

BỘ GIÁO DỤC ĐÀO TẠO VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

.....o0o.....

HOÀNG THỊ BÍCH

PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN CHỦNG VI KHUẨN CỘNG SINH VỚI
TUYẾN TRÙNG KÝ SINH GÂY BỆNH CÔN TRÙNG
STENERNEMA SP.TĐ3 Ở TAM ĐẢO, VĨNH PHÚC CÓ KHẢ NĂNG
KHÁNG KHUẨN, KHÁNG NẤM

LUẬN ÁN THẠC SỸ SINH HỌC

Hà Nội, 2010

BỘ GIÁO DỤC ĐÀO TẠO VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

.....o0o.....

HOÀNG THỊ BÍCH

PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN CHỦNG VI KHUẨN CỘNG SINH VỚI
TUYẾN TRÙNG KÝ SINH GÂY BỆNH CÔN TRÙNG
STENERNEMA SP.TĐ3 Ở TAM ĐẢO, VĨNH PHÚC CÓ KHẢ NĂNG
KHÁNG KHUẨN, KHÁNG NẤM

LUẬN ÁN THẠC SỸ SINH HỌC

Hà Nội, 2010

MỞ ĐẦU

Ngày nay, nhờ sự có mặt của nhiều kháng sinh có tác dụng diệt khuẩn mạnh nên đã góp phần giải quyết được nhiều bệnh nhiễm trùng mắc phải. Tuy nhiên tỷ lệ đề kháng kháng sinh của vi khuẩn đang ngày càng tăng cao (ở Mỹ: khoảng 70%). Theo ước tính của các Trung tâm kiểm soát bệnh (Centers for Disease Control - CDC) của Mỹ, hàng năm ở Mỹ có khoảng 90 000 ca tử vong/ 2 triệu ca mắc bệnh nhiễm trùng [1].

Sự kháng thuốc của nhiều loại vi khuẩn ngày càng gia tăng đang là mối lo ngại mang tính toàn cầu. Nhiều kháng sinh mà con người tìm ra nay không còn công hiệu trong việc điều trị. Nhiều kháng sinh chỉ xuất hiện và sử dụng trong một thời gian ngắn bị kháng, trong khi việc nghiên cứu tìm ra những loại kháng sinh mới không thể thực hiện trong thời gian ngắn, nhất là tìm ra những loại kháng sinh điều trị vi khuẩn kháng kháng sinh. Vì vậy, nhu cầu khẩn cấp là cần có những thuốc kháng vi sinh vật mới để kiểm soát những căn bệnh một cách có hiệu quả [2]. Chính vì vậy, ngoài những kháng sinh tổng hợp, kháng sinh bán tổng hợp, kháng sinh tự nhiên đang có mặt trên thị trường thì ngành công nghiệp dược phẩm đang tìm kiếm những chất kháng vi sinh vật từ những nguồn gốc khác vừa có hiệu lực cao, vừa có hoạt phổ rộng mà lại thân thiện với môi trường.

Các vi khuẩn cộng sinh với tuyến trùng ký sinh gây bệnh với côn trùng (Entomopathogenic Nematodes - EPN) đang là đối tượng nghiên cứu mới của các nhà khoa học về khả năng diệt côn trùng gây hại và khả năng sinh kháng sinh khi chúng có khả năng ngăn chặn các vi sinh vật khác xâm nhập vào xác chết côn trùng vật chủ. Nhiều nghiên cứu đã cho thấy sản phẩm trao đổi chất thứ cấp của các vi khuẩn cộng sinh có khả năng kháng vi sinh vật hoạt phổ rộng, ngăn chặn sự phát triển của vi khuẩn, nấm và các tế bào ung thư [6,15].

Việt Nam là đất nước có vùng khí hậu nhiệt đới gió mùa, nóng ẩm, mưa nhiều nên tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng có tính đa dạng khá

cao. Hiện nay, khoảng hơn 40 chủng EPN đã được phân lập từ các vùng sinh thái khác nhau của Việt Nam [3,8] và đây cũng là nguồn cung cấp vi khuẩn cộng sinh có ý nghĩa khoa học không chỉ ở Việt Nam mà còn có ý nghĩa trên thế giới trong việc nghiên cứu các chất kháng sinh mới phục vụ cho con người, động vật, thực vật.

Ở Việt Nam đã có nhiều nghiên cứu về tuyến trùng rất có giá trị và có ý nghĩa khoa học trong xác định hình thái, đa dạng loài nhưng chưa có nhiều nghiên cứu về vi khuẩn cộng sinh với tuyến trùng và các sản phẩm trao đổi chất của chúng. Chính vì vậy, chúng tôi lựa chọn đề tài

Phân lập, tuyển chọn chủng vi khuẩn cộng sinh với tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng *Steinernema* sp.TĐ3 ở Tam Đảo, Vĩnh Phúc có khả năng kháng khuẩn, kháng nấm.

Với mục tiêu:

- Phân lập vi khuẩn cộng sinh từ tuyến trùng *Steinernema* sp.TĐ3 ở Tam Đảo, Vĩnh Phúc.
- Thử nghiệm khả năng kháng vi sinh vật kiểm định của các chủng vi khuẩn phân lập được.
- Xác định một số ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy lên khả năng kháng vi sinh vật kiểm định của các chủng vi khuẩn cộng sinh.
- Tách chiết hoạt chất và thử khả năng kháng vi sinh vật kiểm định.
- Định loại vi khuẩn cộng sinh với tuyến trùng *Steinernema* sp.TĐ3 bằng phương pháp sinh học phân tử trên cơ sở phân tích đoạn gen 16S rDNA.

Chương I

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Khái quát chung về tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng

Tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng là loài giun tròn (Nematodes) có ích, ký sinh ở một số loài côn trùng có hại- làm suy yếu hoặc giết chết những côn trùng này, nhưng lại rất an toàn đối với người, động vật và thực vật [3].

Trong số hàng nghìn loài tuyến trùng ký sinh ở côn trùng thì chỉ có nhóm Entomopathogenic nematodes (EPN) có khả năng vừa ký sinh vừa gây bệnh cho côn trùng, gồm 2 giống *Steinernema* và *Heterorhabditis* (giống *Steinernema* thuộc họ Steinernematidae và *Heterorhabditis* thuộc họ Heterorhabditidae của ngành giun tròn.

Mặc dù các loài tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng thuộc giống *Steinernema* và *Heterorhabditis* là những loài ký sinh bắt buộc ở côn trùng nhưng chúng lại có một pha chuyên hóa tồn tại bên ngoài vật chủ côn trùng, (thường là môi trường đất). Đó là ấu trùng tuổi 3, còn gọi là ấu trùng xâm nhiễm (infective juveniles - IJs), là giai đoạn đặc biệt trong vòng đời phát triển của nhóm tuyến trùng này. Ở giai đoạn này, IJs không cần dinh dưỡng nhưng chúng lại có khả năng tồn tại lâu dài trong môi trường đất, khi chưa gặp vật chủ. Đây là giai đoạn ấu trùng nằm chờ trong đất và sẵn sàng xâm nhập vào vật chủ thích hợp để ký sinh, gây bệnh.

Khi tìm được vật chủ thích hợp, IJs xâm nhập vào cơ thể côn trùng qua các lỗ mở tự nhiên như miệng, hậu môn hoặc lỗ thở hoặc một số dạng IJs được trang bị mấu kitin dạng sừng có thể đục thủng thành cơ thể côn trùng tại một nơi xung yếu là ranh giới giữa các đốt cơ thể để xâm nhập. Sau khi vào cơ thể vật chủ, IJs nhanh chóng xâm nhập vào xoang máu, tại đây vi khuẩn cộng sinh được giải phóng. Nhờ môi trường thích hợp là huyết tương vật chủ,

vi khuẩn cộng sinh nhân nhanh số lượng và tạo ra độc tố gây chết vật chủ trong vòng 24 -48h [3].

1.1.1. Tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng *Steinernema*

Tuyến trùng *Steinernema* sinh sản theo kiểu phân tính nhờ giao phối giữa đực và cái, trứng con cái được thụ tinh bởi tinh trùng của con đực. Điều này cũng có nghĩa là để sinh sản được trong cơ thể côn trùng vật chủ, tuyến trùng cần xâm nhập cả IJs đực và IJs cái, để chúng phát triển thành cả đực và cái trưởng thành, cho phép chúng có điều kiện ghép đôi trong vật chủ.

Ở giai đoạn đầu, con cái đẻ trứng vào cơ thể côn trùng và trứng nở thành ấu trùng thế hệ 1. Các ấu trùng của thế hệ 1 không phát tán ra ngoài mà ở lại bên trong xác chết cơ thể vật chủ để dinh dưỡng bằng chính các mô của côn trùng vật chủ và phát triển nhanh chóng đạt đến giai đoạn trưởng thành thế hệ 2. Trong trường hợp xác chết vật chủ vẫn còn nguồn thức ăn, thế hệ 2 tiếp tục giao phối và tiếp tục phát triển qua thế hệ 3, thậm chí cả thế hệ 4 bên trong cơ thể vật chủ. Cuối cùng, khi nguồn dinh dưỡng đã hết, thế hệ cuối cùng trong xác chết côn trùng dừng lại ở pha ấu trùng tuổi 2. Các ấu trùng này bắt đầu chui ra khỏi xác chết côn trùng và phát tán ra môi trường bên ngoài và trở thành IJs (tuổi 3) và từ đây chúng tiếp tục một chu kỳ phát triển mới với côn trùng vật chủ mới.

1.1.2. Tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng *Heterorhabditis*

Không giống với các loài *Steinernema*, ở các loài tuyến trùng *Heterorhabditis*, IJs khi xâm nhập vào cơ thể côn trùng phát triển thành con cái lưỡng tính (Hermaphroditis). Con cái này có khả năng sản sinh ra tinh trùng cùng với trứng và tự thụ tinh để sinh sản. Từ thế hệ 2 trở về sau, IJs mới phát triển thành con trưởng thành phân tính đực cái và sinh sản bằng hình thức giao phối. Giai đoạn đầu của con cái cả lưỡng tính và phân tính, chúng đẻ trứng (oviparous) nhưng ở giai đoạn sau khi con cái về già chúng đẻ trứng

thai (oviviparous); lúc này ấu trùng nở ra bên trong cơ thể con mẹ và sử dụng cơ thể mẹ làm nguồn thức ăn để phát triển thành ấu trùng tuổi 2, biến con cái thành bọc chứa ấu trùng tuổi 2. Khi phá vỡ thành cơ thể con mẹ chui ra ngoài trở thành ấu trùng cảm nhiễm (tuổi 3) chúng vẫn giữ lại vỏ cutin của ấu trùng tuổi 2 [3].

1.2. Vi khuẩn cộng sinh với tuyến trùng EPN

Mỗi ấu trùng xâm nhiễm của tuyến trùng EPN (infective juveniles – IJs) mang trong ruột của chúng một loài vi khuẩn cộng sinh chuyên hóa và chúng đều gây bệnh cho côn trùng khi xâm nhập vào máu. Các nghiên cứu trong 20 năm qua từ tuyến trùng EPN cho thấy vi khuẩn *Xenorhabdus* cộng sinh trong ruột của ấu trùng cảm nhiễm của *Steinernema*, còn với các loài giống *Heterorhabditis* thì vi khuẩn cộng sinh thuộc giống *Photorhabdus* [15].

1.2.1. Vi khuẩn *Xenorhabdus*

Xenorhabdus là trực khuẩn Gram âm, không sinh bào tử, hình que, kỵ khí không bắt buộc. Chúng sinh trưởng ở nhiệt độ tối ưu là 28⁰C; một số chủng có khả năng phát triển ở 40⁰C.

Xenorhabdus khác với các chi khác của họ Enterobacteriaceae là có kích thước tế bào lớn 0,3 – 2 x 2 – 10 μm. Lên men đường glucose sinh acid (không sinh khí) và một số đường khác ít lên men. Phản ứng catalase âm tính và không có khả năng chuyển nitrat thành nitrit. Đa số các chủng có deoxyribonuclease (DNase) và protease dương tính. *Xenorhabdus* có mối quan hệ mật thiết với tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng giống *Steinernema* và có đặc tính miễn dịch.

Ở IJs của các loài *Steinernema* spp., VKCS nằm trong một cái bọc ở phần trước của ruột, phía sau thực quản. Các tổ hợp tuyến trùng và vi khuẩn này có tính chuyên hóa khá cao: mỗi loại tuyến trùng có thể tổ hợp với một số

loài vi khuẩn, nhưng mỗi loài vi khuẩn chỉ tổ hợp với một loài tuyến trùng nhất định (bảng 1.1) [33].

Bảng 1.1. Mối quan hệ giữa tuyến trùng và vi khuẩn cộng sinh

TT	EPN	VKCS	Tài liệu tham khảo
1	<i>Steinernema abbasi</i>	<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	Elawad <i>et al.</i> , 1998
2	<i>S. affine</i>	<i>X. bovienii</i>	Akhurst & Boemare, 1990
3	<i>S. apuliae</i>	<i>X. kozodoii</i>	Tailliez <i>et al.</i> , 2006
4	<i>S. arenarium</i>	<i>X. kozodoii</i>	Tailliez <i>et al.</i> , 2006
5	<i>S. bicornutum</i>	<i>X. budapestensis</i>	Tailliez <i>et al.</i> , 2006
6	<i>S. carpocapsae</i>	<i>X. nematophila</i>	Akhurst & Boemare, 1990
7	<i>S. ceratophorum</i>	<i>X. budapestensis</i>	Tailliez <i>et al.</i> , 2006
8	<i>S. cubanum</i>	<i>X. poinarii</i>	Tailliez <i>et al.</i> , 2006
9	<i>S. diaprepesi</i>	<i>X. doucetiae</i>	Fischer-Le Saux <i>et al.</i> , 1998
10	<i>S. feltiae</i>	<i>X. bovienii</i>	Akhurst & Boemare, 1990
11	<i>S. glaseri</i>	<i>X. bovienii</i>	Akhurst & Boemare, 1990
12	<i>S. hermaphroditum</i>	<i>X. griffiniae</i>	Tailliez <i>et al.</i> , 2006
13	<i>S. intermedium</i>	<i>X. bovienii</i>	Poinar, 1990
14	<i>S. kari</i>	<i>X. hominickii</i>	Tailliez <i>et al.</i> , 2006
15	<i>S. kraussei</i>	<i>X. bovienii</i>	Akhurst & Boemare, 1990
16	<i>S. kushidai</i>	<i>X. japonica</i>	Nishimura <i>et al.</i> , 1994
17	<i>S. longicaudum</i>	<i>X. ehlershii</i>	Tailliez <i>et al.</i> , 2006
18	<i>S. monticolum</i>	<i>X. hominickii</i>	Fischer-Le Saux <i>et al.</i> , 1998
19	<i>S. puertiricense</i>	<i>X. romanii</i>	Tailliez <i>et al.</i> , 2006
20	<i>S. rarum</i>	<i>X. szentirmaii</i>	Tailliez <i>et al.</i> , 2006
21	<i>S. riobravisi</i>	<i>X. cabanillasii</i>	Tailliez <i>et al.</i> , 2006
22	<i>S. scapterisci</i>	<i>X. innexi</i>	Fischer-Le Saux <i>et al.</i> , 1998
23	<i>S. scarabaei</i>	<i>X. koppenhoeferi</i>	Tailliez <i>et al.</i> , 2006
24	<i>S. siamkayai</i>	<i>X. stockiae</i>	Tailliez <i>et al.</i> , 2006
25	<i>S. thermophilum</i>	<i>X. indica</i>	Somvanshi <i>et al.</i> , 2006
26	<i>S. weiseri</i>	<i>X. bovienii</i>	Tailliez <i>et al.</i> , 2006
27	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	<i>Photorhabdus luminescens</i>	Poinar, 1990
28	<i>H. megidis</i>	<i>P. luminescens</i>	Poinar <i>et al.</i> , 1987

Bảng 1.1 cho thấy *X. bovienii* có quan hệ cộng sinh với 4 loài *Steinernema*, trong khi *X. poinarii* với 2 loài, còn 3 loài vi khuẩn *Xenorhabdus* khác chỉ có quan hệ cộng sinh với duy nhất 1 loài *Steinernema*. Điều đó cho thấy tính chuyên hóa của tổ hợp tuyến trùng - vi khuẩn nhưng cũng có tính đa dạng khá cao.

1.2.2. Vi khuẩn *Photorhabdus*

Photorhabdus có kích thước 0,5 -2 x 1- 10 μm , Gram âm, không sinh bào tử và di động bằng lông rung. Hồ hấp kị khí không bắt buộc, nhiệt độ tối ưu là 28⁰C; một số chủng phát triển ở 37- 38⁰C. *Photorhabdus* có phản ứng catalase dương tính nhưng không khử nitrat (chủ yếu âm tính với một số loài thuộc họ Enterobacteriaceae). *Photorhabdus* lên men glucose sinh axit, không sinh khí và cũng có khả năng lên men đường Fructose, D- mannose, maltose, ribose, và N – acetylglucosamine sinh axit, lên men glycerol yếu.

IJs của các loài tuyến trùng *Heterorhabditis* spp., thì vi khuẩn cộng sinh nằm rải rác theo chiều dài của ruột, nhưng chủ yếu vẫn là ở nửa trước của ống ruột. Hầu hết các loài vi khuẩn giống *Photorhabdus* có khả năng tạo sáng huỳnh quang sinh học [8].

1.2.3. Sự chuyển pha của vi khuẩn cộng sinh

Sự biến đổi pha là một đặc điểm phổ biến của vi khuẩn, đó là sự thay đổi đảo nghịch cho phép vi khuẩn tránh được hàng rào miễn dịch của côn trùng vật chủ hoặc sự nhiễm của thực khuẩn thể. Sự biến đổi pha cũng xuất hiện ở các loài vi khuẩn giống *Xenorhabdus* và *Photorhabdus*.

Sự biến đổi pha trong *Xenorhabdus* được mô tả như là sự dị hình 2 dạng khuẩn lạc trên môi trường agar, các khuẩn lạc này khác nhau về màu viền khuẩn lạc của chúng [22,26,31].

Sự biến đổi pha trong *Xenorhabdus* đã được nghiên cứu khá đầy đủ ở *X. nematophilus* và xác định được các đặc trưng chính của sự biến đổi pha

trong loài này [19]. Đặc trưng của pha I là nhuộm màu đường viền xanh (xanh bromothymol và đỏ congo) và sản sinh các chất kháng sinh, lecithinase [26], thể vùi protein và tua viền [16]. Ở pha II hoặc không có những đặc trưng như ở pha I hoặc có những biểu hiện rất yếu. Các tế bào pha I lớn hơn và đa hình hơn ở pha II [26].

Các nghiên cứu gần đây cho thấy vai trò của pha I là sản sinh các chất kháng khuẩn, kháng nấm nhằm ức chế các vi sinh vật khác xâm nhập vào xác chết côn trùng, do đó hạn chế sự cạnh tranh các chất dinh dưỡng, dành nguồn dinh dưỡng cho tuyến trùng. Ngoài ra, bằng cách thủy phân côn trùng bằng hệ enzyme protease, lipase,... pha I có khả năng chuyển hóa cơ chất thành các sản phẩm phù hợp hơn cho tuyến trùng tăng trưởng và sinh sản. Sự xuất hiện của hiện tượng này trong các vi khuẩn cộng sinh của tuyến trùng EPN rất mạnh mẽ cho thấy rằng nó là một yếu tố quan trọng trong mối tương quan giữa tuyến trùng, vi khuẩn và côn trùng vật chủ. Tuy nhiên, giai đoạn biến thể (pha II) chưa có những nghiên cứu rõ ràng về chức năng của chúng trong tổ hợp tuyến trùng - vi khuẩn - côn trùng vật chủ [3].

Pha I và pha II có thể được duy trì như những dòng thuần chủng bằng kỹ thuật nhân dòng thông thường [16].

1.3. Mối quan hệ tương tác giữa tuyến trùng và vi khuẩn cộng sinh

Quan hệ cộng sinh là một mối quan hệ sinh thái cực kỳ phổ biến trong các quần xã sinh vật trong sinh giới. Nó đóng vai trò quan trọng trong việc hợp thành các dạng sống chính trên Trái đất và tạo ra sự đa dạng sinh học vô cùng phong phú này.

Tổ hợp tuyến trùng – vi khuẩn cộng sinh tương tác với nhau, mỗi bên đều thực hiện những nhiệm vụ, chức năng riêng để sinh tồn và phát triển nhưng lại giúp bên kia để tồn tại, tổ hợp này không thể tách rời và tồn tại độc lập trong môi trường tự nhiên được.