

TỐI ƯU HÓA NGUỒN CARBON VÀ NITROGEN CHO SẢN XUẤT CHẾ PHẨM TRỢ SINH TỪ *Streptomyces* sp. A1 ĐỐI KHÁNG VỚI *Vibrio harveyi* V7 GÂY BỆNH TRÊN TÔM NUÔI Ở THỪA THIÊN HUẾ

NGÔ THỊ TƯỜNG CHÂU

Trường Đại học Khoa học tự nhiên,
Đại học Quốc gia Hà Nội

PHẠM THỊ NGỌC LAN

Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

Bệnh do *Vibrio* spp. (vibriosis) được xem là bệnh vi khuẩn có tính hệ thống ở tôm sú và tôm ấu trùng trong các trại sản xuất giống [1, 2]. Một số giải pháp nhằm kiểm soát các bệnh do *Vibrio* spp. gây ra trên tôm đã được đề nghị và áp dụng. Việc bổ sung những lượng đáng kể các loại thuốc kháng sinh và hóa chất vẫn là giải pháp được chọn lựa cho mục đích kiểm soát dịch bệnh do *Vibrio* spp. trong nuôi tôm. Tuy nhiên, khi sử dụng kháng sinh hay các hóa chất để diệt khuẩn, một số vi khuẩn mang gen kháng có thể sống sót, phát triển và chuyển khả năng kháng này sang thế hệ sau hay chuyển trực tiếp sang cơ thể khác của cùng loài. Từ đó, tạo ra các dòng vi khuẩn kháng nhiều loại kháng sinh rất nguy hiểm [3, 5]. Vì vậy, như là một giải pháp thay thế trong quản lý bệnh do *Vibrio* spp., việc ứng dụng các tác nhân kiểm soát sinh học, đặc biệt là các chế phẩm đối kháng đã được đề nghị [6].

Trên thực tế, chúng tôi đã phân lập được chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. A1 có khả năng đối kháng với *Vibrio* sp. V7 gây bệnh từ trầm tích ao nuôi tôm ở Thừa Thiên Huế [4]. Những kết quả đạt được trình bày trong bài báo này sẽ tạo cơ sở khoa học cho việc sản xuất chế phẩm trợ sinh ứng dụng vào thực tiễn nuôi tôm tại Thừa Thiên Huế.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

- **Xác định nguồn carbon (C) và nitrogen (N) tối ưu:** Bổ sung riêng biệt các nguồn C (tinh bột, glucose, maltose, lactose, saccharose với các nồng độ 8-13g/L) và N (casein, urea, NH₄Cl, NH₄NO₃ (NH₄)₂SO₄ với các nồng độ 0,1-0,6g/L) vào môi trường SCB (Starch Casein Broth) cơ sở đã được khử trùng ở 121°C, 15 phút bằng cách sử dụng màng lọc cellulose acetate có kích thước lỗ 0,22µm. Cây giống xạ khuẩn vào môi trường nuôi cấy đến mật độ cuối cùng đạt 10⁸ tế bào/ml. Nuôi cấy trên máy lắc ổn nhiệt tại 30°C, 120 vòng/phút, trong 4 ngày.

- **Xác định sinh khối:** Sinh khối tạo thành sau nuôi cấy được thu bằng cách lọc chân không. Sấy khô đến khối lượng không đổi. Cân khối lượng sinh khối.

- **Xác định hoạt tính đối kháng:** Cây trái 100µl dịch huyền phù vi khuẩn *Vibrio harveyi* V7 đã được tăng sinh 24 giờ trong môi trường peptone kiềm lên thạch đĩa chứa môi trường TCBS. Tạo giếng có đường kính 1cm trên bề mặt thạch đĩa. Nhỏ 100µl dịch nuôi cấy *Streptomyces* sp. A1 vào giếng. Đặt ở nhiệt độ 4°C trong 10-12 giờ để dịch được khuếch tán đều. Ủ các đĩa ở 35°C. Sau 24 giờ, đo đường kính vòng kháng khuẩn (nếu có).

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Khảo sát nguồn C tối ưu cho khả năng tạo sinh khối và hoạt tính đối kháng với *Vibrio harveyi* V7 của *Streptomyces* sp. A1. Kết quả cho thấy, với các nồng độ được khảo sát, tinh bột đã thể hiện là nguồn cung cấp C tối ưu nhất cho khả năng tạo sinh khối và hoạt tính đối kháng với *Vibrio* sp. V7 của *Streptomyces* sp. A1, tiếp đến là nguồn glucose và lactose. Riêng đối với nguồn C là maltose và saccharose, mặc dù sinh khối được tạo thành nhưng đã không thể hiện hoạt tính đối kháng với (bảng 1, 2). Vì vậy, tinh bột được chọn làm nguồn C cho nuôi cấy *Streptomyces* sp. A1.

Bảng 1

Ảnh hưởng của nguồn C và nồng độ đến khả năng tạo sinh khối (g/100 mL)

Nồng độ (g/L)	Glucose	Lactose	Maltose	Saccharose	Tinh bột
8	0,093 ^d	0,057 ^d	0,183 ^e	0,095 ^d	0,321 ^f
9	0,095 ^d	0,063 ^c	0,196 ^d	0,104 ^c	0,352 ^e
10	0,099 ^{dc}	0,066 ^c	0,198 ^d	0,119 ^b	0,385 ^d
11	0,121 ^{cb}	0,072 ^b	0,209 ^c	0,122 ^b	0,393 ^c
12	0,131 ^{ba}	0,075 ^{ba}	0,226 ^b	0,122 ^b	0,410 ^b
13	0,147 ^a	0,078 ^a	0,239 ^a	0,136 ^a	0,422 ^a

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

Bảng 2

Ảnh hưởng của nguồn C và nồng độ đến hoạt tính đối kháng (mm)

Nồng độ (g/L)	Glucose	Lactose	Maltose	Saccharose	Tinh bột
8	2,3 ^e	0,3 ^c	0	0	3,7 ^d
9	2,7 ^{de}	1,0 ^b	0	0	4,2 ^d
10	3,3 ^{cd}	1,2 ^b	0	0	4,7 ^d
11	4,0 ^{bc}	1,5 ^{ba}	0	0	5,7 ^c
12	4,7 ^{ab}	1,7 ^a	0	0	8,3 ^b
13	5,3 ^a	2,0 ^a	0	0	9,3 ^a

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

Khảo sát nguồn N tối ưu cho khả năng tạo sinh khối của *Streptomyces* sp. A1. Kết quả cho thấy, với các nồng độ được khảo sát, casein đã thể hiện là nguồn cung cấp N tối ưu nhất cho khả năng tạo sinh khối và hoạt tính đối kháng với *Vibrio harveyi* V7 (bảng 3, 4). Tiếp đến lần lượt là

các nguồn NH_4NO_3 , NH_4Cl , urea và $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Vì vậy, casein sẽ được chọn làm nguồn N cho nuôi cấy *Streptomyces* sp. A1.

Bảng 3

Ảnh hưởng của các nguồn N và nồng độ đến khả năng tạo sinh khối (g/100mL)

Nồng độ (g/L)	Casein	Urea	NH_4Cl	NH_4NO_3	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
0,1	0,143 ^e	0,122 ^c	0,121 ^d	0,122 ^d	0,125 ^e
0,2	0,234 ^d	0,189 ^b	0,216 ^b	0,183 ^b	0,179 ^{bc}
0,3	0,321 ^c	0,196 ^b	0,297 ^a	0,208 ^b	0,195 ^a
0,4	0,383 ^b	0,297 ^a	0,232 ^b	0,244 ^a	0,189 ^{ab}
0,5	0,388 ^b	0,190 ^b	0,184 ^c	0,198 ^b	0,175 ^c
0,6	0,419 ^a	0,182 ^b	0,166 ^c	0,151 ^c	0,162 ^d

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

Bảng 4.

Ảnh hưởng của các nguồn N và nồng độ của chúng đến hoạt tính đối kháng

Nồng độ (g/L)	Casein	Urea	NH_4Cl	NH_4NO_3	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
0,1	0,8 ^d	0,7 ^d	0,7 ^b	2,3 ^b	1 ^{cd}
0,2	3,7 ^c	1,5 ^{cd}	2 ^{ab}	2,3 ^b	2,7 ^{ab}
0,3	4,2 ^c	4,5 ^a	3 ^a	3,7 ^{ab}	3 ^a
0,4	4,7 ^{bc}	3,7 ^{ab}	1,7 ^{ab}	4,7 ^a	2 ^{abc}
0,5	5,3 ^{ab}	2,5 ^{bc}	1,7 ^{ab}	3,8 ^{ab}	1,5 ^{bcd}
0,6	6 ^a	0,7 ^d	0,7 ^b	2,2 ^b	0,3 ^d

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

III. KẾT LUẬN

Nguồn C và N trong môi trường SCB cơ sở đã ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng hình thành sinh khối và hoạt tính đối kháng với vi khuẩn *Vibrio harveyi* V7 gây bệnh trên tôm của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. A1. Hai nguồn C và N thích hợp nhất cho sự hình thành sinh khối và đối kháng với *Vibrio harveyi* V7 của *Streptomyces* sp. A1 tương ứng là tinh bột và casein. Trong đó, nồng độ tối ưu của tinh bột và casein tương ứng là 13g/L và 0,6g/L.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106.03-2011.59

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Abraham T.J., Manley R., Papanippan R., Dhevendran K.**, 1997. Pathogenicity and antibiotic sensitivity of luminous *Vibrio harveyi* isolated from diseased penaeid shrimp, *J. Aqua. Trop*, 12, pp.1-8.
2. **Karunasagar I., Pai R., Malahti G. R., Karunasagar I.**, 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection, *Aquaculture*, 128, pp. 203-209.
3. **Ngô Thị Tuông Châu, Phạm Hữu Quang, Nguyễn Xuân Hiếu**, 2010. Characterization of Vibrios isolated from infected shrimps in culture ponds of Thua Thien Hue province, *J. Biotechnology*, Vietnam, 8 (3B), pp. 1693-1700.
4. **Ngô Thị Tuông Châu, Nguyễn Xuân Hiếu, Lê Thị Nam Thuận, Masaru Matsumoto, Miyajima I**, 2011. Identification and characterization of actinomycetes antagonistic to pathogenic *Vibrio* spp. isolated from shrimp culture pond sediments in Thua Thien Hue-Viet Nam, *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.*, 56 (1), pp. 15-22.
5. **Tendencia E.A., De la Pena L.D.**, 2001. Antibiotic resistance of bacteria from shrimp ponds, *Aquaculture*, 195, pp. 193-204.
6. **Verschuere L., Rombaut G., Sorgeloos P., Verstraete W.**, 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture, *Microbiol. Mol. Bio. Reviews*, 64, pp. 655- 671.

OPTIMIZATION OF CARBON AND NITROGEN SOURCES FOR THE PRODUCTION OF PROBIOTICS FROM *Streptomyces* sp. A1 ANTAGONISTIC TO *Vibrio harveyi* V7 PATHOGENIC FOR SHRIMP CULTURED IN THUA THIEN HUE PROVINCE

NGO THI TUONG CHAU, PHAM THI NGOC LAN

SUMMARY

A strain, *Streptomyces* sp. A1 isolated from shrimp pond sediments has been identified as an aquaculture probiotic antagonistic to pathogenic *Vibrio harveyi* V7. In the present study, the different carbon and nitrogen sources in a mineral base of SCB were investigated for the biomass production and antagonistic activity to *Vibrio harveyi* V7 of *Streptomyces* sp. A1. The results show that optimal carbon and nitrogen sources for biomass production and antagonistic activity to *Vibrio harveyi* V7 of *Streptomyces* sp. A1 are starch and casein, respectively. The optimal concentrations of starch and casein are 13g/L and 0,6g/L respectively.