

## PHÂN LẬP CHỦNG *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* SINH HOẠT CHẤT KHÁNG KHUẨN PYOCYANIN

Nguyễn Quang Vinh<sup>1,2</sup>, Nguyễn Chí Thuận<sup>1</sup>, Nguyễn Huyền Trang<sup>1</sup>,  
Nguyễn Hoàng Uyên<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Thanh Lợi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VAST)

<sup>2</sup> Công ty Cổ phần Dịch vụ phân tích di truyền (GENTIS)

### TÓM TẮT

*Pseudomonas aeruginosa* được quan tâm là vi khuẩn có nhiều ứng dụng trong công nghệ sinh học và có khả năng sinh các hoạt chất thứ cấp. Pyocyanin (PYO) được sinh tổng hợp từ *Pseudomonas aeruginosa*, là hợp chất thứ cấp, có khả năng kháng khuẩn, kháng nấm. Nghiên cứu này nhằm mục đích phân lập các chủng *Pseudomonas aeruginosa* từ mẫu môi trường và đánh giá khả năng kháng khuẩn của hoạt chất PYO sinh ra từ vi khuẩn này. Kết quả phân lập được 11 chủng từ mẫu nước nuôi thủy sản (PS1; PS2; PS3; PS4; PS5; PS6; PS11; PS33; PS35; PS39 và PS44). Trong đó, chủng *Pseudomonas* sp. PS39 được giải trình tự gen 16S rRNA, đăng ký trên ngân hàng gen mã số KJ579953, cho thấy tương đồng cao 100% với trình tự gen của nhóm chủng *P. aeruginosa* MCCB117 (EF062511) và *P. aeruginosa* MCCB102 (EF062514). Sử dụng xét nghiệm API 20NE cho thấy *Pseudomonas* sp. PS39 có tính chất giống với chủng *P. aeruginosa* ATCC 27853. PYO được tách chiết từ dịch nuôi cấy ức chế các vi sinh vật kiểm định, các chủng *Vibrio* sp. kháng kháng sinh, gây bệnh trên tôm nuôi nước lợ.

Từ khóa: *P. aeruginosa*, kháng khuẩn, phenazin, pyocyanin, *Vibrio* sp.

### MỞ ĐẦU

*Pseudomonas aeruginosa* là vi khuẩn hiếu khí hình que dài, gram âm, có mặt phổ biến trong tự nhiên. Nó có thể được tìm thấy trong môi trường đất, nước ngọt, nước lợ... *Pseudomonas aeruginosa* được chú ý bởi khả năng sinh sắc tố phenazin mà không có loại vi khuẩn gram âm nào khác có thể sinh sắc tố đặc trưng như chủng này. Sắc tố đặc trưng được tạo ra bởi vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* bao gồm pyocyanin (PYO) có màu xanh đậm, pyoverdine có màu vàng, xanh lá cây và phát huỳnh quang, pyomelanin có màu nâu nhạt và pyorubrin có màu nâu đỏ (Meyer *et al.*, 2000; Reyes *et al.*, 1981). Trong đó, hợp chất thứ cấp pyocyanin được đặc biệt chú ý với khả năng kháng khuẩn, kháng nấm cao có thể dùng làm chất diệt khuẩn sinh học thay thế kháng sinh vì phổ kháng khuẩn rộng, không bị kháng và có khả năng phân hủy dễ dàng trong môi trường. Để phân lập chủng vi khuẩn sinh PYO người ta dựa trên khả năng sinh sắc tố xanh đặc trưng của PYO và sử dụng môi trường phân lập King A. Môi trường này ức chế sự sản sinh của các sắc tố khác như pyoverdine hoặc pyomelanin nhưng lại hỗ trợ cho vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* sản xuất PYO (Jayaseelan *et al.*, 2014).

PYO có tính kháng khuẩn mạnh, sự kháng *Escherichia coli* của PYO được báo cáo lần đầu tiên vào năm 1940. Nghiên cứu về tính kháng khuẩn của PYO từ *P. aeruginosa* phân lập từ môi trường biển đã cho thấy gần 90 - 95% khả năng ức chế vi khuẩn của các chủng *P. aeruginosa* là do PYO (Angell *et al.*, 2006). Ngoài ra, PYO còn được biết đến với hoạt tính kháng nấm và khả năng kiểm soát sinh học hiệu quả (Jayaseelan *et al.*, 2014). Do đó PYO đã trở thành hợp chất được quan tâm và ứng dụng làm chất diệt khuẩn và có khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh như *Vibrio* sp. ứng dụng trong nuôi thủy sản.

Để phục vụ cho mục đích tìm kiếm PYO có nguồn gốc tự nhiên từ vi khuẩn ở Việt Nam. Trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành phân lập, sàng lọc các chủng vi khuẩn sinh PYO và đánh giá khả năng kháng khuẩn của hoạt chất thu được dựa vào phương pháp xác định nồng độ ức chế và diệt khuẩn tối thiểu (MIC và MBC).

### NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

#### Nguyên liệu

Các mẫu nước nuôi thủy sản, mẫu tôm và cá thu thập từ Quảng Ninh, Ninh Bình và Nam Định.

Các chủng vi khuẩn *Vibrio* sp. trong bộ sưu tập của phòng thí nghiệm Công nghệ sinh học tái tạo môi trường, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Thành phần và các môi trường nuôi cấy vi khuẩn King A, King B được sử dụng của các hãng Sigma, Invitrogen...

Các hóa chất dùng cho sinh học phân tử đạt tiêu chuẩn dùng cho nghiên cứu với xuất xứ từ các hãng ThermoScience, Invitrogen và máy chạy PCR (Eppendorf - Mỹ), điện di (Mupid<sup>R</sup> 2plus - Nhật), máy soi gel (UV Transilluminator, Wealtec, Đài Loan).

**Phương pháp**

**Phân lập vi khuẩn**

Nước nuôi thủy sản, các xoang tiêu hoá được nghiền kỹ và được pha loãng tới các nồng độ tới  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  và  $10^{-5}$ , cấy trải 0,1 ml dịch pha loãng lên đĩa thạch King A và ủ ở 30°C. Sau 24 giờ, quan sát và chọn những khuẩn lạc màu xanh và môi trường đổi màu sang xanh để thực hiện tiếp các thí nghiệm sàng lọc chọn chủng thuần. Những chủng này được cấy trong môi trường lỏng King A để kiểm tra khả năng tiết pyocyanin và trên đĩa thạch King B để quan sát khả năng phát huỳnh quang (King *et al.*, 1954).

**Đặc điểm hình thái tế bào**

Nhuộm Gram theo phương pháp Hucker cải tiến (Hucker, 1921) và chụp ảnh kính hiển vi điện tử quét (SEM - JSM-5410LV, JEOL, Nhật)

**Định danh vi khuẩn (theo Kit 20NE cho vi khuẩn Gram -)**

Phương pháp được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất Kit API 20NE (BioMérieux, Pháp), được tóm tắt như sau: lấy 2 khuẩn lạc từ đĩa thạch nuôi sau 18-24 giờ cho vào 4ml muối sinh lý 0,9% đã khử trùng; trộn đều, tránh phá huỷ tiên mao, tiêm mao và không tạo bọt. Dịch vi khuẩn này được nhỏ vào các phản ứng có sẵn cơ chất bằng pipet, trong đó các phản ứng vi hiếu khí GLU, ADH và URE cần bổ sung dầu khoáng, các phản ứng hiếu khí GLU, ARA, MNE, MAN, NAG, MAL, GNT, CAP, ADI, MLT, CIT VÀ PAC nhỏ dịch vi khuẩn dưới miệng giếng (không cho dịch đầy). Ủ mẫu trong khay ảm ở 30°C trong 24 giờ và đọc kết quả.

**Xác định gen đặc trưng loài *Pseudomonas aeruginosa***

Sử dụng cặp mồi PA-F và PA-R: PA-F: 5'-GGGGATCTTCGGACCTCA-3'; PA-R: 5'-TCCTTAGAGTGCCCAACCG - 3' đặc hiệu (Spilker *et al.*, 2004) để khuếch đại đoạn gen PA 956 bp ở các chủng vi khuẩn nghiên cứu, có độ đặc hiệu và độ nhạy 100% với chủng *P. aeruginosa*. Chu trình nhiệt cho phản ứng gồm 94°C-5 phút; 35 chu kì (94°C-30 giây; 58°C-30 giây; 72°C-45 giây) và kết thúc phản ứng ở 4°C. Kiểm tra sản phẩm PCR trên gel agarose 1,5%, đệm TAE 1X.

**Phương pháp xác định hàm lượng PYO (Essar *et al.*, 1990)**

Dịch nuôi vi khuẩn được ly tâm 5000 v/ph trong 10 phút, thu dịch nổi, loại bỏ tế bào, thêm chloroform theo tỷ lệ 1:2 về thể tích (1 dịch : 2 chloroform), lắc đều, để lắng khoảng 15 phút, loại bỏ phần dịch trên, thu lớp chloroform chứa PYO có màu xanh. Sau đó, thêm HCl 0,2M để axit hóa với tỷ lệ 1:1 về thể tích, lắc đều, dung dịch chuyển sang màu đỏ. Pha loãng đo OD ở bước sóng 520 nm để xác định nồng độ hoạt chất. Hàm lượng PYO xác định theo công thức: PYO ( $\mu\text{g/ml}$ ) = OD520 x độ pha loãng x 17,072.

**Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (Minimum Inhibitory Concentration - MIC) (Hadacek, Greger *et al.*, 2000)**

Dịch chiết pyocyanin và các kháng sinh được pha loãng giảm dần 1/2 để có dải nồng độ cuối cùng của pyocyanin là 6,5; 3,25; 1,625; 0,8; 0,4; 0,2 và 0,1 ( $\mu\text{g/ml}$ ); của các kháng sinh 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4 và 2 ( $\mu\text{g/ml}$ ). Mỗi nồng độ được lặp lại 3 lần trên 3 giếng. Thêm dịch nuôi vi sinh vật kiểm định (VSVKĐ) và các chủng *Vibrio* sp. nghiên cứu lần lượt đưa vào các giếng và ủ ở 37°C. Sau 24 giờ, xác định giá trị MIC bằng cách đo độ đục tế bào ở 620 nm trên máy Biotec và sử dụng phần mềm Raw data.

**Xác định nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (Minimum Bactericidal Concentration - MBC)**

Nồng độ diệt khuẩn tối thiểu là nồng độ thấp nhất của dịch chiết hay hợp chất tinh khiết mà diệt 99,9% vi khuẩn. Thí nghiệm được thực hiện theo phương pháp pha loãng dung dịch của Hadacek có thay đổi cho phù hợp với đối tượng nghiên cứu (Hadacek, Greger *et al.*, 2000).

Thêm vào các ống thí nghiệm 1 mL dịch chiết pyocyanin, 1 mL dịch vi khuẩn của 3 chủng *V. parahaemolyticus*  $3.10^5$  cfu/mL để đạt dải nồng độ pyocyanin cuối cùng 0,4; 0,8; 1,2; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4 và 5  $\mu\text{g/mL}$ . Nuôi lắc 200 vòng/phút ở 30°C. Sau 18 - 24 giờ cấy 100  $\mu\text{L}$  dịch vi khuẩn từ các ống lên đĩa thạch TCBS. Đếm khuẩn lạc sau 24 giờ và xác định MBC.

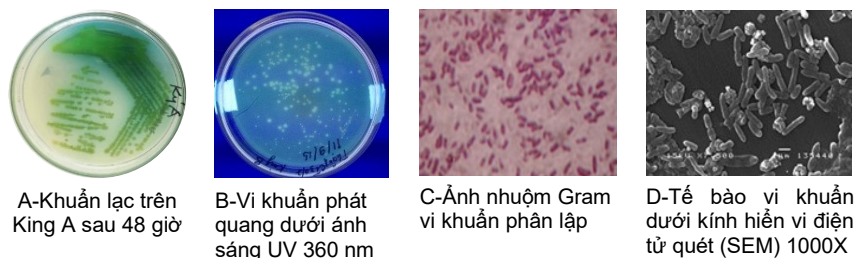
**Phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch**

Phương pháp xác định theo Bauer có thay đổi cho phù hợp với hoạt chất nghiên cứu (Bauer *et al.*, 1966). Làm giàu các chủng vi khuẩn *Vibrio* sp. trong môi trường APW, lắc ở 30°C, 24 giờ. Cấy trải dịch vi khuẩn *Vibrio* sp. lên đĩa thạch 2216E. Đặt khoanh giấy thấm PYO với các nồng độ khác nhau 0,02; 0,04; 0,08; 0,16; 0,33; 0,65; 1,3 và 2,6  $\mu\text{g}$  và kháng sinh đối chứng Gentamycine 10  $\mu\text{g}$  lên các đĩa đã cấy vi khuẩn và ủ ở 30°C. Đo đường kính vùng ức chế sau 24 giờ.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Phân lập vi khuẩn và đặc điểm hình thái chủng *Pseudomonas* sinh PYO

Vi khuẩn sinh PYO được phân lập và sàng lọc dựa trên khả năng sinh sắc tố có màu xanh đặc trưng của PYO trên môi trường King A, làm đổi màu môi trường (hình 1-A), phát huỳnh quang trên môi trường King B dưới ánh sáng tử ngoại 360 nm (hình 1B) và tiết PYO trong môi trường King A lỏng. 11 chủng vi khuẩn thu nhận có khả năng sinh PYO với các mức độ khác nhau từ các mẫu nước thủy sản đã được phân lập (bảng 1). Danh sách các chủng sinh PYO được trình bày tại bảng dưới đây gồm: PS1; PS2; PS3; PS4; PS5; PS6; PS11; PS33; PS35; PS39 và PS44.



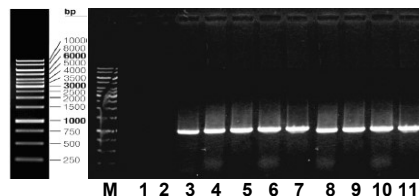
Hình 1. Chủng *Pseudomonas* sp. PS39 được phân lập

Từ kết quả nhận được chỉ ra rằng chủng PS39 có khả năng sinh PYO cao nhất khi so sánh với các chủng còn lại dựa vào việc xác định hàm lượng PYO tiết ra trong môi trường King A lỏng. Từ kết quả này chủng vi khuẩn PS39 được lựa chọn để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo.

Kết quả nhuộm Gram (hình 1-C) và chụp kính hiển vi điện tử quét (hình 1-D) cho thấy chủng vi khuẩn PS39 là trực khuẩn gram âm, hình que, hai đầu tròn, chiều dài khoảng 1 - 1,5 µm, chiều rộng khoảng 0,5 - 1µm, đứng một mình hoặc thành đôi.

### Kết quả PCR đoạn gen đặc trưng loài *P. aeruginosa*

Cặp mồi trên (PA-F; PA-R) có độ đặc hiệu và độ nhạy 100% với loài *P. aeruginosa* (Spilker et al., 2004), được sử dụng để khuếch đại đoạn gen PA với chiều dài mong muốn là 956 bp. Kết quả điện di đồ sản phẩm PCR khuếch đại gen đặc trưng loài *P. aeruginosa* trên hình 2 cho thấy, các chủng vi khuẩn được phân lập dựa vào các đặc tính hình thái và sự tiết PYO đều dương tính với một băng ADN duy nhất có kích thước khoảng 1.000 bp.



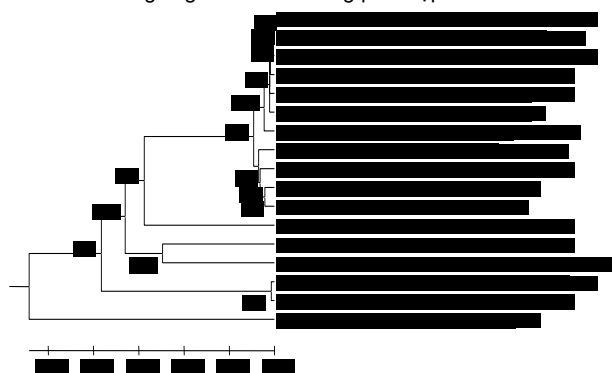
Hình 2. Sản phẩm PCR đoạn gen PA 956 bp của một số chủng vi khuẩn phân lập.

M: Thang chuẩn ADN 1kp, giếng 1: chứng âm; giếng 2: DNA EI, giếng 3-11: các chủng phân lập

### Định danh chủng vi khuẩn *Pseudomonas* phân lập sinh PYO

Xác định trình tự gen mã hoá 16S rRNA của chủng vi khuẩn sinh PYO PS39 và so sánh với các trình tự đã được công bố trên Ngân hàng gen quốc tế. Dữ liệu trình tự gen 16S rRNA của chủng vi khuẩn PS39 được đăng kí trên Ngân hàng gen với mã số KJ579953.

Kết quả so sánh trình tự gen 16S rRNA của chủng PS39 với các chủng vi khuẩn khác trên Genbank chỉ ra độ tương đồng cao từ 93% đến 100% (hình 3). Đặc biệt, chủng vi khuẩn PS39 có độ tương đồng 100% với các chủng *P. aeruginosa* MCCB117 được phân lập từ nước biển của Ấn Độ và chủng *P. aeruginosa* MCCB102 có nguồn gốc từ nước lợ của Ấn độ. Đây là các mẫu được các nhà khoa học Ấn Độ dùng để nghiên cứu thu nhận PYO có khả năng ức chế vi khuẩn *Vibrio* sp. gây bệnh ở tôm sú. Kết hợp đặc điểm hình thái của chủng PS39 với kết quả so sánh trình tự gen 16S rRNA có thể khẳng định chủng PS39 thuộc chi *Pseudomonas* và được đặt tên là *Pseudomonas* sp. PS39.



Hình 3. Cây phát sinh loài của chủng *Pseudomonas* sp. PS39

**Đặc điểm sinh hoá của chủng phân lập**

Để định danh các chủng vi khuẩn Gram (-), bộ Kit 20NE (Biomerieux, Pháp) được sử dụng để nghiên cứu. Chủng vi khuẩn phân lập quan tâm *Pseudomonas* sp. PS39 được sử dụng và kết quả thu nhận so sánh với chủng chuẩn ATCC 27853 và trình bày theo bảng 2 dưới đây. Với chủng PS39, các phản ứng (-): sinh indole (TRP); Urease (URE), arabinose (ARA); mannose (MNE), penylacetic acid (PAC); ở các phản ứng (+): khử NO<sub>3</sub> (NO<sub>3</sub>); chuyển hóa Arginine Dihydrolase (ADH); thủy phân esculin (ESC), gelatin (GEL); chuyển hoá β-galatosidase (PNPG), glucose (GLU), mannitol (MAN), Nacetylglucosamine (NAG), potassium gluconate (GNT), capric acid (CAP), trisodium citrate (CIT).

**Bảng 2. Đặc điểm sinh hóa chủng *Pseudomonas* sp. PS39**

	NO3	TRP	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	CIT	PAC
1	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
2	+	-	V	-	+	-	+	V	-	-	+	+	-	+	+	+	-

1-Chủng *Pseudomonas* sp. PS39; 2 - ATCC 27853 bộ chủng chuẩn của Mỹ, theo kit test - API20NE của BIOMERIEUX; V: tùy theo chủng. (-) âm tính; (+) dương tính

Từ bảng 2 cho thấy đặc điểm sinh hoá của chủng *Pseudomonas* sp. PS39 phân lập giống với đặc điểm sinh hoá của chủng chuẩn *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 từ ATCC. Kết quả này thêm phần khẳng định các kết quả về đã nhận được của chủng *Pseudomonas* sp. PS39 trong các thí nghiệm trước.

**Tách chiết hoạt chất pyocyanin và định lượng**

Để đánh giá khả năng sinh PYO bởi chủng *Pseudomonas* sp. PS39, chủng PS39 được nuôi cấy trong môi trường King A ở 30°C, lắc 200 vòng/phút trong khoảng 5 ngày, tiết sắc tố PYO có màu xanh lá cây (hình 4-A), tan trong nước và chloroform, khuếch tán ra môi trường làm môi trường có màu xanh. Thực hiện tách chiết PYO theo phương pháp mô tả ở trên được minh hoạ như hình 4-B. Dịch chiết thu nhận có màu xanh dương, trong suốt (hình 4-C) hàm lượng được xác định theo phương pháp so màu ở bước sóng 520 nm.



A-Dịch nuôi vi khuẩn tiết PYO



B-Tách chiết PYO



C-Dịch chiết PYO

**Hình 4. Đặc điểm tiết sắc tố xanh của vi khuẩn *Pseudomonas* sp. 39 và tách chiết, thu nhận PYO**

**Khả năng kháng khuẩn của pyocyanin của chủng *Pseudomonas* sp. PS39**

**Khả năng kháng các vi sinh vật kiểm định của PYO**

Nhằm nghiên cứu phổ kháng khuẩn, dịch chiết PYO thu được từ chủng *Pseudomonas* sp. PS39 được kiểm tra hoạt tính ức chế của nó trên các vi sinh vật kiểm định (VSVKD) theo mô tả như phần phương pháp.

Kết quả cho thấy, PYO ức chế sự tăng trưởng của vi khuẩn Gram (-) và nấm ở giá trị MIC thấp hơn (1,625 µg/ml) so với giá trị MIC ức chế vi khuẩn Gram (+) (3,25 và 6,5 µg/ml). Trong khi giá trị MIC của kháng sinh cần để ức chế vi khuẩn cao hơn rất nhiều so với PYO trong nghiên cứu này; ví dụ: để ức chế chủng Gram (+) *E. faecalis* ATCC299212, kháng sinh Streptomycin cần nồng độ gấp 79 lần so với nồng độ MIC của PYO và để ức chế chủng Gram (-) *P. aeruginosa* ATCC27853 thì Streptomycin cần nồng độ cao gấp 158 lần (bảng 3).

**Bảng 3. Nồng độ ức chế tối thiểu của PYO và các kháng sinh đối với vi sinh vật kiểm định**

Nồng độ (µg/ml)	Gram (+) <sup>a</sup>			Gram (-) <sup>b</sup>			Nấm men
	<i>E. faecalis</i> ATCC299212	<i>S. aureus</i> ATCC25923	<i>B. cereus</i> ATCC13245	<i>E. coli</i> ATCC25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	<i>S. enterica</i> ATCC13076	
PYO	3,25	6,5	6,5	1,625	1,625	1,625	1,625
Streptomycin	256	256	128	32	256	128	-
Tetracycline	4	16	64	8	256	256	-
Kanamycin	128	4	8	128	64	16	-
Nystatin	-	-	-	-	-	-	8
Cycloheximide	-	-	-	-	-	-	32

Ghi chú: Gram (+)<sup>a</sup>: *Enterococcus faecalis* ATCC299212, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC 13245. Gram (-)<sup>b</sup>: *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Salmonella enterica* ATCC13076. Dấu -: không thực hiện phản ứng

**Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của PYO đối với các chủng *Vibrio* sp. gây bệnh trên tôm**

Nồng độ ức chế tối thiểu của PYO lên các chủng vi khuẩn bệnh *Vibrio* sp., kháng kháng sinh gây bệnh hoại tử gan tụy trên tôm thẻ chân trắng đã được thử trên 5 chủng vi khuẩn đại diện gây bệnh *Vibrio* sp. bao gồm cả *V. parahaemolyticus* (VpKG12T1, VpST22T, VpCMT31) và *V. harveyi* (Vh3) và *V. alginolyticus* (Val) mang các

CÔNG NGHỆ VI SINH VÀ LÊN MEN

đặc tính gen quan tâm để đánh giá khả năng ức chế tối thiểu của dịch chiết PYO đối với các chủng vi khuẩn này. Từ bảng 4 kết quả cho thấy, 2 chủng VpKG12T1 và VpST22T bị ức chế sinh trưởng hoàn toàn ở nồng độ tối thiểu ở 1,25 µg/ml, 3 chủng còn lại gồm VpCMT31, Vh3 và Val bị ức chế ở nồng độ 1,75 µg/ml.

**Bảng 4. Nồng độ ức chế tối thiểu, MIC (µg/ml), của PYO đối với các chủng *Vibrio* sp.**

	VpKG12T1	VpST22T	VpCMT31	Vh3	Val
PYO (µg/ml)	1,25	1,25	1,75	1,75	1,75

\* Ghi chú: Vp: *Vibrio parahaemolyticus*; Vh: *Vibrio harveyi*; Val: *Vibrio alginolyticus*

**Nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) của PYO đối với các chủng *Vibrio* gây bệnh trên tôm**

Các chủng *Vibrio* sp. sau 24 giờ được ủ với PYO ở các nồng độ khác nhau từ 0,4 đến 5 µg/ml, quan sát độ đục cho thấy, tất cả 5 chủng đều sinh trưởng được ở nồng độ 1,2 µg/ml nhưng trong đó 2 chủng Val và Vh3 sinh trưởng được cả ở nồng độ dịch chiết PYO cao hơn là 1,5 µg/ml.

Sau khi cấy dịch vi khuẩn này lên đĩa thạch TCBS, kết quả được ghi lại ở bảng 6 dưới đây:

**Bảng 5. Sự sinh trưởng của các chủng *Vibrio* sp. trong môi trường APW bổ sung PYO**

<i>Vibrio</i> sp. 1-2.10 <sup>5</sup> cfu/ml	Nồng độ của dịch chiết vi khuẩn PYO (µg/ml)									
	0,4	0,8	1,2	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	5,0
Vh3	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Val	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
VpKG12T1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
VpST22T	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
VpCMT31	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

\* Ghi chú: (+) sinh trưởng; (-) không sinh trưởng.

Từ kết quả ở bảng 6 cho thấy ở nồng độ PYO 2 µg/ml đã ức chế các chủng VpCMT31, VpKG12T1 và VpST22T; với chủng Vh3 và Val đã không sinh trưởng được ở nồng độ PYO 2,5µg/ml. Như vậy, có thể khẳng định giá trị diệt khuẩn tối thiểu MBC đến 99,9% của dịch chiết PYO đối với VpCMT31, VpKG12T1 và VpST22T là 2 µg/ml; và đối với Vh3 và Val là 2,5µg/ml.

**Xác định đường kính vòng kháng khuẩn của PYO**

Hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết PYO còn được đánh giá dựa vào khả năng ức chế sự tăng trưởng của các chủng *Vibrio* sp. theo phương pháp khuếch tán đĩa thạch.

**Bảng 6. Khả năng kháng các chủng *Vibrio* sp. gây bệnh trên tôm của PYO**

PYO (µg/khoanh giấy)	Đường kính vùng ức chế (mm) của các chủng <i>Vibrio</i> sp.				
	VpCMT31	VpST22T	VpKG12T1	Vh3	Val
2,6	26,0 ± 0,06	28,0 ± 0,06	26,2 ± 0,07	25,3 ± 0,05	31,7 ± 0,12
1,3	23,3 ± 0,03	25,2 ± 0,05	22,2 ± 0,05	23,6 ± 0,05	28,5 ± 0,07
0,65	21,6 ± 0,05	22,3 ± 0,04	21,7 ± 0,05	22,1 ± 0,05	27,0 ± 0,07
0,33	19,2 ± 0,05	20,6 ± 0,03	18,2 ± 0,05	18,2 ± 0,05	25,4 ± 0,07
0,16	17,9 ± 0,05	19,1 ± 0,05	17,2 ± 0,05	16,3 ± 0,05	18,3 ± 0,06
0,08	15,0 ± 0,05	16,3 ± 0,05	14,2 ± 0,05	13,7 ± 0,05	15,6 ± 0,05
0,04	14,0 ± 0,05	12,2 ± 0,05	11,7 ± 0,05	9,9 ± 0,05	14,2 ± 0,05
0,02	5,7 ± 0,03	0,0	0,0	0,0	6,0 ± 0,01
Gen (10)	9,0 ± 0,02	9,0 ± 0,01	11 ± 0,05	6,0 ± 0,01	7,0 ± 0,01

Kết quả nhận được (bảng 6) cho thấy, ở nồng độ PYO dưới 0,65 µg/khoanh giấy (đường kính 6 mm), đường kính vòng kháng khuẩn đa số đều ≤ 20 mm, trong giải nồng độ từ 0,65 - 1,3 µg/khoanh giấy không có sự khác biệt nhiều trên một chủng, nhưng từ nồng độ 2,6 µg/khoanh giấy đường kính vòng kháng khuẩn tăng lên rõ rệt và đạt khoảng 25 - 32 mm, trong khi ở kháng sinh đối chứng Gentamycine (Gen) 10 µg/khoanh giấy đường kính vòng kháng khuẩn rất nhỏ dao động từ 6-11 mm. Priyaja và đồng tác giả (2014) đã công bố tính kháng của PYO thu được từ vi khuẩn *Pseudomonas* phân lập từ môi trường nước lợ với 7 loài *Vibrio*: *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. mediterrani* và *V. nereis* với đường kính vòng kháng khuẩn từ 13,5 đến 31,0 mm. Thêm nữa, chủng *P. aeruginosa* và PYO đã được ứng dụng giúp gia tăng sức khỏe và hệ miễn dịch của tôm bạc *Penaeus latissulcatus* khi cho tôm ăn với liều lượng 10<sup>5</sup> cfu/ml. Vi khuẩn *P. aeruginosa* YC58 cũng liên kết hoạt động với hệ vi sinh của ấu trùng hàu *Cortez*, *C. Corteziensis*, giúp gia tăng tỷ lệ sống và tăng trưởng của hàu ngọc *Pinctada mazatlanica* (Luna-González et al., 2011; Ngo et al., 2009). Hiện nay có rất ít công bố về khả năng kháng lại vi khuẩn *Vibrio* trong thủy sản, đặc biệt *Vibrio* sp. gây bệnh trên tôm của PYO. Do đó, khả năng ức chế và diệt *Vibrio* gây bệnh tôm của PYO sinh ra bởi chủng *Pseudomonas* sp. PS39 trong nghiên cứu này đã cung cấp thêm thông tin về ứng dụng của PYO trong ngăn ngừa bệnh nhiễm khuẩn *Vibrio* trong nuôi tôm nước lợ.

**KẾT LUẬN**

Đã phân lập và định danh được chủng *Pseudomonas* sp. PS39 sinh hoạt chất PYO cao, có trình tự 16s rRNA tương đồng cao đến 100% với trình tự gen sẵn có trên NCBI. Pyocyanin tách chiết từ dịch nuôi chủng *Pseudomonas* sp. PS39 có khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh. Pyocyanin thể hiện sự ức chế tăng trưởng của cả vi khuẩn Gram (-), Gram (+) và nấm men (nhóm VSVKD) ở nồng độ PYO tối thiểu (MIC) là từ 1,625 - 6,5 µg/ml. Vi khuẩn *Vibrio* sp. gây bệnh ở tôm bị ức chế sinh trưởng hoàn toàn ở nồng độ tối thiểu 1,25 µg/ml đến 1,75 µg/ml và bị diệt khuẩn ở nồng độ từ 2 hoặc 2,5 µg/ml trở lên. Nghiên cứu này tạo tiền đề cần thiết cho việc phát triển ứng dụng hoạt chất trong việc phòng trị bệnh cho tôm nuôi nước lợ.

**Lời cảm ơn:** Công trình được thực hiện nhờ nguồn kinh phí của đề tài: “Nghiên cứu sản xuất và ứng dụng chất diệt khuẩn sinh học pyocyanin thay thế kháng sinh trong nuôi tôm nước lợ” thuộc Chương trình CNSH thủy sản, Bộ NN&PTNT.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

- Angell S, Bench BJ, Williams H, Watanabe CMH (2006). Pyocyanin Isolated from a Marine Microbial Population: Synergistic Production between Two Distinct Bacterial Species and Mode of Action. *Chem Biol* 13: 1349-1359.
- Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 45: 493-496.
- Essar DW, Eberly L, Hadero A, Crawford IP (1990). Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. *J Bacteriol* 172: 884-900.
- Hadacek F, Greger H (2000) Testing of antifungal natural products: Methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochem Anal* 11: 137-147.
- Hucker GJ (1921). A New Modification and Application of the Gram Stain. *J Bacteriol* 38: 599.
- Jayaseelan S, Ramaswamy D, Dharmaraj S (2014). Pyocyanin: production, applications, challenges and new insights. *World J Microbiol Biotechnol* 30: 1159-1168.
- King EO, Ward MK, Raney DE (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J Lab Clin Med.* 44: 301-307.
- Luna-González A, González-Ocampo HA, Campa-Córdova AI, Mazón-Suastegui JM, Ascencio F, Aguirre-Guzmán G (2011). Effect of probiotic bacteria on survival and growth of Cortez oyster larvae, *Crassostrea corteziensis* (Bivalvia: Ostreidae). *Rev Biol Trop* 59: 183-191.
- Meyer JM (2000). Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. *Arch Microbiol* 174: 135-142.
- Ngo H, Buller N, Fotadar R (2009). Effects of probiotics (*Pseudomonas synxantha* and *P. aeruginosa*) on the growth, survival and immune parameters of juvenile western king prawns (*Penaeus latisulcatus* Kishinouye, 1896). *Aqua Res* 40: 590-602.
- Priyaja P, Jayesh P, Correya NS, Sreelakshmi B, Sudheer NS, Philip R, Singh ISB (2014). Antagonistic effect of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from various ecological niches on *Vibrio* species pathogenic to crustaceans. *J Coast Life Med* 2: 76-84.
- Reyes EAP, Bale MJ, Cannon WH, Matsen JM (1981). Identification of *Pseudomonas aeruginosa* by pyocyanin production on Tech agar. *J Clin Microbiol* 13: 456-458.
- Spilker T, Coenye T, Vandamme P, LiPuma JJ (2004). PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 42(5): 2074-2079.

**ISOLATION OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA BIOSYNTHESIZING PYOCYANIN ANTIBACTERIAL COMPOUND**

**Nauven Quana Vinh<sup>1,2</sup>, Nauven Chi Thuan<sup>1</sup>, Nguyen Hoang Uyen<sup>1</sup>,  
Nguyen Huyen Trang<sup>1</sup>, Nguyen Thi Thanh Loi<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology (VAST)

<sup>2</sup> Genetic testing service joint stock company (GENTIS)

**SUMMARY**

*Pseudomonas aeruginosa* attracts attention as bacteria with many applications in biotechnology and capable of producing antibacterial secondary metabolism compounds. Pyocyanin (PYO) biosynthesized from *Pseudomonas aeruginosa*, is a secondary natural metabolite having antimicrobial and antifungal activity. This study aims to isolate the strains of *Pseudomonas aeruginosa* from aquaculture water samples and evaluate the antibacterial ability of PYO produced from this bacterium. 11 strains were isolated from these samples including the PS1; PS2; PS3; PS4; PS5; PS6; PS11; PS33; PS35; PS39 và PS44. In those strain, *Pseudomonas* sp. PS39 strain was sequenced 16S rRNA gene and the sequence was registered on GenBank with corresponding code KJ579953. Comparison with the selected available sequences on GenBank, the *Pseudomonas* sp. PS39 sequence had a high homology that is 100% with the gene sequence of *P. aeruginosa* strains MCCB117 (EF062511) and *P. aeruginosa* MCCB102 (EF062514). The results from API 20NE test showed that *Pseudomonas* sp. PS39 strain was highly similar to the reference *P. aeruginosa* strain ATCC 27853. The PYO of *Pseudomonas* sp. PS39 strain is extracted from its culture and inhibited the reference bacteria, the strains *Vibrio* sp. that is antibiotic resistance, cause of disease in brackish water shrimp.

**Keywords:** *P. aeruginosa*; antibacteria, phenazine, pyocyanin, *Vibrio* sp.

\* Author for correspondence: Tel: +84-868796499; Email: thithanhloi.nguyen@gmail.com