

# NGHIÊN CỨU ĐỘC TÍNH CỦA VI KHUẨN LẠM ĐỘC NƯỚC NGỌT BẰNG PHƯƠNG PHÁP THỬ SINH HỌC TRÊN *ARTEMIA SALINA* VÀ PHƯƠNG PHÁP HPLC

Đặng Hoàng Phước Hiền, Nguyễn Sỹ Nguyên  
Dương Thị Thủy, Đặng Đình Kim, Phạm Thị Lan  
Viện Công nghệ Sinh học, Trung Tâm KHTN&CNQG

Jens Dahlmann  
Viện Dinh dưỡng, Đại học Friedrich- Schiller, Jena, Germany  
Tomoaki Itayama  
Viện nghiên cứu môi trường, Tsukuba, Nhật Bản

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Nhiều thập niên trở lại đây, sự phì dưỡng tại các thủy vực nội địa do các nguồn nước thải công nghiệp, nông nghiệp, nuôi trồng thủy sản và sinh hoạt cùng với các điều kiện thời tiết khí hậu thích hợp là nguyên nhân của hiện tượng nở rộ thực vật nổi (chủ yếu là vi khuẩn lam – VKL) – còn gọi là sự nở hoa nước (water bloom) diễn ra thường xuyên quanh năm. Phần lớn những VKL này có khả năng sản ra độc tố và gây hại cho thủy sản, động vật nuôi, động vật hoang dã và cho cả con người (1). Bởi vậy ô nhiễm tảo độc đang trở thành một thách thức lớn đối với công tác giám sát và quản lí nguồn nước mặt, đặc biệt là các thủy vực nước đứng làm nguồn cung cấp nước tưới tiêu và sinh hoạt trực tiếp cho cộng đồng dân cư. Để đáp ứng nhu cầu giám sát tảo độc và độc tố của chúng, ở nhiều nước trên thế giới song song với những phương pháp đòi hỏi kỹ thuật cao để xác định nhanh chóng hàm lượng độc tố VKL như sắc kí lỏng cao áp (HPLC), sắc kí khí kết hợp với detector khối phổ (GC/MS), điện di mao dẫn (CE) v.v..., việc tìm kiếm những phương pháp đơn giản, rẻ tiền, lại có thể đưa ra những kết luận nhanh chóng và chính xác là hướng nghiên cứu đang được quan tâm. Bên cạnh phép thử sinh học (bioassay) trên đối tượng kinh điển là chuột nhắt trắng, nhiều nghiên cứu đã sử dụng những động vật không xương sống, thực vật, vi khuẩn, tế bào động vật v.v... để xác định độc tính của VKL. Bài viết này trình bày sự so sánh những kết quả nghiên cứu độc tính và độc tố của VKL độc nước ngọt bằng phương pháp HPLC và phương pháp thử sinh học trên *Artemia salina* – một loài động vật không xương sống sống ở các hồ nước mặn. Trứng của *Artemia* có khả năng chống chịu lớn với điều kiện ngoại cảnh và dễ dàng được nở thành nauplii và *Artemia* trưởng thành trong vòng 20-30 giờ. Bởi vậy *Artemia* thường được gây nhân tạo để sử dụng trong các thí nghiệm nghiên cứu các chất trao đổi chất thứ cấp có độc tính (2) và làm thức ăn cho cá con.

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Nguyên liệu thí nghiệm

Là các mẫu nước nở hoa thu được từ các thủy vực nước ngọt (tại Hà Nội và vùng lân cận) và các mẫu VKL độc được phân lập và nuôi cấy trong phòng thí nghiệm. Phần lớn các mẫu nước nở hoa ngoài tự nhiên đều chứa VKL độc (thường là đại diện của các chi *Microcystis*, *Anabaena*, *Oscillatoria* và *Aphanizomenon*) với tỷ lệ khác nhau phụ thuộc vào địa điểm và thời gian lấy mẫu. Mẫu VKL sau khi thu từ các thủy vực được rửa sạch, đông khô và bảo quản ở nhiệt độ - 20°C.

### Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp thử sinh học trên *Artemia salina*:

Dịch chiết tảo bằng methanol 50% sau khi được sấy khô bằng speedvac system được pha trong nước biển thành các nồng độ 40-20-10-5-2.5-1.25 mg.mL<sup>-1</sup>.

*Artemia salina* vừa nở sau khi được ủ ở nhiệt độ 25°C trong 24 giờ được pha trong nước biển với nồng độ khoảng 10-20 con trong 0.1ml.

Cho vào mỗi giếng của microplate 0.1ml dịch chiết tảo và 0.1ml dịch *Artemia salina* (chứa khoảng 10-20 con), mỗi nồng độ lặp lại 3 lần. Theo dõi và đếm số *Artemia salina* chết sau 24 giờ. Sau đó cố định toàn bộ số *Artemia salina* bằng vài giọt formol. Đếm tổng số *Artemia salina* trong mỗi giếng và tính tỷ lệ % chết cho mỗi nồng độ dịch chiết.

Độc tính của các mẫu thí nghiệm được xác định bằng giá trị  $LC_{50}$ .  $LC_{50}$  là nồng độ gây chết 50% Artemia thí nghiệm sau 24h được xác định theo đường chuẩn phụ thuộc tỷ lệ chết của artemia vào nồng độ dịch chiết xây dựng bằng phương pháp hồi quy tuyến tính sử dụng phần mềm Excel.

**Phương pháp HPLC**

**Chiết xuất :** 50 mg mẫu tảo đã được sấy đông khô nghiền trong 1ml hỗn hợp Methanol: H<sub>2</sub>O (1:1), siêu âm trong 20 phút và ly tâm. Dịch nổi lọc qua giấy lọc nilon kích thước 0,45 μm.

**Làm sạch:** Dịch lọc được chuyển lên cột chiết pha rắn với C18-catridge đã được cân bằng trước đó với 5ml methanol và 5ml nước cất (0.05% axit trifluoroacetic TFA). Sau khi rửa bằng 10ml 0.05% TFA và 5ml 0.05% TFA: methanol (80:20,v:v) , microcystin được chiết ra bằng 5ml methanol. Dịch chiết được bay hơi trong chân không đến thể tích khoảng 200μl rồi dưới dòng N<sub>2</sub> đến khô hoàn toàn. Cặn khô được hoà tan trong 200μl methanol: H<sub>2</sub>O, 1:1.

Dịch thu được làm sạch bằng sắc ký lọc gen qua cột Superdex Peptide HR 10/30; ID 1cm; V= 24ml (Pharmacia Biotech). Dịch thổi là 0,1% Trifluoroacetic acid (TFA)/ acetonitrile (1:1, v:v) dòng chảy 1ml /phút. Dịch từ cột ra được theo dõi bằng UV Detector ở 238nm. Phân đoạn microcystin thu được ứng với Rt 12,5 đến 14,5 phút, đã được làm sạch. Dịch chiết sạch được bơm trực tiếp lên hệ HPLC-MS.

**Điều kiện HPLC**

Cột: Phenomenex Prodigy [5μ ODS (3) 100A; 250x4,6mm ID].

Eluent 1: Acetonitrile. Eluent 2: H<sub>2</sub>O cất dùng cho HPLC. Eluent 3: 0,05% TFA.

Gradient:

Dòng chảy 1ml/phút. Injection: 100μl. Detector: UV 238nm

Thời gian (phút)	Eluent1 (%)	Eluent 2 (%)	Eluent 3 (%)
0,0	32	18	50
35,0	44,5	5,5	50
37,0	32	18	50
45	32	18	50

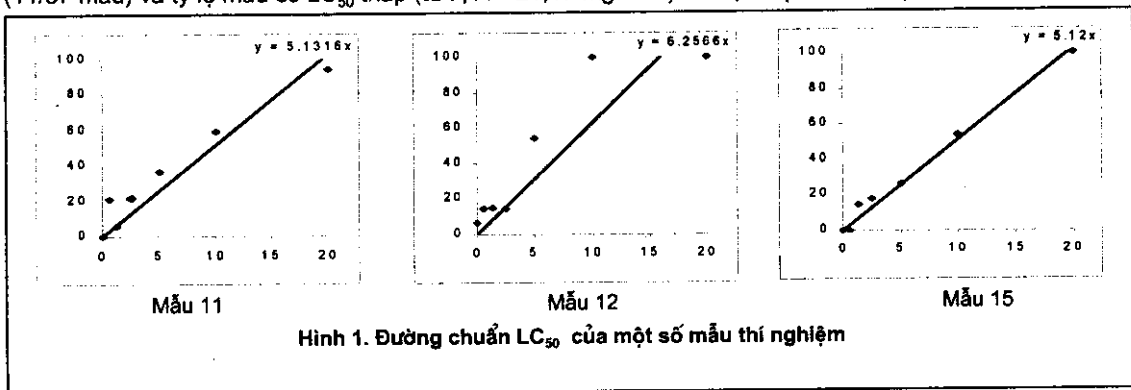
**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**Phương pháp thử sinh học trên Artemia salina**

Kết quả theo dõi tỷ lệ Artemia chết theo thời gian cho thấy sau 12 giờ tỷ lệ Artemia chết đã khá cao (≥ 80%) ở những nồng độ dịch chiết ≥ 10 mg/ml. Tuy nhiên, để tiện bố trí công việc trong phòng thí nghiệm chúng tôi chọn thời gian sau 24 h để xác định tỷ lệ Artemia chết.

Độc tính của các mẫu thí nghiệm được xác định bằng giá trị  $LC_{50}$  là nồng độ gây chết 50% Artemia thí nghiệm sau 24 h.  $LC_{50}$  được xác định trên cơ sở đường chuẩn phụ thuộc tỷ lệ chết của Artemia vào nồng độ dịch chiết xây dựng theo phương pháp hồi quy tuyến tính sử dụng phần mềm Excel (Hình 1). Từ các đường chuẩn nhận được có thể thấy giá trị  $LC_{50}$  càng cao thì độc tính của mẫu tảo đối với Artemia salina càng thấp và ngược lại, giá trị  $LC_{50}$  thấp tương ứng với độc tính cao của mẫu thí nghiệm.

Kết quả nghiên cứu độc tính của các mẫu VKL gây nở hoa nước ngoài tự nhiên và các mẫu VKL độc được phân lập và nuôi cấy trong phòng thí nghiệm (Bảng1) cho thấy: qua cả 2 đợt thí nghiệm, giá trị  $LC_{50}$  thay đổi rất lớn: từ 7,04-89,35mg.mL<sup>-1</sup> (đợt I) và 7,11-96,51mg.mL<sup>-1</sup> (đợt II). Tuy nhiên, các kết quả có khuynh hướng chia làm 2 nhóm rõ rệt: nhóm mẫu có giá trị  $LC_{50}$  cao (độc tính đối với Artemia salina thấp) và nhóm mẫu có giá trị  $LC_{50}$  thấp (độc tính đối với Artemia salina cao). Trong đợt thí nghiệm I tỷ lệ mẫu có  $LC_{50}$  cao (>28mg.mL<sup>-1</sup>) chiếm 24,1% (7/29 mẫu) và tỷ lệ mẫu có  $LC_{50}$  thấp (từ 7,04-16,21mg.mL<sup>-1</sup>) là 75,9% (22/29 mẫu). Tương tự, trong đợt thí nghiệm thứ II tỷ lệ mẫu có  $LC_{50}$  cao (>25 mg.mL<sup>-1</sup>) chiếm 29,7% (11/37 mẫu) và tỷ lệ mẫu có  $LC_{50}$  thấp (từ 7,11 - 21,17 mg.mL<sup>-1</sup>) là 70,3% (26/37 mẫu).



Hình 1. Đường chuẩn  $LC_{50}$  của một số mẫu thí nghiệm

Bảng1. Độc tính và độc tố của các mẫu VKL xác định bằng phép thử sinh học trên *Artemia salina* và HPLC

Kí hiệu	Địa điểm thu mẫu	Thời gian thu mẫu	Phương trình đường chuẩn $y = ax$		LC50		HPLC -Nhật	HPLC -Đức
			a- Đợt 1	a- Đợt 2	Đợt 1	Đợt 2		
1	D7 Đình Bảng-BắcNinh	18.06.01	0.56	0.95	89.35	52.84	0.156	nd
2	D8 Đình Bảng-BắcNinh	18.06.01	1.30	0.79	38.52	63.18	-	nd
3	D10 Đình Bảng-BắcNinh	18.06.01	0.93	-	54.02	-	-	0.024
4	SV Đình Bảng-BắcNinh	18.06.01	6.70	5.82	7.46	8.59	1.335	0.195
5	D6 Đình Bảng-BắcNinh	19.07.01	0.70	0.52	70.97	96.51	-	nd
6	D8 Đình Bảng-BắcNinh	19.07.01	1.13	0.72	44.12	69.87	-	nd
7	D10 Đình Bảng-BắcNinh	19.07.01	0.63	0.70	79.18	71.16	-	nd
9	B8 ThanhLiệt, ThanhTri HàNội	21.08.01	6.60	1.57	7.57	31.76	0.051	-
10	B10 ThanhLiệt-ThanhTri HàNội	21.08.01	5.19	0.87	9.63	57.43	0.030	0.014
11	Hải Phòng	5.01	7.10	5.93	7.04	8.43	0.703	-
12	YênXá-NamĐịnh	25.08.01	6.37	6.26	7.85	7.99	-	0.900
14	D12 Đình Bảng-BắcNinh	30.08.01	4.49	2.00	11.13	24.94	-	nd
15	KTX2 ĐìnhBảng-BắcNinh	30.08.01	6.34	5.12	7.89	9.77	0.562	1.308
16	B9 ThanhLiệt ThanhTri HàNội	06.09.01	6.76	3.15	7.40	15.87	0.078	0.046
17	KTX2 Đình Bảng-BắcNinh	25.09.01	6.75	4.29	7.41	11.66	-	0.165
18	C18 Đình Bảng-BắcNinh	30.10.01	6.02	6.17	8.31	8.11	-	1.095
19	C18 Đình Bảng-BắcNinh	30.10.01	5.20	4.73	9.62	10.56	-	0.329
20	C20 Đình Bảng-BắcNinh	30.10.01	6.32	5.13	7.91	9.75	-	0.332
21	C23 Đình Bảng-BắcNinh	30.10.01	6.70	-	7.46	-	-	0.622
22	C27 Đình Bảng-BắcNinh	Oct 30.01	7.06	6.86	7.08	7.28	-	3.583
23	C18 Đình Bảng-BắcNinh	26.12.01	6.12	6.08	8.17	8.23	-	1.476
24	C25 Đình Bảng-BắcNinh	26.12.01	6.37	7.03	7.85	7.11	-	0.150
25	D8 Đình Bảng-BắcNinh	17.01.02	6.55	4.75	7.64	10.53	0.945	-
26	D10 Đình Bảng-BắcNinh	17.01.02	3.63	1.77	13.76	28.24	0.005	nd
27	KTX6 Đình Bảng-BắcNinh	17.01.02	5.23	2.49	9.57	20.11	-	nd
28	KTX7 Đình Bảng-BắcNinh	17.01.02	1.74	5.63	28.68	8.88	-	nd
29	M.aeruginosa HK1	1999	3.09	4.04	16.21	12.36	0.015	0.060
32	M.aeruginosa TC2	1998	4.43	6.53	11.28	7.66	2.888	0.007
33	M.aeruginosa TC3	1999	7.03	0.85	7.11	58.93	2.160	nd
35	HK4	-	-	3.44	-	14.55	0.041	nd
37	M.aeruginosa SVDB1	2001	-	5.15	-	9.71	-	nd
38	M.aeruginosa TL	-	-	6.74	-	7.41	-	1.929
40	D5 Đình Bảng-BắcNinh	18.6.01	-	1.45	-	34.52	-	0.005
41	Rau muống	18.6.01	-	3.72	-	13.44	0.004	nd
44	D4 Đình Bảng-BắcNinh	20.9.02	-	3.82	-	13.09	-	0.289
45	D10 Đình Bảng-BắcNinh	20.9.02	-	2.36	-	21.17	-	nd
46	Ana phân lập	-	-	5.13	-	9.74	-	0.018

Như vậy trung bình tỷ lệ số mẫu có độc tính cao đối với *Artemia salina* là 73,1% và tỷ lệ số mẫu có độc tính thấp đối với *Artemia salina* là 26,9 % qua cả 2 đợt thí nghiệm.

#### Phương pháp HPLC

Kết quả phân tích độc tố của các mẫu thí nghiệm bằng phương pháp HPLC cho thấy trong tổng số 37 mẫu đã phân tích có 9 mẫu không chứa microcystins (MCs) (not detected), chiếm tỷ lệ 24,3%. 28 mẫu còn lại có chứa độc tố với hàm lượng MCs tổng số dao động từ 0,005  $\square$  2,888mg.g<sup>-1</sup> TLK chiếm tỷ lệ 75,7%.

Điều thú vị là so sánh kết quả của 2 phương pháp trên cho thấy có sự tương đồng rất lớn: ở hầu hết các mẫu có LC<sub>50</sub> cao trong phương pháp thử sinh học trên *Artemia salina* đều không xác định được MCs bằng phương pháp HPLC. Điều này chứng tỏ *Artemia salina* có phản ứng khá nhạy bén với MCs - các độc tố VKL.

#### KẾT LUẬN

Từ các kết quả thu được có thể thấy phương pháp thử sinh học trên *Artemia salina* là một phương pháp khá đơn giản, dễ thao tác, ít tốn kém, cho kết quả nhanh và chính xác (phù hợp với kết quả phân tích độc tố bằng HPLC). Bởi vậy đây là phương pháp thích hợp, đặc biệt là với mục đích sàng lọc (screening) mẫu VKL độc, có thể sử dụng trong các chương trình giám sát tảo độc nước ngọt.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Đặng Hoàng Phước Hiền và cs, 2002. *Đánh giá tình hình ô nhiễm tảo độc và tiềm năng tác động của nó lên sức khoẻ con người tại các ao nuôi cá trọng điểm của Hà Nội và các hồ Dầu Tiếng, Trị An (Thành phố Hồ Chí Minh)*. Báo cáo tổng kết đề tài Khoa học Công nghệ cấp Trung tâm giai đoạn 2001-2002
2. Toxic cyanobacteria in water, 1999. *A guide to their public health consequences, monitoring and management*. Eds. I Chorus & J. Bartram. E&FN Spon.

SUMMARY

**RESEARCH ON TOXICITY OF TOXIC FRESHWATER CYANOBACTERIA BY ARTEMIA SALINA BIOASSAY AND HPLC METHOD**

**Dang Hoang Phuoc Hien, Nguyen Sy Nguyen**  
**Duong Thi Thuy, Dang Dinh Kim, Pham Thi Lan**  
*Institute of Biotechnology, National Center for Science and Technology*  
**Jens Dahlmann**  
*Institute of Nutrition, Friedrich-Schiller University, Jena, Germany*  
**Tomoaki Itayama**  
*National Institute of Environmental Study, Tsukuba, Japan*

The toxicity of 37 natural cyanobacterial bloom and isolated samples was investigated using *Artemia salina* bioassay and HPLC method. The results by *Artemia salina* bioassay showed that LC<sub>50</sub> of these samples varied widely from 7,04 to 96,51 mg.mL<sup>-1</sup> and the percentage of high toxic for *Artemia salina* samples was 73.1%. These results were confirmed by HPLC : 75,7 % of these samples contained microcystins – cyanobacterial toxins with content of 0,005-2,888 mg MCs.g<sup>-1</sup> D.W.