

ĐỘC TÍNH VÀ ĐỘC TỔ CỦA MỘT SỐ CHŨNG VI KHUẨN LAM *MICROCYSTIS AERUGINOSA* PHÂN LẬP TỪ HỒ HOÀN KIẾM VÀ HỒ THÀNH CÔNG

ĐẶNG HOÀNG PHƯỚC HIỀN, DƯƠNG THỊ THÚY

ĐẶNG ĐÌNH KIM, NGUYỄN SỸ NGUYỄN

Viện Công nghệ Sinh học, Trung tâm KHTN&CNQG

CHRISTIAN HUMMERT

Viện Dinh dưỡng, Đại học Tổng hợp Friedrich-Schiller, Jena, Germany

I. MỞ ĐẦU

Sự có mặt của một số loài vi khuẩn lam (VKL) có độc tố tại hồ Hoàn Kiếm đã được phát hiện từ năm 1997 [1]. Các tác giả cũng cho thấy sự nở hoa của nước hồ Hoàn Kiếm xảy ra 2 lần trong năm vào đầu hè và cuối thu. Khi nước hồ nở hoa, mật độ *Microcystis aeruginosa* chiếm tới 40% quần thể thực vật phù du.

M. aeruginosa là loài VKL nước ngọt sản ra độc tố thuộc họ microcystin - chất được coi là gây ung thư ở động vật và người [2]. Việc phân lập và nuôi cấy VKL này trong phòng thí nghiệm, nghiên cứu độc tính và độc tố của nó là bước cần thiết tiếp theo trong chương trình nghiên cứu tảo lam có độc tố.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Phân lập và nuôi cấy

Mẫu tảo nở hoa ngoài tự nhiên ở hồ Hoàn-Kiểm và hồ Thành Công chứa *Microcystis aeruginosa* được thu bằng vợt phù du. Các khuẩn lạc *M. aeruginosa* được xác định theo Dương Đức Tiến [3] và Skulberg [4]. Quy trình phân lập tiến hành theo phương pháp Shirai [5] có cải tiến, sử dụng các môi trường sau làm môi trường lỏng và là cơ sở cho môi trường thạch: 1. Môi trường Bourelly [6]; 2. Môi trường BG 11 [7] 3. Môi trường GMA [7]; 4. Môi trường B 12 [8] ; 5. Môi trường CB [8]; 6. Môi trường MA [8].

Các khuẩn lạc *M. aeruginosa* từ mẫu nước hồ nở hoa được gắp ra dưới kính hiển vi và chuyển vào môi trường thạch trong đĩa Petri (0.6% thạch trong môi trường tương ứng) được bọc kín bằng parafilm và đặt dưới đèn đèn ánh sáng 2000-3000 lux ở 25 - 30°C trong vòng 1- 2 tuần. Những khuẩn lạc phát triển được kiểm tra dưới kính hiển vi đối pha để xác định xem có bị nhiễm hay không. Những khuẩn lạc sạch được chuyển sang nuôi cấy trong bình nón 50ml trong môi trường lỏng tương ứng ở điều kiện như trên để lấy sinh khối, đông khô và sử dụng trong các thí nghiệm nghiên cứu độc tính và xác định độc tố tiếp theo. Nếu khuẩn lạc bị nhiễm thì quá trình phân lập lại quay lại từ bước đầu.

2. Nghiên cứu độc tố

* Phương pháp thử trên chuột:

Chuột nhắt trắng trọng lượng 20-25g được tiêm dưới màng bụng 1 ml dịch tảo trong Methanol: H₂O (1:1) hoặc nước cất. Các nồng độ tảo là: 10-20-30 mg/ml. Đối chứng là chuột được tiêm bằng dịch *Spirulina* trong Methanol: H₂O (1:1), dịch Methanol: H₂O (1:1) và nước cất. Sau khi tiêm chuột được theo dõi trong 24h. Các triệu chứng và thời gian chuột bị chết được ghi lại. Chuột chết trong vòng 4 h sau khi tiêm được coi là do độc tố của tảo.

* Phương pháp HPLC-MS

Chiết xuất : 50 mg mẫu tảo đã được sấy đông khô nghiền trong 1ml hỗn hợp Methanol: H₂O (1:1), siêu âm trong 20 phút và ly tâm. Dịch nổi lọc qua giấy lọc nylon kích thước 0,45 µm.

Làm sạch : Dịch lọc được chuyển lên cột chiết pha rắn với C18-catrige 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 200 µl rồi dưới dòng N₂ đến khô hoàn toàn. Cặn khô được hoà tan trong 200 µl methanol : H₂O, 1:1.

Dịch thu được được làm sạch bằng sắc ký lọc gen qua cột Superdex Peptide HR 10/30; ID 1 cm; V= 24ml (Pharmacia Biotech). Dịch thời 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 238 nm. 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 [5u ODS (3) 100A; 250 × 4,6 mm ID].

Eluent 1: Acetonitrile. Eluent 2: H₂O cất dùng cho HPLC. Eluent 3: 0,05% TFA.

Gradient:

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

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

Xác định khối lượng: Positive ionization, phổ quét khối lượng: 500-530; 900-1070 Da

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Phân lập và nuôi cấy

Các kết quả thí nghiệm cho thấy : trong điều kiện phòng thí nghiệm *M. aeruginosa* chỉ phát triển được trên môi trường đã có sẵn hoặc được bổ sung hỗn hợp vitamin (B₁, B₁₂ và H). Ở những môi trường không có hoặc không bổ sung vitamin tảo lụi dần và chết mặc dù các nguyên tố đa lượng và vi lượng đều đầy đủ. Điều đó chứng tỏ vitamin là một trong những yếu tố quan trọng để *M. aeruginosa* phát triển. Trong những môi trường đã thử nghiệm, môi trường thích hợp nhất để phân lập và nuôi cấy *M. aeruginosa* là môi trường CB. Nồng độ thạch thích hợp nhất cho các khuẩn lạc *M. aeruginosa* phát triển là 0,6 % . Nhiều chủng *M. aeruginosa* có thể sinh trưởng và phát triển trên những môi trường dành cho tảo lam khác nhau (5,7). Hơn nữa, theo một số tác giả môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng rất lớn đến tốc độ tăng trưởng và khả năng tích lũy độc tố của tảo [9].

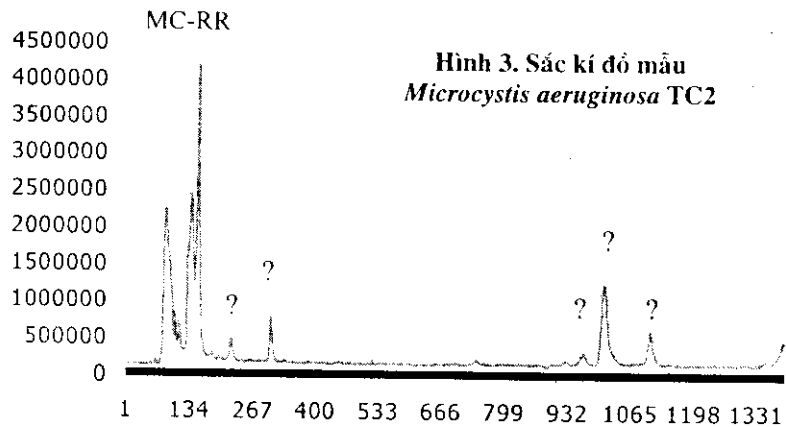
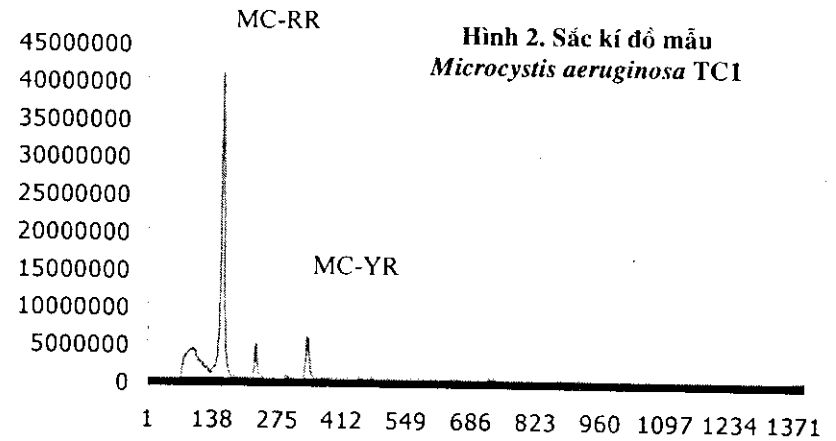
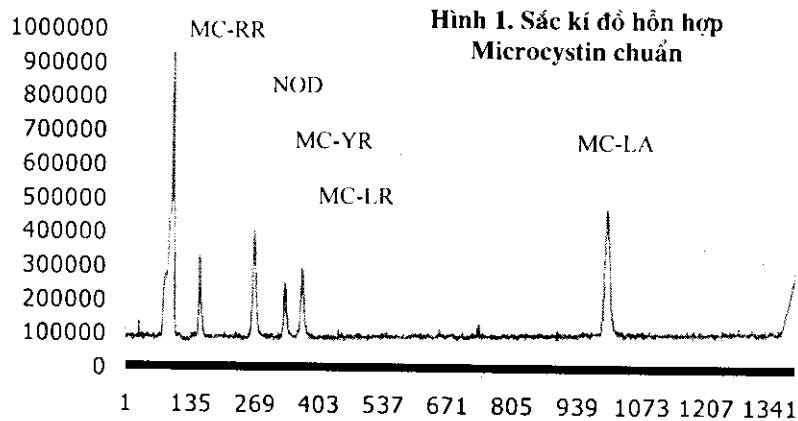
Từ mẫu nước nở hoa của hồ Hoàn Kiếm và hồ Thành Công đã phân lập được 5 chủng *Microcystis* kí hiệu là *M. aeruginosa* HK1, *M. aeruginosa* HK2 (ảnh 1, 2) và *M. aeruginosa* TC1; *M. aeruginosa* TC2 và *M. aeruginosa* TC3 (ảnh 3,4,5).

Các tập đoàn *M. aeruginosa* HK1 và *M. aeruginosa* HK2 cũng như *M. aeruginosa* TC1, *M. aeruginosa* TC2 và *M. aeruginosa* TC3 khác nhau về kích thước, màu sắc, độ nổi... và rất gần với mô tả của Dương Đức Tiến về *M. aeruginosa* Kutz [3].

Trong điều kiện phòng thí nghiệm, cường độ ánh sáng 2000-3000 lux là thích hợp để nuôi cấy những chủng *Microcystis* này. Ở điều kiện ánh sáng thấp hơn, tảo phát triển chậm và dễ bị lặn ất bởi nấm mốc. Nhiệt độ tối thích cho tảo phát triển cả trên môi trường thạch lẫn môi trường lỏng là 25-30°C. Ở nhiệt độ thấp hơn hoặc cao hơn tảo đều phát triển kém. Những chủng tảo trên là nguyên liệu quan trọng cho các nghiên cứu độc tố tiếp theo.

2. Nghiên cứu độc tố

Kết quả các thí nghiệm thử độc tính trên chuột cho thấy: tỷ lệ chuột chết sau khi được tiêm 1ml dịch tảo với nồng độ tảo ≥ 2mg/ml là 95% (40 con chết/ 42 con được tiêm) trong khi tất cả chuột trong các lô đối chứng (được tiêm bằng nước cất, nước cất : methanol, 1:1, hoặc dịch *Spirulina platensis* trong nước cất : methanol, 1:1 ở nồng độ 30mg/ml) đều còn sống. Như vậy những mẫu tảo *M. aeruginosa* được phân lập từ các hồ Hà Nội đều có độc tính đối với chuột ở nồng độ ≥ 2mg/ml. *M. aeruginosa* TC1 làm chuột chết trong vòng 1giờ đầu chứng tỏ hàm lượng độc tố trong chủng tảo này khá cao. Theo Falconer (1993) hàm lượng 3 µg MC là liều giết chết 30 g chuột [10]. Scarafia và cộng sự (1995) cũng cho thấy LD50 của mẫu tảo lam nở hoa là 14,5mg/kg và của microcystin là 500 µg/ kg trọng lượng chuột thí nghiệm [11]. Điều thú vị là kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng giống với thông báo của Shyyaa và cs. (1997) khi tác giả này khẳng định mẫu tảo còn nguyên tế bào làm các loài Cladoceran chết nhanh hơn dịch chiết tảo [12].



Bảng 1. Hàm lượng microcystin trong các mẫu *Microcystis aeruginosa* phân lập từ hồ Hoàn Kiếm và hồ Thành Công

Chủng tảo thí nghiệm	Hàm lượng microcystin (mg/gTLK)	
	MC-RR	MC-YR
<i>Microcystis aeruginosa</i> TC1	3,136	1,266
TC2	0,347	-
TC3	0,790	-
Mix	0,354	-
HK1	0,626	-
HK2	0,798	-

Kết quả định tính và định lượng microcystin bằng HPLC-MS trình bày trên hình 1, 2, 3 và bảng 1.

Kết quả trên bảng 1 cho thấy tất cả các mẫu *M. aeruginosa* phân lập được từ hồ Thành Công và hồ Hoàn Kiếm đều chứa microcystin (MC). Trong đó *M. aeruginosa* TC1 chứa 2 loại MC là MC-RR và MC-YR với hàm lượng rất cao : 3,136 và 1,266 mg/g trọng lượng khô, tương ứng. Các mẫu còn lại đều chứa MC-RR với hàm lượng khá cao. Theo Herniksen và cs.(1997) chỉ có một lượng nhỏ microcystin (khoảng 0,1-0,9 $\mu\text{g/g}$) trong các mẫu tảo lam nở hoa từ các hồ của Đan Mạch [13]. Hesse và cs. (1997) cho thấy hàm lượng MC-RR trong chủng tảo *M. aeruginosa* HUB là 1 $\mu\text{g}/\text{mm}^3$, hàm lượng MC-YR là 0,4 $\mu\text{g}/\text{mm}^3$ [14]. Youssef và cs. cũng nhận thấy rằng 23% mẫu tảo lam phân lập từ các ruộng lúa và kênh tưới tiêu tại châu thổ sông Nin sản ra khoảng 0,5- 4,3 ng MC/ l dịch chiết tế bào [15]. Tại Canada, nồng độ MC trong nước tối đa cho phép là 0,5 $\mu\text{g/l}$, còn ở Úc người ta sử dụng lượng 1 $\mu\text{g/l}$ (tương đương 5000 tế bào/ml) là nồng độ ngưỡng cho các thủy vực sử dụng làm nguồn nước uống hoặc giải trí [16]. Hàm lượng MC trong các mẫu *M.aeruginosa* phân lập từ hồ Hoàn Kiếm và hồ Thành Công cho thấy khả năng nhiễm độc MC tại các hồ này, đặc biệt là trong các thời điểm nước nở hoa, khi các tế bào *M.aeruginosa* chiếm tới 40% tổng lượng thực vật phù du là một nguy cơ tiềm tàng.

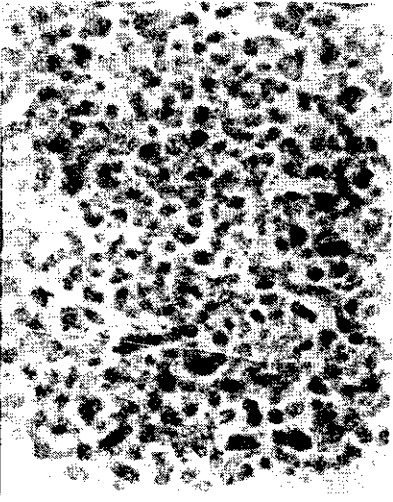
IV.KẾT LUẬN

Đã phân lập và nuôi cấy được 5 chủng *Microcystis* từ hồ Thành Công và hồ Hoàn Kiếm. Trong các môi trường đã thử nghiệm, môi trường CB là môi trường thích hợp nhất cho tảo phát triển trong phòng thí nghiệm. Nồng độ thạch thích hợp khi nuôi cấy *Microcystis* trên môi trường rắn là 0,6%. Điều kiện nuôi cấy trong phòng là ánh sáng 2000-3000 lux, nhiệt độ 25-30°C.

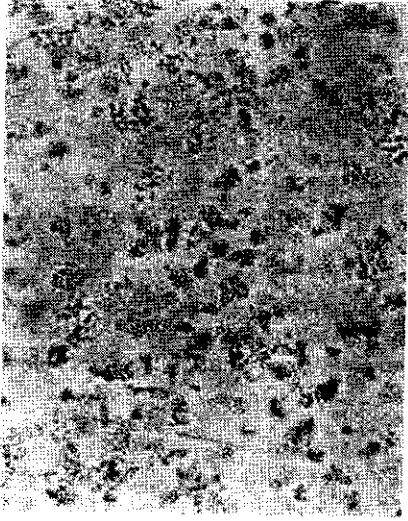
Các chủng *M. aeruginosa* đã phân lập được đều gây chết đối với chuột ở nồng độ $\geq 2\text{mg}$ tảo khô/con trong vòng 24 h. Chủng *M.aeruginosa* TC1 làm chuột chết trong vòng 1 h ở nồng độ 5 mg tảo khô/ con cho thấy hàm lượng độc tố trong chủng tảo này khá cao là điều được khẳng định bằng các kết quả phân tích độc tố . Chủng *Microcystis aeruginosa* TC1 chứa 2 loại microcystin : MC -RR và MC -YR với hàm lượng : 3,136 và 1,266 mg/g tảo khô, tương ứng, trong khi các chủng khác chỉ chứa 1 loại microcystin : MC-RR với hàm lượng thấp hơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

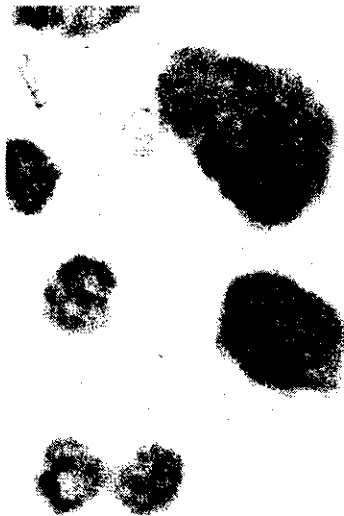
1. Đặng Hoàng Phước Hiền, Đặng Đình Kim, Dương Thị Thuý, Dương Đức Tiến, 1997. Kỷ yếu Viện Công nghệ Sinh học : 408- 412.
2. Ian R. Falconer and Andrew R. Humpage, 1996. Phycologia, Vol135 (6 supplement): 74-79.
3. Dương Đức Tiến, 1996. Phân loại Vi khuẩn lam ở Việt Nam. Nhà xuất bản Nông nghiệp.
4. Skulberg Olav M. et al., 1993. Taxonomy of toxic cyanophyceae (Cyanobacteria). The book " Algal toxins in seafood and drinking water". 145-175.Ed.Ian.R.Falconer. Academic Press.
5. Shirai M. et al., 1989. Applied and Environmental Microbiology. 2569-2571
6. Institute of BiotechnologyIII. Collection of Microalgae, , Julich, Germany.
7. Atlas CRC. Ronald M., 1995. Handbook of Media for Environmental Microbiology. Atlas University of Louisville.
8. Environment agency, 1997. NIES - collection. List of strains. Fifth edition 1997. Microalgae and protozoa. Microbial culture collection. National Institute for Environmental studies. Japan.
9. Rao P.V et al., 1996. Microbios. 86(347) : 95-104.
10. Ian R. Falconer, 1996. Algal toxins in seafood and drinking water. Academic Press. Harcourt Brace and Company Publishers.p166.
11. Scarafia M.E et al., 1995. Nat. toxins. 3(2) : 75-77.
12. Brahim Shyyaa et al., 1997. Harmful algae. VIII International Conference UNESCO: 382-385.
13. Henricksen P et al., 1997. Toxicon, Jun.35(6):901-913
14. Karina Hesse et al., 1997. Harmful algae. VIII International Conference UNESCO : 333-336
15. Youssef G. Yanni and Wayne W. Carmichael, 1997. Harmful algae. VIII International Conference UNESCO : 493-494.
16. W.W. Carmichael, 1995. Manual on Harmful Marine Microalgae. UNESCO: 163-169.



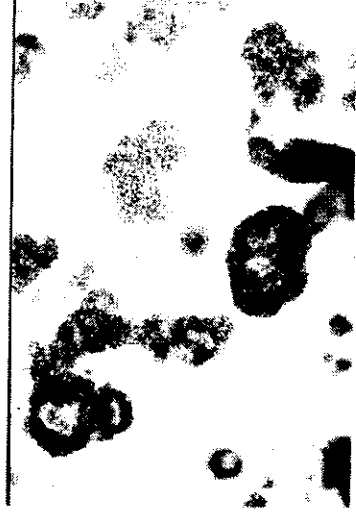
Microcystis aeruginosa HK1 (x200)



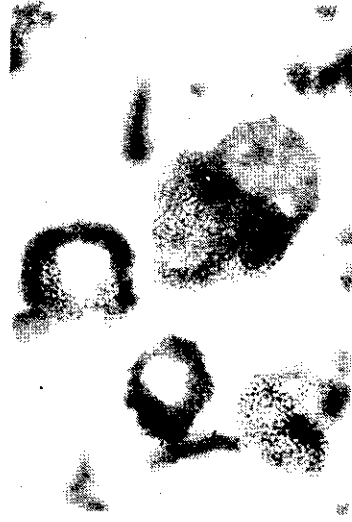
Microcystis aeruginosa HK2(x200)



Microcystis aeruginosa TC1(x 100)



Microcystis aeruginosa TC2 (x 100)



Microcystis aeruginosa TC3 (x 100)

SUMMARY

**TOXICITY AND TOXINS OF SOME
MICROCYSTIS AERUGINOSA (CYANOBACTERIACEAE)
STRAINS ISOLATED FROM HOAN KIEM
AND THANH CONG LAKES**

DANG HOANG PHUOC HIEN, DUONG THI THUY,

DANG DINH KIM, NGUYEN SY NGUYEN,

Institute of Biotechnology, NCST

CHRISTIAN HUMMERT

Institute of Nutrition, Friedrich-Schiller University, Jena, Germany

*Five strains of *Microcystis aeruginosa* have been isolated from the Hoan Kiem and Thanh Cong lakes, Hanoi city and cultivated in laboratory conditions. The CB medium has been shown to be the most suitable in this process. The solid medium prepared on the base of this one containing 0,6% agar could be used effectively. The optimal light intensity and temperature for the growth of these strains were 2000 - 3000 lux and 25 - 30°C, respectively.*

*All isolated *M. aeruginosa* strains were toxic to mouse with lethal dose ≥ 2 mg of lyophilised cells/mouse within 3 - 4 hours. The death of mice within 1h after i.p. injection caused by *M. aeruginosa* TC1 at concentration of 5mg dried cells/mouse showed its high toxin content that was confirmed by the results of HPLC - MS toxin analysis : This strain contains 2 microcystins : MC-RR and MC-YR at concentration 3.136 and 1.266 mg/g of dried cells, respectively, while 4 another strains contain only MC-RR at lower concentration.*