

HÌNH THÁI VÀ KHẢ NĂNG SINH ĐỘC TỔ CYLINDROSPERMOPSISIN CỦA CÁC CHỦNG VI KHUẨN LAM PHÂN LẬP TỪ MỘT SỐ AO HỒ VIỆT NAM

Nguyễn Thị Thu Liên^{1,2}, Nguyễn Thị Cảnh¹, Lê Thị Trân Nhi¹

¹Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

²Viện Tài nguyên, Môi trường và Công nghệ sinh học, Đại học Huế

TÓM TẮT

Sự hiện diện sinh khối của vi khuẩn lam đã được biết nhiều trên thế giới ở những ao hồ ưu dưỡng, những hồ chứa nước uống, và liên quan một cách đáng kể đến chất lượng nước. Một số loài vi khuẩn lam có khả năng sản sinh ra độc tố ảnh hưởng trực tiếp hoặc gián tiếp đến sức khỏe con người. Độc tố cylindrospermopsin được tìm thấy đầu tiên do loài vi khuẩn lam *Cylindrospermopsis raciborskii* sản sinh ra, nhưng đến nay loại độc tố này cũng đã được phát hiện thấy ở một số loài vi khuẩn lam khác. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phân lập 28 chủng vi khuẩn lam có tiềm năng sinh độc tố cylindrospermopsin thuộc các chi *Cylindrospermopsis*, *Aphanizomenon*, *Anabaena* và *Raphidiopsis* từ một số thủy vực ở Việt Nam, phân tích hình thái và thăm dò khả năng sinh độc tố của chúng bằng phép thử ELISA. Dựa vào sự giống nhau về hình thái giữa các chủng chúng tôi xếp chúng vào 6 loài: *Cylindrospermopsis raciborskii* (20 chủng), *Raphidiopsis curvata* (1 chủng), *R. mediterranea* (1 chủng), *Aphanizomenon* sp. (1 chủng), *Anabaena circinalis* (4 chủng), *Anabaena smithii* (1 chủng). Phân tích độc tố cho thấy, chỉ có 14 chủng (thuộc loài *Cylindrospermopsis raciborskii*) phát hiện thấy có cylindrospermopsin trong nuôi cấy. Trong cùng một loài, mặc dù hình thái không khác biệt, khả năng sinh độc tố và hàm lượng độc tố là khác nhau giữa các chủng.

Từ khóa: *Cylindrospermopsis*, *Cylindrospermopsis raciborskii*, vi khuẩn lam, Việt Nam

MỞ ĐẦU

Vi khuẩn lam hiện diện ở nhiều nơi trên thế giới, ở những ao hồ ưu dưỡng, những hồ chứa nước uống, và liên quan một cách đáng kể đến chất lượng nước. Một số loài vi khuẩn lam có khả năng phát triển mạnh trong các thủy vực gây nên hiện tượng nước nở hoa (Saker *et al.*, 2001; Evangelista *et al.*, 2007). Thêm nữa một số loài còn có thể sản sinh ra độc tố. Độc tố vi khuẩn lam có thể gây nhiễm độc hoặc thậm chí có thể gây chết động vật nếu uống phải nước có chứa độc tố. Do vậy, nó có thể ảnh hưởng trực tiếp hoặc gián tiếp đến sức khỏe con người (Chorus, Bartram, 1999; WHO 2003; Evangelista *et al.*, 2007).

Cylindrospermopsin là một loại độc tố của vi khuẩn lam thuộc nhóm alkaloid, có tác dụng ức chế sự sinh tổng hợp protein. Độc tố này có thể gây tổn thương cho gan, thận, phổi và ruột của động vật có vú. Nó cũng được biết là có thể gây ra những tổn thương di truyền như gây đột biến mất nhiễm sắc thể hay đứt gãy DNA (Bourke *et al.*, 1983; Hawkins *et al.*, 1997; Chorus, Bartram, 1999; Scott, 2000; Young *et al.*, 2008). Độc tố cylindrospermopsin được tìm thấy đầu tiên do loài vi khuẩn lam *Cylindrospermopsis raciborskii* sản sinh ra, nhưng

đến nay loại độc tố này cũng đã được phát hiện thấy ở một số loài vi khuẩn lam khác thuộc các chi *Aphanizomenon*, *Anabaena*, *Raphidiopsis*, *Umezakia* và *Lyngbya* (Harada *et al.*, 1994; Banker *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2001; Fastner *et al.*, 2003; Preußel *et al.*, 2006; Spoof *et al.*, 2006; Seifert *et al.*, 2007; Nguyen, 2007).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phân lập các chủng vi khuẩn lam có tiềm năng sinh độc tố cylindrospermopsin thuộc các chi *Cylindrospermopsis*, *Aphanizomenon*, *Anabaena* và *Raphidiopsis* từ một số thủy vực ở Việt Nam, phân tích hình thái và bước đầu thăm dò khả năng sinh độc tố của chúng bằng phép thử ELISA. Kết quả nghiên cứu sẽ làm tiền đề cho việc đề xuất biện pháp quản lý nhóm loài độc hại này trong các thủy vực.

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Mẫu để phân lập được thu ngẫu nhiên ở các thủy vực: sông Hương, Sông Như Ý, Hồ Tịnh Tâm (Thừa Thiên Huế), Biển Hồ, hồ Đức An (Gia Lai) và hồ Trị An (Đồng Nai) và hồ Hoàn Kiếm (Hà Nội).

Sự phân loại loài vi khuẩn lam dựa vào hệ thống phân loại mới của Hoffmann và đồng tác giả (2005);

định loại và mô tả loài được dựa trên mẫu tự nhiên và cả mẫu vật nuôi cấy nhờ kính hiển vi quang học.

Các chủng nuôi được phân lập bằng phương pháp phân tách tế bào đơn sử dụng kính hiển vi đảo ngược (Olympus, USA) và được nuôi cấy trong điều kiện nhiệt độ $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, cường độ ánh sáng là 2000 - 3000 lux và thời gian chiếu sáng 10 h/ngày.

Phân tích hàm lượng độc tố cylindrospermopsin trong các mẫu nuôi cấy bằng phương pháp ELISA (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay) (Ueno *et al.*, 1996), sử dụng kit thương mại (Arbraxis, USA). Thí nghiệm được tiến hành tại Phòng thí nghiệm Các hợp chất thứ cấp (Viện Tài nguyên, Môi trường và Công nghệ sinh học, Đại học Huế). Phá vỡ tế bào bằng sóng siêu âm trong 3 phút, ly tâm 10000 rpm trong 10 phút và các bước tiếp theo được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tiến hành đo mật độ quang của dịch lọc ở bước sóng 450 nm trên máy test ELISA (BIO-RAD, USA). Hàm lượng cylindrospermopsin trong mẫu được so sánh với đường chuẩn của cylindrospermopsin.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Trong 59 mẫu thu từ tháng 8/2008 đến tháng 6/2009, chúng tôi phân lập được 28 chủng thuộc 6 loài: *Cylindrospermopsis raciborskii* (20 chủng) thuộc chi *Cylindrospermopsis*, *Raphidiopsis curvata* (1 chủng), *R. mediterranea* (1 chủng) thuộc chi *Raphidiopsis*, *Aphanizomenon* sp. (1 chủng) thuộc chi *Aphanizomenon*, *Anabaena circinalis* (4 chủng), *Anabaena smithii* (1 chủng) thuộc chi *Anabaena*. Tên chủng và nguồn gốc chủng được trình bày ở bảng 1.

Mô tả hình thái các loài vi khuẩn lam tiềm năng sinh độc tố cylindrospermopsin trong các thủy vực nghiên cứu

Anabaena circinalis Rabenth. Ex Born et Flah 1886, tên chủng: ABC11TA, ABC12TA, ABC13TA, ABC14TA.

Sợi đơn độc, sống trôi nổi, cuộn xoắn rộng, rộng 70 - 120 μm , đôi lúc có vỏ bọc nhỏ chứa nhiều sợi đơn. Đa số các sợi không có chất nhầy. Các tế bào hình trứng và hình cầu, dài 7 - 9 μm , rộng 7 - 8 - 11 μm , bên trong có các không bào khí và có màu xanh lam. Các tế bào dị hình (heterocyte) hình cầu, rộng bằng các tế bào dinh dưỡng. Các bào tử có dạng ovan, thon dài hay hình trụ ngắn, đôi lúc có đỉnh hình nón, 20 - 28 \times 15 - 21 μm . Nuôi cấy của các

chúng đều có màu xanh lam đậm. Hình thái các chủng đều giống nhau.

Mẫu được phân lập từ hồ Trị An (Đồng Nai).

Anabaena smithii (Kom.) M. Watanabe 1991, tên chủng ABSMTA.

Sợi dạng thẳng, đơn độc, dính nhau tạo thành khối nhầy, sống trôi nổi. Các tế bào dinh dưỡng hình trứng, chiều rộng lớn hơn chiều dài, có không bào khí với chiều rộng 9 - 15 μm , chiều dài 9 - 10 μm . Các tế bào dị hình (heterocyte) hình cầu, hơi nhỏ hơn tế bào dinh dưỡng, có đường kính 7 - 12 μm . Các bào tử (akinetete) có hình cầu, có đường kính 15 - 30 μm .

Mẫu được phân lập từ hồ Trị An (Đồng Nai).

***Aphanizomenon* sp.**, tên chủng APDD.

Sợi đơn độc, thẳng hay hơi cong, dài từ 100-300 μm , eo thắt rõ giữa vách ngăn ngang các tế bào. Sợi bất đối xứng: các tế bào cuối một đầu sợi thuôn nhọn, đầu kia thì thuôn nhưng tròn.

Tế bào dinh dưỡng hình trụ chứa những không bào không khí, đường kính 3 - 8 \times 3 - 5 μm . Tế bào dị hình hình cầu đường kính 3,5 - 5 μm . Bào tử chưa xuất hiện.

Mẫu được phân lập từ đầm Đập Đá, Huế.

Cylindrospermopsis raciborskii (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju 1972, tên chủng: CR1DD, CR2DD, CR3DD, CR4DD, CR5DD, CR1NY, CR2NY, CR1CB, CR1BHA, CR1BHB, CR2BHB, CR3BHB, CR4BHB, CR5BHB, CR6BHB, CR7BHB, CR8BHB, CR1DAI, CR2DAI, CR3DAI.

Sợi đơn độc, thẳng hoặc hơi cong, trôi nổi tự do, dài khoảng 70 - 250 μm . Sợi thường hơi eo thắt ở vách ngăn ngang, và hơi thuôn nhẹ về phía cuối sợi, với những tế bào tận cùng hình trụ tròn. Tế bào hình trụ, với nhiều không bào khí, vách tế bào nhìn thấy rõ, kích thước: 2,5 - 18 \times 2,5 - 3,75 μm .

Tế bào dị hình ở đầu sợi, hình nón hay hình mũ tên, kích thước: 6 - 7(8) \times 2 - 3,75 μm . Tế bào dị hình mọc ra từ tế bào dinh dưỡng tận cùng, ở một đầu hoặc cả 2 đầu của sợi. Bào tử hình oval dài, 10 - 18 \times 3,75 - 5 μm , đơn độc, hoặc hình thành một cặp hay 3 tế bào xếp thành một dãy, bên cạnh hoặc cũng có thể cách xa tế bào dị hình.

Hình thái của từng chủng đều mang đặc điểm đặc trưng của loài, không khác biệt nhiều, kể cả những chủng từ các vùng địa lý khác nhau.

Mẫu được phân lập từ ở Đập Đá (sông Hương), sông Như Ý ở Thừa Thiên Huế; Hồ Trị An, Đồng Nai; Biển Hồ, hồ Đức An, Gia Lai.

Raphidiopsis curvata Fritsch et Rich 1929, tên chủng RPCTT.

Sợi đơn độc, sống trôi nổi, hơi uốn cong, không eo thắt ở vách ngăn ngang tế bào, dài 100 - 150 µm, đôi khi dài hơn 1 cm trong nuôi cấy, thuôn nhọn ở một hoặc cả hai đầu sợi.

Tế bào rộng khoảng 2 - 5 µm. Chưa thấy có bào tử.

Mẫu được phân lập từ hồ Tịnh Tâm ở Thừa Thiên Huế.

Raphidiopsis mediterranea Skuja 1938, tên chủng RPMH.

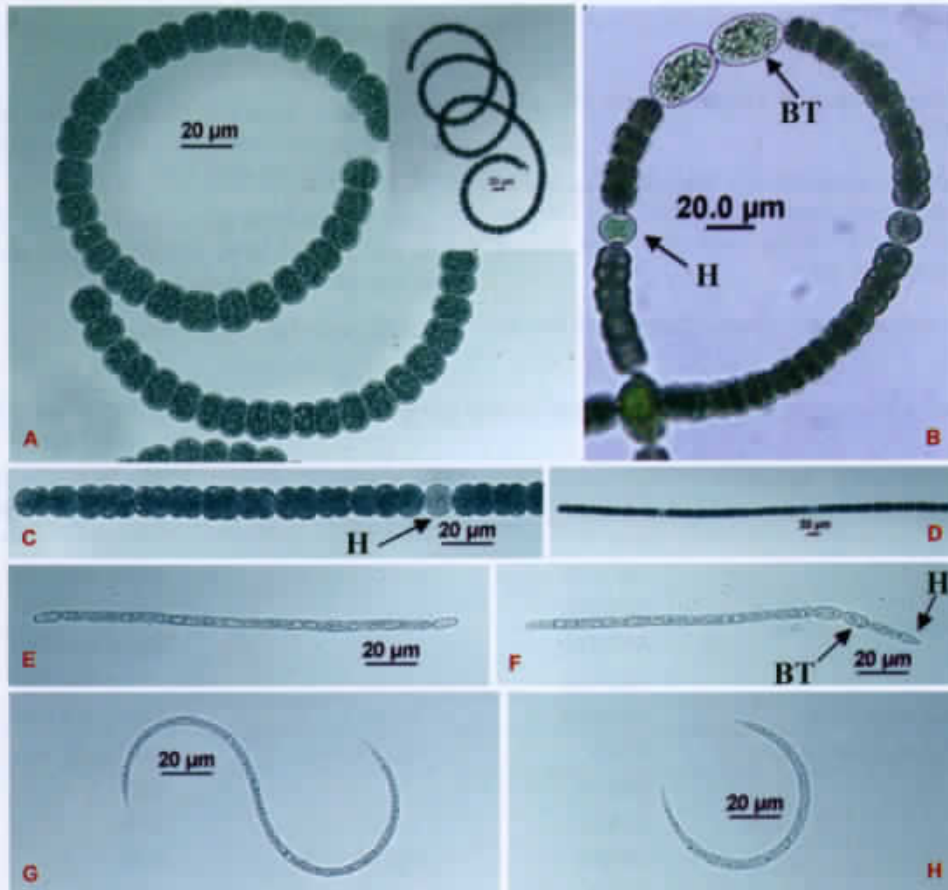
Sợi thẳng hoặc hơi cong, trôi nổi, thường ngắn, dài khoảng 100 - 150 µm, không có eo thắt giữa các vách tế bào, thuôn nhọn lại ở hai đầu sợi.

Tế bào dinh dưỡng dài 2,4 - 6 µm và rộng 3,5 - 5 µm. Bào tử hình ovan, dài 8,5 - 9 µm, rộng 5,5 - 6 µm, đơn độc hoặc thành cặp.

Mẫu phân lập từ điểm Đập Đá.

Bảng 1. Danh sách các chủng vi khuẩn lam phân lập từ các thủy vực nghiên cứu: tên chủng, nguồn gốc và hàm lượng độc tố.

STT	Loài	Chủng	Nguồn gốc	Hàm lượng độc tố cylindrospermopsin (ng/mg trọng lượng tươi)	
1		ABC11TA		không phát hiện	
2	<i>Anabaena circinalis</i>	ABC12TA	Trị An	không phát hiện	
3		ABC13TA		không phát hiện	
4		ABC14TA		không phát hiện	
5		ABSMTA		Trị An	không phát hiện
6	<i>Aphanizomenon sp.</i>	APDD	Đập Đá, Huế	không phát hiện	
7		CR1DD		20,31	
8		CR2DD		5,72	
9		CR3DD	Đập Đá, Huế	6,39	
10		CR4DD		70,83	
11		CR5DD		20,95	
12		CR1NY			6,05
13		CR2NY		Như Ý, Huế	6,73
14		CR1CB		5,25	
15		CR1BHA		không phát hiện	
16	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	CR1BHB		4,43	
17		CR2BHB		không phát hiện	
18		CR3BHB		không phát hiện	
19		CR4BHB	Biển Hồ, Gia Lai	9,83	
20		CR5BHB		không phát hiện	
21		CR6BHB		26,32	
22		CR7BHB		không phát hiện	
23		CR8BHB		42,85	
24		CR1DAI		không phát hiện	
25		CR2DAI	Đức An, Gia Lai	3,52	
26		CR3DAI		12,92	
27	<i>Raphidiopsis curvata</i>	RPCTT	Tịnh Tâm, Huế	không phát hiện	
28	<i>Raphidiopsis mediterranea</i>	RPMH	Đập Đá, Huế	không phát hiện	



Hình 1. Hình thái các loài vi khuẩn lam nghiên cứu: A. Sợi *Anabaena circinalis*; B. Sợi *Anabaena circinalis* có chứa bào tử và tế bào dị hình; C. Sợi *Anabaena smithii* có chứa tế bào dị hình; D. Sợi *Anabaena smithii*; E. Sợi *Cylandrospermopsis raciborskii* có chứa tế bào dị hình ở hai đầu; F. Sợi *Cylandrospermopsis raciborskii* có chứa bào tử và tế bào dị hình; G, H: Sợi *Raphidiopsis curvata*; H: tế bào dị hình; BT. Bào tử.

Kết quả phân tích độc tố

Kết quả phân tích hàm lượng độc tố cylindrospermopsin bằng kỹ thuật ELISA đối với các chủng phân lập được trình bày ở bảng 1. Kết quả cho thấy, không phát hiện thấy độc tố cylindrospermopsin trong nuôi cấy các chủng của các loài *Anabaena circinalis*, *Anabaena smithii*, *Aphanizomenon* sp., *Raphidiopsis curvata*, *Raphidiopsis mediterranea*. Độc tố chỉ được phát hiện trong nuôi cấy một số chủng của loài *Cylandrospermopsis raciborskii*: 14 chủng có độc tố, 6 chủng không phát hiện độc tố. Nhìn chung, hàm lượng độc tố trong các chủng không giống nhau, cao nhất ở chủng CR4DD (70,83 ng/mgWW) và thấp nhất ở chủng CR2DAI (3,52

ng/mgWW). Các chủng phân lập từ Huế (Đập Đá và Như Ý) đều có độc tố. Trong 9 chủng phân lập từ Biển Hồ chỉ 4 chủng có độc tố, còn 3 chủng ở Đức An thì 1 chủng không độc. Khả năng sinh độc tố của các chủng nuôi cấy không phụ thuộc vào đặc điểm địa lý của địa điểm thu mẫu.

Từ kết quả nghiên cứu trên, có thể kết luận rằng trong số các loài vi khuẩn lam nghiên cứu chỉ có loài *Cylandrospermopsis raciborskii* là có khả năng sinh độc tố cylindrospermopsin trong điều kiện thí nghiệm của chúng tôi. Tuy nhiên, không phải tất cả các chủng phân lập trong cùng một loài đều có khả năng này. Do vậy, có thể nói khả năng sinh độc tố cylindrospermopsin của vi khuẩn lam không thể chỉ

xác định dựa vào đặc điểm hình thái loài mà cần phải có những phân tích sâu hơn về độc tố và đặc trưng phân tử để có thể khẳng định chính xác khả năng sinh độc tố của loài. Từ đó, chúng ta mới có thể xác định chính xác mức độ ô nhiễm độc tố vi khuẩn lam này trong các thủy vực nghiên cứu.

Lời cảm ơn: Các tác giả xin chân thành cảm ơn ThS. Nguyễn Văn Song (Viện Tài nguyên, Môi trường và Công nghệ sinh học, Đại học Huế) đã giúp đỡ để thực hiện các phân tích ELISA. Công trình được thực hiện nhờ vào kinh phí hỗ trợ của Bộ Giáo dục và Đào tạo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Banker RS, Carmeli O, Hadas B, Teltsch R, Porat R, Sukenik A (1997) Identification of cylindrospermopsin in *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanophyceae) isolated from Lake Kinneret, Israel. *J Phycol* 33(4): 613-616.

Bourke ATC, Hawes RB, Neilson A, Stallman ND (1983) An outbreak of hepatoenteritis (the Palm Island mystery disease) possibly caused by algal intoxication. *Toxicon* 3: 45-48.

Chorus I, Bartram J (1999) *Toxic Cyanobacteria in Water*, E&FN Spon, London.

Evangelista V, Barsanti L, Frassanito AM, Passarelli V, Gualtieri P (2007) *Algal Toxins: Nature, Occurrence, Effect and Detection*. The NATO Science for Peace and Security Programme, Italia.

Fastner J, Heinze R, Humpage RA, Mischke U, Eaglesham KG, Chorus I (2003) Cylindrospermopsin occurrence in two German lakes and preliminary assessment of toxicity and toxin production of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates. *Toxicon* 42(3): 313-321.

Harada K, Ohtani I, Iwamoto K, Suzuki M, Watanabe MF, Watanabe M, Terao K (1994) Isolation of cylindrospermopsin from a cyanobacterium *Umezakia natans* and its screening method. *Toxicon* 32(1): 73-84.

Hawkins RP, Chandrasena RN, Jones JG, Humpage RA, Falconer RI (1997) Isolation and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* from an Ornamental lake. *Toxicon* 35(3): 341-346.

Hoffmann L, Komárek J, Kaštovský J (2005) System of cyanoprokaryotes (Cyanobacteria) - state in 2004. *Arch Hydrobiol Suppl 159/Algal Stud* 117: 95-115.

Li R, Carmichael WW, Brittain S, Eaglesham GK, Shaw GR, Liu Y, Watanabe MM (2001) First report of the cyanotoxins cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from *Raphidopsis curvata* (Cyanobacteria). *Phycology* 37(6): 1121-1126.

Nguyen TT Lien (2007) *Planktic Cyanobacteria from freshwater localities in Thuathien-Hue province, Vietnam*, Ph. D. thesis, Section of Phycology Department of Biology, Faculty of Science University of Copenhagen.

Preußel K, Stüken A, Wiedner C, Chorus I, Fastner J (2006) First report on cylindrospermopsin producing *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria) isolated from two German lakes. *Toxicon* 47(2): 156-162.

Saker LM, Griffiths DJ (2001) Occurrence of blooms of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju from a north Queensland domestic water supply. *Mar Freshwater Res* 52(6): 907-915.

Scott M (2000) Cylindrospermopsin. Review of Toxicological Literature. Final Report, Integrated Laboratory Systems: 1-29.

Seifert M, McGregor G, Eaglesham G, Wickramasinghe W, Shaw G (2007) First evidence for the production of cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin by the freshwater benthic cyanobacterium, *Lyngbya wollei* (Farlow ex Gomont) Speziale and Dyck. *Harmful Algae* 6(1): 73-80.

Spoof L, Berg KA, Rapala J, Lahti K, Lepistö L, Metcalf JS, Codd GA, Meriluoto J (2006) First observation of cylindrospermopsin in *Anabaena lapponica* isolated from the boreal environment (Finland). *Environ Toxicol* 21 (6): 552-560.

Ueno Y, Nagata S, Tsutsumi T, Hasegawa A, Watanabe MF, Park HH, Chen GC, Chen G, Yu SZ (1996) Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Hainan and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogenesis* 17: 1317-1321.

WHO (2003) *Guidelines for drinking-water quality-Second edition, Addendum to Volume 2 Health criteria and other supported information*, World Health Organisation, Geneva.

Young FM, Micklem J, Humpage AR (2008) Effects of blue-green algal toxin cylindrospermopsin (CYN) on human granulosa cells in vitro. *Reprod Toxicol* 25: 374-380.

MORPHOLOGY AND CYLINDROSPERMOPSIN - PRODUCING ABILITY OF CYANOBACTERIA STRAINS ISOLATED FROM SOME LAKES AND PONDS IN VIETNAM

Nguyễn Thị Thu Liên^{1,2,*}, Nguyễn Thị Canh¹, Lê Thị Trần Nhi¹

¹College of Sciences, Hue University

²Institute of Resources, Environment and Biotechnology, Hue University

SUMMARY

Occurrence of cyanobacteria have been found worldwide in eutrophic freshwaters, drinking water reservoirs and can significantly deteriorate the quality of water. Some cyanobacterial species are known to produce toxins affected directly or indirectly to human health. Cylindrospermopsin was first found in *Cylindrospermopsis raciborskii*. Currently, cylindrospermopsin was found in other cyanobacteria. In this study, 28 strains of potential cylindrospermopsin - producing cyanobacteria were isolated from some freshwater bodies in Vietnam. Based on morphology, 28 isolated strains were classified in 6 species: *Cylindrospermopsis raciborskii* (20 strains), *Raphidiopsis curvata* (1 strain), *R. mediterranea* (1 strain), *Aphanizomenon* sp. (1 strain), *Anabaena circinalis* (4 strains) and *Anabaena smithii* (1 strain). Cylindrospermopsin was found in 14 cultured strains of *Cylindrospermopsis raciborskii* by ELISA. In the same species, the toxin producing ability and concentration were different among the strains.

Keywords: Cyanobacteria, cylindrospermopsin, *Cylindrospermopsis raciborskii*, Vietnam

* Author for correspondence: Tel: 84-54-3832665; E-mail: nthulien@yahoo.com