17. Fathima, A.T. and M. Reenaa, Anticancer and Antibacterial Activity of Ganoderma lucidum. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 2016. 5(10): p. 891-909.
18. Liyan Zhao, Y.D., Guitang Chen, Qiuhui Hu, Extraction, purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from Ganoderma lucidum. Carbohydrate Polymers, 2010. 80(3): p. 783-789.
19. Antonio Barbieri, V.Q., Vitale Del Vecchio, Michela Falco, Antonio Luciano, Nagoth Joseph Amruthraj, Guglielmo Nasti, Alessandro Ottaiano, Massimiliano Berretta, Rosario Vincenzo Iaffaioli, Claudio Arra, Anticancer and Anti-Inflammatory Properties of Ganoderma lucidum Extract Effects on Melanoma and Triple-Negative Breast Cancer Treatment. Nutrients, 2017. 9(210).
20. Liang Feng, L.Y., Meng Du, Yan Chen, Ming-Hua Zhang, Jun-Fei Gu, Jun-Jie He, Ying Wang, Wei Cao. , Anti-lung cancer activity through enhancement of immunomodulation and induction of cell apoptosis of total triterpenes extracted from Ganoderma luncidum. Molecules 2013. 18: p. 9966-9981.
21. Sun LX, L.Z., Duan XS, Lu J, Ge ZH, Li XJ, Li M, Xing EH, Jia J, Lan TF, Li WD., Ganoderma lucidum polysaccharides antagonize the suppression on lymphocytes induced by culture supernatants of B16F10 melanoma cells. Journal of Pharmacy and Pharmacology 2011. 63(5): p. 725-735.
22. N. Sheena, T.A.A., A. Thomas Mathew and K.K. Janardhanan, Antibacterial Activity of Three Macrofungi, Ganoderma lucidum, Navesporus floccosa and Phellinus rimosus Occurring in South India. Pharmaceutical Biology, 2003. 41(8): p. 564-567.
23. R. Kamble, S.V., A.M. Gupte, Antimicrobial Activity of Ganoderma lucidum Mycelia. Journal of pure and applied microbiology, 2011. 5(2).
24. T. Attin, K.B., C. Hannig, W. Buchalla, A. Wiegand, Suitability of a malachite green procedure to detect minimal amounts of phosphate dissolved in acidic solutions. Clin. Oral Invest., 2005. 9: p. 203–207.
25. Loganathan K. Jagadish , V.V.k., R. Shenbhagaraman, V. Kaviyarasan, Comparitive study on the antioxidant, anticancer and antimicrobial property of Agaricus bisporus (J. E. Lange) Imbach before and after boiling. African Journal of Biotechnology, 2009. 8(4): p. 654-661.
26. Morris, H., et al., Mycelia from Pleurotus sp. (oyster mushroom): a new wave of antimicrobials, anticancer and antioxidant bio-ingredients. International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients, 2017. 4(1): p. 3.
27. Shopana Mohanarji, S.D., Anandarajagopal Kalusalingam, Screening of Lignosus rhinocerus Extracts as Antimicrobial Agents against Selected Human Pathogens. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences, 2012. 18(18): p. 1-4.

Ngày nhận bài: 25/09/2019

Ngày chấp nhận đăng: 28/11/2019