

TUYỂN CHỌN VÀ KHẢO SÁT ĐIỀU KIỆN SINH TỔNG HỢP KHÁNG SINH CỦA CHỦNG XẠ KHUẨN ĐỐI KHÁNG VỚI *VIBRIO*

Nguyễn Thị Thu Thủy, Nguyễn Thị Thu Hồng, Hoàng Thị Kim Hồng

Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

TÓM TẮT

Hiện nay có một số hóa chất, kháng sinh, chế phẩm sinh học đã được nghiên cứu và sử dụng nhằm hạn chế các bệnh do *Vibrio* gây ra đối với tôm. Tuy nhiên, việc sử dụng hóa chất, kháng sinh không đúng quy cách, liều lượng có thể tạo ra các dòng vi khuẩn kháng thuốc, làm suy thoái môi trường. Vì vậy, cần thiết phải tạo ra các chế phẩm sinh học có hiệu quả cao, phù hợp với điều kiện địa phương, an toàn trong khi sử dụng đồng thời giá thành rẻ. Xạ khuẩn là nhóm vi sinh vật có khả năng sinh kháng sinh cao, vì vậy nghiên cứu xạ khuẩn đối kháng với *Vibrio* là một trong những biện pháp nhằm hạn chế bệnh ở tôm, giảm thiểu hóa chất sử dụng trong nuôi trồng thủy sản. Từ 5 chủng xạ khuẩn có hoạt tính đối kháng với *Vibrio* trong số 93 chủng được phân lập từ các mẫu đất, đã tuyển chọn được hai chủng X11 và X27 có hoạt tính đối kháng với *Vibrio* mạnh, đường kính vòng vô khuẩn đạt 32,25 - 34,33 mm. Khảo sát ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy đến hoạt tính đối kháng với *Vibrio* cho thấy: trong môi trường Gause I dịch thể có pH 6,5-7,0, thay thế nguồn KNO_3 bằng cao thịt, hai chủng xạ khuẩn X11 và X27 có hoạt tính đối kháng với *Vibrio* mạnh nhất với nguồn carbon lần lượt là saccharose và tinh bột sau 84 giờ nuôi cấy.

Từ khóa: Đối kháng, kháng khuẩn, phẩy khuẩn, tôm, *Vibrio*, xạ khuẩn

MỞ ĐẦU

Phú Vang là huyện đồng bằng ven biển và đầm phá của tỉnh Thừa Thiên Huế có tiềm năng lớn để phát triển đánh bắt và nuôi trồng thủy sản, đặc biệt là nghề nuôi tôm (Phạm Hồng Ngọc Thủy, 2008). Trong những năm gần đây, sự bùng nổ của dịch bệnh tôm, môi trường bị ô nhiễm nghiêm trọng gây thiệt hại đáng kể đến kinh tế - xã hội và hệ sinh thái vùng đầm phá. Dịch bệnh tôm do vi khuẩn *Vibrio* gây nên chiếm một tỷ lệ khá lớn. Hiện nay, đã có một số hóa chất, kháng sinh, chế phẩm sinh học đã được nghiên cứu sử dụng. Tuy nhiên, việc sử dụng hóa chất, kháng sinh có thể tạo ra các dòng vi khuẩn kháng thuốc, tồn dư các loại hóa chất, chất kháng sinh trong tôm. Đa số các chế phẩm sinh học không công bố về nguồn gốc xuất xứ là nguy cơ gây mất an toàn sinh học. Xạ khuẩn (*Actinomycetes*) có khả năng hình thành chất kháng sinh, trong số 8000 chất kháng sinh đã được biết trên thế giới thì trên 80% là do xạ khuẩn sinh ra (Dzung *et al.*, 2002). Vì vậy, xạ khuẩn là đối tượng rất có tiềm năng trong việc kiểm soát *Vibrio* gây bệnh, giảm thiểu hóa chất sử dụng trong nuôi trồng thủy sản.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Các chủng xạ khuẩn có hoạt tính đối kháng mạnh với *Vibrio* được phân lập từ ao nuôi tôm ở thị

trấn Thuận An và một số xã (Phú Xuân, Phú Mỹ, Phú An, Phú Thuận) thuộc huyện Phú Vang, tỉnh Thừa Thiên Huế.

Vi sinh vật kiểm định nhận được từ Viện công nghệ Sinh học Hà Nội: *Vibrio parahaemolyticus* (HH1), *Vibrio alginolyticus* (HU1), *Vibrio* sp. (HU3).

Phương pháp

Tuyển chọn xạ khuẩn sinh kháng sinh bằng phương pháp nuôi xạ khuẩn trên môi trường đặc Gause I có bổ sung streptomycine 0.01%.

Xác định hoạt tính kháng khuẩn bằng cách đo kích thước vòng vô khuẩn (phương pháp thoi thạch). Xạ khuẩn được nuôi cấy trên môi trường Gause I trong hộp petri, sau khi mọc đều dùng dụng cụ khoan nút chai ấn nhẹ trên bề mặt thạch để lấy ra những thoi thạch hình trụ. Đồng thời nấu môi trường tương ứng đối với vi khuẩn kiểm định và phân vào bình tam giác, khử trùng 1 atm trong 20 phút, để nguội đến 40⁰C, cho riêng từng loại VSV kiểm định vào từng bình, lắc cho vi khuẩn phân bố đều rồi rót vào các đĩa petri (có độ cao bằng độ cao của thoi thạch xạ khuẩn). Đợi cho thạch đông cứng, dùng dụng cụ khoan nút chai loại bỏ các thoi thạch và dùng tăm vô trùng để lấy các thoi thạch có xạ khuẩn mọc đặt vào các lỗ tương ứng trên đĩa petri có chứa môi trường đã cấy sẵn vi khuẩn kiểm định. Cho đĩa petri này vào tủ lạnh 4⁰C từ 10-12 giờ để CKS kịp

khúc tán ra xung quanh trước khi VSV kiểm định phát triển. Rồi lấy ra khỏi tủ lạnh, đặt vào tủ ấm nhiệt độ 30°C từ 16-20 giờ. Sau đó lấy ra quan sát và đo vòng vô khuẩn xung quanh thỏi thạch (Nguyễn Văn Cách, 2004; Egorov, 1976).

Tiến hành nuôi các chủng xạ khuẩn đã được tuyển chọn trong môi trường dịch thể Gause I với các điều kiện thời gian, pH môi trường (5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0), nguồn carbon, nguồn nitrogen khác nhau. Sau khi nuôi cấy, thu dịch lọc để xác định hoạt tính đối kháng với *Vibrio* bằng phương pháp khuếch tán trên thạch (Nguyễn Lân Dũng, 1978).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tuyển chọn chủng xạ khuẩn

Từ 93 chủng xạ khuẩn phân lập được, chúng tôi chọn ra 5 chủng có kích thước vòng vô khuẩn lớn nhất, cấy vạch trên môi trường Gause I, nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C, sau 72 giờ thử hoạt tính đối kháng với *Vibrio* bằng phương pháp thỏi thạch. Kết quả ở bảng 1 cho thấy, 2 chủng X11 và X27 thể hiện hoạt tính đối kháng với các chủng *Vibrio* kiểm định (HH1, HU1 và HU3) khá lớn, kích thước vòng vô khuẩn lần lượt là 33,83;

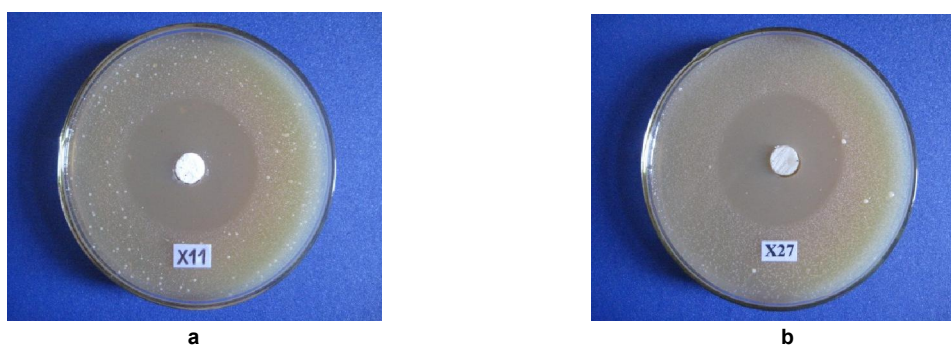
24,33; 34,33 và 32,15; 22,85; 30,85 mm (Hình 1).

Nghiên cứu các điều kiện nuôi cấy thích hợp cho sinh tổng hợp kháng sinh của xạ khuẩn

Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy

Chủng X11 và X27 được nuôi cấy trên môi trường dịch thể thích hợp. Hoạt tính kháng sinh được thử định kỳ sau 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120 giờ với vi khuẩn kiểm định là HH1 ứng với X11 và HU3 ứng với X27. Kết quả được trình bày ở bảng 2.

Kết quả cho thấy, cả khi tăng thời gian nuôi cấy thì hoạt tính đối kháng với *Vibrio* của hai chủng xạ khuẩn đều tăng. Đối với chủng X11, trong 84 giờ nuôi cấy đường kính vòng vô khuẩn tăng nhanh và đạt cực đại ở 84 giờ (kích thước vòng vô khuẩn đạt 23,75 mm). Sau thời điểm này, hoạt tính đối kháng với *Vibrio* giảm mạnh (kích thước vòng vô khuẩn đạt 13,50 mm ở 120 giờ nuôi cấy). Tương tự đối với chủng X27, trong khoảng thời gian từ 24 - 84 giờ nuôi cấy, đường kính vòng vô khuẩn tăng nhanh và đạt cực đại ở 84 giờ (kích thước vòng vô khuẩn đạt 25,00 mm). Sau 84 giờ nuôi cấy hoạt tính đối kháng với *Vibrio* giảm mạnh (kích thước vòng vô khuẩn đạt 14,85mm ở 120 giờ nuôi cấy).



Hình 1. a. Hoạt tính đối kháng chủng HH1 của chủng X11 nuôi cấy trên môi trường Gause I. **b.** Hoạt tính đối kháng chủng HU3 của chủng X27 nuôi cấy trên môi trường tinh bột-đạm sulphate.

Bảng 1. Kích thước vòng vô khuẩn của các chủng xạ khuẩn tuyển chọn.

Chủng xạ khuẩn	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)		
	HH1	HU1	HU3
X11	33,83 ± 0,44	24,33 ± 0,17	34,33 ± 0,33
X24	25,50 ± 0,25	27,15 ± 0,15	20,33 ± 0,60
X27	32,25 ± 0,50	22,85 ± 0,35	30,85 ± 0,15
X77	26,17 ± 0,17	28,83 ± 0,17	17,33 ± 0,33
X82	25,00 ± 0,25	26,33 ± 0,33	21,83 ± 0,44

Bảng 2. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến hoạt tính đối kháng với Vibrio của chủng X11 và X27.

Chủng xạ khuẩn	Thời gian (giờ)	Đường kính vòng vô khuẩn D - d (mm)
X11	24	7,67 ± 0,33
	36	11,83 ± 0,44
	48	15,85 ± 0,15
	60	17,50 ± 0,29
	72	22,33 ± 0,17
	84	23,75 ± 0,25
	96	18,65 ± 0,35
	108	15,33 ± 0,33
	120	13,50 ± 0,00
X27	24	9,33 ± 0,17
	36	12,35 ± 0,15
	48	14,17 ± 0,17
	60	19,50 ± 0,29
	72	23,25 ± 0,25
	84	25,00 ± 0,00
	96	21,50 ± 0,25
	108	16,33 ± 0,33
	120	14,85 ± 0,35

Bảng 3. Ảnh hưởng của pH môi trường đến hoạt tính đối kháng với Vibrio của chủng X11 và X27.

Chủng xạ khuẩn	pH môi trường	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)
X11	5,5	15,33 ± 0,33
	6,0	19,33 ± 0,17
	6,5	27,50 ± 0,25
	7,0	22,65 ± 0,35
	7,5	17,00 ± 0,00
	8,0	13,33 ± 0,17
X27	5,5	14,50 ± 0,50
	6,0	18,83 ± 0,16
	6,5	23,50 ± 0,29
	7,0	28,50 ± 0,00
	7,5	21,67 ± 0,33
	8,0	15,25 ± 0,15

Ảnh hưởng của pH môi trường

Nuôi cấy lắc các chủng xạ khuẩn trong môi trường dịch thể ở điều kiện thích hợp, sau đó thu dịch lọc và xác định hoạt tính đối kháng với *Vibrio* (HH1, HU3) bằng phương pháp khuếch tán trên thạch.

Từ kết quả nghiên cứu chúng tôi nhận thấy, khi pH môi trường từ 6,0 - 7,5 hoạt tính đối kháng với *Vibrio* của hai chủng xạ khuẩn đều mạnh. Chủng X11 có hoạt tính đối kháng với *Vibrio* mạnh nhất trong môi trường pH 6,5 (kích thước vòng vô khuẩn đạt 27,50 mm), chủng X27 có pH thích hợp là 7 (kích thước vòng vô khuẩn đạt 28,50 mm).

Bảng 4. Ảnh hưởng của nguồn carbon đến hoạt tính đối kháng với *Vibrio* của chủng X11 và X27.

Chủng xạ khuẩn	Nguồn carbon	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)
X11	Glucose	26,67 ± 0,33
	Lactose	15,25 ± 0,25
	Saccharose	29,83 ± 0,44
	Tinh bột	26,00 ± 0,50
	CMC	19,50 ± 0,50
X27	Glucose	21,65 ± 0,35
	Lactose	13,33 ± 0,17
	Saccharose	26,50 ± 0,25
	Tinh bột tan	28,67 ± 0,33
	CMC	20,35 ± 0,15

Bảng 5. Ảnh hưởng của nguồn nitrogen đến hoạt tính đối kháng với *Vibrio* của chủng X11 và X27.

Chủng xạ khuẩn	Nguồn nitrogen	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)
X11	KNO ₃	21,33 ± 0,33
	(NH ₄) ₂ SO ₄	19,33 ± 0,17
	Gelatin	13,25 ± 0,50
	Peptone	23,83 ± 0,44
	Cao thịt	29,50 ± 0,29
	Urea	20,50 ± 0,25
X27	KNO ₃	23,17 ± 0,17
	(NH ₄) ₂ SO ₄	17,33 ± 0,17
	Gelatin	15,00 ± 0,00
	Peptone	25,50 ± 0,29
	Cao thịt	30,85 ± 0,15
	Urea	19,50 ± 0,29

Ảnh hưởng của nguồn carbon

Để xác định ảnh hưởng của nguồn carbon đến sinh tổng hợp kháng sinh của chủng X11 và X27,

chúng tôi tiến hành nuôi cấy lắc hai chủng X11 và X27 trong môi trường Gause I và tinh bột - đạm sulphate dịch thể tương ứng nhưng thay thế các nguồn carbon khác nhau: saccharose, tinh bột tan,

CMC, glucose, lactose. Sau khoảng thời gian nuôi cấy thích hợp (84 giờ), thu dịch lọc và xác định hoạt tính đối kháng với vi khuẩn kiểm định là HH1 ứng với chủng X11 và HU3 ứng với chủng X27.

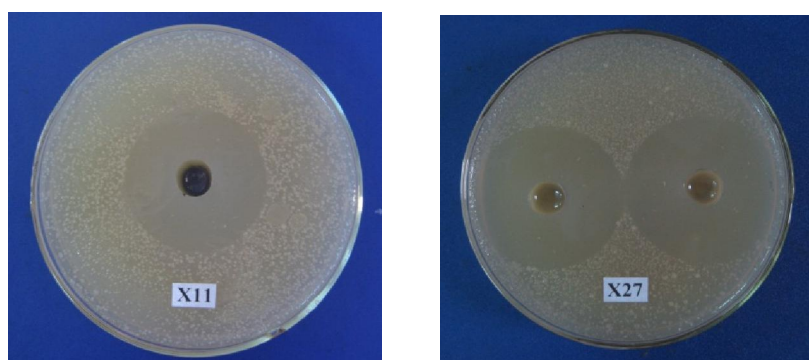
Kết quả nghiên cứu cho thấy, nguồn carbon ảnh hưởng rất lớn đến hoạt tính đối kháng với *Vibrio* của xạ khuẩn. Chủng X11 thể hiện hoạt tính đối kháng *Vibrio* mạnh nhất trong môi trường nuôi cấy có nguồn carbon là saccharose (kích thước vòng vô khuẩn đạt 29,83 mm), còn chủng X27 thích hợp nhất với nguồn carbon là tinh bột (kích thước vòng vô khuẩn đạt 28,67 mm).

Ảnh hưởng của nguồn nitrogen

Để thăm dò ảnh hưởng của nguồn nitrogen đến

hoạt tính đối kháng với *Vibrio* của xạ khuẩn, chúng tôi tiến hành nuôi cấy lắc các chủng xạ khuẩn trong môi trường dịch thể với nguồn carbon thích hợp cho từng chủng, có bổ sung các nguồn nitrogen khác nhau là KNO_3 , $(NH_4)_2SO_4$, gelatin, peptone, cao thịt, urea. Sau 84 giờ nuôi cấy, thu dịch lọc và xác định hoạt tính đối kháng với chủng *Vibrio* HH1 và HU3.

Qua kết quả nghiên cứu cho thấy, nguồn nitrogen ảnh hưởng rất lớn đến hoạt tính đối kháng với *Vibrio* của xạ khuẩn. Cả hai chủng X11 và X27 đều thể hiện hoạt tính đối kháng với *Vibrio* mạnh nhất trong môi trường nuôi cấy có nguồn nitrogen là cao thịt (kích thước vòng vô khuẩn của chủng X11 đạt 29,50 mm, chủng X27 đạt 30,85 mm).



Hình 2. Vòng vô khuẩn của chủng X11 và X27 khi nuôi cấy trong môi trường tối thích.

KẾT LUẬN

Từ 10 mẫu đất ao nuôi tôm ở thị trấn Thuận An và một số xã thuộc huyện Phú Vang tỉnh Thừa Thiên Huế, chúng tôi đã phân lập và tách ra được 93 chủng xạ khuẩn có khả năng sinh kháng sinh.

Tuyển chọn được hai chủng X11 và X27 có hoạt tính đối kháng với *Vibrio* mạnh, đường kính vòng vô khuẩn đạt 32,25 - 34,33 mm.

Nuôi cấy hai chủng xạ khuẩn X11 và X27 trong môi trường Gause I dịch thể, thay thế cao thịt, tinh bột hoặc saccharose, pH môi trường 6,5 hoặc 7,0, hoạt tính đối kháng với *Vibrio* mạnh nhất sau 84 giờ nuôi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Dzung NA, Thang NT (2002) Effect of oligoglucosamine prepared by enzyme degradation

on the growth of soybean. Suchiva K, Chandkrachang S, Methacanon P and Peter MG, eds. *Advances in Chitin Science*, Vol. 5. Proceedings of the 5rd Asia Pacific symposium & Exhibition, Bangkok, 463-467.

Egorov NV (1976) *Thực tập vi sinh vật*. Nxb Mir, *Matxcova*. Nguyễn Lâm Dũng dịch, 1983. Nhà xuất bản Đại học và Trung học công nghiệp. Hà Nội.

Nguyễn Lâm Dũng (1978) *Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học, tập 3*. Nxb Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.

Nguyễn Văn Cách (2004) *Công nghệ lên men các chất kháng sinh*. Nxb Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.

Phạm Hồng Ngọc Thủy (2008) Bước đầu nghiên cứu thu nhận enzyme chitosanase kỹ thuật từ *Streptomyces griseus*. *Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản*, 3: 45-53.

SCREENING OF ANTAGONISTIC-*VIBRIO* ACTINOMYCES AND INVESTIGATION OF THE CONDITIONS FOR ANTIBIOTIC SYNTHESIS

Nguyen Thi Thu Thủy, Nguyen Thi Thu Hong, Hoang Thi Kim Hong*

College of Sciences, Hue University

SUMMARY

At present, some chemicals, antibiotics, biological products were studied and used to limit the disease in shrimp caused by *Vibrio*. However, the use of chemicals and antibiotics without the right rule and dosage can create drug-resistant bacteria, leading to a degradation of the environment. Therefore, the creating high effective biological products with cheaper price, safe and suitable with local conditions are necessary work. Meanwhile, the actinomycete is one of the microorganism groups with high fertility antibiotics, so study on the actinomycete antagonistic to *Vibrio* is one of the methods to reduce disease shrimp and chemicals used in aquaculture. Among 93 actinomycetes strains with antagonistic-*Vibrio* activity isolated from soil, two strains X11 and X27 with high antagonistic-*Vibrio* activity (diameter of inhibition zones about 32.25-34.33mm) were selected. Studying on the effects of the culture medium of actinomycete to antagonistic activity against *Vibrio* showed that GauseI medium (pH 6,5 – 7,0) in which KNO_3 source was replaced by beef glue, two actinomycete strains of X11 and X27 showed the strongest antagonistic activity against *Vibrio* with the carbon source of sucrose and starch, respectively after 84 hours of culture.

Keywords: *Actinomycetes, antibacterial activity, antagonistic, shrimp, Vibrio*

* Author for correspondence: E-mail: hkhong@husc.edu.vn