

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/338221599>

Dirinaria applanata: morphology, chemical composition and antimicrobial activity

Article · April 2019

CITATIONS

0

READS

170

4 authors, including:



Trinh Phan-Canh

Max Perutz Labs Vienna

10 PUBLICATIONS 16 CITATIONS

SEE PROFILE

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Actinobacteria secondary metabolites [View project](#)



Tropical lichen and lichen-associated microbes [View project](#)

KHẢO SÁT ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI, THÀNH PHẦN HOÁ HỌC VÀ HOẠT TÍNH KHÁNG VI SINH VẬT CỦA ĐỊA Y *DIRINARIA APPLANATA* (FÉE) D. D. AWASTHI

Phan Cảnh Trinh, Võ Lê Công Tráng*, Dương Nguyễn Phi Long*, Nguyễn Đình Nga**

TÓM TẮT

Mở đầu: *Dirinaria applanata* là loài địa y phổ biến ở Việt Nam nhưng chưa được nghiên cứu đầy đủ về thành phần hoá học cũng như hoạt tính sinh học.

Mục tiêu: Khảo sát đặc điểm hình thái, xác định sơ bộ thành phần hoá học và hoạt tính kháng vi sinh vật của địa y *Dirinaria applanata* nhằm bổ sung dữ liệu về loài địa y này tại Việt Nam.

Đối tượng – Phương pháp nghiên cứu: Mẫu địa y được thu hái trên thân Dừa, tại tỉnh Bến Tre; xác định loài nhờ đặc điểm hình thái và các dữ liệu hoá định danh tại chỗ. Địa y được nghiền thành bột, chiết xuất với methanol, tách phân đoạn bằng sắc ký cột chân không, xác định phân đoạn có hoạt tính kháng vi sinh vật. Chất kháng khuẩn được phân lập định hướng nhờ kỹ thuật sắc ký lớp mỏng kết hợp tự sinh đồ, sau đó sắc ký cột cổ điển.

Kết quả: Loài địa y phân bố trên thân Dừa tại huyện Giồng Trôm, tỉnh Bến Tre có các đặc điểm hình thái phù hợp với mô tả về *Dirinaria applanata*. Cao chiết methanol từ địa y này có hoạt tính trên *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Trichophyton rubrum* và *Microsporum canis*. Phân đoạn mục tiêu PD-D-2T là chất rắn kết tinh, màu trắng, đạt độ tinh khiết sắc ký lớp mỏng, kháng *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 đề kháng methicilin, *Streptococcus faecalis* ATCC 29212 ở nồng độ MIC là 115 µg/ml.

Kết luận: *Dirinaria applanata* là loài địa y tiềm năng trong nghiên cứu phát triển thuốc điều trị bệnh nhiễm. Đề nghị xác minh cấu trúc PD-D-2T và tiến hành thử nghiệm các hoạt tính sinh học khác.

Từ khóa: địa y, *Dirinaria applanata*, hình thái, kháng vi sinh vật

ABSTRACT

DIRINARIA APPLANATA (FÉE) D. D. AWASTHI: MORPHOLOGY, CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY

Phan Canh Trinh, Vo Le Cong Trang, Duong Nguyen Phi Long, Nguyen Dinh Nga

* Ho Chi Minh City Journal of Medicine * Supplement of Vol. 23 - No 2- 2019: 47 – 54

Background – Objectives: Lichens are symbiotic systems including mycobionts and photobionts, which produce various secondary metabolites having high potential in drug discovery. This study investigated the morphology, preliminary chemical components and antimicrobial activities of methanol extract of *Dirinaria applanata* (Fée) D. D. Awasthi collected from Ben Tre coconut tree in Vietnam.

Method: The antimicrobial capacity of methanol extract was screened on *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (MSSA), *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MRSA), *Streptococcus faecalis* ATCC 29212, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 35657, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida glabrata* ND31, *Candida tropicalis* PNT20, *Trichophyton rubrum* DS01, and *Microsporum canis* VB2 by agar diffusion assay. Isolation the effective fractions from the methanol extract used bioautography technique and column chromatography.

*Khoa Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

Tác giả liên lạc: PGS. TS. Nguyễn Đình Nga

ĐT: 0908836969

Email: nganguyendinh@ump.edu.vn

Results: *D. applanata* exhibited strong impact on Gram positive bacteria and fungal strains with the zone inhibition diameter from 13 to 31 mm. PD-D-2T, isolated by column chromatography method, reaches the purify on TLC and has the minimum inhibitor concentration at 115 µg/ml on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus faecalis*.

Conclusion: *D. applanata* possesses the high potential in developing the antimicrobial drug. In the following study, we will identify the chemical structure of PD-D-2T and evaluate its effects on biofilm models of gram positive bacteria and yeast strains.

Key words: lichen, *Dirinaria applanata*, morphology, antimicrobial

MỞ ĐẦU

Địa y từ lâu được biết đến là hệ cộng sinh giữa vi nấm dị dưỡng (mycobiont) và một sinh vật tự dưỡng quang hợp thường là tảo lục hoặc vi khuẩn lam (photobiont). Chúng thực chất là một tập đoàn vi sinh vật có mối quan hệ mật thiết, tạo nên một loạt các chất chuyển hoá thứ cấp có tiềm năng ứng dụng trong trị liệu, nhưng chưa được khai thác đúng mức, đặc biệt là địa y tại các quốc gia cận nhiệt đới như Việt Nam. Thành phần các chất chuyển hoá thứ cấp ở địa y xuất phát từ ba con đường sinh hoá chính gồm: con đường axit shikimic (tạo nên các hợp chất terphenyl quinon, dẫn xuất axit tetronic), con đường axit mevalonic (tạo nên terpenoid, steroid), con đường polyketid (tạo nên depsid, depsidon, quinon, xanthon...). Các hợp chất này thường hiện diện trong địa y với hàm lượng lớn do đó được sử dụng như một chỉ dấu để nhận biết loài. Có khoảng hơn 350 hợp chất từ địa y đã được phân lập và xác định cấu trúc hoá học, các chất này thường kém tan trong nước, có thể được chiết xuất bằng dung môi hữu cơ, hàm lượng chất dao động từ 0,1-10% khối lượng khô của tản, thậm chí có khi lên đến 30%⁽²⁾.

Mặc dù địa y đã được sử dụng từ thời tiền sử, nhưng các thông tin còn rải rác, ứng dụng quan trọng nhất tập trung trong mảng điều trị bệnh ho, viêm họng, cảm sốt, viêm khớp, vàng da, khó tiêu, chán ăn, rụng tóc⁽¹¹⁾ của các địa y thuộc chi *Cladonia*, *Evernia*, *Lobaria*, *Parmelia*, *Peltigera*, *Pertusaria*, *Physica*, *Rocella*, *Usnea* và *Xanthoria*⁽¹²⁾. Nhiều quốc gia đã phát triển các

sản phẩm thương mại chứa hoạt chất từ địa y như axit usnic⁽⁹⁾, được sử dụng làm thuốc sát trùng tại Đức và Ý với biệt dược Camillen 60 và Gessato dạng xịt hoặc dầu xoa trị nấm móng; Isla-Moos[®] và Broncholind[®] có nguồn gốc từ *Cetraria islandica* cũng được phát triển tại Đức dùng trong điều trị cảm lạnh. Điểm đáng chú ý nhất là clofazimin (Lamprene), kháng sinh kháng lao, phong trong danh mục thuốc thiết yếu của WHO, được phát triển từ diploicin, một hợp chất phân lập từ địa y *Buellia canescens*⁽⁴⁾. Hơn 50% các loài địa y được báo cáo có khả năng kháng một vi khuẩn nhất định, hoạt phổ rộng trên vi khuẩn gram dương và gram âm, nấm men, nấm sợi tùy thuộc vào thành phần hợp chất xuất hiện trong từng loài địa y nhất định. Các báo cáo về hoạt tính kháng khuẩn kháng nấm thường thực hiện trên cao chiết từ dung môi hữu cơ, với dung môi phổ biến nhất là methanol; giá trị nồng độ ức chế tối thiểu trong các nghiên cứu này thường dưới 20 mg/ml đối với cao toàn phần⁽⁶⁾.

Tại Việt Nam, *Dirinaria applanata* là loài địa y phổ biến, thường phát triển trên thân cây nhưng chưa được nghiên cứu đầy đủ về đặc điểm hình thái, thành phần hoá học cũng như hoạt tính sinh học.

Mục tiêu

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành khảo sát mẫu địa y được thu hái trên thân Dừa tại huyện Giồng Trôm, tỉnh Bến Tre với mục tiêu bổ sung dữ liệu về hình thái học, thành phần hoá học và hoạt tính kháng vi sinh vật của loài địa y này, định hướng cho việc phát

triển thuốc kháng khuẩn, kháng nấm từ *Dirinaria applanata*.

ĐỐI TƯỢNG-PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu

Dược liệu

Địa y *Dirinaria applanata* được thu hái trên thân dừa *Cocos nucifera* tại huyện Giồng Trôm, tỉnh Bến Tre vào tháng 2 năm 2018, trong bán kính 1 km quanh tọa độ 10,14 Bắc; 106,52 Đông.

Vi sinh vật thử nghiệm

Các vi sinh vật thử nghiệm được sử dụng bao gồm vi khuẩn gram dương: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (MSSA), *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MRSA), *Streptococcus faecalis* ATCC 29212; vi khuẩn gram âm: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 35657, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922; nấm men: *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida glabrata* ND31, *Candida tropicalis* PNT20; nấm da: *Trichophyton rubrum* DS01, *Microporum canis* VB2.

Phương pháp nghiên cứu

Khảo sát đặc điểm hình thái

Hình thái học địa y được phân tích thông qua hai nhóm đặc điểm đại thể và vi thể.

Đặc điểm đại thể

Quan sát, ghi nhận đặc điểm địa y lúc chưa thu hái, sau khi thu hái tiến hành quan sát các cấu tử chi tiết trên tán địa y bằng kính hiển vi soi nổi, ghi nhận đặc điểm.

Đặc điểm vi thể

Thực hiện tiêu bản cắt ngang, quan sát dưới kính hiển vi soi nổi sau khi cắt ngang, phản ứng với KOH 10% trong nước (K test); phản ứng với NaClO (C test), phản ứng lần lượt qua KOH 10% sau đó đến NaClO (KC test)⁽⁴⁾. Quan sát tiêu bản cắt ngang với kính hiển vi quang học ở vật kính x40, thu nhận các đặc điểm liên quan đến bào tử nấm và vi tảo.

Bột dược liệu

Dược liệu sau thu hái, rửa sạch, phơi âm can 48 giờ, nghiền thành bột, bảo quản trong túi giấy có hút ẩm.

Phân tích sơ bộ thành phần hoá học

10 gam bột địa y được sử dụng để xác định các nhóm hợp chất chính dựa trên các phản ứng hóa học đặc trưng theo quy trình phân tích của Ciuley (Trường Đại học Dược khoa Bucarest, Rumani) được cải tiến bởi Khoa Dược, Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh⁽⁵⁾.

Chiết xuất cao toàn phần và cao phân đoạn

Bột địa y được ngâm lạnh với methanol 5 lần, mỗi lần 24 giờ. Dịch chiết được cô quay dưới 50 °C thu được cao methanol toàn phần. Thu nhận cao phân đoạn bằng sắc ký cột chân không với silicagel cỡ hạt 230-400 µm, rửa giải lần lượt qua các dung môi *n* - hexan, cloroform, ethyl acetat và methanol.

Xác định hoạt tính kháng vi sinh vật của cao toàn phần và phân đoạn

Hoạt tính kháng vi sinh vật của cao toàn phần và cao phân đoạn thực hiện bằng phương pháp khuếch tán, lượng tẩm 5 mg/ đĩa giấy, môi trường thử nghiệm là Muller Hinton Agar (MHA) cho vi khuẩn và nấm da, MHA bổ sung glucose 2% cho nấm men, điều kiện thí nghiệm thực hiện theo các hướng dẫn của Viện Tiêu chuẩn Lâm sàng và Xét nghiệm Hoa Kỳ (CLSI)^(15,16,18). Khả năng kháng của cao toàn phần được đánh giá trên bốn nhóm vi sinh vật: vi khuẩn gram dương và gram âm, nấm men, nấm da. Các chủng bị ức chế bởi cao toàn phần được định hướng sử dụng cho thử nghiệm trên cao phân đoạn.

Xác định mục tiêu kháng vi sinh vật bằng kỹ thuật tự sinh đồ

Kỹ thuật sắc ký lớp mỏng kết hợp tự sinh đồ được sử dụng để xác định vết mục tiêu có hoạt tính kháng vi sinh vật. Điều kiện thí nghiệm: cao E2 được hoà tan trong ethyl acetat, chấm và triển khai sắc ký trên bản mỏng Silicagel F254; pha động CHCl₃ - EtOAc

- AcOH (9:1:0,2), phát hiện vết dưới UV 254 nm, UV 365 nm, thuốc thử VS. Vết có hoạt tính kháng khuẩn được quan sát qua vòng ức chế *Staphylococcus aureus*⁽¹⁴⁾.

Phân lập chất mục tiêu bằng sắc ký cột cổ điển

Tiến hành phân lập mục tiêu kháng khuẩn trong cao E2 nói trên bằng sắc ký cột cổ điển. Điều kiện sắc ký: cột 50 cm x 1,2 cm; pha tĩnh silicagel cỡ hạt 40-63 µm; pha động CHCl₃ – EtOAc (9:1-0:10) (Cột 1), CHCl₃ – EtOAc – CH₃COOH (9:1:0,2) (Cột 2); thể tích mỗi phân đoạn 5 ml; lượng mẫu nạp 0,79 g (Cột 1), 0,15 g (Cột 2); gộp các phân đoạn, xác định độ tinh khiết sắc ký lớp mỏng của vết mục tiêu.

Xác định nồng độ ức chế tối thiểu của phân đoạn mục tiêu

Giá trị MIC được xác định bằng phương pháp pha loãng trong thạch theo hướng dẫn của CLSI⁽¹⁷⁾.

KẾT QUẢ

Đặc điểm hình thái

Đại thể

Mẫu địa y thu được có đường kính tán dao động từ 5-10 cm, tán nhỏ nhất là 0,5 cm, thùy phát triển rộng 0,4-2,0 mm, dạng lông chim kế tiếp nhau, gấp nếp theo chiều dọc và hướng ra ngoài (Hình 1). Bề mặt có màu xanh nhạt, xanh xám, xám nhạt, ở giữa nổi lên cấu trúc cơ quan sinh sản đặc trưng cho chi *Dirinaria* là bào tử phấn (soredia) (Hình 1-C). Không thấy sự xuất hiện của thể quả đĩa. Mặt dưới có màu đen ở giữa, rìa màu đen hoặc nâu.

Phản ứng hóa học tại chỗ: phần vỏ K+ (màu vàng), C- (không màu), KC- (không màu); phần tủy: K- (không màu), C- (không màu), KC- (không màu).

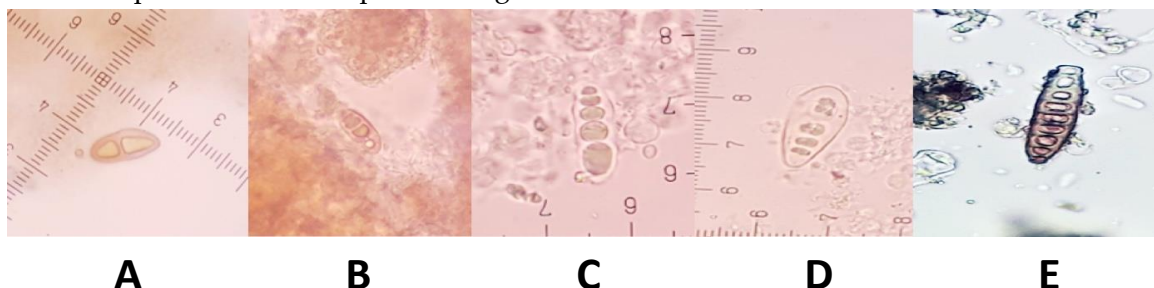


Hình 1: Cấu trúc đại thể của mẫu địa y (A: tán địa y với thùy gấp nếp lông chim; B: vùng trung tâm tán địa y, các thùy xếp sát nhau; C: bào tử phấn - soredia). K: phản ứng màu với KOH 10%, phần vỏ dương tính (màu vàng); C: phản ứng màu với NaClO; KC: phản ứng màu lân lượt với KOH 10% và NaClO. D: mũi tên chỉ vào phần tủy

Vi thể

Mẫu địa y tươi, cắt thành lát cắt mỏng và soi dưới kính hiển vi theo thứ tự từ ngoài vào trong gồm các lớp: lớp vỏ trên, lớp tảo, lớp tủy, lớp vỏ dưới. Cơ quan sinh sản của phần nấm gồm các

túi bào tử trưởng thành chứa tối đa 8 bào tử, mỗi bào tử túi có vách ngăn ngang duy nhất, ở giữa, chia làm hai tế bào. Kích thước túi bào tử: 10,6-18,5 x 6,6-7,9 μm.



Hình 2: Cấu trúc vi thể bào tử túi (A) và các túi bào tử (B, C, D, E)

Phân tích sơ bộ thành phần hoá học

Qua phân tích sơ bộ thành phần hoá học theo phương pháp của Cuiley, trong mẫu địa y có sự hiện diện của chất béo, coumarin, flavonoid, polyphenol, glycosid tim, axit hữu cơ và chất khử.

Hoạt phổ kháng vi sinh vật của cao toàn phần

Cao methanol toàn phần được định tính khả năng kháng trên một số đại diện vi khuẩn

Gram dương, Gram âm, nấm men, nấm da bằng phương pháp đĩa giấy khuếch tán với nồng độ 5 mg/ giếng thạch; tác động kháng vi sinh vật của cao methanol toàn phần được trình bày trong Bảng 1. Hoạt tính của cao toàn phần tập trung trên vi khuẩn Gram dương và vi nấm, với đường kính vòng ức chế dao động trong khoảng 13-31 mm; không thể hiện hoạt tính trên vi khuẩn Gram âm (EC, KP và PA).

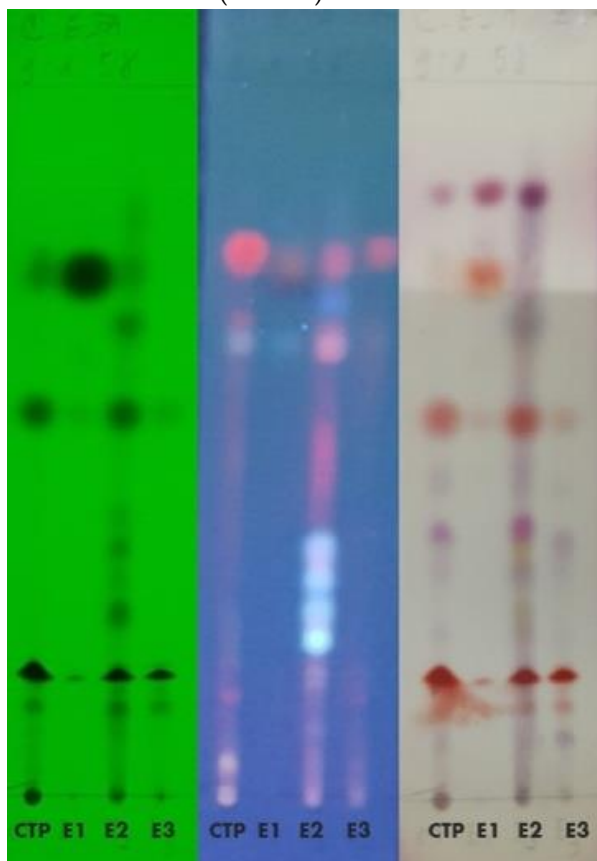
Bảng 1: Hoạt tính kháng vi sinh vật của cao toàn phần và các phân đoạn sắc ký cột chân không

Cao chiết	Đường kính vòng ức chế vi sinh vật (mm)										
	MS	MR	SF	EC	KP	PA	CA	CT	CG	TR	MC
TP*	22	15	22	-	-	-	14	13	12	22	31
H	-	-	n/a	-	-	-	-	-	-	n/a	n/a
C1	-	-	n/a	-	-	-	10	7	7	n/a	n/a
C2	-	-	n/a	-	-	-	8	8	8	n/a	n/a
C3	8	8	n/a	-	-	-	12	12	10	n/a	n/a
E1	11	11	n/a	-	-	-	14	12	11	n/a	n/a
E2	16	14	n/a	-	-	-	12	12	8	n/a	n/a
E3	16	15	n/a	-	-	-	10	9	9	n/a	n/a
M1	15	13	n/a	-	-	-	-	-	-	n/a	n/a
M2	15	13	n/a	-	-	-	-	-	8	n/a	n/a
M3	15	12	n/a	-	-	-	11	8	10	n/a	n/a
M4	9	9	n/a	-	-	-	13	-	11	n/a	n/a
M5	7	7	n/a	-	-	-	12	-	8	n/a	n/a
M6	-	-	n/a	-	-	-	-	-	-	n/a	n/a

MS: MSSA, MR: MRSA, SF: *Streptococcus faecalis*, EC: *Escherichia coli*, KP: *Klebsiella pneumoniae*, PA: *Pseudomonas aeruginosa*, CA: *Candida tropicalis*, CT: *Candida tropicalis*, CG: *Candida glabrata*, TR: *Trichophyton rubrum*, MC: *Microsporium canis*. TP: cao methanol toàn phần, H: phân đoạn n – hexan, C1-C3: phân đoạn chloroform, E1-E3: phân đoạn ethyl acetat, M1-M6: phân đoạn methanol. n/a: không thử nghiệm. (-) âm tính. * cao toàn phần sử dụng phương pháp khuếch tán qua giếng.

Xác định phân đoạn chứa chất kháng khuẩn

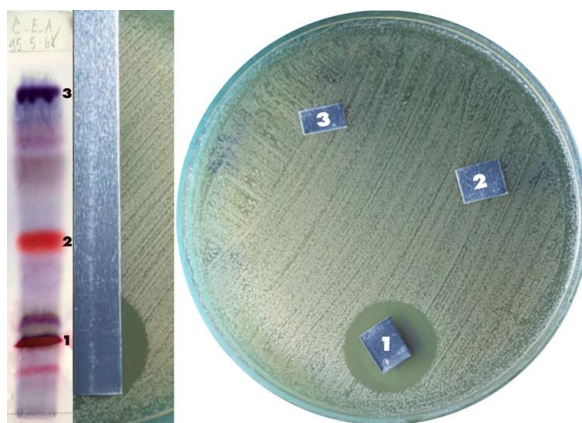
Cao toàn phần sau sắc ký cột chân không thu được 13 phân đoạn chúng tôi tiến hành đánh giá hoạt tính của các cao này bằng phương pháp đĩa giấy khuếch tán với nồng độ 5 mg/ đĩa giấy trên các đại diện vi khuẩn gram dương và nấm men. Kết quả được trình bày ở Bảng 1. cho thấy các chất kháng khuẩn, kháng nấm phân bố từ phân đoạn phân cực trung bình đến mạnh. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tập trung khảo sát phân đoạn E2 là phân đoạn có hoạt tính tốt, trên sắc ký đồ sắc ký đồ sắc ký lớp mỏng có các vết chính với hàm lượng cao hơn E1, E3; đồng thời có đầy đủ các vết của E1 và E3 (Hình 3).



Hình 3: Sắc ký đồ sắc ký lớp mỏng các phân đoạn ethyl acetat (E1, E2, E3); đối chứng cao toàn phần (CTP). Pha động CHCl₃ - EtOAc - AcOH (9:1:0,2). Phát hiện lần lượt dưới UV254, UV 365, thuốc thử vanilin sulfuric.

Phân lập chất kháng khuẩn bằng sắc ký cột cổ điển

Xác định mục tiêu kháng khuẩn bằng tự sinh đồ



Hình 4: Kết quả tự sinh đồ E2 trên chủng MSSA

Triển khai sắc ký lớp mỏng phân đoạn E2 với hệ dung môi CHCl₃ - EtOAc - AcOH (95:5:0,2). Quan sát dưới UV 254 kết quả thu được 3 vết chính có Rf lần lượt là: 0,13; 0,48; 0,90. Tiến hành tự sinh đồ trên vi khuẩn đại diện là MSSA thu được kết quả như Hình 4, trong đó vết chính tắt quang dưới UV254, hiện màu đỏ khi phun thuốc thử VS, Rf = 0,13 là vết cho vòng kháng khuẩn rõ trên tự sinh đồ.

Phân lập chất mục tiêu bằng sắc ký cột cổ điển

Cao E2 sau khi được triển khai qua cột 1 thu được 176 phân đoạn (PĐ), gộp các phân đoạn chứa các vết giống nhau thu được 5 phân đoạn lớn PĐ-A: 3-4 (0,02 g), PĐ-B: 5-20 (0,36 g), PĐ-C: 21-59 (0,15 g), PĐ-D: 60-114 (0,2 g), PĐ-E: 115-176 (0,01 g), trong đó PĐ-C và PĐ-D có chứa mục tiêu phân lập, PĐ-D tinh khiết hơn (gồm 1 vết tắt quang trên UV254, 2 vết màu đỏ khi phun thuốc thử VS).

PĐ-D được sử dụng để triển khai cột cổ điển 2, thu được 65 phân đoạn. Gộp các PĐ chứa mục tiêu bằng SKLM thu được PĐ-D-1: 36 (11 mg), PĐ-D-2: 37-42 (77,3 mg), PĐ-D-3: 43-47 (8 mg). Tinh khiết hoá PĐ-D-2 bằng kết tinh trong methanol lạnh, rửa tủa nhiều lần thu được 15 mg chất rắn kết tinh màu trắng (PĐ-D-2T).

Độ tinh khiết sắc ký lớp mỏng của PD-D-2T

PD-D-2T đạt độ tinh khiết sắc ký lớp mỏng khi xác định qua ba hệ dung môi khác nhau, cho một vết duy nhất trên sắc ký đồ; lần lượt là CHCl₃ - EtOAc - AcOH (9:1:0,2), R_f = 0,23; CHCl₃ - Aceton - MeOH - AcOH (8:1:1:0,4), R_f = 0,42; CHCl₃ - MeOH - AcOH (7:3:0,2), R_f = 0,71.

Giá trị nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của PD-D-2T

Giá trị MIC của PD-D-2T được xác định bằng phương pháp pha loãng trong thạch trên các vi khuẩn gram dương gồm MRSA, *Streptococcus faecalis*, chúng tôi thu được giá trị MIC trên các chủng vi khuẩn này là 115 µg/ml. Thí nghiệm được lặp lại hai lần với kết quả giống nhau.

BÀN LUẬN

Về mặt hình thái học, các đặc điểm đại thể, vi thể tương tự mô tả của Awasthi (1975)⁽³⁾, Ryan và cs. (2004). Dữ liệu về hình thái và hoá học (phản ứng K, C, KC) cho thấy mẫu địa y thuộc loài *Dirinaria appplanata* theo khoá phân loại "Keys to lichens of North America"⁽⁷⁾; trong nghiên cứu này chúng tôi không thực hiện phản ứng P (para phenylendiamin) vì không sử dụng trong định danh.

Phản ứng của phần vỏ với KOH 10% cho màu vàng, phù hợp với một số depsid như atranorin, axit thamnic và nhiều depsidon có chứa nhóm β-orcinol⁽⁴⁾; trong đó, atranorin đã được báo cáo có nhiều trong phần vỏ của *D. appplanata*⁽¹³⁾. Sơ bộ phân tích thành phần hoá học cho thấy sự hiện diện của hợp chất phenol, phù hợp với hiểu biết trước đây về thành phần hoá học của địa y, chủ yếu là các khung depsid, depsidon⁽⁸⁾. Polyphenol (gồm cả flavonoid) là nhóm hợp chất tồn tại với lượng lớn trong thực vật, thường có hoạt tính sinh học như kháng khuẩn và chống oxy hoá. Theo kết quả của Kekuda và cs (2015)⁽¹⁰⁾, *D. appplanata* chứa một lượng lớn polyphenol, cao hơn so với *Parmotrema*

cristiferum, một loài địa y khác đã từng được báo cáo ở đỉnh Langbiang, Việt Nam⁽¹⁹⁾.

Về hoạt tính sinh học, cao methanol của mẫu địa y *Dirinaria appplanata* nghiên cứu chỉ thể hiện hoạt tính trên vi khuẩn gram dương và vi nấm; kết quả này có phần khác với báo cáo Kekuda và cs (2015)⁽¹⁰⁾ cho thấy khả năng kháng của cao methanol từ loài địa y này trên hai vi khuẩn gram âm là *Vibrio cholerae* và *Klebsiella aerogenes*; sự khác biệt này có thể đến từ điều kiện khí hậu nơi lấy mẫu khác nhau giữa hai nghiên cứu, cũng như khác nhau về chủng vi sinh vật thử nghiệm. Sau quá trình phân lập, chúng tôi thu được phân đoạn PD-D-2T đạt độ tinh khiết sắc ký lớp mỏng, với giá trị MIC trên *Staphylococcus aureus* đề kháng methicilin và *Streptococcus faecalis* là 115 µg/ml.

KẾT LUẬN

Loài địa y phân bố trên thân Dừa tại huyện Giồng Trôm, tỉnh Bến Tre có các đặc điểm hình thái phù hợp với mô tả về *Dirinaria appplanata*. Cao chiết methanol từ địa y này có hoạt tính trên *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Trichophyton rubrum* và *Microsporum canis*. Trong nghiên cứu này, chúng tôi phân lập được mục tiêu PD-D-2T là chất rắn kết tinh, màu trắng, kháng *Staphylococcus aureus* đề kháng methicilin, *Streptococcus faecalis* ở nồng độ MIC là 115 µg/ml. Trong các nghiên cứu tiếp theo, chúng tôi sẽ tiến hành xác định cấu trúc PD-D-2T bằng các phương pháp hoá lý và tối ưu hoá điều kiện chiết xuất, tinh chế hợp chất này với lượng lớn hơn để tiến hành thử nghiệm các hoạt tính sinh học khác.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ahmadjian V, Blum OB, Brodo IM, Gilbert OL, et al. (1973). Appendix B: Identification and isolation of lichen substances. In: Ahmadjian V. and Hale M. E. The Lichens, pp. 633-650. Academic Press.
2. Ahmadjian V, Blum OB, Brodo IM, Gilbert OL, et al. (1973). Chapter 17. Antibiotics in Lichens. In: Ahmadjian V. and Hale M. E. The Lichens, pp. 547-561. Academic Press.

3. Awasthi DD (1975). A monograph of the lichen genus *Dirinaria*. pp. 1-108.
4. Barry VC and Twomey D (1950), Anti-tubercular substances. VI. Derivatives of diploicin, Proceedings of the Royal Irish Academy. Section B: Biological, Geological, and Chemical Science, JSTOR, pp. 55-59.
5. Bộ môn Dược liệu (2017). Phương pháp nghiên cứu dược liệu. tr. 51-83. Khoa Dược, Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh, Thành phố Hồ Chí Minh.
6. Branislav R, Marijana K, and Slobodan S (2010). Antimicrobial activity of some lichens and their components. *Recent Adv Clin Med*: pp. 279-286.
7. Brodo IM (2016). Keys to lichens of North America: revised and expanded. pp. 164-165. Yale University Press.
8. Elix J, Stocker-Wörgötter E, and Nash T (2008). Lichen biology. pp. 104-133. Cambridge University Press, New York.
9. Ingólfssdóttir K (2002). Usnic acid. *Phytochemistry*. 61(7): pp. 729-736.
10. Kekuda TP, Dhanya R, Dhatri R, Sunita C, Onkarappa R, and Vinayaka K (2015). Radical scavenging, Antimicrobial and Insecticidal Efficacy of *Parmotrema cristiferum* and *Dirinaria applanata*. *Science, Technology and Arts Research Journal*. 4(1): pp.95-102.
11. Pereira J (1854). The elements of materia medica and therapeutics. pp. 885-887. Blanchard and Lea.
12. Perez-Llano GA (1944). Lichens their biological and economic significance. *The Botanical Review*. 10(1): pp. 15-45.
13. Ryan BD, Lumbsch H, Messuti M, Printzen C, O'Elia I, Nash T, Diederich P, Gries C, and Bungartz F (2004). Lichen flora of the Greater Sonoran Desert region. *Lichens Unlimited*. pp. 357.
14. Shahverdi AR, Abdolpour F, Monsef-Esfahani HR, and Farsam H (2007). A TLC bioautographic assay for the detection of nitrofurantoin resistance reversal compound. *Journal of Chromatography B*. 850(1-2): pp. 528-530.
15. The Clinical & Laboratory Standards Institute (2010), Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Nondermatophyte Filamentous Fungi, M51-A, Microbiology, CLSI, pp. 44.
16. The Clinical & Laboratory Standards Institute (2011), Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts, M44-A2, Microbiology, CLSI, pp. 40.
17. The Clinical & Laboratory Standards Institute (2012), Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, M07-A9, Microbiology, CLSI, USA, pp. 112.
18. The Clinical & Laboratory Standards Institute (2018), Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, M02-A13, Microbiology, CLSI, USA, pp. 92.
19. Võ Thị Phi Giao (2009). New records of lichens from Vietnam. *Science and Technology Development*. 12: pp.54-60.

Ngày nhận bài báo:	18/10/2018
Ngày phản biện nhận xét bài báo:	01/11/2018
Ngày bài báo được đăng:	15/03/2019