

ĐÁNH GIÁ ĐẶC TÍNH THUẦN CHỦNG VÀ HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN CỦA LÁ TRÀM (*MELALEUCA LEUCADENDRA*)

Huỳnh Kim Diệu¹

ABSTRACT

Total 30 leaf samples of *Melaleuca leucadendra* cultivated in different places in Kien Giang province were collected. Their leaves were used for protein electrophoresis employing the SDS-PAGE method and tested for the antibacterial susceptibilities expressed as minimum inhibitory concentrations (MIC) of eight selected gram positive and gram negative strains: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella spp.*, *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella ictaluri* and *Edwardsiella tarda*. There were 11 different protein bands of these 30 leaf samples were discovered. Protein bands were 16.7% polymorphic while the polymorphic individuals were 9% and the phenotypic diversity value (H_o) was 3.30, the genetic diversity value (H_{EP}) was 0.71 and sum of the effective number alleles (SENA) was 2.44. *Melaleuca leucadendra* could divide into 10 lines with the antibacterial susceptibilities were best against *Staphylococcus aureus* (10 lines with MIC=32 μ g/ml), *Streptococcus faecalis* (3 lines with MIC=32 μ g/ml), *Aeromonas hydrophila* (4 lines with MIC=32 μ g/ml), *Edwardsiella ictaluri* and *Edwardsiella tarda* (3 lines with MIC=64 μ g/ml) and *Pseudomonas aeruginosa* (4 lines with MIC=256-512 μ g/ml). All *Melaleuca leucadendra* lines nearly have no effect against *Escherichia coli* and *Salmonella spp.* *Melaleuca leucadendra* is a potential medicinal plant for humans and animals and the difference in lines and the antibacterial activities must be taken into account.

Keywords: *Melaleuca leucadendra*, protein electrophoresis, minimum inhibitory concentration

Title: Evaluation the genetic diversity and anti-bacterial activity of *Melaleuca leucadendra* leaf

TÓM TẮT

30 mẫu lá Tràm được thu thập từ nhiều nơi thuộc tỉnh Kiên Giang được điện di protein bằng phương pháp SDS-PAGE và thử hoạt tính kháng khuẩn (xác định nồng độ ức chế tối thiểu MIC) trên 8 chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella spp.*, *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella ictaluri* và *Edwardsiella tarda*. Kết quả cho thấy các mẫu lá Tràm có 11 dãy băng protein khác nhau với tỉ lệ cá thể đa hình là 9%, tỉ lệ băng protein đa hình 16,7%, chỉ số đa dạng về kiểu gen $H_{EP} = 0,71$, rõ nhất là chỉ số đa dạng về kiểu hình $H_o = 3,30$ và số allele hiệu quả $SENA = 2,44$. Kết quả cho thấy Tràm không thuần chủng được chia làm 10 dòng, hoạt tính kháng khuẩn của các dòng trên vi khuẩn thử nghiệm có khác nhau, nhưng hầu hết đều tác động rất tốt trên *Staphylococcus aureus* (10 dòng có MIC=32 μ g/ml) và *Streptococcus faecalis* (3 dòng MIC=32 μ g/ml), kể đến trên *Aeromonas hydrophila* (4 dòng MIC=32 μ g/ml), *Edwardsiella ictaluri* và *Edwardsiella tarda* (3 dòng MIC=64 μ g/ml) và *Pseudomonas aeruginosa* (4 dòng MIC=256-512 μ g/ml). Các dòng Tràm không có hay tác động rất yếu trên *Escherichia coli* và *Salmonella spp.* Tràm là cây thuốc có tiềm năng khai thác sử dụng trong điều trị bệnh cho người và vật nuôi, đặc biệt những dòng có khả năng kháng khuẩn mạnh cần được quan tâm.

Từ khóa: Tràm, điện di protein, nồng độ ức chế tối thiểu

¹ Khoa NN & SHƯĐ, Trường Đại học Cần Thơ

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây Tràm *Melaleuca leucadendra* trồng rất nhiều trên đất phèn ngập ở nước ta và có rất nhiều công dụng vừa sử dụng gỗ mà lá còn dùng làm thuốc. Tràm đã được sử dụng nhiều trong dân gian như lá Tràm sử dụng rửa sát trùng vết thương chống nhiễm khuẩn làm lành nhanh, lành da không để lại sẹo, bôi lên vết bỏng tránh hiện tượng phỏng nước, tắm chữa mẩn ngứa; giúp hoạt huyết, an thần, giảm đau, tiêu đờm, sát trùng, trị ho, cảm cúm; uống kích thích tiêu hóa. Tinh dầu Tràm được dùng xoa bóp chữa đau khớp, chân tay nhức mỏi, nhỏ mũi để sát khuẩn, chống đau răng; ngoài ra còn được sử dụng trị giun, đặc biệt giun đũa. Tinh dầu Tràm có khả năng ức chế vi khuẩn Gram âm và Gram dương (Nguyễn Minh Phúc *et al.*, 2002; Đỗ Huy Bích *et al.*, 2004).

Lá Tràm đã được khai thác để cất tinh dầu bán rộng rãi trên thị trường với tên “dầu khuynh diệp” (Võ Văn Chi, 2005) và Việt Nam là một trong những nước có diện tích Tràm tự nhiên lớn nhất châu Á. Mỗi năm, Việt Nam có thể sản xuất từ 80 – 100 tấn tinh dầu chủ yếu là xuất khẩu (Đỗ Huy Bích *et al.*, 2004). Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào cho biết sự thuần chủng của cây Tràm này. Để góp phần tìm hiểu thêm về cây Tràm, nghiên cứu về sự thuần chủng của cây Tràm được thực hiện. Mục đích từng bước chọn lọc ra những dòng có hoạt tính cao.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP THÍ NGHIỆM

2.1 Vật liệu

- Lá Tràm thu tại tỉnh Kiên Giang
- Sử dụng các chủng vi khuẩn:
 - + Chủng vi khuẩn nguồn gốc từ viện Pasteur Tp Hồ Chí Minh: *Staphylococcus aureus* (Staph.), *Streptococcus faecalis* (Strep.), *Escherichia coli* (E.coli), *Pseudomonas aeruginosa* (Pseu.), *Salmonella* spp.(Sal.), *Edwardsiella tarda* (E. tarda) và *Aeromonas hydrophila* (A. hydrophila).
 - + Chủng vi khuẩn nguồn gốc từ khoa Thủy Sản (Đại học Cần Thơ): *Edwardsiella ictaluri* (E. ictaluri)

2.2 Phương pháp thí nghiệm

2.2.1 Điện di protein

- 30 mẫu lá Tràm dùng điện di protein được thu từ 30 nơi khác nhau (cách khoảng 1km).
- Điện di protein lá Tràm được tiến hành theo phương pháp SDS-PAGE (Laemmli, 1970).

Sự đa dạng về di truyền được đánh giá dựa trên những thông số Ho (đa dạng về kiểu hình), H_{EP} (đa dạng về kiểu gen) và SENA (tổng của số alen hiệu quả: sum of the effective number of alleles) (Hub and Ohnishi, 2002; Thanh *et al.*, 2003):

$$Ho = -\sum f_i \ln f_i, \quad H_{EP} = 1 - f_i^2, \quad SENA = (1 / f_i^2 - 1)$$

Trong đó:

- f_i là tần số xuất hiện dãy băng protein i. Qui định tần số của những dãy băng protein được thấy bằng mắt thường, nếu có hiện diện cho điểm là 1, nếu không hiện diện cho điểm là 0.

- n là số dãy băng protein hiện diện.
- Nếu $H_o = 0$ chứng tỏ tính thuần chủng cao, nếu giá trị H_o lớn chứng tỏ có sự đa dạng về di truyền, tức cây không thuần chủng.
- H_{EP} biến thiên từ 0 đến 1, nếu trị số H_{EP} nhỏ chứng tỏ tính thuần chủng cao, nếu trị số H_{EP} lớn chứng tỏ có sự đa dạng về di truyền.
- SENA được tính toán dựa vào xác định số allele hiệu quả.
- Sự đa dạng về hình thái của cá thể hay của các dãy băng protein được ghi nhận khi sự biến đổi những dãy băng protein của nó < 90%.

2.2.2 Thử hoạt tính kháng khuẩn

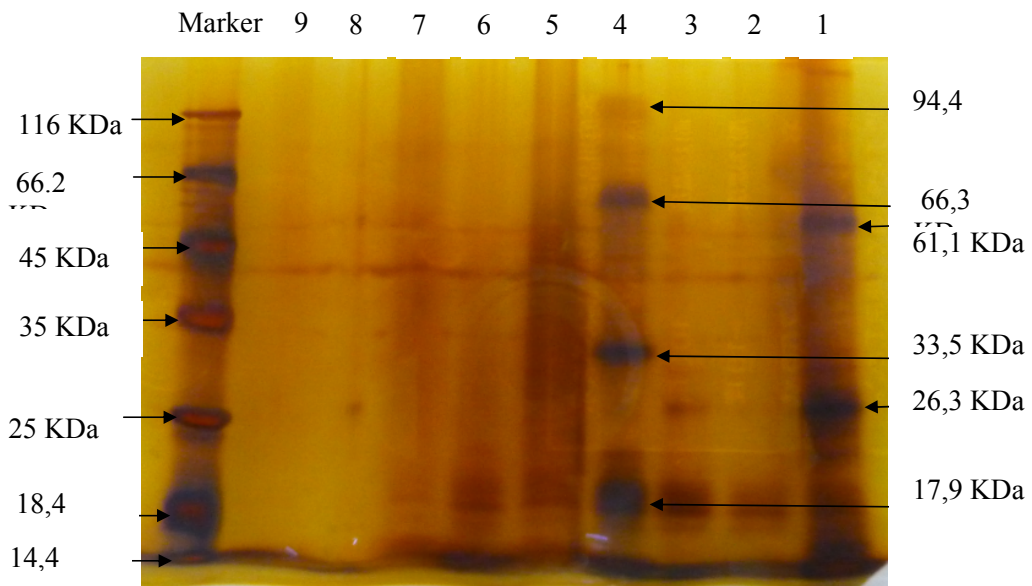
Các cây có sự khác biệt về dãy băng protein được trồng lại trong cùng điều kiện chăm sóc, dinh dưỡng. Sau khoảng 4 tháng, lá được hái thử hoạt tính kháng khuẩn.

- Lá Tràm được sấy khô, chiết bằng phương pháp ngâm dầm với methanol và loại bỏ dung môi bằng máy cô quay đến cạn, được cao thô, dùng thử hoạt tính kháng khuẩn MIC (minimum inhibitory concentration) (Nguyễn Văn Đán và Nguyễn Việt Tựu, 1985).
- Dùng phương pháp pha loãng trong thạch để xác định MIC (Trương Công Quyền *et al.*, 1986; Từ Minh Koóng *et al.*, 2001).

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Sự đa dạng về di truyền

Trong 30 mẫu lá Tràm bằng phương pháp điện di protein SDS-PAGE phát hiện được lá Tràm có 11 dãy băng protein có sự khác biệt (Hình 1).



Hình 1: Kết quả điện di protein các mẫu lá Tràm

Những thông số biểu thị sự đa dạng về di truyền của các lá Tràm được trình bày qua bảng 1. Qua kết quả bảng 1 cho thấy tỉ lệ cá thể đa hình của lá Tràm là 9%, tỉ lệ băng protein đa hình là 16,7%, chỉ số đa dạng về kiểu gen $H_{EP} = 0,71$ và số allele hiệu quả $SENA = 2,44$, rõ nhất là chỉ số đa dạng về kiểu hình $H_o = 3,30$. Như vậy, cây Tràm không thuần chủng mà gồm nhiều dòng (line), nhưng cùng loài (species). Theo Rao *et al.* (1992), kết quả cấu trúc những dãy băng protein giữa các dòng trong cùng loài có khác biệt nhưng vẫn tiêu biểu cho mỗi loài và giữa các loài, khi điện di bằng SDS-PAGE sẽ cho các dãy băng protein khác nhau về số lượng lẫn trọng khối.

Bảng 1: Những thông số đa dạng về di truyền của cây Tràm

Thông số	Giá trị
Cá thể đa hình (%)	9
Băng protein đa hình (%)	16,7
Đa dạng về kiểu hình H_o	3,30
Đa dạng về kiểu gen H_{EP}	0,71
SENA	2,44

Cây Tràm được trồng từ hạt nên kết quả thu nhận được từ điện di protein cho thấy cấu trúc các dãy băng protein khác nhau và các thông số đa dạng về di truyền đã đánh giá được sự không thuần chủng của chúng. Như vậy cây Tràm có sự đa dạng về di truyền.

Dựa vào kết quả điện di protein, cây Tràm có khác biệt về gen di truyền và chia làm 10 dòng khác nhau.

3.2 Thử hoạt tính kháng khuẩn

Các cây có sự khác biệt các dãy băng protein được trồng trong cùng điều kiện chăm sóc sau 4 tháng, lá các nhóm cây này được thử hoạt tính kháng khuẩn, kết quả được trình bày qua bảng 2.

Bảng 2: Kết quả thử hoạt tính kháng khuẩn của các dòng Tràm có sự khác biệt dãy băng protein

Dòng Tràm	Vi khuẩn							
	<i>Staph.</i>	<i>Strep.</i>	<i>E. coli</i>	<i>Pseu.</i>	<i>Sal.</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>E. ictaluri</i>	<i>E. tarda</i>
1	32	512	>4096	2048	4096	2048	512	2048
2	64	1024	4096	1024	4096	2048	2048	2048
3	64	64	4096	512	4096	512	64	64
4	2048	>4096	4096	2048	4096	2048	1024	256
5	32	32	4096	256	4096	32	128	64
6	1024	32	>4096	512	>4096	32	256	256
7	32	32	4096	1024	4096	1024	64	64
8	32	64	4096	1024	4096	32	256	128
9	32	128	4096	1024	4096	2048	64	256
10	32	128	4096	512	4096	32	1024	128

Qua kết quả bảng 2 cho thấy tất cả các dòng Tràm đều tác động rất tốt trên vi khuẩn Gram dương *Staphylococcus aureus* và *Streptococcus faecalis* (MIC=32-1024 µg/ml), chỉ duy dòng Tràm 4, đặc biệt dòng 1, 5, 7, 8, 9, 10 tác động rất mạnh trên *Staphylococcus aureus* và dòng 5, 6, 7 trên *Streptococcus faecalis*

(MIC=32µg/ml). Kế đến, các dòng Tràm cũng tác động tốt trên *Pseudomonas aeruginosa* (MIC=256-2048 µg/ml). *Staphylococcus aureus* và *Streptococcus faecalis* là nhóm vi khuẩn Gram dương gây viêm có mũ, viêm họng và *Pseudomonas aeruginosa* còn gọi trực khuẩn mũ xanh tìm thấy trong quá trình mung mũ gây viêm hoại tử. Điều này phù hợp với kinh nghiệm dân gian dùng nước sắc lá Tràm để rửa, sát trùng vết thương, sát trùng mũi, họng, trị cảm cúm.

Bên cạnh đó, kết quả có được cũng cho thấy khả năng tác động trên nhóm vi khuẩn gây bệnh quan trọng và gây tử vong cao trên cá của các dòng Tràm: *Aeromonas hydrophila* gây bệnh đốm đỏ (đặc biệt dòng 5, 6, 8, 10 với MIC=32µg/ml), *Edwardsiella ictaluri* gây bệnh gan thận mũ (đặc biệt dòng 3, 7, 9 với MIC=64µg/ml), và *Edwardsiella tarda* gây nhiễm khuẩn máu (đặc biệt dòng 3, 5, 7 với MIC=64µg/ml) gây áp xe gan thận, gây bệnh trên tôm càng xanh tỉ lệ tử vong 30-70% (có thể lên đến 100%) (Bùi Quang Tề *et al.*, 2004). Các chủng vi khuẩn này đã kháng rất nhiều loại kháng sinh mạnh như *Staphylococcus aureus* đề kháng cao với penicillin (89,4%), tetracycline (82,4%), trimethoprim-sulfamethazine (80,65%), chloramphenicol (64,8%), erythromycin (38,4%) và methicillin (35,9%), ampicillin, Co-trimoxazol, erythromycin, lincomycin (từ 50-80%). *Streptococcus faecalis* kháng nhiều kháng sinh như gentamicin (7%), streptomycin (20%), gentamicin + streptomycin (22%), kháng cả vancomycin (4%); *Streptococcus faecalis* cũng kháng aztreonam, cephalosporins, clindamycin, nafcillin, oxacillin, trimethoprim-sulfamethoxazol. *Pseudomonas aeruginosa* kháng tất cả cephalosporins (ngay cả ceftazidim chỉ còn nhạy 50%), kháng mạnh với nhóm aminoglycosides (65-70%). Nhóm vi khuẩn gây bệnh trên cá càng kháng nhiều kháng sinh mạnh như ampicillin (100%), oxacillin (100%), Bacitracin (100%), streptomycin (26%), clindamycin (43%), nalidixic acid (26%), novobiocin (87%), rifampicin (4%), vancomycin (9%)...(Orozoval *et al.*, 2008). Colistin (>90%), streptomycin (83%), oxytetracycline (81%), trimethoprim (73%) (Tu Thanh Dung *et al.*, 2008).

Theo Đỗ Huy Bích *et al.* (2004), tinh dầu Tràm có tác dụng kháng khuẩn *in vitro* theo thứ tự hoạt tính giảm trên các chủng vi khuẩn: *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Pneumococcus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, nhưng kết quả bảng 2 cho thấy các dòng Tràm tác động yếu hoặc không có khả năng tác động trên *E. coli* và *Salmonella*, nhưng lại tác động mạnh trên *Staphylococcus aureus* và *Pseudomonas aeruginosa*.

Kết quả điện di protein đã giúp chọn lọc dòng Tràm có hoạt tính kháng khuẩn cao trên vi khuẩn gây bệnh cho người, gia súc và động vật thủy sinh. Cây Tràm là tiềm năng lớn có thể khai thác để thay thế kháng sinh trong tương lai, cần nên được quan tâm nhiều hơn nữa.

4 KẾT LUẬN

Cây Tràm *Melaleuca leucadendra* trên đất phèn ngập có nhiều dòng và các dòng này có sự khác biệt về hoạt tính kháng khuẩn, đa số các dòng đều tác động tốt trên *Staphylococcus aureus* và *Streptococcus faecalis* và nhóm vi khuẩn gây bệnh trên cá *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella ictaluri* và *Edwardsiella tarda*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bùi Quang Tề, Đỗ Thị Hòa, Nguyễn Hữu Dũng và Nguyễn Thị Muội (2004), Bệnh học thủy sản, NXB Nông Nghiệp.
- Bùi Thị Tho (2003), Thuốc kháng sinh và nguyên tắc sử dụng trong chăn nuôi, NXB Hà Nội.
- Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương, Nguyễn Thượng Đông, Đỗ Trung Đàm, Phạm Văn Hiến, Vũ Ngọc Lộ, Phạm Duy Mai, Phạm Kim Mãn, Đoàn Thị Thu, Nguyễn Tập và Trần Toàn (2004). Cây Thuốc Và Động Vật Làm Thuốc Ở Việt Nam, Tập II, NXB Khoa Học Và Kỹ Thuật.
- Hub, M.K. and Ohnishi O. (2002), Genetic diversity and genetic population of wild radish revealed by AFLP, *Breeding Science* 52:79-88.
- Laemmli U.K. (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227: 680 - 685.
- Nguyễn Minh Phúc, Nguyễn Thời Nhậm, Nguyễn Minh Đức và Phạm Hùng Vân (2002), Nghiên cứu y học, NXB Y Học TP. Hồ Chí Minh, Phụ bản số 1, Tập 6.
- Nguyễn Văn Đán và Nguyễn Viết Tựu (1985), Phương pháp nghiên cứu hóa học cây thuốc, NXB Y học Tp Hồ Chí Minh.
- Orozoval P., Chikova V., Kolarova V., Nenova R., Konovska M. and Najdenskil H. (2008), Antibiotic resistance of potentially pathogenic *Aeromonas* strains, *Trakia journal of sciences*, 6: 71-77.
- Rao R., Vaglio M.D., Paino D'Urzo M. and Monti L. (1992), Identification of *Vigna* spp. through specific seed storage polypeptides, *Euphytica* 62:39-43.
- Thanh V.C., Nguyen T.N., Hirata Y. and Thuong N.V. (2003), Antenna protein diversity of prawns (*Macrobrachium*) in the MeKong Delta, *Biophere Conservation* 5:11-17.
- Trương Công Quyền *et al.* (1986), Thực hành dược khoa, NXB Y học.
- Từ Minh Koóng *et al.* (2001), Kỹ thuật sản xuất dược phẩm Tập I, Trường Đại học Dược Hà Nội.
- Tu Thanh Dung, Freddy H., Nguyen A.T., Patric S., Margo B. and Annemie D. (2008), Antimicrobial susceptibility pattern of *Edwardsiella ictaluri* isolates from natural outbreaks of Bacillary necrosis of *Pangasianodon hypophthalmus* in Vietnam, *Microbial drug resistance*, 14(4): 311-316.
- Võ Văn Chi (2005), Cây rau, trái đậu dùng để ăn và trị bệnh, NXB khoa học và kỹ thuật TP. Hồ Chí Minh.