

NGHIÊN CỨU CHỦNG XẠ KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG ĐỐI KHÁNG VỚI VI KHUẨN *Vibrio parahaemolyticus* GÂY BỆNH TRÊN TÔM

Nguyễn Xuân Cảnh^{1*}, Hồ Tú Cường², Nguyễn Thị Định¹, Phạm Thị Hiếu¹

¹Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

²Viện Công nghệ Môi trường, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Email*: nxcanh@vnua.edu.vn

Ngày gửi bài: 12.07.2016

Ngày chấp nhận: 20.11.2016

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này chúng tôi đã tiến hành tuyển chọn, nghiên cứu đặc điểm sinh học của chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng với vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh trên tôm. Từ 96 chủng xạ khuẩn có nguồn gốc khác nhau, bằng phương pháp khuếch tán thời thạch chúng tôi đã thu được 3 chủng có khả năng đối kháng với vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*. Trong số này, chủng 25.2 thể hiện hoạt tính mạnh nhất với đường kính vòng kháng khuẩn là 15 mm. Chủng 25.2 có khuẩn lạc màu trắng, nuôi từ 7 ngày trở đi thì có màu trắng viền xám, không sinh sắc tố tan trên môi trường Gause - 1, sinh trưởng tốt ở ngưỡng nhiệt độ từ 30 - 45°C, pH trung tính và chịu được nồng độ muối tương đối cao lên đến 6%. Chủng 25.2 có khả năng sử dụng nhiều nguồn đường và nitrogen khác nhau. Phân tích trình tự 16S rRNA cho thấy chủng 25.2 và chủng *Streptomyces aureofaciens* có độ tương đồng là 96%. Kết hợp các đặc điểm hình thái, nuôi cấy, sinh lý, sinh hóa và phân tích sinh học phân tử đã xác định chủng xạ khuẩn 25.2 thuộc vào loài *Streptomyces aureofaciens*.

Từ khóa: *Streptomyces* sp., *Vibrio parahaemolyticus*, xạ khuẩn, hoạt tính sinh học.

Characterization of An Actinomycete Strain with Bioactivity against *Vibrio parahaemolyticus* Causing Disease on Shrimp

ABSTRACT

An experiment was conducted to screen and identify the actinomycete strains that are capable of antagonizing *Vibrio parahaemolyticus* causing disease on shrimp. Among of 96 isolated strains, three strains were obtained as capable of antagonizing *Vibrio parahaemolyticus* by agar diffusion plate method. The strain number 25.2 had strongest activity with a diameter of 15 mm clear zone of bacteria. The 25.2 strain showed white colonies but white colonies with grey borders after three and seven days of incubation, respectively. The strain did not produce soluble pigments on Gause-1 medium but grew well at temperatures between 30 - 45°C and neutral pH, and was tolerant to high salt concentration medium. The 25.2 strain was able to utilize several sources of carbon and nitrogen. Results of 16S rRNA sequence analysis showed that the strain 25.2 had a similarity of 96% compared with *Streptomyces aureofaciens*. Based on morphological characteristics, culture, physiological and biochemical characteristics and molecular biological analyses, the strain 25.2 was identified as *Streptomyces aureofaciens*.

Keywords: *Streptomyces* sp., *Vibrio parahaemolyticus*, Actinomycete, bioactivity.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh hoại tử gan tụy do vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây ra đang gây thiệt hại nghiêm trọng cho ngành nuôi tôm (Donald *et al.*, 2012). Bệnh xảy ra đầu tiên ở Trung Quốc

vào năm 2009, đến năm 2010 đã được ghi nhận ở Việt Nam và tiếp đó xảy ra ở nhiều nước khác như Thái Lan, Malaysia... Để khống chế vi khuẩn này, thời gian qua các trại sản xuất tôm đã dùng nhiều kháng sinh như Tetracycline, Oxytetracycline, Rifamycine và hóa chất như

Iodin, $KMnO_4$ trong xử lý ao nuôi. Hàng loạt hóa chất được quảng cáo và phân phối cho các cơ sở sản xuất tôm là có thể diệt được vi khuẩn gây bệnh nhưng thực tế lại không hiệu quả, ngược lại còn gây tồn dư một lượng hóa chất trong tôm dẫn tới việc giảm năng suất và chất lượng của tôm (FAO, 2013). Đứng trước thực trạng đó thì việc tìm kiếm các giải pháp điều trị bệnh mới là hết sức cấp bách đối với ngành nuôi tôm của Việt Nam hiện nay và trong tương lai.

Xạ khuẩn (*Actinomycetes*) được biết đến là một nhóm vi khuẩn đặc biệt. Chúng phân bố rất rộng rãi và có vai trò quan trọng trong chu trình tuần hoàn vật chất tự nhiên. Trong quá trình sống xạ khuẩn tiết ra nhiều chất có hoạt tính sinh học cao có khả năng kháng lại các loài vi sinh vật khác nhau bao gồm cả nấm và vi khuẩn. Trong số 23.000 hợp chất có hoạt tính sinh học được sản xuất từ vi sinh vật, hơn 10.000 hợp chất được phân lập từ xạ khuẩn (Watve *et al.*, 2001). Trên 80% số hợp chất này là các loại kháng sinh khác nhau. Các nhà nghiên cứu chỉ ra rằng cứ 1.000 chủng xạ khuẩn được phân lập một cách ngẫu nhiên thì khoảng 10 chủng sẽ sinh streptomycin và 4 chủng sẽ sinh tetracycline. Chính vì vậy, xạ khuẩn là một trong những nguồn sản xuất các chất có hoạt tính sinh học đầy tiềm năng (Mitra *et al.*, 2008). Nghiên cứu này được thực hiện với mong muốn phát hiện, xác định được những chủng xạ khuẩn có hoạt tính kháng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*. Từ đó tìm kiếm các hoạt chất mới, an toàn, hiệu quả và thân thiện với môi trường để phục vụ nghề nuôi trồng thủy sản nói chung và nuôi tôm nói riêng.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Chủng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh trên tôm được cung cấp từ Viện Công nghệ Môi trường Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Các chủng xạ khuẩn phân lập từ nhiều nguồn khác nhau được lưu trữ tại phòng thí nghiệm Bộ môn Công nghệ Vi sinh, Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tuyển chọn các chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*

Các chủng xạ khuẩn được nuôi cấy trên môi trường Gause - 1 (Tinh bột tan 20 g/l; K_2HPO_4 0,5 g/l; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 g/l; NaCl 0,5 g/l; KNO_3 0,5 g/l; $FeSO_4$ 0,01 g/l; Agar 20 g/l; pH = 7 - 7,4) ở 30°C trong 5 ngày. Các thỏi thạch chứa xạ khuẩn đã nuôi cấy có đường kính 7 mm được đặt vào đĩa môi trường MPA (cao thịt 5 g/l; pepton 10 g/l; NaCl 5 g/l; agar 20 g/l; pH 7 - 7,2) đã được cấy trải đều vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*, ủ ở 4°C trong 1 giờ để hoạt chất khuếch tán từ thỏi thạch ra môi trường. Chuyển đĩa thạch này vào tủ nuôi ở 30°C và quan sát kết quả sau 12 giờ nuôi cấy, đo đường kính vòng vô khuẩn (nếu có).

Các chủng xạ khuẩn được xác định là có hoạt tính tiếp tục được nuôi cấy trong môi trường Gause - 1 lỏng trong 5 ngày, li tâm ở 7.000 vòng/phút trong 5 phút, thu dịch. Dịch này được pha loãng theo những tỷ lệ nhất định (10, 100, 1.000 lần), nhỏ 100 μ l dịch pha loãng vào các giếng tạo ra trên đĩa môi trường TCBS đã cấy vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*. Kiểm tra hoạt tính dịch nuôi cấy thông qua kích thước vòng vô khuẩn như mô tả ở trên.

2.2.2. Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học của chủng xạ khuẩn đã tuyển chọn (25.2)

Xác định hình thái, kích thước khuẩn lạc: Chủng xạ khuẩn 25.2 được cấy trên môi trường Gause - 1, nuôi ở 30°C trong 5 ngày, quan sát hình thái và màu sắc khuẩn lạc, mép khuẩn lạc và đo kích thước của chúng.

Xác định hình thái chuỗi sinh bào tử và bề mặt bào tử: Chủng xạ khuẩn 25.2 được cấy trên môi trường Gause - 1 đã găm các phiến kính vào thạch với góc nghiêng 45° so với bề mặt. Sau 3 ngày nuôi cấy ở 30°C, rút các phiến kính có khuẩn ty khí sinh của xạ khuẩn và quan sát hình thái chuỗi sinh bào tử dưới kính hiển vi quang học. Hình thái và bề mặt bào tử xạ khuẩn được quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM).

Kiểm tra khả năng sinh sắc tố melanin: Nuôi chủng xạ khuẩn 25.2 trên môi trường ISP - 6 (Peptone 10 g/l; cao nấm men 1 g/l; xitrat sắt 0,5 g/l; Agar 20 g/l; pH 7,0 - 7,2) ở nhiệt độ 30°C. Quan sát màu sắc môi trường trong 14 ngày, nếu chủng xạ khuẩn sinh ra melanin thì màu của môi trường sẽ chuyển từ vàng nhạt sang nâu hoặc đen.

Kiểm tra khả năng đồng hóa các nguồn carbon: Nuôi chủng xạ khuẩn 25.2 trên môi trường ISP - 9 ((NH₄)₂SO₄ 2,64 g/l; KH₂PO₄ 2,38 g/l; K₂HPO₄.3H₂O 5,65 g/l; MgSO₄.7H₂O 1 g/l; dung dịch B 1,0 ml; Agar 20 g/l; pH 6,8 - 7,0) có bổ sung 1% theo trọng lượng các nguồn đường khác nhau bao gồm D - Glucose, D - Fructose, D - manotol, Sucrose, Rhamnose, Inositol, L - arabinose, Cellulose, D - Xylose, Raffinose. Khả năng đồng hóa đường được đánh giá bởi khả năng sống và phát triển của chủng xạ khuẩn trên các môi trường.

Kiểm tra khả năng sử dụng các nguồn ni tơ: Chủng xạ khuẩn 25.2 được nuôi cấy trên môi trường Starch Nitrate (Tinh bột 20 g/l; NaNO₃ 2 g/l; K₂HPO₄ 1 g/l; MgSO₄.7H₂O 0,5 g/l; KCl 0,5 g/l; FeSO₄.5H₂O 0,01 g/l; pH 6.8 - 7) làm đối chứng, các nguồn ni tơ bao gồm: Cao thịt bò, KNO₃, NH₄Cl, Pepton, (NH₄)₂SO₄, NH₄NO₃ được thay thế cho NaNO₃.

Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ, pH, nồng độ NaCl tới sinh trưởng và phát triển của chủng 25.2: Chủng xạ khuẩn 25.2 được nuôi trên môi trường Gause - 1 với các điều kiện nuôi cấy khác nhau bao gồm; nhiệt độ (4, 20, 30, 40, 45, 50°C), pH (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12) và nồng độ muối NaCl bổ sung vào môi trường (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9%).

2.2.3. Định danh chủng xạ khuẩn 25.2

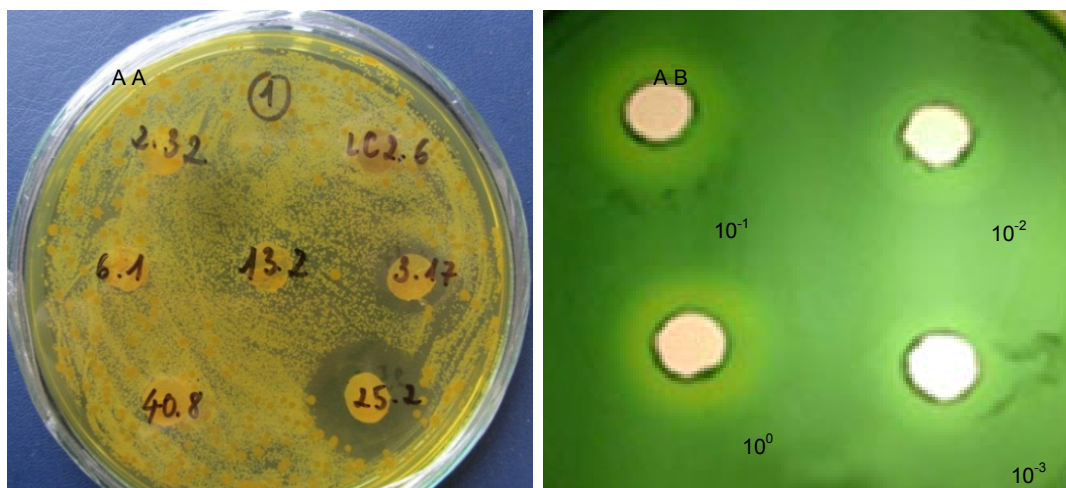
Căn cứ vào đặc điểm hình thái và nuôi cấy: Chủng xạ khuẩn 25.2 được nuôi cấy trên môi trường sau đó xác định các đặc điểm như hình thái khuẩn lạc, màu sắc khuẩn ty cơ chất, khuẩn ty khí sinh, cuống sinh bào tử và bề mặt bào tử trên môi trường nuôi cấy. So sánh các đặc điểm này với các chủng xạ khuẩn đã biết trong hệ thống phân loại quốc tế (ISP) (Shirling and Gottlieb, 1966).

Căn cứ vào phân tích trình tự 16S rRNA: ADN từ xạ khuẩn chủng 25.2 được tách chiết theo phương pháp mô tả bởi Marmur (1961). Phản ứng PCR khuếch đại vùng bảo thủ của 16S rRNA với cặp mồi có trình tự: 5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3' và 5' - ACGGCTACCTTGTTACGACTT - 3'. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 1% sau đó gửi đi đọc trình tự tại công ty 1tsBASE (Singapore). Mức độ tương đồng về trình tự gen mã hóa 16S rRNA của chủng nghiên cứu được so sánh với các chủng đã công bố trên genbank sử dụng công cụ tra cứu Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Sử dụng phần mềm MEGA6 để xây dựng cây xác định mối quan hệ di truyền, lựa chọn phương pháp Maximum Parsimony với độ tin cậy được tính bằng thuật toán Bootstrap với 100 lần lặp lại. Dựa vào cây phân loại và giá trị bootstrap để xác định mối quan hệ di truyền của chủng nghiên cứu.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tuyển chọn chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng với vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*

Khả năng đối kháng với các vi sinh vật khác của xạ khuẩn được cho là bởi các hợp chất có hoạt tính sinh học, đặc biệt là các loại chất kháng sinh. Các chất này thường được xạ khuẩn tiết ra môi trường trong quá trình nuôi cấy, chính vì vậy chúng tôi đã sử dụng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch để tuyển chọn và đánh giá hoạt tính kháng vi khuẩn của các chủng xạ khuẩn. Môi trường Gause - 1 được sử dụng để nuôi xạ khuẩn, hai loại môi trường MPA và TCBS được sử dụng để nuôi cấy vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*. Qua quá trình sàng lọc, 03 trong số 96 chủng xạ khuẩn nghiên cứu được xác định có khả năng đối kháng với *Vibrio parahaemolyticus*. Trong đó, chủng 25.2 có khả năng đối kháng mạnh với đường kính vòng vô khuẩn là 15 mm (Hình 1 A). Trong những năm gần đây, đã có một số công bố trên thế giới về việc tìm ra các chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng với *Vibrio parahaemolyticus*. So sánh với những kết quả trước đây, chủng 25.2



Hình 1. Khảo sát hoạt tính kháng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* của chủng xạ khuẩn 25.2. Hoạt tính kháng vi khuẩn của một số chủng xạ khuẩn phân lập (A) và Hoạt tính kháng vi khuẩn của dịch nuôi cấy chủng xạ khuẩn 25.2 ở các độ pha loãng khác nhau (B)

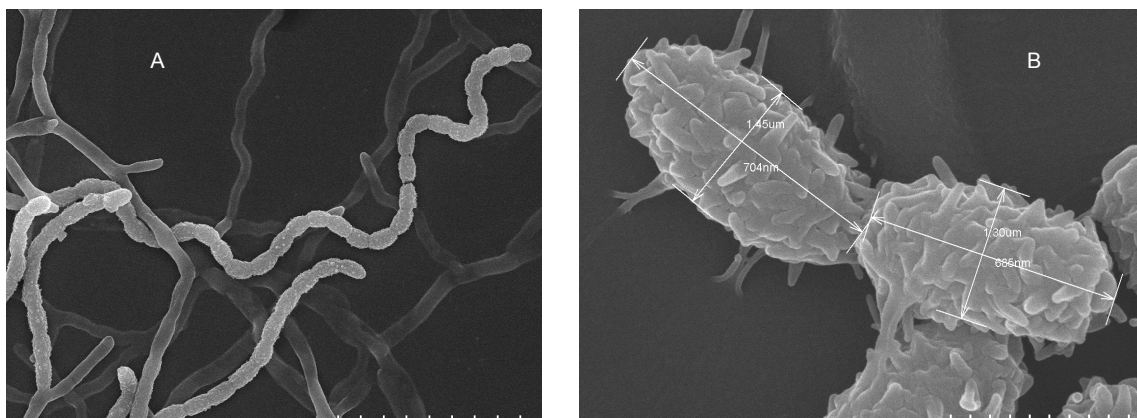
trong nghiên cứu này có hoạt tính tương đối mạnh (You *et al.*, 2005; Selvakumar *et al.*, 2010; Ngo *et al.*, 2011). Để đánh giá thêm về hoạt tính của chủng 25.2 này tôi đã sử dụng các nồng độ pha loãng khác nhau của dịch nuôi cấy và môi trường TCBS (môi trường đặc hiệu cho *Vibrio parahaemolyticus*) được sử dụng để nuôi vi khuẩn. Kết quả cho thấy ở độ pha loãng 1.000 lần, tuy có giảm nhưng dịch nuôi cấy xạ khuẩn vẫn còn hoạt tính kháng khuẩn (Hình 1 B). Kết quả này cho thấy chủng xạ khuẩn 25.2 có tiềm năng để phát triển ứng dụng, chính vì vậy chúng tôi sử dụng chủng này trong các nghiên cứu tiếp theo. 3.2. Đặc điểm sinh học của chủng xạ khuẩn 25.2.

3.2.1. Đặc điểm hình thái

Một trong những tiêu chí đầu tiên để nghiên cứu đặc điểm sinh học và phân loại xạ khuẩn là căn cứ vào đặc điểm hình thái (Miyadoh *et al.*, 2016). Chủng xạ khuẩn 25.2 được nuôi trên môi trường Gause - 1 trong 7 ngày ở 30°C để quan sát các đặc điểm màu sắc, kích thước, hình dạng của khuẩn lạc. Sau 3 ngày nuôi cấy, quan sát cho thấy khuẩn lạc chủng 25.2 có dạng tròn đều, kích thước dao động 0,3 - 0,6 mm, màu trắng. Màu sắc khuẩn

lạc có sự thay đổi sau các ngày nuôi cấy, đến ngày thứ 5 xuất hiện viền xám xung quanh khuẩn lạc, kích thước của viền này tăng dần theo thời gian nuôi cấy.

Sau khi xác định các đặc điểm khuẩn lạc, chúng tôi tiến hành các nghiên cứu xác định hình dạng cuống sinh bào tử, chuỗi bào tử và bề mặt bào tử của chủng 25.2. Kết quả quan sát dưới kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 1.000 lần cho thấy sau 48 h nuôi cấy chủng xạ khuẩn 25.2 bắt đầu hình thành bào tử. Các bào tử được sắp xếp thành chuỗi dài, phân nhánh và xoắn lò xo. Sau 60 h nuôi cấy các bào tử bắt đầu rời khỏi chuỗi, phát tán vào môi trường. Để xác định chính xác hơn hình thái của chủng xạ khuẩn 25.2 chúng tôi đã quan sát hình thái chuỗi sinh bào tử và bề mặt bào tử dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM). Việc xử lý tiêu bản, quan sát và phân tích hình ảnh được thực hiện tại Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương. Ở độ phóng đại 8.000 lần, chuỗi sinh bào tử của chủng 25.2 rất đặc trưng với dạng xoắn lò xo màu trắng, mỗi chuỗi hình thành 10 - 30 bào tử (Hình 2 A). Bào tử chủng 25.2 có dạng hình bầu dục, kích thước dao động từ 1,4 - 1,6 × 6,5 - 7,5 μm. Bề mặt bào tử xù xì, có nhiều gai ngắn (Hình 2 B).



Hình 2. Hình thái chuỗi sinh bào tử và bề mặt bào tử của chủng 25.2 dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM) ở độ phóng đại 8.000 lần (A) và 40.000 (B)

3.2.2. Khả năng hình thành sắc tố melanin

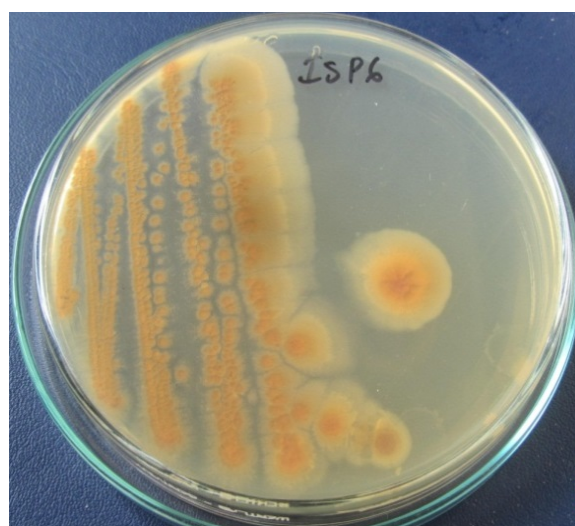
Melanin là chất do xạ khuẩn sinh ra trong quá trình nuôi cấy trên môi trường ISP - 6, làm màu môi trường sẽ chuyển từ màu vàng nhạt sang màu nâu, đen. Theo chương trình phân loại xạ khuẩn quốc tế (ISP) năm 1966, khả năng hình thành melanin được xác định trên môi trường ISP6 ở 30°C trong ít nhất 21 ngày, nếu chủng sinh ra melanin thì màu của môi trường sẽ chuyển từ vàng nhạt sang nâu, đen (Shirling và Gottlieb, 1966).

Chủng 25.2 được nuôi cấy trên môi trường ISP - 6 và quan sát sau 21 ngày nuôi cấy. Nhận thấy màu của môi trường không chuyển sang màu nâu đen, điều này chứng tỏ chủng 25.2 không có khả năng sinh sắc tố melanin.

3.2.3. Khả năng sử dụng các nguồn đường và ni tơ của chủng 25.2

Khảo sát khả năng sử dụng các nguồn carbon và ni tơ của chủng 25.2 là một trong những căn cứ để tiến hành phân loại xạ khuẩn theo hệ thống ISP đồng thời cung cấp thông tin về dinh dưỡng của chủng 25.2 cho quá trình lên men sau này. Chủng 25.2 được nuôi cấy trên môi trường ISP - 9 có bổ sung các nguồn đường khác nhau và trên môi trường Starch Nitrate với nguồn NaNO_3 được thay thế bằng các nguồn ni tơ khác nhau như mô tả trong phần phương pháp. Kết quả cho thấy chủng 25.2 có khả năng sử dụng nguồn

carbon từ nhiều nguồn đường khác nhau như Fructose, R - Hannose, L - arabinose, Raffinose, D - xylose, Inositol, D - manitol, Cellulose, Sucrose, trong đó tốt nhất là Sucrose và Inositol (Bảng 1). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu đã được công bố của Mohana và Radhakrishnan (2014). Chủng 25.2 có khả năng sử dụng nguồn ni tơ từ nhiều nguồn khác nhau là NH_4NO_3 , cao thịt bò, NH_4Cl , pepton, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KNO_3 (Bảng 1). Trong đó, nguồn gen từ KNO_3 , cao thịt bò giúp chủng xạ khuẩn 25.2 sinh trưởng tốt và ổn định nhất.



Hình 3. Kết quả kiểm tra khả năng hình thành melanin của chủng 25.2 khi nuôi cấy trên môi trường ISP - 6 sau 21 ngày

Bảng 1. Khả năng sử dụng các nguồn carbon và nitro khác nhau của chủng 25.2

Nguồn carbon	Khả năng phát triển của chủng 25.2 sau 5 ngày nuôi cấy	Nguồn ni tơ	Khả năng phát triển của chủng 25.2 sau 5 ngày nuôi cấy
Sucrose	+++	NaNO ₃	++
R - Hannose	++	KNO ₃	++
Cellulose	++	Cao thịt bò	++
Fructose	++	NH ₄ Cl	-
L - arabinose	++	Pepton	+
Raffinose	++	(NH ₄) ₂ SO ₄	-
D - xylose	+	NH ₄ NO ₃	-
Inositol	+++		
D - manitol	++		

Chú thích: (+) Chủng 25.2 có thể phát triển; (++) Chủng 25.2 phát triển tốt; (+++) Chủng 25.2 phát triển rất tốt; (-) Chủng 25.2 không có khả năng phát triển

3.2.3. Khả năng thích nghi với một số điều kiện môi trường của chủng 25.2

Mỗi vi sinh vật khác nhau sẽ thích nghi với các điều kiện môi trường khác nhau, nó ảnh hưởng đến quá trình trao đổi chất và sinh trưởng của mỗi loài. Khảo sát các yếu tố môi trường đến sự sinh trưởng và phát triển của chủng xạ khuẩn 25.2 nhằm mục đích cung cấp thông tin về điều kiện nuôi cấy phục vụ các nghiên cứu sau này. Chủng xạ khuẩn 25.2 đã được nuôi trên môi trường Gause - 1 ở các nhiệt độ, pH và các nồng độ muối khác nhau. Khả năng sinh trưởng và phát triển của chủng 25.2 sau 5 ngày nuôi cấy đã được kiểm tra, kết quả được tổng hợp trong bảng 1. Kết quả cho thấy chủng xạ khuẩn 25.2 có khả năng thích ứng tương đối cao với các điều kiện thử nghiệm. Tuy nhiên chủng này có khả năng phát triển tốt trong điều kiện nhiệt độ từ 30 - 45°C, thích hợp với môi trường trung tính hoặc hơi kiềm với khoảng pH từ 6 - 9 và có khả năng chịu được nồng độ NaCl lên đến 6%. (Bảng 2)

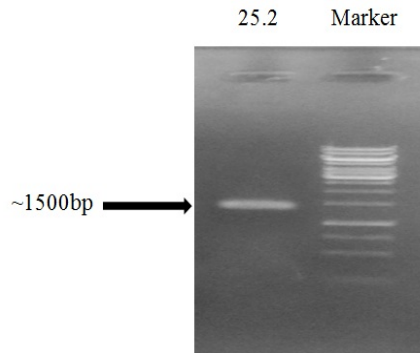
Trong nghiên cứu này, chủng 25.2 sinh trưởng được đến nồng độ muối là 6% nên xếp vào nhóm chịu muối trung bình, tuy nhiên phát triển mạnh ở nồng độ 1 - 3%. Các kết quả về điều kiện nuôi cấy này tương đối giống với kết quả nghiên cứu đã được công bố của Mohana và Radhakrishnan (2014).

3.3. Định danh chủng xạ khuẩn 25.2

Để định danh chủng xạ khuẩn trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng phương pháp sinh học phân tử dựa trên độ tương đồng của đoạn gen 16S rARN của chủng này với các chủng xạ khuẩn đã công bố trên ngân hàng gen. ADN của xạ khuẩn đã được tiến hành tách chiết theo phương pháp của Marmur (1961). Cặp mồi 27F và 1492R để khuếch đại đoạn gen 16S rARN của chủng 25.2 đã được sử dụng, kết quả điện di thu được 1 băng ADN duy nhất có kích thước khoảng 1500 bp phù hợp với kích thước lý thuyết có thể đạt được khi nhân bằng đoạn mồi này (Hình 4).

Bảng 2. Ảnh hưởng của một số điều kiện môi trường đến sự phát triển của chủng xạ khuẩn 25.2

Yếu tố	Khoảng tối ưu	Khoảng chịu đựng
Nhiệt độ (°C)	30 - 45	20 - 45
NaCl (%)	1 - 3	1 - 6
pH	6 - 9	4 - 12

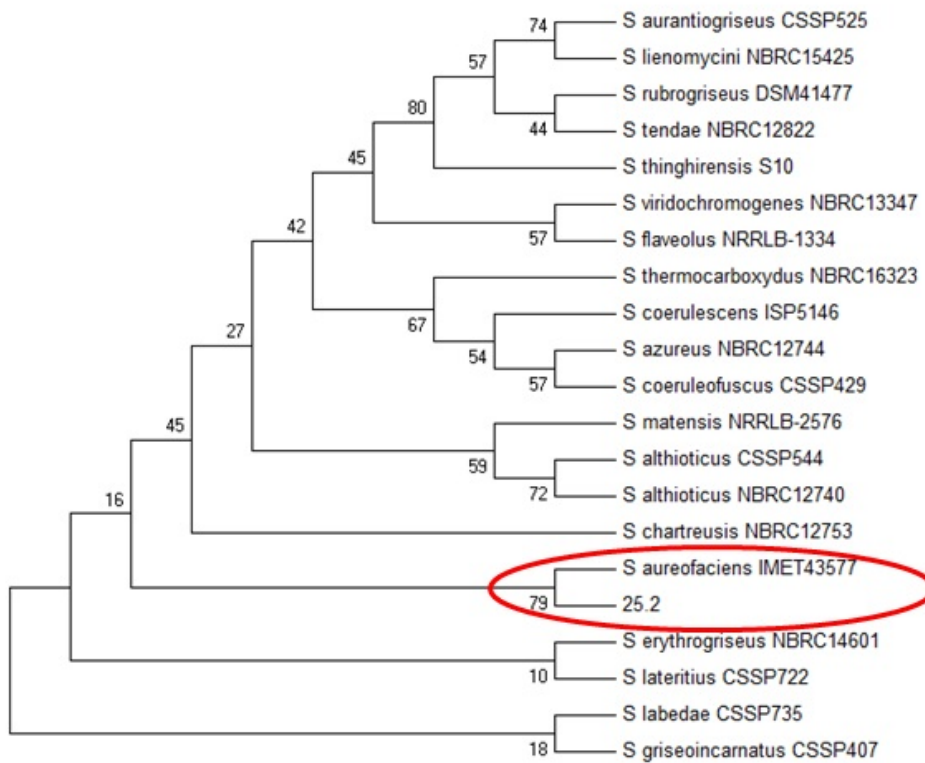


Hình 4. Kết quả điện di sản phẩm PCR

Sản phẩm PCR được tinh sạch và giải trình tự tại công ty 1st BASE (Singapore). Sau khi nhận được trình tự, tiến hành so sánh trình tự thu được với các trình tự khác trên ngân hàng gen nhờ công cụ blast, xây dựng cây phân loại cho chủng 25.2 bằng phần mềm MEGA6. Kết quả được thể hiện ở hình 5.

Dựa vào cây phân loại này có thể thấy chủng xạ khuẩn 25.2 nằm cùng nhánh với chủng *Streptomyces aureofaciens* IMET43577 với giá trị bootstrap là 79. Bên cạnh đó, kết

quả căn trình tự nucleotide cho thấy mức độ tương đồng của 16S rARN của chủng xạ khuẩn 25.2 và *Streptomyces aureofaciens* IMET43577 là 96%. Xét về mặt giá trị tin cậy và mức độ tương đồng thì hai chủng này giống nhau. Ngoài ra các đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa đã nghiên cứu, tôi nhận thấy chủng xạ khuẩn nghiên cứu 25.2 có nhiều đặc điểm giống với chủng *Streptomyces aureofaciens* IMET43577 trên ngân hàng gen (Shirling and Gottlieb, 1968).



Hình 5. Cây phân loại dựa trên trình tự 16S rARN của chủng xạ khuẩn 25.2

Chính vì vậy, kết hợp các đặc điểm sinh học và phương pháp sinh học phân tử, chúng tôi đưa ra kết luận chủng 25.2 có quan hệ họ hàng gần gũi với loài *Streptomyces aureofaciens* và chúng tôi đặt tên cho chủng này là *Streptomyces aureofaciens* 25.2.

4. KẾT LUẬN

Đã tuyển chọn được 3 chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng lại vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh trên tôm, trong đó chủng 25.2 có hoạt tính mạnh nhất.

Đã nghiên cứu các đặc điểm sinh học của chủng xạ khuẩn 25.2 bao gồm đặc điểm về hình thái, nuôi cấy, sinh lý và sinh hóa.

Sử dụng phương pháp sinh học phân tử kết hợp với các khóa phân loại truyền thống để định danh chủng xạ khuẩn 25.2, kết quả cho thấy chủng xạ khuẩn này có quan hệ họ hàng gần gũi với loài *Streptomyces aureofaciens*.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi ngân sách cho Khoa học và Công nghệ của Học viện Nông nghiệp Việt Nam trong đề tài mã số T2016 - 12 - 49.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Donald V. L., Redman R. M., Pantoja C. R., Noble B. L., Tran L. (2012). Early mortality syndrome affects shrimp in Asia. *Global Aquaculture Advocate Magazine*.

FAO (2013). Report of the Fao/mard technical workshop on early mortality syndrome (EMS) or acute hepatopancreatic necrosis syndrome (AHPNS) of cultured shrimp (under TCP/VIE/3304).

Marmor J. (1961). A Procedure for the Isolation of Deoxyribo - nucleic Acid from Micro - Organism. *Journal of Molecular Biology*, 3(2): 208 - 218.

Miyadoh S., Tsuchizaki N., Ishikawa J., Hotta K. (2016). *Digital Atlas of Actinomycete*. The Society for Actinomycetes Japan, Asakura Co.

Mitra, A., S.C. Santra and J. Mukharjee (2008). Distribution of actinomycetes, the antagonistic behavior and the Physio - chemical characteristic of the worlds largest tidal mangrove forest. *Applied Microbial Biotechnology*, 80: 685 - 695.

Mohana, S., and M. Radhakrishnan (2014). *Streptomyces* sp MA7 isolated from mangrove rhizosphere sediment effective against Gram negative bacterial pathogens. *International Journal of PharmTech Research (0974 - 4290)*, 6(4): 1259 - 1264.

Ngo T. T. C., Nguyen X. H., Le T. N. T., Masaru M., and Ikuo M. (2011). Identification and Characterization of Actinomycetes Antagonistic to Pathogenic *Vibrio* spp. Isolated from Shrimp Culture Pond Sediments in Thua Thien Hue - Viet Nam. *Journal - Faculty of Agriculture, Kyushu University*, 56(1): 15 - 22.

Selvakumar D., Arun K., Suguna S., Kumar D., Dheendaran K. (2010). Bioactive potential of *Streptomyces* against fish and shellfish pathogens. *Iranian Journal of Microbiology*, 2(3): 157 - 164.

Shirling, E.B. and Gottlieb D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 16: 313 - 340.

Shirling, E.B. and Gottlieb D. (1968). Cooperative description of type cultures of streptomyces III. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 18: 279 - 392.

Watve M. G., Tickoo R., Jog M. M., Bhole B. D. (2001). How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Archives of Microbiology*, 176(5): 386 - 390.

You J. L., L. X. Cao, G. F. Liu, S. N. Zhou, H. M. Tan, Y. C. Lin. (2005). Isolation and characterization of actinomycetes antagonistic to pathogenic *Vibrio* spp. from nearshore marine sediment. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(5): 679 - 682.