



KHẢO SÁT TÍNH ĐA DẠNG SINH HỌC VI KHUẨN ACID LACTIC PHÂN LẬP TỪ COM MỀ Ở BA VÙNG SINH THÁI CỦA ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

Trần Ngọc Được, Trần Nhân Dũng, Bùi Thị Minh Diệu và Đỗ Tấn Khang¹

¹*Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ*

Thông tin chung:

Ngày nhận: 20/08/2012

Ngày chấp nhận: 22/03/2013

Title:

Diversity of lactic acid bacteria isolated from “Com me” collected from different ecological regions in Mekong Delta

Từ khóa:

16S rDNA, *Lactobacillus*, probiotic, đa dạng sinh học, vi khuẩn acid lactic

Keywords:

16S rDNA, *Lactobacillus*, probiotic, biodiversity, acid lactic bacteria

ABSTRACT

Sixty five microbial isolates were isolated on MRS medium from eighteen “Com me” products collected in six provinces of The Mekong Delta. Their colonies were round, smooth white to translucent and their shapes were short rod to long rod, single or double or chained. All Gram +, catalase negative, oxidase negative, indole-negative, unable to move. They were capable of lactic fermentation from 10-20g/l. Eighteen isolates which had high lactic fermentation were identified by PCR technique with the primer pairs 8F and 1391R. Six isolates that were capable of production high acid lactic were chosen to sequence the 16S region. The results of Blast showed that B3.21n, AG.4, S3.111, K1.61, TCM1.42 and TA6 isolates were similar to *L. plantarum* strain 0100, *L. fermentum* strain 6-1-2, *L. paracasei* strain ATCC 25302, *L. casei* strain 0105 *L. paracasei* subsp. *paracasei* strain BCRC 12193, and *L. plantarum* strain ABRIINW-BL3, respectively.

TÓM TẮT

Sáu mươi lăm dòng vi khuẩn được phân lập trên môi trường MRS từ 18 mẫu com mề ở ba vùng sinh thái của Đồng Bằng Sông Cửu Long. Phần lớn khuẩn lạc của chúng có dạng tròn, láng màu trắng đục đến trắng trong và những dòng vi khuẩn này có dạng que ngắn đến que dài, đơn hoặc kết đôi hoặc kết chuỗi. Tất cả vi khuẩn đều Gram dương, Catalase âm tính, Oxidase âm tính, Indole âm tính, không có khả năng chuyển động. Chúng có khả năng lên men lactic từ 10 – 20g/l. Giải trình tự 6/65 dòng đại diện cho sáu tinh có khả năng lên men lactic cao. Kết quả so sánh trình tự tương đồng cho thấy Các dòng B3.21n, AG.4, S3.111, K1.61, TCM1.42 và TA6 tương đồng với các dòng tương ứng trên cơ sở dữ liệu NCBI gồm: *L. plantarum* strain 0100, *L. fermentum* strain 6-1-2, *L. paracasei* strain ATCC 25302, *L. casei* strain 0105 *L. paracasei* subsp. *paracasei* strain BCRC 12193 và *L. plantarum* strain ABRIINW-BL3.

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay có nhiều vi sinh vật hữu ích được ứng dụng trong sản xuất trên quy mô công

nh nghiệp trong đó có vi khuẩn lactic. Chúng có khả năng sinh ra acid lactic và các sản phẩm phụ khác (Wood và Holzapfel, 1995). Sản phẩm của những vi khuẩn lactic được ứng dụng

rộng rãi trong nhiều ngành công nghiệp như công nghiệp thực phẩm, chăn nuôi gia súc, y học, thủy sản...

Đồng bằng sông Cửu Long có ba vùng sinh thái là nước mặn, nước lợ và nước ngọt. Mỗi vùng có nguồn nước sinh hoạt, các điều kiện sản xuất, sinh hoạt khác nhau. Trong đó nguồn cơm mẻ được nuôi ở các điều kiện khác nhau về nguồn nước, khí hậu, loại gạo, cách nuôi làm cho cơm mẻ có màu sắc, độ chua, dạng đặc hay lỏng, nhiệt độ nuôi... cũng khác nhau. Câu hỏi được đặt ra là những yếu tố môi trường có ảnh hưởng đến tính đa dạng sinh học của vi khuẩn lactic không? Và như thế trong cơm mẻ ở các vùng sinh thái khác nhau hệ vi khuẩn lactic có khác nhau hay không? Đề tài “*Khảo sát tính đa dạng sinh học vi khuẩn acid lactic từ cơm mẻ ở ba vùng sinh thái của Đồng Bằng Sông Cửu Long*” đã được thực hiện với mục tiêu:

- Phân lập các dòng vi khuẩn lactic trong cơm mẻ.
- Đánh giá khả năng lên men lactic của các dòng vi khuẩn lactic phân lập được.
- Định danh các dòng vi khuẩn lactic có khả năng lên men lactic cao.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Thu mẫu

Mẫu cơm mẻ được thu từ các tỉnh khác nhau như: Cà Mau, Kiên Giang đại diện cho vùng sinh thái nước mặn. Bạc Liêu, Sóc Trăng đại diện cho vùng sinh thái nước lợ. Cần Thơ, An Giang đại diện cho vùng sinh thái nước ngọt. Mỗi tỉnh thu 3 mẫu cơm mẻ ở những nơi khác nhau mang về phòng thí nghiệm và trữ ở 4 °C cho đến khi phân lập.

2.2 Xác định thành phần hóa lý trong cơm mẻ

Phân tích các thành phần hóa lý cơ bản của sản phẩm cơm mẻ lên men như độ pH, độ ẩm và hàm lượng dinh dưỡng (đạm, đường, béo).

- Đo pH: Giá trị pH được đo trực tiếp bằng pH kế (Sartorius, PB-20, Germany).
- Xác định độ ẩm: Độ ẩm được xác định bằng phương pháp sấy đến khối lượng không đổi.

Phân tích thành phần dinh dưỡng: Các mẫu cơm mẻ được xác định:

- + Phân tích đạm tổng số bằng hệ thống Kjeldahl.
- + Đường khử được xác định bằng phương pháp Nelson – Somogyi.
- + Hàm lượng béo được phân tích bằng hệ thống Soxhlet.
- Mỗi mẫu cơm mẻ được phân tích ba lần lặp lại để lấy giá trị trung bình.

2.3 Phân lập vi khuẩn acid lactic từ cơm mẻ

Quy trình phân lập theo Oyetayo (2004)

Chuẩn bị mẫu: Cân khoảng 5 g cơm mẻ cho vào bình tam giác có dung tích 250 ml chứa 50 ml môi trường lỏng MRS. Ủ ở 37 °C trong 24 giờ. Pha loãng mẫu sau khi ủ thành nhiều nồng độ 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ bằng môi trường lỏng MRS. Ủ các đĩa petri trong bình kỵ khí, ở nhiệt độ 37 °C trong 48 giờ, tiếp tục cấy chuyển nhiều lần cho đến khi thu được mẫu ròng, cấy chuyển vào ống thạch nghiêng chứa môi trường thạch MRS và tồn trữ ở 4 °C.

Xác định sơ bộ vi khuẩn: dựa vào hình dạng, màu sắc, bề mặt khuẩn lạc, kích thước khuẩn lạc.

Quan sát hình thái vi khuẩn dưới kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 400 lần.

Chỉ tiêu chọn: chỉ chọn những vi khuẩn có đặc tính như: dạng trực khuẩn, hình que hay hình cầu, dạng đơn hay kết chuỗi.

Kiểm tra sinh hóa

Dựa vào các đặc tính sinh hóa chuyên biệt để chọn lọc những dòng vi khuẩn acid lactic đã phân lập được.

- Nhuộm Gram
- Thử nghiệm catalase
- Thử nghiệm oxydase
- Thử nghiệm khả năng sinh indol

So sánh khuẩn lạc các dòng vi khuẩn acid lactic phân lập được giữa các vùng sinh thái khác nhau về hình dạng, màu sắc khuẩn lạc, dạng bia, độ nổi, kích thước khuẩn lạc.

2.4 Kiểm tra khả năng sinh acid tổng của các dòng vi khuẩn acid lactic (Collin, 1989)

Tiến hành thí nghiệm:

– Sáu mươi lăm (65) dòng vi khuẩn acid lactic phân lập được nhân mật số trong ống nghiệm chứa môi trường MRS broth, ủ ở 30 °C, trong 24 giờ đếm mật số bằng buồng đếm hồng cầu.

– Dung dịch để tiến hành lên men (100 ml/l bình) được khử trùng ở 121°C trong 20 phút, để nguội khoảng 37 °C, chủng 1% các dòng vi khuẩn vào.

Vi khuẩn acid lactic tạo ra hàm lượng acid trong dịch lên men, độ pH đạt thấp nhất trong khoảng thời gian ngắn nhất.

Thí nghiệm được lặp lại 3 lần

– Các chỉ tiêu phân tích vào thời điểm: 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 giờ sau khi chủng vi khuẩn: xác định hàm lượng acid lactic trong dịch lên men.

Chọn một số dòng vi khuẩn acid lactic đại diện của mỗi vùng sinh thái có lượng acid lactic sinh ra cao và khác nhau được dùng để tinh sạch DNA chuẩn bị cho các bước tiếp theo.

2.5 Nhận diện các dòng vi khuẩn acid lactic đã phân lập bằng kỹ thuật sinh học phân tử

Ly trích DNA của các dòng vi khuẩn acid lactic đã phân lập

Sau khi nuôi vi khuẩn thuần trong ống nghiệm chứa môi trường lỏng MRS để thu sinh khối, tiến hành trích DNA của vi khuẩn.

Các mẫu DNA của vi khuẩn sau khi ly trích, sẽ tiến hành phản ứng PCR với cặp mồi (universal primer của rDNA vi khuẩn) khuếch đại trình tự gen 16S rDNA: 8F làm mồi xuôi và 1391R làm mồi ngược có trình tự như sau (Maniatis *et al.*, 1989):

8F 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'
1391R 5'-GAC GGG CGG TGW GTR CA-3'

Thành phần hóa học cho phản ứng PCR bao gồm: BiH₂O, PCR buffer 5X, 200nM

dNTP, 50 mM MgCl₂, 1U Taq, 10 pmol primer 8 F, 10 pmol primer 1891R, 100 ng DNA. Chu kỳ nhiệt như sau: 94 °C (2 phút), tiếp theo là 25 chu kỳ của 94 °C (1 phút), 60 °C (1 phút 30 giây), 72 °C (2 phút), sau đó là 72°C (3 phút).

Điện di gel agarose sản phẩm PCR.

Giải trình tự DNA: Giải trình tự bằng máy ABI 3130.

2.6 Phân tích và xử lý số liệu

Các mẫu sau khi giải trình tự, dùng phần mềm BioEdit 5.0 để xếp hàng (Alignment) các trình tự giống nhau. Sau đó dùng SeqVerter để chuyển định dạng dữ liệu (format) theo phần mềm PAUP 4.0 (Swofford, 2002). Cuối cùng dùng phần mềm PAUP 4.0 phân tích kết quả.

Các số liệu của mẫu và dòng *Lactobacillus* sp. được xử lý thống kê và vẽ biểu đồ bằng phần mềm Statgraphics Plus 4.0 để tìm sự khác biệt ý nghĩa nhằm chọn ra dòng *Lactobacillus* sp. có khả năng lên men lactic tốt.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Nguồn gốc mẫu com mẻ phân lập các dòng vi khuẩn

Sáu mươi lăm (65) dòng vi khuẩn đã được phân lập trên môi trường MRS (*De Man, Rogosa and Sharpe*) từ com mẻ thu được thuộc 3 vùng sinh thái của Đồng Bằng Sông Cửu Long ở 6 tỉnh, thành phố khác nhau (Bảng 1).

Trong 65 dòng vi khuẩn phân lập được có 40/65 (chiếm 61,53%) dòng vi khuẩn phân lập từ com mẻ nuôi ở gia đình, sử dụng gạo, nguồn nước... ở địa phương để làm. 25/65 (chiếm 38,47%) dòng vi khuẩn mua ở chợ.

Thành phần hóa học trong Com Mẻ

pH và ẩm độ

Thành phần hóa học cơ bản gồm pH và độ ẩm của 18 mẫu com mẻ lên men thu thập ở 6 tỉnh thuộc 3 vùng sinh thái của Đồng Bằng Sông Cửu Long được trình bày ở Bảng 2.

Giá trị pH thấp nhất là mẫu B3 (2,91) khác biệt không ý nghĩa với các mẫu K2, S2, S4 và khác biệt có ý nghĩa với các mẫu còn lại (K1, K3, CM1, CTM, 5C1, B1, B2, S3, TA, O2, O3, AG, A2, A3). Mẫu O3 có giá trị pH thấp nhất

(3,55) khác biệt có ý nghĩa thống kê với các mẫu còn lại. Tóm lại pH giữa các mẫu com mè dao động từ 2,9 – 3,5. Giữa các mẫu khác nhau được lấy ở các vùng sinh thái khác nhau cũng có sự khác nhau về pH. Kết quả này cho thấy

com mè là sản phẩm lên men chứa acid rất cao, cho thấy có sự hoạt động rất mạnh mẽ của nhóm vi khuẩn sinh acid mà trong đó chủ yếu là vi khuẩn acid lactic.

Bảng 1: Nguồn gốc các dòng vi khuẩn phân lập

Vùng sinh thái	Tỉnh	Ký hiệu mẫu	Số mẫu	Địa điểm thu mẫu	Số dòng phân lập
Nước mặn	Cà Mau	Tp Cà Mau(TCM)	1	Mua ở chợ	3
		Cà Mau (CM1)	1	Nuôi ở gia đình	4
		Năm Căn (5C1)	1	Nuôi ở gia đình	5
	Kiên Giang	Vĩnh thuận (K1, K2, K3)	3	Mua ở chợ	11
Nước lợ	Bạc Liêu	Giá Rai (B1)	1	Nuôi ở gia đình	4
		Phước Long (B2, B3)	2	Nuôi ở gia đình	7
		Kế Sách (S2)			
	Sóc Trăng	Mỹ Xuyên (S3)	1	Mua ở chợ	3
		TP Sóc Trăng (S4)	1	Mua ở chợ	4
			1	Nuôi ở gia đình	5
Nước ngọt	Cần thơ	Tân An (TA)	1	Mua ở chợ	4
		Ô Môn (O2, O3)	2	Nuôi ở gia đình	6
	An Giang	Phú Tân (AG)	1	Nuôi ở gia đình	4
		Tân Châu (A2, A3)	2	Mua ở chợ	5
Tổng cộng			18		65

Bảng 2: Giá trị pH và độ ẩm (%) của 18 mẫu com mè

STT	Mẫu	pH	Âm độ (%)
1	K1	3,13 ^{fgh}	75,65 ^{defg}
2	K2	2,98 ^{abc}	83,09 ^{abc}
3	K3	3,04 ^{cd}	72,09 ^{fg}
4	CM1	3,17 ^{efg}	83,27 ^{ab}
5	5C1	3,00 ^{def}	74,02 ^{efg}
6	TCM	3,14 ^{gh}	73,50 ^{fg}
7	B1	3,01 ^{efg}	73,20 ^{fg}
8	B2	3,03 ^{cd}	79,60 ^{bcd}
9	B3	2,91 ^a	83,83 ^{ab}
10	S2	2,97 ^{abc}	78,42 ^{cde}
11	S3	3,06 ^{de}	71,15 ^g
12	S4	2,94 ^{ab}	75,78 ^{defg}
13	TA	2,99 ^{bc}	76,72 ^{def}
14	O2	3,08 ^h	85,58 ^a
15	O3	3,55 ⁱ	82,12 ^{abc}
16	AG	3,06 ^{gh}	82,76 ^{abc}
17	A2	3,17 ^{gh}	80,31 ^{bcd}
18	A3	3,02 ^{cd}	76,19 ^{def}
CV(%)		1,13	3,23

Số liệu là kết quả trung bình của 3 lần lặp lại. Trong cùng một cột các giá trị trung bình cùng chữ thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%

Qua kết quả phân tích về ẩm độ cũng cho thấy có sự khác biệt. Mẫu có ẩm độ cao nhất là

O2 (85,577%) khác biệt không ý nghĩa với các mẫu K2, CM1, B3, AG và khác biệt có ý nghĩa với các mẫu còn lại. Sự khác biệt này chủ yếu là do mỗi một mẫu được thu thập ở các vùng khác nhau, thành phần nguyên liệu về cơ bản là giống nhau nhưng tỉ lệ com và nước bổ sung vào để nuôi com mè thì ở mỗi nơi khác nhau dẫn đến sự khác nhau về ẩm độ giữa các mẫu.

Thành phần dinh dưỡng trong Com Mè

Về hàm lượng dinh dưỡng, trong đó có 3 thành phần chính là đạm, đường và chất béo được trình bày ở Bảng 3.

Về đạm tổng số thì mẫu S3 có đạm tổng số cao nhất (5,31) khác biệt không có ý nghĩa thống kê với các mẫu O2, S2, TCM và khác biệt có ý nghĩa thống kê với các mẫu còn lại. Đạm formol cao nhất là mẫu B2, S2, TCM và khác biệt có ý nghĩa thống kê với các mẫu còn lại. Đạm amoniac cao nhất là mẫu B2, S2 và khác biệt có ý nghĩa thống kê với các mẫu còn lại. Đạm amin cao nhất là mẫu B2, TCM và khác biệt có ý nghĩa thống kê với các mẫu còn lại. Kết quả này cho thấy com mè là một thực phẩm lên men bổ dưỡng cung cấp thêm đạm cho thức ăn.

Bảng 3: Kết quả phân tích hàm lượng dinh dưỡng của 18 mẫu com mẻ

Tên mẫu	Hàm lượng đạm (g/kg)				Hàm lượng đường (%)	Hàm lượng béo (%)
	Đạm nito Tổng	Đạm nito Formol	Đạm nito Amoniac	Đạm nito Amin		
K1	3,92 ^{bcd}	2,24 ^{bc}	0,37 ^{bcd}	1,87 ^{bc}	3,97 ^{bcd}	1,66 ^{ab}
K2	2,87 ^{efg}	0,72 ⁱ	0,28 ^{de}	0,44 ^k	4,40 ^{bc}	0,94 ^{ab}
K3	2,70 ^{fg}	2,33 ^b	0,33 ^{cde}	2,00 ^b	3,87 ^{bcd}	1,14 ^{ab}
CM1	3,60 ^{def}	1,79 ^{defg}	0,27 ^{de}	1,52 ^{cde}	4,01 ^{bcd}	1,66 ^{ab}
5C1	4,20 ^{bb} ^{cde}	1,54 ^{fg}	0,39 ^{bcd}	1,16 ^{efgh}	3,49 ^{bcd}	0,74 ^{ab}
TCM	4,84 ^{abc}	2,86 ^a	0,43 ^{bc}	2,42 ^a	4,07 ^{bcd}	2,60 ^a
B1	3,70 ^{def}	1,06 ^{hi}	0,22 ^c	0,84 ^{hi}	3,52 ^{bcd}	1,25 ^{ab}
B2	3,19 ^{defg}	2,84 ^a	0,32 ^{cde}	2,52 ^a	4,17 ^{bcd}	1,20 ^{ab}
B3	3,57 ^{def}	1,81 ^{defg}	0,35 ^{bcd}	1,46 ^{de}	3,96 ^{bcd}	1,94 ^b
S2	4,90 ^{ab}	2,04 ^{bcde}	0,32 ^{cde}	1,72 ^{bcd}	2,91 ^d	1,56 ^{ab}
S3	5,31 ^a	2,46 ^{ab}	0,57 ^a	1,89 ^{bc}	3,96 ^{bcd}	0,53 ^{ab}
S4	3,51 ^{def}	1,64 ^{efg}	0,27 ^{de}	1,37 ^{def}	3,16 ^{cd}	1,61 ^{ab}
TA	3,8 ^{cdef}	0,95 ⁱ	0,35 ^{bcd}	0,60 ^{ik}	3,45 ^{bcd}	1,15 ^{ab}
O2	4,97 ^{ab}	1,49 ^{fg}	0,48 ^{ab}	1,01 ^{fgh}	4,11 ^{bcd}	1,70 ^{ab}
O3	3,74 ^{def}	1,42 ^{gh}	0,48 ^{ab}	0,94 ^{ghi}	5,85 ^a	0,95 ^{ab}
AG	2,33 ^g	2,16 ^{bcd}	0,46 ^{abc}	1,71 ^{bcd}	4,04 ^{bcd}	1,98 ^{ab}
A2	3,70 ^{def}	1,58 ^{fg}	0,32 ^{cde}	1,27 ^{efg}	4,44 ^{bc}	1,44 ^{ab}
A3	3,64 ^{def}	1,88 ^{cdef}	0,35 ^{bcd}	1,53 ^{cde}	4,61 ^b	1,68 ^{ab}
CV (%)	15,65	12,75	20,45	46,89	16,77	58,98

Số liệu là kết quả trung bình của 3 lần lặp lại. Trong cùng một cột các giá trị trung bình cùng chữ thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%

Kết quả cho thấy dưới hàm lượng đường trong com mẻ từ 2,9 – 5,8%. Trong đó mẫu O3 cho thấy hàm lượng đường cao nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các mẫu còn lại. Vùng nước ngọt có hàm lượng đường trong com mẻ cao nhất từ 3,45 – 5,85%, vùng nước lợ có hàm lượng đường trong com mẻ thấp nhất từ 2,91- 4,17%, vùng nước mặn có hàm lượng đường từ 3,49 – 4,4%. Sự khác nhau về hàm lượng đường có thể là do thời gian cho mẻ ăn sớm hay muộn và hoạt động tích cực của vi sinh vật mà đặc biệt là vi khuẩn lactic đã lên men lượng đường có trong com mẻ để tạo thành

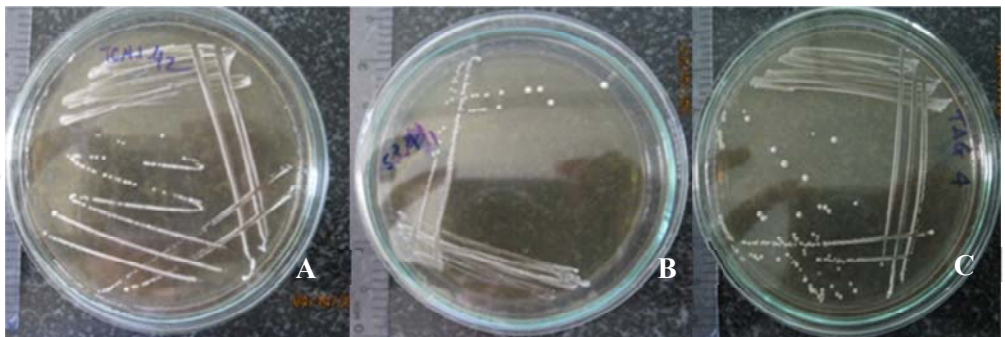
acid và các sản phẩm khác làm cho com mẻ có vị chua (pH thấp) và hương vị đặc trưng.

Hàm lượng lipid đa số trong com mẻ rất thấp từ 0,53 – 2,60%. Lipid ở mẫu S3 là thấp nhất (0,53%) và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các mẫu còn lại. Kết quả này cho thấy giữa các vùng sinh thái khác nhau thì hàm lượng lipid trong mẫu com mẻ thấp và có sự khác biệt nhau nhưng sự khác biệt này không có ý nghĩa về thống kê.

3.2 Đặc điểm hình thái của khuẩn lạc

Khuẩn lạc sau khi cấy chuyển 48h

Hình 1: Đặc điểm khuẩn lạc của vi khuẩn ở Cà Mau (A), Sóc Trăng (B) và An Giang (C)

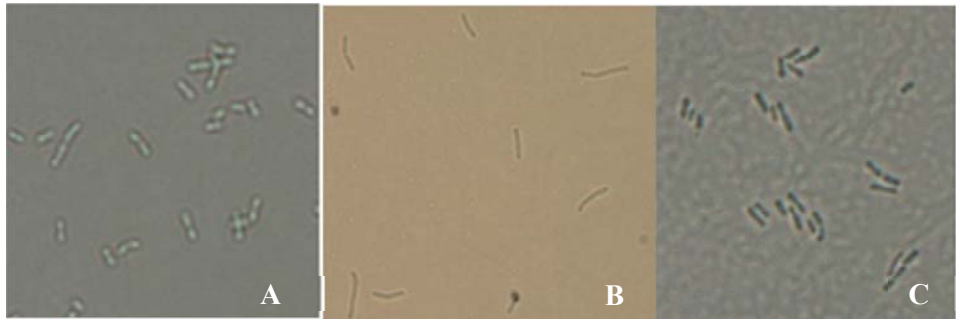


Trong 65 dòng vi khuẩn phân lập được ở 3 vùng sinh thái khác nhau có 62/65 dòng vi khuẩn có khuẩn lạc tròn, láng chiếm tỉ lệ 95,4%, 3/65 dòng có khuẩn lạc tròn, sần chiếm tỉ lệ 4,6%. 36/65 dòng vi khuẩn có màu khuẩn lạc trắng đục chiếm tỉ lệ 55,4%, có 19/65 dòng có màu khuẩn lạc trắng trong chiếm tỉ lệ 29,2%, có 10/65 dòng có màu khuẩn lạc trắng đục bìa trong chiếm tỉ lệ 15,4%. 60/65 dòng vi khuẩn có bìa khuẩn lạc dạng nguyên chiếm tỉ lệ 92,3%, 5/65 dòng có bìa khuẩn lạc dạng răng cưa chiếm tỉ lệ 7,7%. 46/65 dòng vi khuẩn có độ nổi ở dạng mô cao chiếm tỉ lệ 77,8%, 19/65 dòng có độ nổi ở dạng mô lồi bìa chiếm tỉ lệ 29,2%.

Giữa các vùng sinh thái khác nhau thì cũng có sự khác nhau về hình thái khuẩn lạc. Tuy nhiên sự khác nhau này không lớn lắm. Ở vùng nước ngọt các dòng vi khuẩn phân lập có màu trắng đục, mô cao, đường kính khuẩn lạc lớn từ 1,5 – 2,5 mm chiếm đa số, ở vùng nước lợ các dòng vi khuẩn phân lập được chủ yếu có khuẩn lạc trắng trong, mô cao, kích thước từ 1,0 – 2,0 mm chiếm đa số. Còn vùng nước mặn các dòng vi khuẩn phân lập được chủ yếu có khuẩn lạc màu trắng đục và trắng trong, mô cao, khuẩn lạc nhỏ từ 1,0 – 1,5 mm chiếm đa số. Các khuẩn lạc được đo sau khi cấy chuyển sang môi trường thạch 48h.

Hình dạng tế bào

Hình 2: Hình dạng tế bào của vi khuẩn (độ phóng đại 100X) ở Cà Mau (A), Sóc Trăng (B) và Cần Thơ (C)



Trong 65 dòng vi khuẩn phân lập được có 19/65 dòng vi khuẩn có tế bào hình que ngắn chiếm tỉ lệ 29,2%, có 22/65 dòng vi khuẩn có tế bào hình que ngắn kết đôi chiếm tỉ lệ 33,9%, có 9/65 dòng vi khuẩn tế bào hình que ngắn kết chuỗi chiếm tỉ lệ 13,9%, có 3/65 dòng vi khuẩn có tế bào hình que ngắn kết đôi cong chiếm tỉ lệ 4,6%, có 1/65 dòng vi khuẩn tế bào hình cầu chiếm tỉ lệ 1,5%, có 11/65 dòng vi khuẩn có tế bào dạng que dài chiếm tỉ lệ 16,9%.

An Giang, Sóc Trăng, Bạc Liêu, Kiên Giang, Cà Mau) là vi khuẩn thuộc giống *Lactobacillus* và 1 dòng vi khuẩn lactic hình cầu không thuộc giống *Lactobacillus*.

Đặc điểm sinh hóa

Kết quả nhuộm gram cho thấy tế bào của tất cả các dòng vi khuẩn phân lập được đều bắt màu tím xanh của thuốc nhuộm của Crystal Violet chứ không bắt màu đỏ của Fushin. Qua đó cho thấy các dòng vi khuẩn phân lập được đều là vi khuẩn gram dương.

Vùng nước ngọt chỉ phân lập được một dòng vi khuẩn lactic hình cầu cho thấy trong com mẻ chứa nhiều vi khuẩn lactic hình que (giống *Lactobacillus*). Tế bào vi khuẩn kết đôi cong chiếm tỉ lệ rất ít và chỉ phân lập ở vùng nước mặn (2 dòng) và vùng nước lợ (1 dòng). Ở 3 vùng sinh thái đều phân lập đa số tế bào vi khuẩn hình que ngắn 19/65 và que ngắn kết đôi hoặc kết chuỗi 32/65, chỉ có một số ít tế bào hình que dài 10/65. Vì vậy, có thể kết luận được rằng 64 dòng vi khuẩn có hình que phân lập được từ com mẻ lên men thu ở 6 tỉnh, thành phố thuộc 3 vùng sinh thái ĐBSCL (Cần Thơ,

Khuẩn lạc của các dòng vi khuẩn phân lập trên môi trường MRS agar sau 48 giờ cấy sẽ được chọn kiểm tra sự hiện diện của enzyme catalase và cytochrome oxidase. Khi được thử với H₂O₂ 3%, khuẩn lạc của tất cả các dòng đều không có hiện tượng sủi bọt khí, chứng tỏ các dòng đều không có hệ enzyme catalase để phân giải H₂O₂ 3% thành nước và oxy hay nói cách khác là các dòng vi khuẩn phân lập có catalase âm tính.

Tất cả các dòng phân lập đều cho kết quả oxidase âm tính vì khi được kiểm tra với giấy lọc có tẩm thuốc thử Tetramethyl - p - phenylendiamin dihydroclorid, khuẩn lạc của tất cả các dòng đều không làm đổi màu của giấy lọc từ trắng sang xanh. Trong khi dòng đối chứng (*Bacillus* sp.) được sử dụng làm đối chứng dương làm xanh giấy lọc có tẩm thuốc thử (Wood, 1995).

Kiểm tra khả năng hình thành indole từ tryptophan của tất cả các dòng vi khuẩn phân lập được đều cho kết quả indole âm tính với các thuốc thử chứa p-Dimethylaminobenzaldehyde (pDMABA). Các dòng vi khuẩn phân lập đều không tạo màu đỏ trong lớp dung môi hữu cơ. Trong khi dòng đối chứng (*Bacillus* sp.) được sử dụng tạo được vòng màu đỏ trên lớp dung môi hữu cơ.

3.3 So sánh khả năng lên men lactic của các dòng vi khuẩn acid lactic ở ba vùng sinh thái

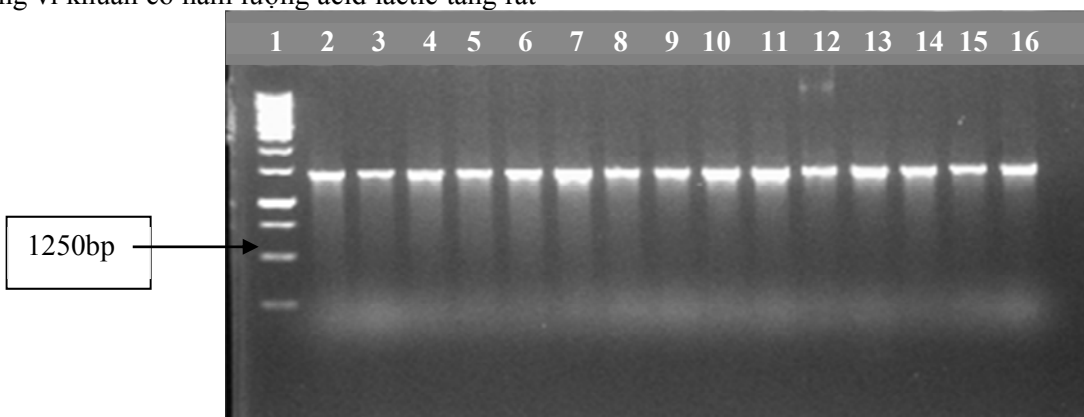
Sau khi chủng vi khuẩn 24 giờ, hàm lượng acid lactic của các dòng vi khuẩn tăng nhanh, đạt cao nhất ở các dòng TA6, K1.6₁, S2.1₁, TCM1.2n, TCM1.42, S3.11₁ khoảng 15-16g/l và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các dòng vi khuẩn còn lại. Từ 24h thì hàm lượng acid lactic tiếp tục tăng nhanh đến 72h. Từ 72h thì hàm lượng acid lactic của các dòng vi khuẩn tăng chậm lại đến 96h, từ 96h trở đi một số dòng vi khuẩn có hàm lượng acid lactic tăng rất

ít đến 144h, một số dòng hàm lượng acid lactic còn có xu hướng giảm nhẹ như các dòng A3.4N, A3.3, AG5, K1.2₁, K1.8, K2.1, K2.3, K3.1, K3.8, K3.3n, CM1.5₁, B1.7₂, B1.3₁n, B3.2₁ n, S2.1₁, S2.1, S3.3₁, O2.3, O2.3₄, O2.3₃, TA6, A2.2₁. Trong 65 dòng vi khuẩn phân lập có 3 dòng vi khuẩn có khả năng lên men tạo acid thấp nhất khoảng 10,8- 11,04 g/l là các dòng A3.3, O3.7, O3.7n.

Khả năng lên men lactic của các dòng vi khuẩn đạt cao nhất từ 48h- 96h. Điều này chứng tỏ sinh khối của các dòng vi khuẩn tăng cao nhất vào lúc 48h – 96h. Giữa các dòng vi khuẩn phân lập từ ba vùng sinh thái nước mặn, lợ, ngọt có khả năng lên men lactic khác nhau. Trong đó mẫu O3 pH= 3,5 là cao nhất, kết quả phân lập được 2 dòng O3.7 và O3.7n cũng có khả năng lên men lactic thấp nhất khoảng 10,50 – 10,89 g/l, lượng đường cao nhất. Những mẫu còn lại có pH thấp (2,9- 3,1) kết quả phân lập được các dòng vi khuẩn có khả năng lên men lactic cao hơn khoảng 18- 20g/l. Từ đó cho thấy pH, ẩm độ, hàm lượng dinh dưỡng có ảnh hưởng đến sự phát triển của vi khuẩn lactic.

3.4 Nhận diện các dòng vi khuẩn acid lactic đã phân lập bằng kỹ thuật sinh học phân tử

Kết quả cho thấy, sản phẩm PCR của 18/18 dòng vi khuẩn acid lactic trên đều có băng DNA nằm trong khoảng 1200bp (Hình 3).



Hình 3: Sản phẩm PCR của một số dòng vi khuẩn phân lập được

(1) Thang chuẩn 1500bp; (2) Dòng TA6; (3) Dòng S4.8₄; (4) Dòng TCM1.4₂; (5) Dòng B3.2₁nhỏ; (6) Dòng O2.3₄; (7) Dòng K2.1₂; (8) Dòng B1.4n; (9) Dòng 5C1.12₁; (10) Dòng A3.2₁; (11) Dòng A2.2₁; (12) Dòng S3.11₁; (13) Dòng AG.4; (14) Dòng S2.1₁; (15) Dòng CM1.5₁; (16) Dòng K1.6₁

Kết quả giải trình tự của 6 dòng vi khuẩn acid lactic phân lập bằng máy giải trình tự tự động

Căn cứ vào khả năng lên men tạo acid lactic cao của 6 tinh, 6 dòng vi khuẩn đại diện cho 6 tinh của 3 vùng sinh thái đồng bằng sông Cửu Long: TA6, AG4, S3.11₁, B3.2_{1n}, K1.6₁, TCM1.4₂ được chọn để giải trình tự.

Sử dụng chương trình BLAST N để so sánh mức độ đồng hình của trình tự các dòng vi khuẩn phân lập với trình tự của dòng vi khuẩn trong ngân hàng gen trên trang NCBI BLAST. Kết quả thu được như sau:

Dòng AG.4 có tổng số nucleotide được giải là 923 nucleotide, cho kết quả đồng hình với dòng *Lactobacillus plantarum* 033 strain (JN560899.1) với tỉ lệ 99% và *Lactobacillus fermentum* strain 6-1-2 (GU451063.1) với tỉ lệ 99%, có 4 vị trí bị ngắt quãng trên chuỗi 4/895 (0%).

- Dòng TA6 có tổng số nucleotide được giải là 923 nucleotide, cho kết quả đồng hình với dòng *Lactobacillus plantarum* strain ABRIINW-BL3 (JN368469.1) với tỉ lệ 97% và dòng *Lactobacillus pentosus* MP-10

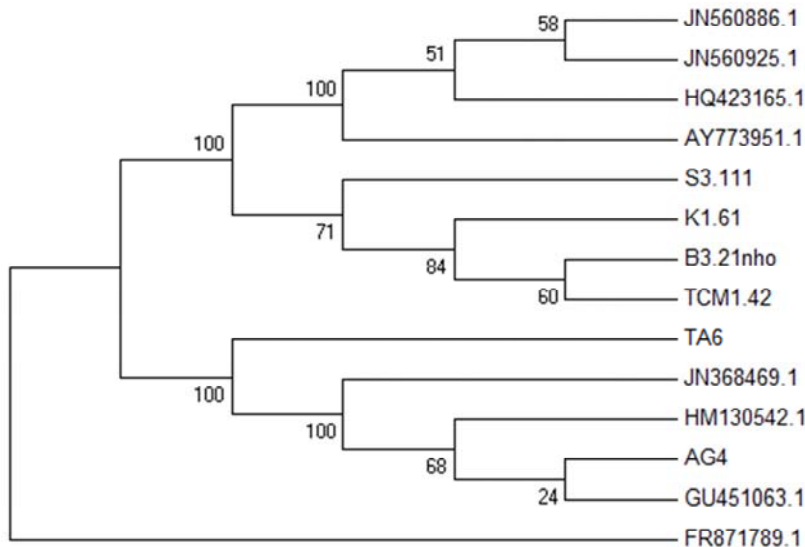
(Fr871789.1) với tỉ lệ 97%, có ba vị trí bị ngắt quãng trên chuỗi 3/805 (0%).

- Dòng S3.11₁ có tổng số nucleotide được giải là 924 nucleotide, cho kết quả đồng hình với dòng *Lactobacillus paracasei* strain ATCC 25302 (HQ423165.1) với tỉ lệ 96%, có sáu vị trí bị ngắt quãng trên chuỗi 6/899 (1%).

- Dòng B3.2_{1n} có tổng số nucleotide được giải là 954 nucleotide, cho kết quả đồng hình với dòng *Lactobacillus casei* 012 strain (JN560840.1) với tỉ lệ 97%, có một vị trí bị ngắt quãng trên chuỗi 1/926 (0%).

- Dòng TCM1.4₂ có tổng số nucleotide được giải là 844 nucleotide, cho kết quả đồng hình với dòng *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* strain BCRC 12193 (AY773951.1) với tỉ lệ 98%, có hai vị trí bị ngắt quãng trên chuỗi 2/819 (0%).

- Dòng K1.6₁ có tổng số nucleotide được giải là 844 nucleotide, cho kết quả đồng hình với dòng *Lactobacillus casei* strain 0105 (JN560886.1) với tỉ lệ 97%, có hai vị trí bị ngắt quãng trên chuỗi 2/819 (0%).



Hình 4: Mối quan hệ tiến hóa (cây phả hệ) của các dòng vi khuẩn lactic đã phân lập từ mẫu Cơm mẻ của ba vùng sinh thái ở đồng bằng sông Cửu Long

Kết quả phân tích mối quan hệ tiến hóa (cây phả hệ) cho thấy các dòng vi khuẩn trên được chia thành 2 nhóm lớn (Hình 4). Trong đó, dòng *Lactobacillus pentosus* tạo thành một nhóm riêng có mức tương đồng 99,1% so với nhóm còn lại. Nhóm lớn 2 chia thành 2 nhóm nhỏ. Trong nhóm nhỏ 1 có 2 dòng TA6 và AG4 ở vùng sinh thái nước ngọt tạo thành một nhóm riêng biệt và tương đồng ở mức 99,94% so với các dòng còn lại. Dòng AG4 có mối quan hệ gần nhất với dòng *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum* ở mức tương đồng 99%, Dòng TA6 *Lactobacillus plantarum* và *Lactobacillus pentosus* ở mức tương đồng 97% trên ngân hàng gen. Trong nhóm nhỏ 2 là các dòng còn lại của 2 vùng sinh thái nước mặn và lợ tạo thành một nhóm với mức tương đồng 99,99%. Các dòng B3.2_{1n}, S3.11₁, S3.11₁, K1.6₁, TCM1.4₂ có mối quan hệ gần nhất với các dòng *Lactobacillus paracasei* và *Lactobacillus casei* có mức tương đồng từ 96 - 98% trên ngân hàng gen.

Các dòng phân lập ở vùng nước mặn và nước lợ được thu mẫu ở những tỉnh giáp ranh nhau là Cà Mau, Kiên Giang, Bạc Liêu, Sóc Trăng. Các mẫu cơm mẻ được làm từ nguồn nước ngầm, do khoảng cách địa lý gần nên nguồn gạo và cách làm cơm mẻ của người dân cũng không khác nhau nhiều dẫn đến các dòng vi khuẩn phân lập được có quan hệ gần nhau hơn. Hai dòng TA6 và AG4 được phân lập ở Cần Thơ và An Giang có khoảng cách địa lý khá xa so với các mẫu còn lại. Hai tỉnh này người dân chủ yếu sử dụng nguồn nước sông hoặc nước máy, cho nên điều kiện lên men của các mẫu cơm mẻ khác với vùng nước mặn và nước lợ dẫn đến có sự khác biệt về mặt di truyền của các loài vi khuẩn lactic.

Lactobacillus casei, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei* là các dòng vi khuẩn được sử dụng phổ biến trong các chế phẩm probiotic vì nó có tác dụng ức chế lại nhiều loại vi khuẩn gây bệnh, tăng khả năng hấp thu trong hệ tiêu hóa.

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

4.1 Kết luận

Kết quả phân tích các thành phần cơ bản của 18 mẫu cơm mẻ thu được như sau:

- Giá trị pH dao động trong khoảng 2,9 – 3,5; độ ẩm mẫu cơm mẻ dao động trong khoảng 71% - 85%; hàm lượng đạm trong cơm mẻ: Nitơ tổng từ 2,7-4,9 (g/kg), nitơ formol từ 0,7-2,8(g/kg), nitơ amoniac từ 0,27 - 0,57(g/kg) và nitơ amin từ 0,4 – 2,4(g/kg); hàm lượng đường: 2,9 - 5,8%; hàm lượng chất béo: 0,53 % - 2,6%.

- Sáu mươi lăm dòng vi khuẩn acid lactic hầu hết đều có khuẩn lạc tròn, láng, màu sắc từ trắng đục đến trắng trong, hình que ngắn và dài, kết đôi hoặc kết chuỗi, không có khả năng chuyển động.

- Định danh được 6 dòng vi khuẩn lactic bao gồm AG.4, TA6, S3.11₁, B3.2_{1n}, TCM1.4₂ và K1.6₁.

4.2 Đề xuất

Do thời gian và kinh phí có hạn, đề nghị thực hiện những nghiên cứu tiếp theo:

Sử dụng các dòng vi khuẩn có khả năng sinh acid lactic cao để ứng dụng vào thực phẩm và thủy sản.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Collins, C. H, Lyne Patricia M, Grange, T. M. 1989. *Microbiological methods* (sixth edition), pp 320-329.
2. Maniatis T., J. Sambrook, E. F. Fritsch. 1989. *Molecular, a laboratory manual*. Second edition. Cold Spring harbor laboratory press, USA. 1:6.5-7.34
3. Oyetayo, V.O. 2004. *Phenotypic characterisation and assessment of the inhibitory potential of Lactobacillus isolates from different sources*. American Journal of Biotechnology. Vol.3 (7), pp 355-357.
4. Swofford, D.L. 2002. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods). Sinauer Associates, Sunderland, MA.
5. Wood, B.J.B and Holzapfel, W. H. 1995. The Genera of Lactic Acid Bacteria.