

TỐI ƯU HÓA MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY CHO SINH TRƯỞNG VÀ ĐỐI KHÁNG VỚI *VIBRIO HARVEYI* V7 CỦA *STREPTOMYCES* SP. A1

NGÔ THỊ TƯỜNG CHÂU, NGUYỄN ĐOÀN LINH AN

Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

Trong số các dịch bệnh ở tôm nuôi tại Thừa Thiên Huế, bệnh do vi khuẩn, đặc biệt là *Vibrio* spp., chiếm một tỉ lệ lớn. Việc bổ sung kháng sinh vẫn là giải pháp được sử dụng phổ biến nhất, nhưng giải pháp này để lại nhiều nguy hại như tồn dư thuốc kháng sinh trong tôm thương phẩm, tạo ra những dòng vi khuẩn kháng kháng sinh nguy hiểm cho sức khỏe con người. Vì vậy, dùng chế phẩm sinh học được xem là giải pháp thay thế an toàn và hiệu quả. Đa số chế phẩm sinh học đang được sử dụng có nguồn gốc ngoại nhập, không rõ xuất xứ, tạo nguy cơ lan truyền các vi sinh vật ngoại lai, vi sinh vật biến đổi gen gây hại. Vì vậy việc tạo ra các chế phẩm sinh học sử dụng vi khuẩn bản địa là việc làm cấp thiết.

Chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. A1 được phân lập tại ao nuôi tôm ở Thừa Thiên Huế đã thể hiện khả năng đối kháng rất cao với *Vibrio harveyi* V7 gây bệnh trên tôm. Để tạo cơ sở khoa học cho việc sản xuất chế phẩm trợ sinh, chúng tôi tiến hành tối ưu hóa môi trường nuôi cấy *Streptomyces* sp. A1 cho khả năng sinh trưởng và đối kháng với *Vibrio harveyi* V7 theo phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM). Đây là một kỹ thuật mô hình hóa thống kê được áp dụng để phân tích đa hời quy, sử dụng dữ liệu định lượng thu được từ các thí nghiệm được thiết kế phù hợp để giải quyết đồng thời các phương trình đa biến. Kỹ thuật này đã được sử dụng để tạo ra các môi trường tối ưu cho sự sản xuất các bacteriocin, enzyme, kháng sinh, polysaccharide và các acid hữu cơ.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. A1 (Ngo Thi Tuong Chau et al., 2011), được nuôi cấy trên môi trường thạch- tinh bột- casein (SCA). Sinh khối được hòa trong dung dịch nước muối sinh lý (0,85% NaCl) và được sử dụng để làm dịch cấy. Tối ưu hóa môi trường nuôi cấy theo kiểu truyền thống (one-at-a-time), sử dụng các nguồn C (glucose, sucrose, maltose, lactose và tinh bột) và N (casein, urea, NH_4Cl , NH_4NO_3 và $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) làm nguồn C và N duy nhất trong môi trường tinh bột - casein dịch thể (SCB). Xác định nguồn C và N thích hợp nhất cho khả năng sinh trưởng và đối kháng với *Vibrio harveyi* V7 của *Streptomyces* sp. A1. Sau đó, khảo sát nồng độ giới hạn tối thiểu và tối đa của nguồn C, N và NaCl bổ sung vào môi trường SCB cho hoạt tính đối kháng với *Vibrio harveyi* V7 của *Streptomyces* sp. A1.

Nuôi cấy chủng xạ khuẩn trong các bình tam giác thể tích 250 ml với 100 ml môi trường với thành phần và nồng độ đã xác định. Các loại đường đã được khử trùng bằng phương pháp Tuyndan, pH được điều chỉnh đến 8,0. Cây dịch cấy vào môi trường để mật độ cuối cùng tương đương với chuẩn Mc Farland 0.5 (10^8 tế bào/ml). Nuôi cấy ở 30°C, trên máy lắc tại 120 vòng/phút. Ly tâm dịch nuôi cấy tại 6,000 vòng/phút trong 15 phút để thu dịch nổi sử dụng cho thử nghiệm đối kháng với *Vibrio harveyi* V7 bằng phương pháp khuếch tán trên môi trường thạch đĩa TCBS (HiMedia, India). Sinh khối *Streptomyces* sp. A1. được tách ra khỏi dịch nuôi cấy sau ly tâm bằng cách lọc qua giấy lọc, sấy khô đến khối lượng không đổi và cân để xác định khối lượng.

Thiết kế thí nghiệm và tối ưu hóa theo phương pháp bề mặt đáp ứng với kiểu tâm phức hợp: Các nồng độ giới hạn tối thiểu và tối đa của nguồn C, N và NaCl đã được xác định và một tập hợp gồm 20 thí nghiệm đã được đưa vào chương trình sử dụng phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM). Kiểu tâm phức (CCD) của RSM đã được sử dụng cho thí nghiệm tối ưu hóa sau cùng. Các thí nghiệm được thực hiện sử dụng phần mềm Design Expert version 7.0 (StatEase, USA). Sự xác định cuối cùng đã được tiến hành trong các bình lắc với các điều kiện đã được tiên đoán bởi mô hình.

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Tối ưu hóa môi trường nuôi cấy theo phương pháp truyền thống

1.1. Chọn lựa nguồn C thích hợp và khảo sát nồng độ giới hạn khả năng đối kháng

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của các nguồn C khác nhau đến sinh trưởng và đối kháng với *Vibrio harveyi* V7 của *Streptomyces* sp. A1 được trình bày ở Bảng 1 và 2. Nguồn C của môi trường nuôi cấy đã thể hiện ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng sinh trưởng và đối kháng với *Vibrio harveyi* V7 của *Streptomyces* sp. A1. Trong đó, tinh bột là nguồn C thích hợp nhất.

Bảng 1

Ảnh hưởng của nguồn C đến sinh trưởng của *Streptomyces* sp. A1

TT	Nguồn C	Sinh khối khô (g/100 mL)
1.	Glucose	0,118 ^c
2.	Maltose	0,207 ^b
3.	Lactose	0,062 ^d
4.	Saccharose	0,116 ^c
5.	Tinh bột	0,363 ^a

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác trung bình mẫu có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Bảng 2

Ảnh hưởng của nguồn C đến hoạt tính đối kháng với *Vibrio harveyi* V7

Nguồn C	Glucose	Maltose	Lactose	Saccharose	Tinh bột
Đối kháng	+	-	-	-	+

Ghi chú: + đối kháng và - không đối kháng với *Vibrio harveyi* V7 của *Streptomyces* sp. A1

Khảo sát nồng độ giới hạn của tinh bột cho khả năng đối kháng với *Vibrio harveyi* V7 theo các nồng độ tăng dần trong môi trường SCB cho kết quả nồng độ giới hạn tối đa và tối thiểu là 0.5 g/l và 33 g/l

1.2. Chọn lựa nguồn N thích hợp và khảo sát nồng độ giới hạn khả năng đối kháng

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của các nguồn N khác nhau đến sinh trưởng và đối kháng với *Vibrio harveyi* V7 của *Streptomyces* sp. A1 được trình bày ở Bảng 3 và 4. Nguồn cung cấp N cho môi trường nuôi cấy đã ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng sinh trưởng và đối kháng với *Vibrio harveyi* V7, trong đó casein là nguồn N thích hợp nhất.

Bảng 3

Ảnh hưởng của nguồn N đến sinh trưởng của *Streptomyces* sp. A1

TT	Nguồn carbon	Sinh khối khô (g/100 mL)
1.	Casein	1,235 ^a
2.	Urea	1,084 ^b
3.	NH ₄ Cl	1,097 ^b
4.	NH ₄ NO ₃	1,089 ^b
5.	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,823 ^c

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác trung bình mẫu có ý nghĩa thống kê $p < 0,05$.

Bảng 4

Ảnh hưởng của nguồn N đến hoạt tính đối kháng với *Vibrio harveyi* V7

Nguồn N	Casein	Urea	NH ₄ Cl	NH ₄ NO ₃	(NH ₄) ₂ SO ₄
Đối kháng	+	-	-	-	-

Ghi chú: + đối kháng và - không đối kháng với *Vibrio harveyi* V7 của *Streptomyces* sp. A1

Khảo sát nồng độ giới hạn của casein cho khả năng đối kháng với *Vibrio harveyi* V7 của *Streptomyces* sp. A1 theo các nồng độ tăng dần trong môi trường SCB cho thấy nồng độ giới hạn tối đa và tối thiểu là 0.001 g/l và 2,3 g/l Tương tự, chúng tôi cũng đã xác định được nồng độ giới hạn tối đa và tối thiểu của casein cho khả năng đối kháng với *Vibrio harveyi* V7 của *Streptomyces* sp. A1 tương ứng là 0 và 42 g/l

2. Tối ưu hóa môi trường nuôi cấy theo phương pháp bề mặt đáp ứng

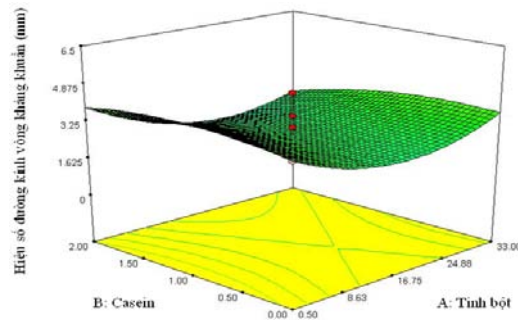
Phần mềm Design Expert version 7.0 (Statease, USA) đã thiết lập 20 lô thí nghiệm sau khi nhập các dữ liệu thu được ở trên. Kết quả tiến hành 20 lô thí nghiệm này được trình bày ở Bảng 5 và Hình 1, 2, 3.

Bảng 5

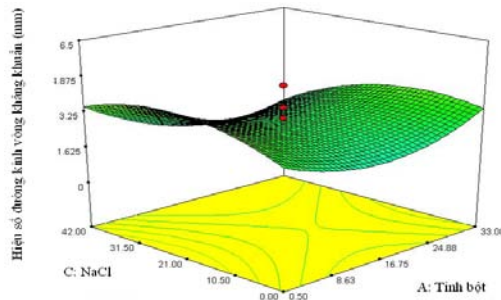
Các lô thí nghiệm được thiết kế theo phần mềm Design Expert version 7.0

TT	Tinh bột	Casein	NaCl	Sinh khối (g/l)		Hiệu số đường kính vòng kháng khuẩn (mm)	
				Thực tế	Lý thuyết	Thực tế	Lý thuyết
1.	0.5	0	0	0.923	0.67	3	3.7
2.	33	0	0	3.02	3.41	5	4.45
3.	0.5	2.3	0	1.16	1.54	3	1.76
4.	33	2.3	0	3.78	4.28	2	1.6
5.	0.5	0	42	0.98	1.75	2	2.12
6.	33	0	42	4.68	4.49	0	0.96
7.	0.5	2.3	42	2.11	2.63	4	4.17
8.	33	2.3	42	5.42	5.36	3	2.01
9.	0	1.15	21	1.15	0.72	6.5	6.51
10.	44.08	1.15	21	5.29	5.32	5	5.40
11.	16.75	0	21	2.40	2.29	3	2.08
12.	16.75	3.08	21	4.23	3.75	0	1.33
13.	16.75	1.15	0	2.18	2.11	0	0.7
14.	16.75	1.15	56.32	4.01	3.93	0	0
15.	16.75	1.15	21	3.57	3.02	1.5	2.82
16.	16.75	1.15	21	2.63	3.02	4.5	2.82
17.	16.75	1.15	21	3.66	3.02	3.5	2.82
18.	16.75	1.15	21	3.30	3.02	2.5	2.82
19.	16.75	1.15	21	3.54	3.02	3	2.82
20.	16.75	1.15	21	2.32	3.02	2	2.82

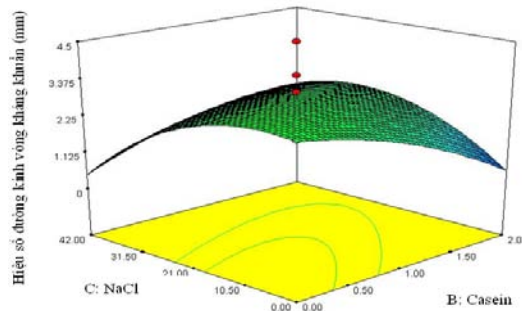
Từ các kết quả, thiết lập phương trình hồi quy bậc 2 như sau (A: tinh bột; B: casein và C: NaCl):
 (i) Sinh khối (g/L) = 2,99 + 1,3A + 0,45 B + 0,6C; (ii) Hiệu số đường kính vòng kháng khuẩn (mm) = 2,82 - 0,33A - 0,22B - 0,29C - 0,25A×B - 0,5A×C + 1B×C + 1,11 A² - 0,4 B² - 0,93C².



Hình 1: Tương quan giữa tinh bột- casein đến hoạt tính đối kháng *V. harveyi* V7



Hình 2: Tương quan giữa tinh bột - NaCl đến hoạt tính đối kháng *Vibrio harveyi* V7



Hình 3: Tương quan giữa casein- NaCl đến hoạt tính đối kháng *Vibrio harveyi* V7

3. Thiết kế lô thí nghiệm theo yêu cầu

Bảng 6

Các lô thí nghiệm và các giá trị sinh khối và đối kháng tương ứng đạt được

TT	Tinh bột	Casein	NaCl	Sinh khối (g/L)		Hiệu số đường kính vòng kháng khuẩn (mm)	
				Thực tế	Lý thuyết	Thực tế	Lý thuyết
A	33	0,94	17,34	4,3	4,21	8	3,78
B	33	2,3	42				
C	33	0	0,64				

Tiến hành thiết kế các lô thí nghiệm theo yêu cầu sinh trưởng và đối kháng cao nhất (lô A), sinh trưởng cao nhất (lô B) và đối kháng cao nhất (lô C) theo các dữ liệu đã đạt được. Do tối ưu hóa môi trường nuôi cấy *Streptomyces* sp. A1 như lô A sẽ cho sinh khối và hoạt tính đối kháng với *Vibrio harveyi* V7 là cao nhất, chúng tôi đã chọn lô A để tiến hành thực nghiệm. Kết quả được thể hiện ở Bảng 6.

III. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã cho thấy thiết kế kiểu tâm phức hợp của phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM) có thể tin cậy để tối ưu hóa môi trường nuôi cấy cho sản xuất các chế phẩm trợ sinh đối kháng với vi khuẩn gây bệnh sử dụng cho nuôi trồng thủy sản. Trong thành phần môi trường được khảo sát, tinh bột, casein và NaCl được xem là các yếu tố giới hạn, ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng sinh trưởng và đối kháng với *Vibrio harveyi* V7 của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. A1. Nồng độ tối ưu của các thành phần này cho sinh trưởng và hoạt tính đối kháng là 33 g/l tinh bột, 0.94 g/l casein và 17.34 g/l NaCl.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Adinarayana K., P. Ellaiah, B. Srinivasulu, R. Bhavani Devi, G. Adinarayana, 2003: *Process Biochem*, 38: 1565-1572.
2. Beg Q.K., V. Sahai, R. Gupta, 2003: *Process Biochem*, 39: 203-209.
3. Leal-Sanchez M.V., R. Jimenez-Diaz, A. Maldonado-Barragan, A. Garrido-Fernandez, J.L. Ruiz-Barba, 2002: *Appl Environ Microbiol*, 68: 4465-4471.
4. Ngo Thi Tuong Chau, Pham Huu Quang, Nguyen Xuan Hieu, 2010: *Journal of Biotechnology*, 8(3B): 1693-1700.
5. Ngo Thi Tuong Chau, Nguyen Xuan Hieu, Pham Thi Ngoc Lan, Masaru Matsumoto, Ikuo Miyajima, 2011: *J. Fac Agr. Kyushu Univ.*, 56(1): 15-22.
6. Preetha R., N.S. Jayaprakash, Rosamma Philip, L.S. Bright Singh, 2007: *Biotechnol Bioprocess Eng*, 12: 548-555.
7. Xiong C., C. Shouwen, S. Ming, Y. Ziniu, 2005: *Appl Microbiol Biotechnol*, 69: 390-396.
8. Wang Y.X., Z.X. Lu, 2004: *Biochem Eng. J.*, 20: 39-47.

Lời cảm ơn: Chúng tôi xin chân thành cảm ơn Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) đã tài trợ cho nghiên cứu này (mã số đề tài 106.03.59.09).

OPTIMIZATION OF MEDIUM FOR BIOMASS PRODUCTION AND ANTAGONISTIC ACTIVITY AGAINST *VIBRIO HARVEYI* V7 OF *STREPTOMYCES* SP. A1

NGO THI TUONG CHAU, NGUYEN DOAN LINH AN

SUMMARY

A marine isolation of *Streptomyces* sp. A1 has been identified as an aquaculture probiotic antagonistic to *Vibrio harveyi* V7. In the present study, different carbon and nitrogen sources and NaCl in a SCB base medium were optimized for enhanced biomass production and antagonistic activity against the target pathogen by using response surface methodology (RSM). Accordingly the minimum and maximum limits of the selected variables were determined and a set of twenty experiments was programmed by employing central composite design (CCD) of RSM for the final optimization. The response surface indicated a strong correlation between the biomass and antagonism. The optimum concentration of the carbon and nitrogen sources, and NaCl for both biomass and antagonistic activity were starch (33 g/L), casein (0.94 g/L) and NaCl (17.34 g/L).