

## PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN DÒNG VI KHUẨN THUỘC LOÀI *LACTOBACILLUS* SP. CÓ KHẢ NĂNG KHÁNG KHUẨN TỪ TÔM SÚ (*PENAEUS MONODON*) Ở TỈNH BẠC LIÊU VÀ CÀ MAU

Huỳnh Ngọc Thanh Tâm, Lưu Huỳnh Mộng Trinh,  
Nguyễn Quang Lộc, Nguyễn Đức Độ  
Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Đại học Cần Thơ

Liên hệ email: [hnttam@ctu.edu.vn](mailto:hnttam@ctu.edu.vn)

### TÓM TẮT

Việc bổ sung những chế phẩm sinh học vào thức ăn trong nuôi trồng thủy sản là một biện pháp thay thế tốt cho việc sử dụng kháng sinh và thuốc hóa học trong phòng và trị bệnh thủy sản. Đề tài được thực hiện với mục đích tìm ra dòng thuộc *Lactobacillus* sp. có những đặc tính tốt để sản xuất probiotics và bacteriocin trong phòng và trị bệnh cho tôm sú (*Penaeus monodon*). Từ các mẫu tôm sú thu ở 8 huyện thuộc 2 tỉnh Bạc Liêu và Cà Mau đã phân lập được 20 dòng thuộc *Lactobacillus* spp. Ngoại trừ dòng NH2, thì 19 dòng được phân lập đều tạo bacteriocin thô có khả năng ức chế vi khuẩn Gram (-) chỉ thị (*Escherichia coli* ATCC® 25922™) với đường kính vòng vô khuẩn từ 11,7 tới 16,3 mm. Dòng NH1 là dòng vi khuẩn acid lactic có khả năng kháng *Escherichia coli* tốt nhất trong 20 dòng được phân lập, do đó, dòng NH1 được định danh là *Lactobacillus plantarum*, bằng phương pháp giải trình tự 16S ribosomal RNA (97%) kết hợp với phân tích đặc điểm hình thái và sinh hóa. Hoạt tính bacteriocin thô của dòng NH1 tăng gấp đôi (160 AU/mL) so với môi trường đối chứng MRS lỏng (80 AU/mL) khi bổ sung dịch chiết nấm men 2% và 3% w/v. Cuối cùng, hoạt tính bacteriocin thô của dòng NH1 giảm phân nửa (40 AU/mL) khi môi trường bổ sung peptone 3% w/v và glucose 3% w/v.

**Từ khóa:** Bạc Liêu, bacteriocin thô, Cà Mau, *Lactobacillus plantarum*, tôm sú (*Penaeus monodon*).

Nhận bài: 14/08/2017

Hoàn thành phản biện: 02/10/2017

Chấp nhận bài: 15/11/2017

### 1. MỞ ĐẦU

Tôm nuôi nước lợ là một trong các đối tượng nuôi trồng thủy sản (NTTS) chủ lực của Việt Nam nói chung và vùng Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) nói riêng. Năm 2014, diện tích nuôi tôm nước lợ cả nước đạt khoảng 658.000 ha, sản lượng tôm nuôi đạt 560.000 tấn, giá trị xuất khẩu từ tôm đạt gần 4 tỷ USD. Trong đó, ĐBSCL có 546.735 ha nuôi tôm, sản xuất 420.000 tấn tôm, chiếm gần 83,1% diện tích và 75% sản lượng tôm nuôi nước lợ cả nước. Đặc biệt, tôm sú (*Penaeus monodon* (*P. monodon*)) chiếm 93,6% diện tích đóng góp 94% sản lượng tôm sú của cả nước (Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, 2017).

Bên cạnh đó, tình hình sử dụng thuốc và hóa chất ở các vùng nuôi tôm trọng điểm ở ĐBSCL cho thấy có đến 122 sản phẩm thuốc kháng sinh tổng hợp hóa học đã được dùng để phòng trị và trộn vào thức ăn cho tôm (Nguyễn Thị Phương Nga, 2004). Hơn thế nữa, 94% trong số 196 dòng vi khuẩn được phân lập từ vùng mẫu nước và bùn đáy ao nuôi tại ĐBSCL đã kháng từ 3 loại kháng sinh trở lên trong đó có cả thuốc kháng sinh dùng trong y khoa như chloramphenicol, ampicillin và tetracycline. Điều này cho thấy sự lạm dụng thuốc kháng sinh trong NTTS ở ĐBSCL là rất nghiêm trọng (Đặng Thị Hoàng Oanh và cs., 2005). Do đó,

hàng năm, diện tích nuôi tôm bị thiệt hại do dịch bệnh là rất lớn, lên tới hàng nghìn ha. Cụ thể, diện tích nuôi tôm bị thiệt hại năm 2014 là 31.514 ha; năm 2015 là 16.278 ha; năm 2016 là 10.662 ha (Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, 2017).

Gần đây, chế phẩm sinh học được sử dụng như nguồn thức ăn bổ sung trong nuôi trồng thủy sản và có vai trò cân bằng hệ vi khuẩn đường ruột, kích thích tăng trưởng, cung cấp dinh dưỡng và tăng sức đề kháng chống lại các tác nhân gây bệnh (Gatesoup, 1999). Các chế phẩm sinh học có thể ngăn chặn mầm bệnh bám vào ruột bằng cách tạo ra các hợp chất tự nhiên có hoạt tính kháng khuẩn (Robertson và cs., 2000; Balcazar và cs., 2006). *Lactobacillus* là giống vi khuẩn acid lactic đã được sử dụng như chế phẩm sinh học trong nuôi tôm (Phianphak và cs., 1999). Nhiều nghiên cứu cho thấy vi khuẩn *Lactobacillus* có lợi trong việc hấp thu dinh dưỡng và chống lại các vi khuẩn gây bệnh cho tôm nuôi (Gilliland và cs., 1985; Rosslund và cs., 2003; Qi và cs., 2009; Ismail và Soliman, 2010). Tuy nhiên, việc nghiên cứu khả năng phòng trị bệnh của các dòng vi khuẩn acid lactic này còn hạn chế, đặc biệt tại vùng ĐBSCL. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm: (1) phân lập những dòng vi khuẩn thuộc *Lactobacillus* spp. từ hệ tiêu hóa tôm sú nuôi ở tỉnh Bạc Liêu và Cà Mau; (2) khảo sát khả năng kháng vi khuẩn *Escherichia coli* (*E. coli*) của các dòng vi khuẩn acid lactic được phân lập; (3) tuyển chọn và định danh tới mức độ loài của dòng vi khuẩn acid lactic tạo bacteriocin có khả năng ức chế *E. coli* tốt nhất; (4) khảo sát những điều kiện môi trường lên hoạt tính kháng *E. coli* của của bacteriocin ly trích từ dòng vi khuẩn acid lactic đã được tuyển chọn và định danh.

## 2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu và hóa chất

Môi trường MRS lỏng (De Man, Rogosa và Sharpe, sản xuất năm 2016, Thermo Fisher Scientific) cải tiến nuôi cấy các vi khuẩn *Lactobacillus* spp.: dịch chiết nấm men (4 g/L), dịch chiết thịt bò (8 g/L), peptone (10 g/L), glucose (20 g/L),  $K_2HPO_4$  (2 g/L),  $C_6H_6K_2O_7$  (2 g/L),  $C_2H_3NaO_2$  (5 g/L),  $MnSO_4$  (0,04 g/L),  $MgSO_4$  (0,2 g/L) và Tween 80 (1 g/L). Môi trường được chuẩn về pH 6,5, sau đó khử trùng nhiệt ước ở 121°C trong 30 phút. Môi trường MRS thạch được pha bằng cách bổ sung thêm vào môi trường MRS lỏng 20 g/L agar trên 1 lít môi trường. Hóa chất nhuộm Gram: Crystal violet, dung dịch iod, dung dịch khử màu (ethanol và acetone theo tỉ lệ 1:1), fushin. Hóa chất nhuộm bào tử: dung dịch xanh methylene 1% và đỏ trung tính 0,5%. Thuốc thử catalase  $H_2O_2$  3%, thuốc thử oxidase và thuốc thử indole (sản phẩm của công ty Nam Khoa Biotek). Môi trường LB (Luria-Bertani, SBC Scientific) nuôi vi khuẩn *E. coli* (ATCC® 25922™): peptone (10 g/L), NaCl (10 g/L), dịch chiết nấm men (5 g/L), agar (15 g/L) và được chuẩn về pH 7,0.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Phân lập và nhận diện các dòng vi khuẩn thuộc *Lactobacillus* spp. thuần từ hệ tiêu hóa tôm sú (*P. monodon*) ở 2 tỉnh Bạc Liêu và Cà Mau

Tôm sú (*P. monodon*) được mua thuộc loại tôm trưởng thành và có kích thước trung bình khoảng 6 - 8 cm tại các vuông nuôi theo phương thức quảng canh ở 8 huyện trong 2 tỉnh. Năm huyện thuộc địa bàn tỉnh Cà Mau như Cái Nước (CN), Đầm Dơi (DD), Năm Căn

(NC), Ngọc Hiến (NH), Phú Tân (PT), Trần Văn Thời (TVT) và U Minh (UM) và 2 huyện thuộc địa bàn tỉnh Bạc Liêu, đó là Đông Hải (ĐH) và Giá Rai (GR). Mỗi huyện thu mẫu khoảng 200 g (khoảng 40 con/kg). Mẫu được bảo quản lạnh bằng cách ướp đá trong thùng xốp trong suốt quá trình vận chuyển đến phòng thí nghiệm.

- *Phân lập những dòng vi khuẩn tiêu biểu từ hệ tiêu hóa tôm sú (P. monodon):*

Xử lý mẫu: tôm được rửa sạch bằng nước cất và khử trùng bên ngoài bằng ethanol 70% (5 con/ huyện). Lây nội tạng vùng đầu rồi cho vào bình tam giác đã khử trùng, cho 10 mL nước cất vô trùng, đồng nhất mẫu và để lắng. Hút lấy 1 mL phần dung dịch cho vào bình tam giác chứa 100 mL môi trường lỏng MRS, ủ kỵ khí ở 37°C trong 48 giờ.

Tiến hành phân lập: pha loãng dung dịch nuôi lỏng MRS 100 lần trong nước muối sinh lý 0,85%. Sau đó hút 0,1 mL dung dịch mẫu trải trên đĩa petri chứa môi trường thạch MRS và ủ trong 37°C. Sau 48 giờ, quan sát và chọn những khuẩn lạc tiêu biểu để tiến hành cấy chuyển vi khuẩn cũng trên môi trường thạch MRS. Quá trình cấy chuyển được lặp lại nhiều lần cho đến độ thuần vi khuẩn được xác định.

- *Kiểm tra hình thái khuẩn lạc đặc trưng cho các vi khuẩn Lactobacillus spp.:*

Đặc điểm nhận dạng khuẩn lạc: Những dòng vi khuẩn được chấp nhận khi có hình dạng khuẩn lạc trắng đục, không màu, bờ láng, lồi, bìa nguyên hoặc chia thùy. Khuẩn lạc phân lập nằm trên đường cấy chuyển và không lẫn với những khuẩn lạc có hình thái và màu sắc lạ. Sau khi được tách riêng, những dòng phân lập sẽ được kiểm tra hình thái và quan sát độ thuần dưới kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 40x và 100x.

- *Đặc điểm sinh hóa tiêu biểu cho các vi khuẩn Lactobacillus spp.:*

Sau khi xác định những dòng vi khuẩn tiêu biểu từ hệ tiêu hóa tôm sú, vi khuẩn *Lactobacillus* spp. được xác định bằng các thí nghiệm sinh hóa được tiến hành như mô tả của Kandler và Wiss (1986) như: nhuộm Gram, catalase, oxidase, phân giải CaCO<sub>3</sub>, dịch hoá gelatin và cuối cùng là sự hình thành indole (Bảng 1).

**Bảng 1.** Đặc điểm sinh hóa tiêu biểu của các vi khuẩn *Lactobacillus* spp.

Các thí nghiệm sinh hóa	Dương tính (+)	Âm tính (-)
Nhuộm Gram	Xanh tím (Gram dương)	Đỏ hồng (Gram âm)
Catalase	Có bọt khí	Không có bọt khí
Oxidase	Giấy lọc đổi màu	Giấy lọc không đổi màu
Phân giải CaCO <sub>3</sub>	Vùng sáng xuất hiện	Không xuất hiện vùng sáng
Dịch hóa gelatin	Môi trường tan chảy	Môi trường không tan chảy
Sự hình thành Indole	Vòng pellicle vàng chuyển đỏ hoặc cam	Vòng pellicle vàng không đổi màu

2.2.2. *Xác định khả năng ức chế E. coli của bacteriocin thô được ly trích từ các dòng vi khuẩn Lactobacillus spp. được phân lập*

Thí nghiệm đã được điều chỉnh dựa trên mô tả của Herreros và cs. (2005). Điều chế dung dịch bacteriocin thô của các dòng thuộc *Lactobacillus* spp.: tất cả các dòng vi khuẩn có đặc điểm hình thái và sinh hóa tiêu biểu của *Lactobacillus* spp. được nuôi cấy trong môi trường MRS lỏng trong điều kiện kỵ khí trong 48 giờ và 37°C. Ly tâm lấy phần dịch trong và

đem đi ly tâm 8.000 vòng trong 10 phút ở 4°C. Điều chỉnh pH 6,5 bằng NaOH 1M, thu được dung dịch bacteriocin.

Xác định khả năng ức chế *E. coli* bằng bacteriocin thô ly trích từ các dòng thuộc *Lactobacillus* spp.: đĩa petri (100 x 15 mm) chứa môi trường thạch LB đã được khử trùng 121°C trong 20 phút; sau đó hút 50 µL huyền phù *E. coli* được nuôi 24 giờ, đạt mật số 10<sup>6</sup> CFU/mL, trải đều mẫu vi khuẩn chỉ thị và để ráo; tạo 5 giếng thạch/ đĩa LB, mỗi giếng có đường kính 4 mm; tiếp tục bơm 50 µL nước cất vô trùng (đối chứng âm); bơm 50 µL bacteriocin thô/ giếng; tiếp tục bơm 50 µL dung dịch ampicillin (500 mg, Mekophar) 0,1 mg/mL (đối chứng dương); để yên mẫu trong tủ cấy khoảng 15 phút; cuối cùng ủ mẫu ở 37°C, sau 48 giờ đo đường kính vòng vô khuẩn (ĐKVVK).

Xác định và chọn lọc những dòng vi khuẩn thuộc *Lactobacillus* spp. tạo bacteriocin thô có khả năng ức chế *E. coli*: Khả năng kháng khuẩn được đánh giá bằng cách đo ĐKVVK bằng công thức: ĐKVVK (mm) = D – 4 mm; trong đó: D = đường kính vòng vô khuẩn thực tế đo được (bao gồm cả giếng thạch) và 4 mm là đường kính giếng thạch.

### 2.2.3. Định danh dòng vi khuẩn thuộc *Lactobacillus* sp. được phân lập có khả năng ức chế *E. coli* mạnh nhất

Thí nghiệm ở mục 2.2.2 đã xác định được dòng thuộc *Lactobacillus* sp. tạo bacteriocin thô mà có khả năng ức chế vi khuẩn Gram (-) chỉ thị (*E. coli*) mạnh nhất. Dòng vi khuẩn acid lactic này được chọn để định danh đến mức độ loài bằng phương pháp sinh học phân tử, kết hợp với đặc điểm hình thái và thí nghiệm sinh hóa. Định danh bằng phương pháp giải trình tự đoạn gen 16S ribosomal RNA (rRNA), mỗi xuôi 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC-3'); mỗi ngược 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACT-3'). Sau đó đoạn gen này được giải trình tự tại công ty Trách Nhiệm Hữu Hạn Phù Sa (Vĩnh Long, Việt Nam).

### 2.2.4. Khảo sát ảnh hưởng của thành phần môi trường nuôi cấy lên khả năng ức chế *E. coli* của dòng thuộc *Lactobacillus* sp. được phân lập

Thí nghiệm đã được điều chỉnh dựa trên mô tả của Todorov và Dicks (2005) nhằm tìm ra sự ảnh hưởng từ các mức nồng độ của glucose, peptone và dịch chiết nấm men lên sự hình thành bacteriocin thô của dòng thuộc *Lactobacillus* sp. đã được phân lập và tuyển chọn.

Thí nghiệm được bố trí theo khối, gồm 1 nhân tố và 3 lần lặp lại. Môi trường nuôi *Lactobacillus* spp. có 3 thành phần môi trường khác nhau, mỗi thành phần khảo sát ở 3 mức nồng độ, mỗi nồng độ được lặp lại 3 lần. Cụ thể: môi trường MRS lỏng là môi trường đối chứng; MRS lỏng + dịch chiết nấm men (1; 2; 3% w/v); MRS lỏng + glucose (1; 2; 3% w/v); MRS lỏng + peptone (1; 2; 3% w/v).

Thí nghiệm được tiến hành tương tự như thí nghiệm ở mục 2.2.2, “xác định khả năng ức chế *Escherichia coli* của bacteriocin thô được ly trích từ các dòng vi khuẩn thuộc *Lactobacillus* spp. phân lập được”, nhưng môi trường nuôi dòng thuộc *Lactobacillus* sp. là MRS lỏng được hiệu chỉnh với thành phần dinh dưỡng (glucose hoặc peptone hoặc yeast extract) với 3 mức nồng độ (1, 2 và 3% w/v).

Xác định hoạt tính bacteriocin (AU/mL) (phương pháp pha loãng của Mayr-Harting và cs., 1972). Ở độ pha loãng lớn nhất (D<sub>fi</sub>) vẫn còn xuất hiện vòng vô khuẩn (ĐKVVK lớn hơn 2 mm), hoạt tính bacteriocin thô (AU/mL) đã xác định theo công thức: AU/mL = D<sub>fi</sub> x 20.

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Phân lập và nhận diện các dòng vi khuẩn acid lactic thuộc các loài *Lactobacillus* spp. từ hệ tiêu hóa tôm sú (*Penaeus monodon*) ở 2 tỉnh Bạc Liêu và Cà Mau

##### 3.1.1. Phân lập vi khuẩn từ hệ tiêu hóa tôm sú (*P. monodon*)

Trong môi trường lỏng MRS và thạch MRS, ủ kỵ khí ở 37°C trong 48 giờ, 20 dòng vi khuẩn thuần đã được phân lập từ hệ tiêu hóa tôm sú ở 2 tỉnh Bạc Liêu và Cà Mau.

Trong tổng số 20 dòng thu được có 14 dòng ở tỉnh Cà Mau và 6 dòng ở tỉnh Bạc Liêu. Trong đó, ở huyện Cái Nước, huyện Đầm Dơi, huyện Phú Tân, huyện Trần Văn Thời và huyện Đông Hải đều phát hiện chỉ có 1 dòng vi khuẩn, 5 dòng vi khuẩn từ 5 huyện được ký hiệu tương ứng CN, DD, PT, TVT và DH. Trong khi huyện U Minh tìm thấy 3 dòng vi khuẩn thì ở địa bàn huyện Giá Rai 5 dòng vi khuẩn được ghi nhận, 11 dòng vi khuẩn tương ứng với tên: UM1, UM2, UM3, GR1, GR2, GR3, GR4 và GR5. Cuối cùng, 6 dòng vi khuẩn thuần trên môi trường MRS được tìm thấy ở huyện Ngọc Hiển, tương ứng: NH1, NH2, NH3, NH4, NH5 và NH6.

##### 3.1.2. Phân loại và nhận diện các dòng vi khuẩn phân lập được thuộc các loài *Lactobacillus* spp.

- Đặc điểm hình thái của 20 dòng vi khuẩn được phân lập:

Trên môi trường thạch MRS, 20 dòng vi khuẩn được phân lập từ hệ tiêu hóa tôm sú (*P. monodon*) sau 48 giờ ủ kỵ khí và ở 37°C, tất cả đều không sinh bào tử, khuẩn lạc của chúng đều có màu trắng đục, dạng tròn, bóng, bìa nguyên, lồi hoặc nhô cao, kích thước dao động từ 1,5 tới 3,0 mm thể hiện ở Bảng 2.

Khi kiểm tra hình thái của vi khuẩn dưới kính hiển vi quang học, tế bào của 20 dòng vi khuẩn phân lập được sau 48 giờ nuôi cấy trên môi trường thạch MRS đều có hình que ngắn hoặc dài. Trong đó, có 18 dòng có dạng que ngắn (chiếm 90%), 2 dòng có dạng que dài (chiếm 10%). Qua kết quả quan sát khả năng chuyển động của 20 dòng vi khuẩn đã phân lập cho thấy đều không có khả năng chuyển động (Bảng 2).

**Bảng 2.** Đặc điểm hình thái của 20 dòng vi khuẩn được phân lập từ hệ tiêu hóa tôm sú (*P. monodon*) ở 2 tỉnh Bạc Liêu và Cà Mau

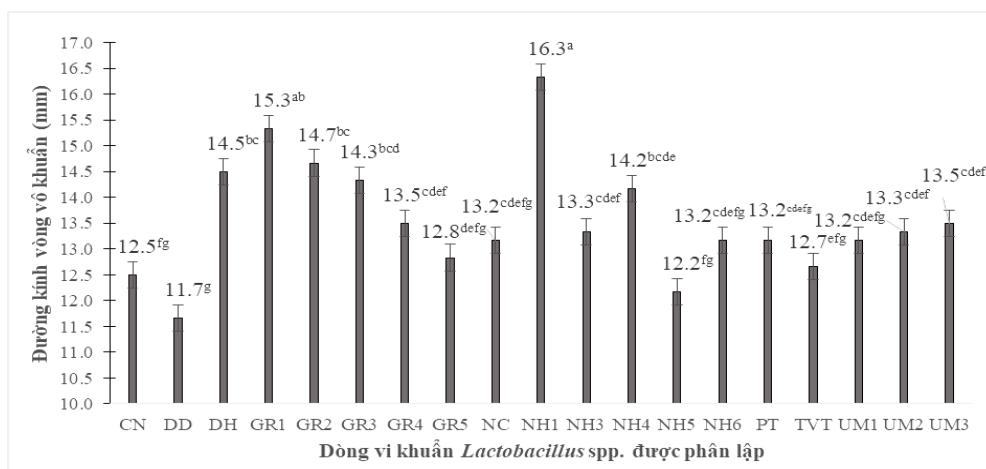
Dòng	Hình dạng khuẩn lạc	Hình dạng tế bào	Màu sắc	Dạng bìa	Độ nổi	Kích thước (mm)	Chuyển động
CN	Tròn	Que ngắn	Trắng đục	Nguyên	Nhô cao	1,5	-
DD	Tròn	Que ngắn	Trắng đục	Nguyên	Nhô cao	1,5	-
DH	Tròn	Que ngắn	Trắng đục	Nguyên	Lài	3	-
GR1	Tròn	Que ngắn	Trắng đục	Nguyên	Nhô cao	2	-
GR2	Tròn	Que ngắn	Trắng đục	Nguyên	Nhô cao	1,5	-
GR3	Tròn	Que ngắn	Trắng đục	Nguyên	Nhô cao	1,5	-
GR4	Tròn	Que ngắn	Trắng đục	Nguyên	Nhô cao	1,5	-
GR5	Tròn	Que ngắn	Trắng đục	Nguyên	Nhô cao	2	-
NC	Tròn	Que ngắn	Trắng đục	Nguyên	Nhô cao	1,5	-
NH1	Tròn	Que ngắn	Trắng đục	Nguyên	Nhô cao	2	-
NH2	Tròn	Que dài	Trắng đục	Nguyên	Nhô cao	2,5	-
NH3	Tròn	Que ngắn	Trắng đục	Nguyên	Nhô cao	1,5	-
NH4	Tròn	Que ngắn	Trắng đục	Nguyên	Nhô cao	2	-
NH5	Tròn	Que ngắn	Trắng đục	Nguyên	Nhô cao	2	-
NH6	Tròn	Que ngắn	Trắng đục	Nguyên	Nhô cao	2,5	-
PT	Tròn	Que ngắn	Trắng đục	Nguyên	Nhô cao	2,5	-
TVT	Tròn	Que dài	Trắng đục	Nguyên	Lài	1,5	-
UM1	Tròn	Que ngắn	Trắng đục	Nguyên	Nhô cao	2	-
UM2	Tròn	Que ngắn	Trắng đục	Nguyên	Nhô cao	2	-
UM3	Tròn	Que ngắn	Trắng đục	Nguyên	Nhô cao	1,5	-

- Đặc điểm sinh hóa của 20 dòng vi khuẩn được phân lập:

Tất cả 20 dòng vi khuẩn được phân lập có 6 đặc điểm sinh hóa như: Gram (+), phân hủy được  $\text{CaCO}_3$  (+), catalase âm tính (-), oxidase âm tính (-), không dịch hóa gelatin, và không sinh indole.

Khi nuôi 20 dòng vi khuẩn Gram (+) được phân lập này trên môi trường MRS thạch có bổ sung 1,5%  $\text{CaCO}_3$ , sự phát triển của vi khuẩn sinh ra acid hữu cơ làm tan  $\text{CaCO}_3$ . Cùng với đó đặc điểm hình thái và đặc biệt 4 thí nghiệm sinh hóa (catalase, oxidase, tạo indole và dịch hóa gelatin) âm tính, có thể kết luận 20 dòng vi khuẩn phân lập từ hệ tiêu hóa của tôm sú (*P. monodon*) ở Bạc Liêu và Cà Mau thuộc các loài *Lactobacillus* spp. Kết quả phân loại và nhận diện vi khuẩn *Lactobacillus* spp. này phù hợp với kết quả công bố của Nguyễn Văn Quý (2011), Nguyễn Văn Thành và Nguyễn Ngọc Trai (2011) và đặc biệt của Nguyễn Thị Trúc Khoa (2014).

### 3.2. Kiểm tra khả năng ức chế *E. coli* của các dòng vi khuẩn thuộc *Lactobacillus* spp. được phân lập



**Hình 1.** Khả năng ức chế vi khuẩn Gram âm đại diện, *Escherichia coli* (ATCC® 25922™) của 19 dòng vi khuẩn acid lactic thuộc *Lactobacillus* spp. được phân lập tại Bạc Liêu và Cà Mau.

*Ghi chú:* Số liệu ĐKVVK là giá trị trung bình của ba lần lặp lại. Trong cùng một hàng các số có ít nhất 1 chữ cái theo sau giống nhau thì thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5% qua kiểm định Tukey. Dòng NH2 không tạo vòng vô khuẩn. Đối chứng dương là ampicillin dùng 1 mg/mL cho ĐKVVK là 24 mm; đối chứng âm là nước cất đã khử trùng.

Khi bacteriocin thô của 20 dòng vi khuẩn thuộc *Lactobacillus* spp. được phân lập từ hệ tiêu hóa tôm sú (*P. monodon*) ở 2 tỉnh Bạc Liêu và Cà Mau tương tác với vi khuẩn *E. coli* (ATCC® 25922™) thì 95% số dòng thuộc *Lactobacillus* spp. phân lập tạo vòng vô khuẩn với vi khuẩn Gram (-) chỉ thị (dịch trích bacteriocin của dòng NH2 không tạo vòng vô khuẩn khi tương tác với *E. coli*). Trong đó, ĐKVVK dao động từ 11,7 tới 16,3 mm (Hình 1).

Dòng NH1 và GR1 chính là 2 dòng thuộc *Lactobacillus* spp. tạo bacteriocin thô có khả năng kháng *E. coli* tốt nhất trong 20 dòng phân lập, với ĐKVVK tương ứng là 16,3 và 15,3 mm (khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% so với 18 dòng thuộc *Lactobacillus* spp. còn lại). Ngược lại, dòng DD là dòng vi khuẩn thuộc *Lactobacillus* sp. tạo bacteriocin thô có khả năng ức chế *E. coli* thấp nhất (11,7 mm) trong 19 dòng thuộc *Lactobacillus* spp. có khả năng ức chế *E. coli*.

Nhiều nghiên cứu đã báo cáo rằng có nhiều loài trong giống *Lactobacillus* có khả năng tạo ra các loại protein có khả năng diệt khuẩn tốt (Verschuere và cs., 2000; Farzanfar, 2005). Hơn thế nữa, dịch trích từ các loài vi khuẩn cũng đã thể hiện khả năng ức chế vi sinh vật gây hại khá tốt (Rosslund và cs., 2003; Sanni và cs., 1999). Trong số 45 dòng thuộc *Lactobacillus* spp. được phân lập ở nghiên cứu của Nguyễn Văn Thành và Nguyễn Ngọc Trai (2011) chỉ duy nhất dòng 1 thuộc *Lactobacillus* sp. được phân lập từ hệ tiêu hóa cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) có khả năng tạo bacteriocin ức chế 2 vi khuẩn Gram (-) là *Aeromonas hydrophila* và *Edwardsiella ictaluri*. Tuy nhiên, khả năng ức chế 2 vi khuẩn Gram (-) trong nghiên cứu này khá thấp, tương ứng với ĐKVVK là 8,3 và 4,6 mm. Khi

bacteriocin thô của dòng *Lactobacillus acidophilus* 04 đối kháng với với 4 dòng trong giống *Vibrio* (*Vibrio parahaemolyticus* SAC 01, *Vibrio cholerae* SAC 04, *Vibrio harveyi* SAC 09 và *Vibrio alginolyticus* SAC 15) giá trị ĐKVVK dao động chủ yếu từ 10 tới 16 mm (Sivakumar và cs., 2012).

Dòng NH1 được xem là dòng tạo bacteriocin thô có khả năng ức chế *E. coli* tốt nhất trong thí nghiệm này, nên dòng NH1 được chọn để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

### 3.3. Định danh dòng NH1 bằng phương pháp giải trình tự đoạn gen 16S rRNA

Dòng NH1 chính là dòng vi khuẩn thuộc *Lactobacillus* sp. tạo ra bacteriocin có hoạt tính ức chế *E. coli* mạnh nhất trong 20 dòng vi khuẩn acid lactic được phân lập tại 2 tỉnh Bạc Liêu và Cà Mau. Dòng NH1 được chọn đi giải trình tự đoạn với 16S rRNA.

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Lactococcus lactis strain 62334.3.CTBL25F1D1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1773	1773	97%	0.0	97%	<a href="#">JQ723699.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Lactobacillus plantarum strain PT0019 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1772	1772	97%	0.0	97%	<a href="#">KX078316.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Lactobacillus plantarum strain AxG 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1772	1772	97%	0.0	97%	<a href="#">KT852452.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Lactobacillus plantarum strain H II 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1772	1772	97%	0.0	97%	<a href="#">KT852450.1</a>

**Hình 2.** Kết quả so sánh trình tự của dòng NH1 bằng đoạn mỗi chung 16S rRNA trên NCBI.

Sau khi có kết quả giải trình tự gen 16S rRNA của dòng NH1, trình tự này được so sánh bằng chương trình BLAST để so sánh mức độ tương đồng của trình tự được giải với các dòng vi khuẩn trên ngân hàng gen trên NCBI. Kết quả cho thấy dòng NH1 có tổng số nucleotide được giải là 1.098 nucleotide, cho kết quả tương đồng với loài *Lactococcus lactis* và loài *Lactobacillus plantarum* với tỷ lệ 97% (Hình 2). Bên cạnh đó, dựa vào đặc điểm hình thái (Bảng 2) và sinh hóa của dòng NH1 phù hợp với miêu tả của Lương Đức Phẩm (2002) dòng thuộc *Lactobacillus* sp. có dạng hình que, không di động, khuẩn lạc có màu trắng sữa, Gram (+), catalase và oxidase âm tính; Kết hợp giữa kết quả nhận diện vi khuẩn bằng kỹ thuật sinh học phân tử (giải trình tự bằng đoạn mỗi chung 16S rRNA) cùng kết quả quan sát hình thái và đặc điểm sinh hóa cho thấy dòng NH1 có trình tự 16S rRNA và các đặc tính sinh hóa tương đồng với loài *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*).

### 3.4. Kết quả ảnh hưởng của các thành phần dinh dưỡng trong môi trường nuôi cấy lên khả năng ức chế *E. coli* và lên việc hình thành bacteriocin thô ly trích từ dòng *L. plantarum* NH1

Qua kết quả thí nghiệm (Bảng 3) cho thấy: thành phần dinh dưỡng của môi trường MRS lỏng ảnh hưởng rất nhiều đến khả năng kháng khuẩn *E. coli* của bacteriocin thô được ly trích từ dòng *L. plantarum* NH1 ( $p < 0,05$ ). ĐKVVK của dòng NH1 trong 9 loại môi trường khảo sát dao động từ 13 tới 19,3 mm.

Dòng *L. plantarum* NH1 khi nuôi ở môi trường Y3 (MRS lỏng được bổ sung dịch chiết nấm men 3%) cho bacteriocin có hoạt tính kháng khuẩn lớn nhất trong số 10 loại môi trường khảo sát với ĐKVVK là 19,3 mm và hoạt tính bacteriocin thô tương ứng là 160 AU/mL (khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại ở độ tin cậy 95%). Kết



quả này phù hợp với công bố của Nguyễn Văn Thành và Nguyễn Ngọc Trai (2011), khi bổ sung 2 và 3% (w/v) dịch chiết nấm men vào môi trường MRS đều làm tăng hoạt tính bacteriocin thô ly trích từ loài *Lactobacillus* sp. lên gấp đôi (160 AU/mL) đối với 2 loài vi khuẩn gây hại *A. hydrophila* và *E. ictaluri*. Bên cạnh đó, khi sử dụng môi trường nuôi *L. plantarum* có thành phần dịch chiết nấm men có nồng độ cao đã giúp việc sinh tổng hợp các hợp có tính chất kháng khuẩn tốt hơn (Lê Ngọc Thùy Trang, 2014; Nguyễn Thị Trúc Khoa, 2014; Thirumurugan và cs., 2015). Khi môi trường MRS lỏng bổ sung dịch chiết nấm men (1% w/v), peptone (1 và 2% w/v), bổ sung glucose (1 và 2% w/v) hoạt tính kháng khuẩn không thay đổi so với nghiệm thức đối chứng (80 AU/mL); ngược lại khi môi trường MRS lỏng bổ sung peptone 3% w/v hoặc glucose 3% w/v thì hoạt tính giảm 50% (40 AU/mL). Kết quả thí nghiệm này cũng phù hợp với nghiên cứu của Nguyễn Văn Thành và Nguyễn Ngọc Trai (2011), Nguyễn Thị Trúc Khoa (2014).

**Bảng 3.** Ảnh hưởng của các thành phần dinh dưỡng trong môi trường nuôi dòng *L. plantarum* NH1 lên hoạt tính của bacteriocin thô và lên khả năng ức chế *E. coli*

Thành phần môi trường	% bổ sung	Kí hiệu	pH cuối của dịch nuôi	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)	Hoạt tính bacteriocin (AU/ mL)
MRS lỏng	0	MRS	5,38	16,3 <sup>bc</sup>	80 <sup>b</sup>
MRS + glucose	1	G1	5,29	15,5 <sup>cd</sup>	80 <sup>b</sup>
	2	G2	5,54	15,8 <sup>bcd</sup>	80 <sup>b</sup>
	3	G3	4,96	13,5 <sup>e</sup>	40 <sup>c</sup>
MRS + peptone	1	P1	5,19	16,0 <sup>bcd</sup>	80 <sup>b</sup>
	2	P2	5,29	15,0 <sup>d</sup>	80 <sup>b</sup>
	3	P3	4,63	13,0 <sup>e</sup>	40 <sup>c</sup>
MRS + dịch chiết nấm men	1	Y1	5,31	16,0 <sup>bcd</sup>	80 <sup>b</sup>
	2	Y2	5,29	16,8 <sup>b</sup>	80 <sup>b</sup>
	3	Y3	5,76	19,3 <sup>a</sup>	160 <sup>a</sup>

Ghi chú: Số liệu ĐKVVK và hoạt tính bacteriocin là giá trị trung bình của ba lần lặp lại. Trong cùng một cột các số có ít nhất 1 chữ cái theo sau giống nhau thì thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5% qua kiểm định Tukey. MRS: môi trường đối chứng. G1: MRS + 1% glucose; G2: MRS + 2% glucose; G3: MRS + 3% glucose. P1: MRS + 1% peptone; P2: MRS + 2% peptone; P3: MRS + 3% peptone. Y1: MRS + 1% dịch chiết nấm men; Y2: MRS + 2% dịch chiết nấm men; Y3: MRS + 3% dịch chiết nấm men.

#### 4. KẾT LUẬN

Hai mươi dòng thuộc *Lactobacillus* spp. đã được phân lập từ hệ tiêu hóa tôm sú (*P. monodon*) ở 8 huyện trong địa bàn 2 tỉnh Bạc Liêu và Cà Mau. Bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch, 19 trong 20 dòng thuộc *Lactobacillus* spp. được phân lập đã tạo bacteriocin có khả năng ức chế vi khuẩn Gram (-) chỉ thị (*E. coli*). Trong đó, dòng *Lactobacillus* sp. NH1 tạo ra bacteriocin thô có hoạt tính ức chế *E. coli* mạnh nhất, ĐKVVK 16,3 mm. Dòng *Lactobacillus* sp. NH1 đã được định danh tới mức độ loài là *L. plantarum*, bằng phương pháp sinh học phân tử kết hợp phân tích hình thái và thí nghiệm sinh hóa. Cuối cùng, bacteriocin thô ly trích từ dòng NH1 trong môi trường lỏng MRS bổ sung dịch chiết nấm men 3% w/v có hoạt tính ức chế *E. coli* tốt nhất (160 AU/mL) trong 10 nghiệm thức MRS lỏng khảo sát.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

### 1. Tài liệu tiếng Việt

- Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, (2017). *Quyết định số 1038/QĐ-BNN-TY, ngày 29/03/2017 về việc “Kế hoạch Quốc gia giám sát dịch bệnh trên tôm và cá tra phục vụ xuất khẩu, giai đoạn 2017 – 2020”*. Truy cập ngày 15/04/2017. Địa chỉ: <https://tongcucthuysan.gov.vn/vi-vn/he-thong-van-ban>.
- Nguyễn Thị Trúc Khoa, (2014). *Phân lập vi khuẩn Lactobacillus sp. ở một số loài cá da trơn có khả năng ức chế vi khuẩn Edwardsiella ictaluri gây bệnh gan thận mù trên cá tra*. Luận văn cao học chuyên ngành Công nghệ sinh học, Viện NC & PT Công Nghệ Sinh Học, Đại học Cần Thơ.
- Nguyễn Thị Phương Nga, (2004). *Phân tích tình hình phân phối và sử dụng thuốc trong nuôi trồng thủy sản tại Sóc Trăng, Bạc Liêu và Cà Mau*. Luận án thạc sĩ Nuôi trồng thủy sản, Khoa Thủy sản, Đại học Cần Thơ.
- Đặng Thị Hoàng Oanh, Nguyễn Thanh Phương, Temdoung Somsiri, Supranee Chinabut, Fatimah Yussoff, Mohamed Shariff, Kerry Bartie, Geert Huys, Mauro Giacomini, Stefania Berton, Jean Swings và Alan Teale, (2005). Xác định tính kháng thuốc kháng sinh của vi khuẩn phân lập từ các hệ thống nuôi thủy sản ở Đồng bằng sông Cửu Long, Việt Nam. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 4, 135-144.
- Lương Đức Phẩm, (2002). *Vi sinh vật học và an toàn vệ sinh thực phẩm*. Hà Nội: NXB Nông Nghiệp.
- Nguyễn Văn Quý, (2011). *Phân lập và ứng dụng vi khuẩn Bacillus sp. và Lactobacillus sp. để bước đầu sản xuất chitin*. Luận văn tốt nghiệp Thạc sĩ ngành Công nghệ Sinh học, Viện NC & PT Công Nghệ Sinh Học, Đại học Cần Thơ.
- Nguyễn Văn Thành và Nguyễn Ngọc Trai, (2012). Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn Lactobacillus sp. có khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh gan thận mù và đốm đỏ trên cá tra. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, 23a, 224-234.
- Lê Ngọc Thùy Trang và Phạm Minh Nhựt, (2014). Phân lập và khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng kháng khuẩn của Lactobacillus plantarum. *Tạp chí sinh học Trường Đại học Công nghệ Tp. Hồ Chí Minh*, 36(1se), 97-106.

### 2. Tài liệu tiếng nước ngoài

- Balcázar, J. L., De Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D. and Muzquiz, J. L., (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary microbiology*, 114(3), 173-186.
- Farzanfar, A., (2006). The use of probiotics in shrimp aquaculture. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 48(2), 149-158.
- Gatesoupe, F. J., (1999). The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 180(1), 147-165.
- Gilliland, S. E., Nelson, C. R. and Maxwell, C., (1985). Assimilation of cholesterol by Lactobacillus acidophilus. *Applied and Environmental Microbiology*, 49(2), 377-381.
- Herreros, M. A., Sandoval, H., González, L., Castro, J. M., Fresno, J. M. and Tornadijo, M. E., (2005). Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). *Food microbiology*, 22(5), 455-459.
- Ismail, M. M. and Soliman, W. S., (2010). Studies on Probiotic effects of lactic acid bacteria against Vibrio vulnificus in freshwater prawn Macrobrachium rosenbergii. *American Journal of Science*, 6, 781-787.
- Kandler, O., and Weiss, (1986). *Genus Lactobacillus Beijerinck 1901, 212<sup>AL</sup>*. In: *Bergeys Manual of system Bacteriology*. P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharp, and J. G. Holt (Eds), 2, Baltimore: Williams and Wilkins, 1209 – 1234.
- Mayr-Harting, A., A. J. Hedges and R. C. W. Berkeley., (1972). Methods for studying bacteriocins. *Methods in Microbiology*, 7, Part 1, 315 – 422.
- Phianphak, W., Rengpipat, S., Piyatiratitivorakul, S. and Menasveta, P., (1999). Probiotic use of Lactobacillus spp. for black tiger shrimp, Penaeus monodon. *Journal of Scientific Research, Chulanokorn University*, 24, 41-51.

- Qi, Z., Zhang, X. H., Boon, N. and Bossier, P., (2009). Probiotics in aquaculture of China—current state, problems and prospect. *Aquaculture*, 290(1), 15-21.
- Robertson, P. A. W., O'Dowd, C., Burrells, C., Williams, P. and Austin, B., (2000). Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Aquaculture*, 185(3), 235-243.
- Røssland, E., Borge, G. I. A., Langsrud, T. and Sørhaug, T., (2003). Inhibition of *Bacillus cereus* by strains of *Lactobacillus* and *Lactococcus* in milk. *International Journal of Food Microbiology*, 89(2), 205-212.
- Sanni, A. I., Onilude, A. A., Ogunbanwo, S. T. and Smith, S. I., (1999). Antagonistic activity of bacteriocin produced by *Lactobacillus* species from ogi, an indigenous fermented food. *Journal of basic microbiology*, 39(3), 189-195.
- Sivakumar, N., Sundararaman, M. and Selvakumar, G., (2012). Probiotic effect of *Lactobacillus acidophilus* against vibriosis in juvenile shrimp (*Penaeus monodon*). *African Journal of Biotechnology*, 11(91), 15811-15818.
- Todorov, SD. and Dicks, L. M. T., (2005). Effect of growth medium on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST194BZ, a strain isolated from Boza. *Food Technol Biotechnol*, 43, 165 – 173.
- Thirumurugan, A., Ramachandran, S. and Gobikrishnan, S., (2015). Optimization of medium components for maximizing the bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ATM11 using statistical design. *International Food Research Journal*, 22(3), 1272-1279.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P. and Verstraete, W., (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and molecular biology reviews*, 64(4), 655-671.

**ISOLATION OF *LACTOBACILLUS* SP. FROM GIANT TIGER PRAWN  
(*PENAEUS MONODON*) HAVING ANTIMICROBIAL ACTIVITY  
IN BAC LIEU AND CA MAU PROVINCE, VIETNAM**

**Huynh Ngoc Thanh Tam, Luu Huynh Mong Trinh,  
Nguyen Quang Loc, Nguyen Duc Do**

Biotechnology Research and Development Institute, Can Tho University

Contact email: [hnttam@ctu.edu.vn](mailto:hnttam@ctu.edu.vn)

**ABSTRACT**

The application of effective probiotics in shrimp aquaculture is an excellent alternative for chemicals and antibiotics to prevent disease control. The study was conducted to isolate the *Lactobacillus* sp. strains having good characteristics to produce probiotics and bacteriocin for using in giant tiger prawn (*Penaeus monodon*). Twenty *Lactobacillus* spp. strains were isolated from gastrointestinal tract of *P. monodon* which were sampled from 8 districts in Bac Lieu and Ca Mau province, Vietnam. Except from NH2 isolate, the others inhibited *Escherichia coli* ATCC® 25922™, and their diameters of inhibition zone ranged from 11.7 to 16.3 mm. It was NH1 isolate that the lactic acid bacterium produced crude bacteriocin at best among 20 isolates. The result of 16S ribosomal RNA gene and morphological and biochemical characteristics, NH1 strain was identified as *Lactobacillus plantarum* (97% identity when searching on Genbank of NCBI). Further experiments on NH1 showed that in MRS broth supplemented with yeast extract at 2% and 3% (w/v), bacteriocin production was doubled to 160 AU/ml compared with 80 AU/ml of MRS broth (control medium). In contrast, in MRS broth supplemented with peptone and glucose at 3% (w/v), bacteriocin production of NH1 strain was decreased to 40 AU/ml.

**Key words:** Bac Lieu province, Ca Mau province, crude bacteriocin, giant tiger prawn (*Penaeus monodon*), *Lactobacillus plantarum*.

*Received:* 14<sup>th</sup> August 2017

*Reviewed:* 2<sup>nd</sup> October 2017

*Accepted:* 15<sup>th</sup> November 2017