

PHÂN LẬP VÀ ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN CỦA XẠ KHUẨN NỘI CỘNG SINH TRÊN CÂY MÀNG TANG (*Litsea cubeba*) ĐỐI VỚI VI KHUẨN GÂY BỆNH TRÊN CÁ CHÉP VÀ RÔ PHI

Trịnh Thị Trang^{1*}, Kim Văn Vạn¹, Trương Đình Hoài¹,
Nguyễn Thanh Hải², Nguyễn Văn Giang², Nguyễn Ngọc Tuấn¹

¹Khoa Thủy sản, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

²Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Email*: tttrang@vnua.edu.vn

Ngày gửi bài: 02.11.2016

Ngày chấp nhận: 28.12.2016

TÓM TẮT

Rô phi và cá chép, hai đối tượng thủy sản nuôi chính có năng suất cao ở miền Bắc Việt Nam đang phải đối mặt với các bệnh truyền nhiễm do vi khuẩn gây ra. Việc sử dụng kháng sinh không đúng cách có thể dẫn tới nguy cơ kháng kháng sinh. Chính vì vậy, để hạn chế hiện tượng kháng kháng sinh xảy ra, việc tìm các hợp chất sinh học có khả năng kháng khuẩn là cần thiết. Mục đích của nghiên cứu này là phân lập và tuyển chọn các chủng xạ khuẩn trên cây Màng tang (*Litsea cubeba*) có khả năng đối kháng với các chủng vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* GL14; *Aeromonas caviae* HD60 và *S. agalactiae* HY10 gây bệnh trên các đối tượng cá trên. Kết quả cho thấy, trong tổng số 32 chủng xạ khuẩn được phân lập từ cây màng tang thì có 9 chủng (28,2%) có khả năng đối kháng với ít nhất 1 chủng vi khuẩn. Ba chủng MTR711, MTR622 và MTL121 có tính kháng khuẩn lớn nhất với nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) dao động từ 93,3 - 300,0 µl/mL, trong đó chủng MTR711 và MTR622 cho giá trị MIC thấp nhất và không sai khác với nhau về mặt thống kê. Khi kết hợp từng cặp xạ khuẩn, cặp MTR711 - MTR622 có khả năng cộng hưởng với giá trị $\Sigma FIC \leq 0,5$, nâng cao hiệu quả diệt khuẩn lên ít nhất 4 lần so với sử dụng đơn lẻ. Kết quả nghiên cứu xạ khuẩn nội cộng sinh trên cây màng tang là tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo về các hợp chất kháng khuẩn sinh học ứng dụng điều trị bệnh nhiễm khuẩn trên các đối tượng thủy sản.

Từ khóa: Màng tang, xạ khuẩn, *Aeromonas*, cá chép, rô phi.

Isolation and Evaluation of Antibiotic Activity of Endophytic Actinobacteria on May Chang Tree (*Litsea cubeba*) against Pathogenic Bacteria Causing Diseases on Common Carp and Tilapia

ABSTRACT

Tilapia and common carp are two main cultured species with high annual production in freshwater aquaculture in northern Vietnam. However, there are serious problems caused by bacterial infection. The use of antibiotics is not sufficient to mitigate outbreaks of the diseases due to antibiotic resistance of the causal agents. Therefore, antimicrobial compounds are potential as a new approach to overcome the challenges of antibiotic resistance. The aim of this study is to isolate and evaluate antibiotic activity of endophytic actinobacteria from May Chang tree (*Litsea cubeba*) against three pathogenic bacterial species *Aeromonas hydrophila* GL14, *Aeromonas caviae* HD60 và *S. agalactiae* HY10. The results showed that 9/32 (28,2%) endophytic actinobacteria isolates could inhibit at least one target pathogenic bacteria. Three isolates MTR711, MTR622 and MTL121 showed the highest antibacterial response with minimum inhibitory concentration (MIC) ranged from 93,3 to 300,0 µl/mL, amongst these the lowest value is for MTR711 and MTR622 without significant difference. When combining three individual actinobacteria mentioned above for fractional inhibitory concentration (FIC) test, the synergistic effect was found for the pair of MTR711-MTR622 against three pathogenic bacteria chosen in this study with $\Sigma FIC \leq 0,5$. The combination of two actinobacteria MTR711 and MTR622 improved bacterial inhibitory effect at least 4 times compared to individual treatment. The results are motivating enough to conduct further studies on use of endophytic actinobacteria for treating pathogenic bacteria in aquatic animals.

Keywords: May Chang, actinobacteria, *Aeromonas*, common carp, tilapia.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ở nước ta, với địa hình và môi trường thuận lợi, ngành thủy sản đang ngày càng phát triển mạnh trong những năm qua. Trong đó, cá nước ngọt vẫn đóng vai trò chủ đạo với tốc độ nuôi không ngừng, góp phần lớn nâng cao sản lượng xuất khẩu và tiêu thụ nội địa của sản phẩm thủy sản (Nguyễn Văn Hảo và Ngô Sỹ Vân, 2001). Tuy nhiên, song song với việc mở rộng diện tích và nâng cao mức độ thâm canh hóa, ngành nuôi trồng thủy sản đang đối mặt với những vấn đề nghiêm trọng như ô nhiễm môi trường và bùng phát dịch bệnh. Nhiều nghiên cứu cho thấy tác hại của việc lạm dụng kháng sinh đã dẫn tới hiện tượng “nhờn thuốc” và chính vì thế nhiều quốc gia trên thế giới đã ban hành quy định cấm và hạn chế nhiều loại kháng sinh trong nuôi trồng thủy sản (Cabello, 2006).

Việc sử dụng các sản phẩm có nguồn gốc thực vật để thay thế kháng sinh đang được quan tâm nhiều cho cả con người và vật nuôi nhằm hạn chế hiện tượng kháng kháng sinh. Rất nhiều loại cây thảo được chứa các hợp chất kháng khuẩn như tannin, phenol, citral, quinon (Reverter *et al.*, 2014). Đã có nhiều nghiên cứu chứng minh rằng, khả năng kháng khuẩn của các cây thảo được có liên quan tới các chủng xạ khuẩn có lợi, sống nội cộng sinh trong cây, do chúng có khả năng tổng hợp các hợp chất sinh học có khả năng diệt khuẩn mạnh và an toàn với con người. Chính vì vậy, việc tuyển chọn các chủng xạ khuẩn tiềm năng từ các cây thảo được là một hướng đi nhiều triển vọng (Wang and Liu, 2010).

Cây màng tang (*Litsea cubeba*) là một loại cây thảo được phân bố ở các nước Châu Á, trong đó có Việt Nam, chúng chứa nhiều thành phần kháng khuẩn (Anil *et al.*, 2012). Mặc dù tinh dầu màng tang được sử dụng nhiều trong cuộc sống nhưng chưa có nghiên cứu nào chứng minh sự tồn tại của các chủng xạ khuẩn nội cộng sinh trên cây màng tang và khả năng kháng khuẩn của chúng đối với các chủng vi khuẩn gây bệnh trên động vật thủy sản. Do đó, nhóm nghiên cứu đã tập trung phân lập và đánh giá khả năng kháng vi khuẩn *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae* và *Streptococcus agalactiae* gây bệnh trên cá chép và cá rô phi của các chủng xạ

khuẩn nội cộng sinh trên cây màng tang để làm tiền đề góp phần giảm thiểu dịch bệnh trên cá chép, cá rô phi nói riêng và động vật thủy sản nói chung.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

2.1.1. Vi khuẩn thí nghiệm

Vi khuẩn *A. hydrophila* GL14; *A. caviae* HD60 gây bệnh xuất huyết, đốm đỏ trên cá chép và *S. agalactiae* HY10 gây bệnh lở loét trên cá rô phi được cung cấp từ bộ môn Môi trường và Bệnh thủy sản - Khoa Thủy sản - Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

2.1.2. Môi trường nuôi cấy

Môi trường sử dụng cơ bản là Nutrient Agar (NA) và Nutrient Broth (NB) do nhà sản xuất Merck cung cấp được hấp ở nhiệt độ 121°C trong 15 phút. Môi trường Gause I (g/l): Tinh bột tan - 20; K_2HPO_4 - 0,5; $MgSO_4 \cdot H_2O$ - 0,5; NaCl - 0,5; KNO_3 - 0,5; $FeSO_4$ - 0,01; pH = 7 - 7,4. Môi trường lên men A4 - H (g/l): Glucoza - 15; bột đậu tương - 15; NaCl - 5; $CaCO_3$ - 1; H_2O - 1 lít; pH = 7 - 7,4.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập xạ khuẩn

Mẫu thân, lá, rễ cây màng tang không bị sâu bệnh được thu hái ở khu vực phía Bắc Việt Nam tại các tỉnh Yên Bái, Sơn La, Hà Tây, Ninh Bình. Mẫu sau khi thu hái về được khử trùng bề mặt theo quy trình của Justin and Christopher (2003). Sau khi xử lý, cấy mẫu trên môi trường Gause I có bổ sung kháng sinh nalidixic acid (25 mg/l), nystatin (50 mg/l) và $K_2Cr_2O_7$ (50 mg/l) để ức chế sự phát triển của vi khuẩn gram âm và nấm. Mẫu được nuôi cấy trong 4 ngày ở nhiệt độ 30°C, sau đó chọn lọc các chủng xạ khuẩn và nuôi cấy thuần trước khi được sử dụng để khảo sát tính đối kháng với vi khuẩn gây bệnh cho đối tượng thủy sản. Các chủng xạ khuẩn được phân loại cơ bản theo màu sắc của hệ sợi khí sinh được xác định dựa vào bảng màu của Tresner và Backus (1963).

2.2.2. Khảo sát khả năng kháng khuẩn của xạ khuẩn nội cộng sinh

Các chủng xạ khuẩn nội cộng sinh sau khi phân lập từ cây Màng tang được sử dụng để khảo sát khả năng đối kháng với các chủng vi khuẩn gây bệnh *A. hydrophila* GL14, *A. caviae* HD60 và *S. agalactiae* HY10 bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch (Dhanasekaran *et al.*, 2012). Các chủng xạ khuẩn khảo sát nuôi trong môi trường Gause I lỏng, lắc 200 vòng/phút ở 30°C và được thu sau 7 ngày nuôi cấy. Vi khuẩn gây bệnh được nuôi trong môi trường NB lỏng ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 24 h sau đó điều chỉnh về mật độ 10⁸ CFU/mL bằng phương pháp đo độ đục huyền phù ở bước sóng 600 nm và kiểm tra lại bằng phương pháp đếm khuẩn lạc trên bề mặt thạch. Cấy chang 50 µl vi khuẩn trên đĩa petri chứa môi trường NA, sau đó đặt 4 đĩa giấy vô trùng (6 mm) lên trên mặt thạch. 50 µl dịch xạ khuẩn sau khi li tâm tốc độ 6000 vòng/phút trong 10 phút được nhỏ lên trên đĩa giấy. Mẫu được nuôi cấy trong điều kiện 30°C, 4 ngày trước khi đọc kết quả.

2.2.3. Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của xạ khuẩn nội cộng sinh đơn lẻ

Các chủng xạ khuẩn nội cộng sinh có vòng kháng khuẩn lớn được chọn lọc để xác định nồng độ ức chế tối thiểu (Minimum Inhibitory Concentration - MIC) của từng chủng. Các chủng xạ khuẩn được nuôi lắc 200 vòng/phút trong môi trường lên men A4 - H lỏng ở 30°C. Sau 7 ngày nuôi cấy, dịch nuôi xạ khuẩn được tách chiết bằng cách li tâm tốc độ 6.000

vòng/phút trong 10 phút và đem đi cô quay chân không để loại bỏ hoàn toàn dung môi. Sau khi được cân khối lượng, cao khô dịch xạ khuẩn được pha trong DMSO tạo dung dịch gốc 100 mg/ml, từ đó pha loãng thành các nồng độ khác nhau. Thí nghiệm được thực hiện trên đĩa 96 giếng với mỗi giếng có chứa 270 µL dịch khuẩn nuôi trong môi trường NB với mật độ 10⁶ CFU/mL và 30 µL dịch xạ khuẩn theo các nồng độ khác nhau. Đối chứng âm (môi trường NB) và đối chứng dương (NB và vi khuẩn) cũng được chuẩn bị để kiểm chứng độ chuẩn xác của thí nghiệm. Mẫu được giữ trong điều kiện 30°C trong 24 h trước khi kết quả được đọc trên máy ELISA với bước sóng 600 nm. Giá trị nồng độ ức chế tối thiểu được định nghĩa là tại nồng độ đó vi khuẩn ức chế không có khả năng phát triển. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần và kết quả được xử lý trên phần mềm SPSS 20.

2.2.4. Xác định tương tác các chủng xạ khuẩn nội cộng sinh (ΣFIC)

Từ giá trị MIC đã xác định được, khả năng tương tác của các chủng xạ khuẩn nội cộng sinh với nhau được đánh giá thông qua chỉ số tổng nồng độ ức chế phân đoạn - ΣFIC (Fractional Inhibitory Concentration) theo phương pháp của Gutierrez *et al.* (2009). Thí nghiệm được thực hiện trên đĩa 96 giếng với mỗi giếng chứa 270 µL dịch khuẩn nuôi trong môi trường NB với mật độ 10⁶ CFU/mL và 15 µL dịch xạ khuẩn 1 kết hợp với 15 µL dịch xạ khuẩn 2 theo trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Bảng phối hợp các nồng độ khác nhau của các loại xạ khuẩn

ΣFIC		Xạ khuẩn 1						
		2 MIC	1,5 MIC	1 MIC	1/2 MIC	1/4 MIC	1/8 MIC	1/16 MIC
Xạ khuẩn 2	2 MIC	4,00	3,50	3,00	2,50	2,25	2,13	2,06
	1,5 MIC	3,5	3,00	2,50	2,00	1,75	1,63	1,56
	1 MIC	3,00	2,50	2,00	1,50	1,25	1,13	1,06
	1/2 MIC	2,50	2,00	1,50	1,00	0,75	0,63	0,56
	1/4 MIC	2,25	1,75	1,25	0,75	0,50	0,38	0,31
	1/8 MIC	2,13	1,63	1,13	0,63	0,38	0,25	0,19
	1/16 MIC	2,06	1,56	1,06	0,56	0,31	0,19	0,13

Giá trị ΣFIC được xác định là tổng nồng độ nhỏ nhất của 2 loại xạ khuẩn kết hợp với nhau có khả năng ức chế hoàn toàn sự phát triển của vi khuẩn gây bệnh với $\Sigma FIC = FIC_{\text{xạ khuẩn 1}} + FIC_{\text{xạ khuẩn 2}}$; trong đó $FIC_{\text{xạ khuẩn}} = MIC_{\text{kết hợp}}/MIC_{\text{đơn lẻ}}$. Từ giá trị ΣFIC được xác định, khả năng tương tác giữa các chủng xạ khuẩn sẽ được đánh giá như sau: tương tác cộng hưởng khi $\Sigma FIC \leq 0,5$; tương tác bổ sung khi $0,5 > \Sigma FIC \leq 1$; không tương tác khi $1 > \Sigma FIC \leq 4$; tương tác đối kháng khi $\Sigma FIC > 4$.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập xạ khuẩn từ mẫu cây màng tang

Từ các cây màng tang thu tại 7 tỉnh ở khu vực phía Bắc, 32 chủng xạ khuẩn đã được phân lập và làm thuần (Bảng 2). Dựa theo bảng màu của Tresner và Backus (1963) và màu sắc của hệ sợi khí sinh, các chủng xạ khuẩn được chia thành 4 nhóm màu là trắng, xám, hồng và nâu. Trong tổng số 32 chủng xạ khuẩn được phân lập, nhóm màu trắng chiếm số lượng lớn nhất với 13 chủng, tiếp theo là nhóm màu nâu (9 chủng) và nhóm hồng là ít nhất. Việc phân lập các chủng xạ khuẩn nội cộng sinh từ các loài cây thảo được khác cũng được nhiều nhóm nghiên cứu tiến hành. Điển hình như nghiên cứu của Gangwar *et al.* (2011) đã phân lập được 40 chủng xạ khuẩn nội cộng sinh được phân lập từ các cây thảo được lô hội (*Aloe vera*), bạc hà (*Metha sp.*) và hương nhu tía (*Ocimum sanctum*).

3.2. Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của các chủng xạ khuẩn phân lập

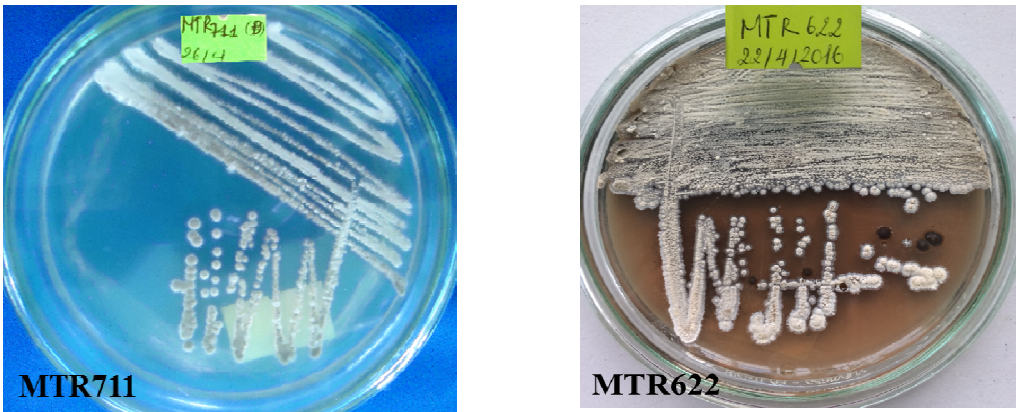
Để tuyển chọn ra các chủng xạ khuẩn từ cây màng tang có hoạt tính kháng khuẩn cao, 32 chủng đã phân lập được khảo sát trên 3 chủng vi khuẩn gây bệnh cho cá chép và cá rô phi là *A. hydrophila* GL14; *A. caviae* HD60; *S. agalactiae* HY10 và kết quả trình bày bảng 2 và 3. Từ 32 chủng xạ khuẩn phân lập được chỉ có 9 chủng thể hiện hoạt tính kháng khuẩn (28,2%), trong đó 4 chủng thuộc nhóm trắng và 1 chủng thuộc nhóm hồng (Bảng 2). Tuy nhiên, khả năng kháng khuẩn của xạ khuẩn có sự biến động giữa 9 chủng xạ khuẩn và giữa các chủng vi khuẩn gây bệnh. Kết quả ở bảng 3 cho thấy, hai chủng xạ khuẩn MTR711 và MTR622 cho vòng kháng khuẩn dao động từ 22,6 - 29,2 mm đối với cả 3 chủng vi khuẩn gây bệnh. Tiếp sau đó, chủng MTL121 có vòng kháng khuẩn dao động từ 10,9 - 15,4 mm. Mặc dù 6 chủng xạ khuẩn còn lại cũng thể hiện khả năng kháng khuẩn nhưng vòng vô khuẩn nhỏ hoặc không ổn định. Chính vì vậy, chỉ có 3 chủng MTR711; MTR622 và MTL121 được lựa chọn để nghiên cứu tiếp theo.

Trong tự nhiên, có rất nhiều chủng xạ khuẩn có khả năng sản sinh chất kháng khuẩn để ức chế sự phát triển của các vi sinh vật gây bệnh như nấm, vi khuẩn, chính vì vậy chúng được sử dụng làm nguồn nguyên liệu để tách chiết, tổng hợp các loại thuốc và hóa chất để điều trị bệnh cho vật nuôi và con người. Nhiều kết quả nghiên cứu trên thế giới đã chứng minh khả năng kháng vi sinh vật của các xạ khuẩn nội cộng sinh. Theo Zhao *et al.* (2012), khi phân lập 560 chủng xạ khuẩn từ 26 cây được liệu tại cao nguyên Panxi, Trung Quốc thì có 60 chủng thể hiện hoạt tính kháng ít nhất một loại vi sinh vật kiểm định (chiếm 10,7%). Tương tự, Li *et al.* (2008) đã phân lập được 41 chủng xạ khuẩn nội

Bảng 2. Xạ khuẩn có hoạt tính kháng khuẩn theo nhóm màu

Nhóm màu xạ khuẩn	Số chủng	Tỉ lệ (%)	Các chủng có hoạt tính kháng khuẩn (HTKK)	
			Số lượng	Tỉ lệ (%)
Trắng (Albus)	13	40,6	4	12,5
Xám (Griseus)	8	25	2	6,3
Hồng (Roseus)	3	9,3	1	3,1
Nâu (Chromogenes)	9	28,1	2	6,3
Tổng số	32	100	9	28,2

Phân lập và đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của xạ khuẩn nội cộng sinh trên cây màng tang (*Litsea cubeba*) đối với vi khuẩn gây bệnh trên cá chép và rô phi

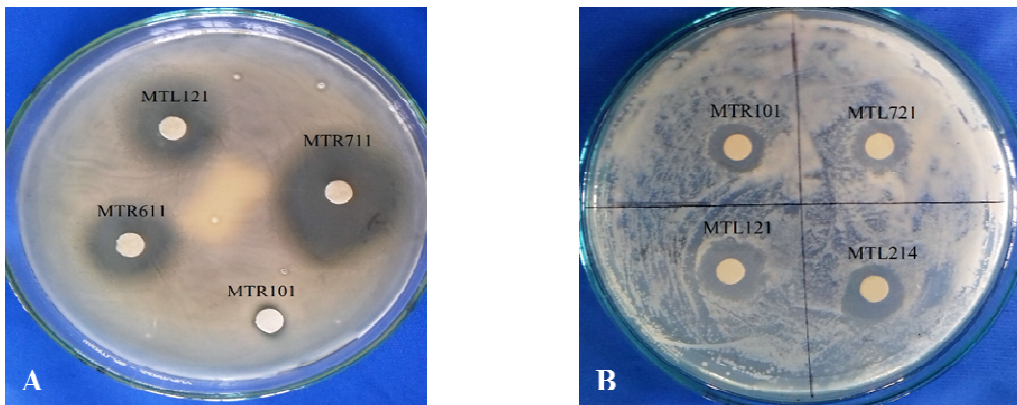


Hình 1. Hình ảnh khuẩn lạc xạ khuẩn trên môi trường Gause 1 của chủng MTR711 và MTR622

Bảng 3. Hoạt tính kháng khuẩn của các chủng vi khuẩn nội cộng sinh trên cây màng tang

Chủng xạ khuẩn	Vòng kháng khuẩn (mm)		
	<i>A. hydrophila</i> GL14	<i>A. caviae</i> HD60	<i>S. agalactiae</i> HY10
MTR711	23,6 ± 2,5	22,6 ± 0,9	29,2 ± 1,3
MTL721	6,5 ± 0,8	5,2 ± 1,3	7,8 ± 1,9
MTL214	4,3 ± 1,4	6,3 ± 2,3	8,3 ± 1,3
MTR622	23,0 ± 2,1	25,6 ± 0,9	26,2 ± 0,8
MTT723	0	0	7,1 ± 1,0
MTL121	15,4 ± 0,7	12,5 ± 0,9	10,9 ± 0,5
MTR611	12,2 ± 1,8	1,8 ± 1,3	1,6 ± 1,6
MTR101	0	0	7,5 ± 0,8
MTT112	5,4 ± 3,3	4,0 ± 4,2	0

Ghi chú: (0) Không có tính kháng khuẩn



Hình 2. Vòng kháng khuẩn của các chủng xạ khuẩn đối với vi khuẩn cộng sinh thuộc chi *Streptomyces* và trong đó có (A) *A. hydrophila* GL14; (B) *S. agalactiae* HY10

cộng sinh thuộc chi *Streptomyces* và trong đó có 65,9% chủng có hoạt tính kháng *E. coli*; 24,4% kháng *Staphylococcus aureus*. Cho đến nay đã có nhiều nghiên cứu về hoạt tính kháng khuẩn

của xạ khuẩn trên người, riêng đối với động vật thủy sản thì lĩnh vực này vẫn còn hạn chế.

3.3. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của xạ khuẩn nội cộng sinh trên cây màng tang

Từ kết quả nghiên cứu trên, ba chủng xạ khuẩn nội cộng sinh trên cây màng tang có vòng kháng khuẩn lớn được chọn để xác định nồng độ ức chế tối thiểu MIC với các chủng vi khuẩn gây bệnh. Kết quả thể hiện ở bảng 4 cho thấy, khi thử nghiệm đơn lẻ chủng MTR711 và MTR622 cho giá trị MIC không khác nhau về ý nghĩa thống kê đối với 2 chủng *A. hydrophila* GL14 và *A. caviae* HD60, nhưng có sự sai khác có ý nghĩa đối với *S. agalactiae* HY10. Chủng MTL121 cho kết quả MIC cao nhất dao động trong khoảng 240 - 300 µl/mL. Kết quả chứng tỏ khả năng diệt khuẩn của 2 chủng MTR711 và MTR622 cao hơn so với chủng MTL121. Kết quả này phù hợp với công bố của Nguyen *et al.* (2016) khi nghiên cứu khả năng kháng khuẩn của chủng xạ khuẩn phân lập từ cây màng tang

trên các chủng vi khuẩn gây bệnh ở người (giá trị MIC biến thiên trong khoảng 50 - 333 µl/mL).

3.4. Tính tương tác của các chủng xạ khuẩn nội cộng sinh

Kết quả nghiên cứu tương tác về tính kháng khuẩn của 3 chủng xạ khuẩn MTR711, MTR622, MTL121 đối với các chủng vi khuẩn gây bệnh trên cá được thể hiện ở bảng 5. Cặp xạ khuẩn MTR711 và MTR622 có tính tương tác với nhau với $\Sigma FIC \leq 0,5$ đối với cả 3 chủng vi khuẩn gây bệnh. Bên cạnh đó, khi chủng MTR711 kết hợp với chủng MTL121 có tác dụng bổ sung với nhau khi giá trị ΣFIC dao động trong khoảng 0,5 - 1,0. Sự kết hợp 2 chủng MTR622 và MTL121 không có khả năng tương tác với nhau khi $\Sigma FIC > 1,0$. Vì vậy, có thể kết luận rằng, chỉ có cặp MTR711 - MTR622 là có khả năng tương tác do hiệu quả kháng khuẩn khi kết hợp cao hơn ít nhất 4 lần so với khi sử dụng đơn lẻ.

Bảng 4. Nồng độ ức chế tối thiểu của xạ khuẩn nội cộng sinh trên cây màng tang

Các chủng xạ khuẩn	Nồng độ ức chế tối thiểu tối thiểu (MIC) (µl/mL)		
	<i>A. hydrophila</i> GL14	<i>A. caviae</i> HD60	<i>S. agalactiae</i> HY10
MTR711	126,7 ^a ± 3,3	126,7 ^a ± 8,8	93,3 ^a ± 3,3
MTR622	143,3 ^a ± 3,3	100,0 ^a ± 5,7	130,0 ^b ± 5,7
MTL121	240,0 ^b ± 5,7	283,3 ^b ± 6,7	300,0 ^c ± 10,0

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sai khác có ý nghĩa thống kê theo phép thử Turkey ($p \leq 0,05$).

Bảng 5. Kết quả tính tương tác của các chủng xạ khuẩn nội cộng sinh

Cặp xạ khuẩn	Vi khuẩn gây bệnh	Tổng nồng độ ức chế phân đoạn (ΣFIC)	Tính tương tác
MTR711 - MTR622	<i>A. hydrophila</i>	0,3	Cộng hưởng
	<i>A. caviae</i>	0,5	Cộng hưởng
	<i>A. agalactiae</i>	0,5	Cộng hưởng
MTR711 - MTL121	<i>A. hydrophila</i>	0,7	Bổ sung
	<i>A. caviae</i>	1,0	Bổ sung
	<i>A. agalactiae</i>	1,0	Bổ sung
MTR622 - MTL121	<i>A. hydrophila</i>	1,6	Không tương tác
	<i>A. caviae</i>	1,1	Không tương tác
	<i>A. agalactiae</i>	1,8	Không tương tác

Ghi chú: *tương tác cộng hưởng khi $\Sigma FIC \leq 0,5$; tương tác bổ sung khi $0,5 > \Sigma FIC \leq 1$; không tương tác khi $1 > \Sigma FIC \leq 4$; tương tác đối kháng khi $\Sigma FIC > 4$

Việc kết hợp các nhóm có tính kháng khuẩn để kiểm tra khả năng tương tác của chúng cũng được nghiên cứu bởi một số tác giả khác. Nghiên cứu kết hợp tinh dầu tỏi và 2 kháng sinh thuộc nhóm β - lactam là cefazolin và oxacillin cũng có khả năng cộng hưởng nhau (Cai *et al.*, 2007). Giá trị MIC của tinh dầu tỏi đơn lẻ là 512 $\mu\text{g/mL}$, khi kết hợp tinh dầu tỏi với kháng sinh thì giá trị $\Sigma\text{FIC}_{\min}$ của cefazolin là 0,5 ($1/4\text{MIC}_{\text{tinh dầu}}$ và $1/4\text{MIC}_{\text{cefazolin}}$), $\Sigma\text{FIC}_{\min}$ của oxacillin là 0,375 ($1/8\text{MIC}_{\text{tinh dầu}}$ và $1/4\text{MIC}_{\text{oxacillin}}$). Không chỉ tương tác của tinh dầu và kháng sinh được nghiên cứu, tương tác của kháng sinh và kháng sinh cũng được quan tâm. Theo báo cáo của Zafar *et al.* (2013), kháng sinh Amoxiillin và Cefadroxil có tương tác cộng hưởng đối kháng với 47 chủng *Staphylococcus aureus* với giá trị $\Sigma\text{FIC}_{\min}$ dao động 0,14 - 0,5, trong khi đó Streptomycin và Cefadroxil tương tác cộng hưởng đối kháng với 44 chủng *S. aureus* với giá trị $\Sigma\text{FIC}_{\min}$ dao động 0,03 - 0,5. Tương tự, Nguyen *et al.* (2016) nghiên cứu tương tác tinh dầu màng tang và xạ khuẩn nội cộng sinh cho kết quả có sự cộng hưởng của tinh dầu màng tang và chủng xạ khuẩn MPT28 đối với 4 chủng vi khuẩn gây bệnh trên người.

4. KẾT LUẬN

Có 9 chủng trong tổng số 32 chủng xạ khuẩn nội cộng sinh trên cây màng tang thể hiện khả năng đối kháng với 3 chủng vi khuẩn gây bệnh *A. hydrophila* GL14, *A. caviae* HD60 và *S. agalactiae* HY10 gây bệnh trên cá chép và cá rô phi. Ba chủng MTR711, MTR622 và MTL121 có vòng kháng khuẩn lớn nhất dao động từ 10,9 - 29,2 mm.

Nồng độ ức chế tối thiểu của 2 chủng MTR711 và MTR622 cho kết quả không khác nhau về mặt ý nghĩa thống kê trong khoảng 93,3 - 143,3 $\mu\text{g/mL}$ đối với cả 3 chủng vi khuẩn gây bệnh trên đối tượng thủy sản.

Chủng xạ khuẩn MTR711 và MTR622 có tính tương tác với nhau làm tăng hiệu quả kháng khuẩn lên ít nhất 4 lần so với sử dụng đơn lẻ, trong khi đó 2 chủng này kết hợp với chủng MTL121 không có tính tương tác.

LỜI CẢM ƠN

Các nội dung nghiên cứu trong bài cáo được thực hiện từ nguồn kinh phí của đề tài “Study on the prevention of bacterial infectious diseases for common carp and tilapia from May Chang (*Litsea cubeba*) and metabolites of endophytic actinobacteria” mã số 03VB2016 do Dự án Việt - Bỉ cấp kinh phí.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Anil K.S., Dipak C., Manuela D.A., Antonella S., Tonia S. and Giuseppe R. (2013). Screening of fruit and leaf essential oils of *Litsea cubeba* Pers. from north - east India - chemical composition and antimicrobial activity. *Journal of Essential Oil Research*, 25(4): 330 - 338.
- Cabello F.C. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ. Microbiol.*, 8: 1137 - 1144.
- Cai Y., Wang R., Pei F. and Liang B. (2007). Antibacterial activity of Allicin alone and in combination with β - lactams against *Staphylococcus* spp. and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antibiot.*, 60: 335 - 338.
- Dhanasekaran D., Thajuddin N. and Panneerselvam A. (2012). Applications of Actinobacterial Fungicides in Agriculture and Medicine. *Fungicides for Plant and Animal Diseases*, pp. 1 - 27
- Gangwar M., Dogra S. and Sharma N. (2011). Antagonistic bioactivity of endophytic actinomycetes isolated from medicinal plants. *JALRP.*, 2(4): 154 - 157.
- Gutierrez J., Barry - Ryan C., and Bourke P. (2009). Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. *Food Microbiol.*, 26(2): 142 - 150.
- Justin T.C. and Christopher M.M.F. (2003). Isolation and Identification of Actinobacteria from Surface - Sterilized Wheat Roots. *Applied and environmental microbiology*, 69(9): 603 - 5608.
- Zhao K., Petri P., Qiang C., Tongwei G., Kristina L., Xiaoling A., Lili Z. and Xiaoping Z. (2012). The rhizospheres of traditional medicinal plants in Panxi, China, host a diverse selection of actinobacteria with antimicrobial properties. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 94: 1321 - 1335.
- Li J., Zhao G.Z., Chen H.H., Wang H.B., Qin S., Zhu W.Y., Xu L.H., Jiang C.L. and Li W.J. (2008).

- Antitumour and antimicrobial activities of endophytic Streptomyces from pharmaceutical plants in rainforest. *Lett Appl Microbiol.*, 47: 574 - 580.
- Nguyen H.V., Vu T.H.N., Vu T.T., Phi Q.T., Khieu T.N., Samira S. and Chu K.S. (2016). Antimicrobial activities and interaction effects of Vietnamese *Litsea cubeba* (Lour.) Pers essential oil and its endophytic actinobacteria. *Lournal of science and technology. Journal of science and technology*, 54(4): 234 - 241.
- Nguyễn Văn Hào và Ngô Sỹ Vân (2001). Cá nước ngọt Việt Nam (Tập 1) Họ cá chép Cyprinidae. Nhà xuất bản Nông nghiệp
- Reverter M., Bontemps N., Lecchini D., Banaigs B., and Sasal P. (2014). Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives. *Aquaculture*, 433: 50 - 61.
- Tresner H.D. and Backus E.J. (1963). System of color wheels for Streptomyces taxonomy. *Appl. Microbiol.*, 11: 335 - 338.
- Wang H. and Liu Y. (2010). Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils from Different Parts of *Litsea cubeba*. *Chemistry & biodiversity*, 7.
- Zafar A., Shaukat S.K. and Mahnaaz K. (2013). *In vitro* trials of some antimicrobial combinations against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 20: 79 - 83.