

# PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN *LACTOBACILLUS* SP. CÓ KHẢ NĂNG ỨC CHẾ VI KHUẨN GÂY BỆNH GAN THẬN MŨ VÀ ĐÓM ĐỎ TRÊN CÁ TRA

Nguyễn Văn Thành<sup>1</sup> và Nguyễn Ngọc Trai<sup>2</sup>

## ABSTRACT

The study was conducted to isolate the *Lactobacillus* sp. strains having good characteristics to produce probiotics and bacteriocin for using in striped catfish farming. Forty-five *Lactobacillus* sp. strains were isolated from gastrointestinal tract of striped catfish and tilapia (*Oreochromis niloticus*) which were sampled from Can Tho, Vinh Long, Ben Tre, Tra Vinh and Hau Giang provinces. All isolates inhibited *Aeromonas hydrophila* but there were 43 strains having antibacterial activity against *Edwardsiella ictaluri* by agar spot testing method. Among these strains, only strain Lb12 produced bacteriocin which inhibited growth of both *E. ictaluri* and *A. hydrophila*. Further experiments on Lb12 showed that in MRS broth (control medium) bacteriocin activity was 80AU/ml. However, in MRS broth supplemented with yeast extract at 2% and 3% (w/v) bacteriocin production was stimulated to 160AU/ml. The identification by sequencing of 16S ribosomal RNA gene revealed that, strain Lb12 has 100% identity to *Lactobacillus suntoryeus* LH5 (by BLASTN search on Genbank of NCBI).

**Keywords:** *Aeromonas hydrophila*, antibacterial, bacteriocin, *Edwardsiella ictaluri*, *Lactobacillus suntoryeus*

**Title:** Isolation of *Lactobacillus* sp. inhibiting bacteria causing “red-sore disease” and “white spot in the internal organs” on *Pangasianodon hypophthalmus*

## TÓM TẮT

Đề tài được thực hiện với mục đích tìm ra dòng *Lactobacillus* sp. có những đặc tính tốt để sản xuất probiotics và bacteriocin trong phòng và trị bệnh cho cá tra. Từ các mẫu cá thu ở Cần Thơ, Vĩnh Long, Bến Tre, Trà Vinh và Hậu Giang đã phân lập được 45 dòng *Lactobacillus* sp. Tất cả chúng đều ức chế *Aeromonas hydrophila* nhưng chỉ 43 dòng có khả năng ức chế *Edwardsiella ictaluri* khi được kiểm tra bằng phương pháp nhỏ giọt. Chỉ duy nhất dòng Lb12 sinh bacteriocin ức chế cả hai loài vi khuẩn gây bệnh trên. Hoạt tính bacteriocin của dòng Lb12 tăng gấp đôi (160 AU/ml) so với môi trường đối chứng MRS broth (80 AU/ml) khi bổ sung yeast extract 2%w/v và 3%w/v. Kết quả định danh bằng phương pháp giải trình tự đoạn gen 16S ribosomal RNA cho thấy dòng Lb12 đồng hình 100% với *Lactobacillus suntoryeus* LH5 (sử dụng phần mềm tìm kiếm BLASTN trên ngân hàng dữ liệu gen của NCBI).

**Từ khóa:** *Aeromonas hydrophila*, kháng khuẩn, bacteriocin, *Edwardsiella ictaluri*, *Lactobacillus suntoryeus*

## 1 GIỚI THIỆU

Cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) là loài cá được nuôi chính ở đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL). Theo số liệu từ Tổng cục Thống kê, sản lượng cá tra năm 2009 ước đạt 1006,3 nghìn tấn. Do tốc độ phát triển nhanh và mức độ thâm

<sup>1</sup> Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup> Học viên Cao học Công nghệ Sinh học khóa 16

canh ngày càng cao đã dẫn đến nhiều bệnh truyền nhiễm do vi khuẩn gây ra trên cá tra. Trong đó, bệnh gan thận mũ do vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* và bệnh đốm đỏ do *Aeromonas hydrophila* gây ra (Tùng Thanh Dung *et al.*, 2005) đã gây thiệt hại kinh tế đáng kể cho người nuôi. Tuy nhiên, do việc chọn và dùng thuốc kháng sinh trong phòng trị bệnh cho cá không đúng cách đã làm cho độ nhạy của vi khuẩn *E. ictaluri* và *Aeromonas sp.* đối với các loại thuốc kháng sinh ngày càng giảm và nguy cơ không còn thuốc điều trị đang đến gần (Nguyễn Đức Hiền, 2008). Mặt khác, việc lạm dụng kháng sinh làm cho dư lượng kháng sinh trong thịt cá tra vượt mức cho phép. Hiện nay việc nghiên cứu sử dụng chế phẩm sinh học đặc biệt là probiotics và bacteriocin để phòng, trị bệnh cho cá đã thu hút nhiều nhà khoa học quan tâm nghiên cứu.

Probiotics là những vi sinh vật sống mà khi được tiêu thụ với lượng thích hợp sẽ mang lại những tác động có ích cho vật chủ (FAO/WHO, 2001). Lactobacilli mang lại nhiều lợi ích cho vật chủ bởi chúng có khả năng: bám vào tế bào biểu mô ruột, tồn tại và tăng mật số trong vật chủ, ngăn chặn hoặc giảm sự bám vào tế bào của các tác nhân gây bệnh, cạnh tranh dinh dưỡng với vi khuẩn gây bệnh, kích thích miễn nhiễm cho vật chủ, tạo ra acid, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> và bacteriocin để ức chế sự tăng trưởng của các tác nhân gây bệnh (Reid, 1999; Vázquez *et al.*, 2005). Nghiên cứu của Galindo (2004) cho thấy các loài vi khuẩn thuộc giống *Lactobacillus* được phân lập từ dạ dày – ruột của một số loài cá nước ngọt có khả năng ức chế mạnh một số loài vi khuẩn gây bệnh phổ biến ở cá như: *A. hydrophila*, *E. tarda* 524362. Bacteriocin khác với hầu hết các kháng sinh dùng trong y học do chúng là các phân tử protein nên dễ bị phân hủy bởi enzyme protease trong hệ tiêu hóa. Bacteriocin được tạo ra bởi các loài thuộc *Lactobacillus* có khả năng ức chế được nhiều loài vi khuẩn gây bệnh (Schillinger và Lucke, 1989; Lewus *et al.*, 1991; Karthikeyan và Santosh, 2009). Tuy nhiên, cho đến nay chưa có nghiên cứu sử dụng *Lactobacillus sp.* hay bacteriocin từ *Lactobacillus sp.* để ức chế lại *E. ictaluri*. Với lý do đó, việc nghiên cứu tìm ra dòng *Lactobacillus sp.* có khả năng ức chế lại *E. ictaluri* và *A. hydrophila* là vấn đề cấp thiết. Nghiên cứu này nhằm mục tiêu phân lập, tuyển chọn dòng *Lactobacillus sp.* có khả năng ức chế vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* gây bệnh ở cá tra để sản xuất chế phẩm sinh học phòng và trị bệnh cho cá tra góp phần xây dựng nền nông nghiệp bền vững.

## 2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Phương tiện nghiên cứu

Thí nghiệm được thực hiện và sử dụng các trang thiết bị hiện có tại Phòng thí nghiệm Công nghệ Sinh học Thực phẩm, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học. Bộ môn Sinh học và Bệnh thủy sản, Khoa Thủy sản, trường Đại học Cần Thơ. Thời gian từ tháng 9/2010 đến tháng 5/2011.

Chủng vi khuẩn gây bệnh *E. ictaluri* và *A. hydrophila* nhận được từ bộ sưu tập của Bộ môn Sinh học và Bệnh thủy sản, Khoa Thủy sản, trường ĐHTC.

## 2.2 Phương pháp nghiên cứu

### 2.2.1 Thu mẫu

Cá tra và cá rô phi được thu tại chợ và các ao nuôi theo các mô hình: quảng canh (nuôi với mật độ nhỏ hơn 10 con/m<sup>2</sup> không cho cá ăn thức ăn công nghiệp và chế phẩm probiotics), bán thâm canh (nuôi với mật độ từ 10 – 19 con/m<sup>2</sup> có cho cá ăn thức ăn công nghiệp và bổ sung chế phẩm probiotics) và thâm canh (cũng cho cá ăn thức ăn công nghiệp và chế phẩm probiotics như bán thâm canh nhưng với mật độ lớn hơn 20 con/m<sup>2</sup>). Cá thu ở các chợ và ao (3 - 4 con/ao) được trữ trong thùng đá mang về phòng thí nghiệm tiến hành giải phẫu và phân lập vi khuẩn.

### 2.2.2 Thí nghiệm 1. Phân lập và nhận diện các dòng vi khuẩn phân lập được thuộc giống *Lactobacillus*

Cá sau khi mang về phòng thí nghiệm được rửa sạch và khử trùng bên ngoài bằng ethanol 70°, cá thu ở các mô hình khác nhau được giải phẫu riêng biệt để lấy phần vật chất trong dạ dày, ruột và tiến hành phân lập trên môi trường *Lactobacillus* Anaerobic MRS with Vancomycin and Bromocresol green (LAMVAB) ủ ở điều kiện kỵ khí, nhiệt độ 30°C. Sau khi phân lập tách rỗng, các dòng vi khuẩn này được cấy trên môi trường MRS (de Man, Rogosa & Sharpe) agar để tiến hành kiểm tra các đặc điểm sinh hóa. Các dòng vi khuẩn phân lập được cho là thuần và thuộc giống *Lactobacillus* khi các đặc điểm hình thái và sinh hóa của chúng giống như mô tả của Kandler và Wiss (1986).

### 2.2.3 Thí nghiệm 2. Kiểm tra khả năng ức chế của *Lactobacillus* sp. phân lập được lên vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila*

Phương pháp nhỏ giọt (Galindo, 2004): Nguyên tắc của phương pháp này là dựa vào khả năng ức chế của tất cả các thành phần mà *Lactobacillus* sp. sinh ra (acid lactic, ethanol, diacetyl, bacteriocin,...) lên dòng vi khuẩn gây bệnh. Mỗi dòng *Lactobacillus* sp. được nuôi trong 3 ống nghiệm 10ml (chứa 9ml MRS broth/ống). Sau 24 giờ, hút 5μl dịch nuôi từ mỗi ống nghiệm nhỏ vào đĩa petri có chứa môi trường MRS agar. Ủ kỵ khí 24 giờ ở 30°C cho khuẩn lạc phát triển. Cho 5 ml môi trường thạch mềm BHI (Brain Heart Infusion) có chứa 0,5 % agar và dịch nuôi 24 giờ của *E. ictaluri* vào đĩa MRS agar có khuẩn lạc đã phát triển. Ủ ở 28°C, 48 giờ. Dòng *Lactobacillus* sp. có khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh sẽ tạo vòng vô khuẩn (VVK) xung quanh khuẩn lạc. So sánh đường kính vòng vô khuẩn (ĐKVVK) để chọn dòng *Lactobacillus* sp. có khả năng ức chế mạnh *E. ictaluri*.

Phương pháp khuếch tán giếng thạch (Aly and Abo-Amer, 2007). Nguyên tắc của phương pháp này chỉ dựa vào khả năng ức chế của bacteriocin do *Lactobacillus* sp. sinh ra lên vi khuẩn gây bệnh. Mỗi dòng *Lactobacillus* sp. được nuôi trong 3 ống nghiệm 20 ml (chứa 19 ml MRS broth/ống). Sau 48 giờ, mỗi ống nghiệm được ly tâm riêng biệt ở 7000 vòng/phút, 8°C, 10 phút. Hút lấy phần dịch trong và điều chỉnh pH về 6,0 bằng NaOH 1M. Dịch trong bây giờ được xem như là bacteriocin thô. *E. ictaluri* được nuôi trong môi trường BHI (Brain Heart Infusion) trong 48 giờ, pha loãng đến mật số khoảng 10<sup>8</sup> tb/ml. Cấy trải 50μl dịch nuôi đã pha loãng vào đĩa petri có chứa môi trường TSA (Trypticase Soy Agar) để ráo, đục lỗ thạch có đường kính 5mm (4 lỗ/đĩa petri), bơm bacteriocin thô (50μl bacteriocin thô/lỗ) vào 3 lỗ và 50μl nước cất vô trùng vào lỗ đối chứng. Ủ ở 28°C, 48 giờ. Dòng

*Lactobacillus* sp. sinh bacteriocin có khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh sẽ tạo VVK xung quanh lỗ thạch. So sánh ĐKVVK để chọn dòng *Lactobacillus* sp. có khả năng ức chế mạnh *E. ictaluri*.

Khả năng ức chế của *Lactobacillus* sp. lên *A. hydrophila* được kiểm tra theo hai phương pháp tương tự đối với *E. ictaluri* nhưng môi trường BHI và TSA lần lượt được thay thế bằng môi trường Nutrient broth (NB) và Nutrient agar (NA).

#### 2.2.4 Thí nghiệm 3. Khảo sát ảnh hưởng của thành phần môi trường nuôi cấy lên sự hình thành bacteriocin của *Lactobacillus* sp.

Dòng *Lactobacillus* sp. sinh bacteriocin ức chế mạnh nhất lên *A. hydrophila* và *E. ictaluri* trong tất cả các dòng *Lactobacillus* sp. sẽ được chọn để khảo sát ảnh hưởng của thành phần nuôi cấy lên sự hình thành bacteriocin. Chỉ chọn 1 dòng vi khuẩn gây bệnh nhạy cảm với bacteriocin do dòng *Lactobacillus* sp. trên sinh ra để làm dòng chỉ thị.

Môi trường MRS broth (được xem như môi trường đối chứng) và môi trường MRS broth được bổ sung thêm một số thành phần với hàm lượng: Yeast extract (1, 2, 3% w/v), NaCl (1, 2, 3% w/v), Glucose (1, 2, 3% w/v), Tween 80 (0,1, 0,5, 1 % w/v) được dùng để khảo sát ảnh hưởng của thành phần môi trường nuôi cấy lên sự hình thành bacteriocin.

Hoạt tính bacteriocin (AU/ml) được xác định bằng phương pháp pha loãng hai lần liên tiếp (Mayr-Harting *et al.*, 1972) và tính theo công thức:

$$\text{AU/ml} = \text{Dfi} \times 1/\text{V}_{\text{bacteriocin}} \text{ (Nguyễn Thúy Hương và Trần Thị Tường An, 2008)}$$

Trong đó: AU: đơn vị hoạt tính; Dfi: Độ pha loãng cao nhất có vòng ức chế;  $\text{V}_{\text{bacteriocin}}$ : Thể tích bacteriocin thô cho vào mỗi giếng (ml).

Phân tích số liệu: Số liệu về ĐKVVK và hoạt tính bacteriocin (AU/ml) của 45 dòng *Lactobacillus* sp. được xử lý thống kê và vẽ biểu đồ bằng phần mềm Statgraphics Plus version 4.0, chương trình Microsoft Excel 2003 nhằm chọn ra dòng *Lactobacillus* sp. ức chế mạnh vi khuẩn gây bệnh.

#### 2.2.5 Định danh dòng Lb12 sinh bacteriocin bằng phương pháp giải và phân tích trình tự gen 16s rRNA

Quy trình giải và phân tích trình tự gen 16S rRNA được tóm tắt như sau: vi khuẩn mọc trên hộp thạch phân lập được gọt vào nước muối sinh lý vô khuẩn để đạt độ đục 0.5 – 1McF. Sau đó đun cách thủy sôi trong 10 phút. Để nguội rồi ly tâm 13.000 rpm trong 5 phút. Lấy 5 $\mu$ l dịch nổi cho vào PCR mix 45 $\mu$ l chứa sẵn các thành phần và cặp mồi NK16s-F và NK16s-R (được phát triển bởi công ty Nam Khoa) khuếch đại đoạn DNA dài 527bps chứa trình tự đặc hiệu loài trên gen 16S của vi khuẩn. Chạy chương trình nhiệt PCR gồm 1 chu kỳ 950C/5 phút rồi 40 chu kỳ 940C/15 giây – 600C/30 giây – 720C/1 phút. Sản phẩm PCR sau đó được tinh sạch bằng bộ “Wizard SV Gel and PCR clean-up System”. Sản phẩm tinh sạch được điện di trên thạch và sau đó định lượng bằng quang phổ GenQuant, sau đó được đưa vào phản ứng giải trình tự 2 chiều sử dụng mồi xuôi và mồi ngược của PCR thực hiện trên bộ thuốc thử “DTCS cycle sequencing kit”. Chương trình luân nhiệt của phản ứng giải trình tự với bộ thuốc thử trên là 30 chu kỳ 960C/20 giây – 500C/20 giây – 600C/4 phút. Sản phẩm của phản ứng giải trình tự được rửa bằng

ethanol, rồi sau đó được chạy điện di giải trình tự trên máy giải trình tự CEQ8000. Kết quả giải trình tự được so chuỗi bằng chương trình blastn search trên ngân hàng dữ liệu gene của NCBI. Từ kết quả so chuỗi, chúng ta sẽ có được kết quả định danh vi khuẩn.

### 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1 Phân lập và nhận diện các dòng vi khuẩn phân lập được thuộc giống *Lactobacillus*

##### 3.1.1 Phân lập vi khuẩn từ dạ dày, ruột cá tra và cá rô phi

Bốn mươi lăm (45) dòng vi khuẩn đã được phân lập tách rỗng trên môi trường LAMVAB từ dạ dày, ruột của các mẫu cá tra và rô phi thu ở: Cần Thơ, Vĩnh Long, Trà Vinh, Bến Tre, Hậu Giang. Trong đó: 29 dòng được phân lập từ cá tra, 16 dòng được phân lập từ cá rô phi. Có thể kết luận rằng các dòng vi khuẩn phân lập từ cá nuôi theo mô hình quảng canh là các dòng vi khuẩn có nguồn gốc từ môi trường nước tự nhiên, chúng xâm nhập và cư trú trong hệ tiêu hóa của cá thông qua nguồn thức ăn tự nhiên hoặc qua nguồn nước. Đối với các dòng phân lập từ cá nuôi theo mô hình bán thâm canh và thâm canh thì vi khuẩn có nguồn gốc tự nhiên hoặc từ thức ăn và sản phẩm probiotics mà người nuôi cho cá ăn.

##### 3.1.2 Nhận diện các dòng vi khuẩn phân lập được

Sau 48 giờ cấy trên môi trường LAMVAB agar khuẩn lạc của các dòng vi khuẩn phân lập có màu xanh hoặc trắng đục (màu của môi trường LAMVAB agar) chuyển từ xanh sang vàng (do acid được tiết ra từ khuẩn lạc làm giảm pH của môi trường). Đặc điểm này giống với đặc điểm của *Lactobacillus* được phân lập và mô tả Hartemink *et al.* (1997). Trên môi trường MRS agar, sau 48 giờ nuôi cấy tất cả các dòng đều có khuẩn lạc tròn, bóng, bìa nguyên, kích thước từ 1 – 3 mm trong đó 42 dòng khuẩn lạc màu trắng đục, 3 dòng khuẩn lạc màu trắng trong. Dưới kính hiển vi quang học (BX41, Olympus), tế bào của 45 dòng vi khuẩn phân lập có dạng que ngắn (28 dòng) hoặc que dài (17 dòng), chiều dài từ 1,17 - 5,13  $\mu\text{m}$  và chiều rộng từ 0,51 - 0,86  $\mu\text{m}$ . Tất cả 45 dòng không có khả năng chuyển động khi được quan sát. Kết quả kiểm tra một số đặc tính sinh hóa cho thấy 45 dòng phân lập đều là vi khuẩn gram dương (+), catalase âm tính (-), oxidase âm tính (-), không hình thành bào tử, không sinh khí H<sub>2</sub>S, không dịch hóa gelatin, không sinh indole (Bảng 1).

Những đặc điểm hình thái và sinh hóa của các dòng vi khuẩn phân lập (Bảng 1) phù hợp với đặc điểm của giống *Lactobacillus* được mô tả bởi Kandler và Wiss (1986). Vì vậy, có thể kết luận 45 dòng vi khuẩn phân lập từ dạ dày, ruột cá tra và rô phi thu ở Cần Thơ, Vĩnh Long, Trà Vinh, Bến Tre, Hậu Giang thuộc giống *Lactobacillus*.

**Bảng 1: Tổng hợp các đặc điểm hình thái và sinh hóa 45 dòng vi khuẩn phân lập được**

Dòng	Đặc điểm khuẩn lạc*	Hình dạng tế bào	Gram	Bào tử	Catalase	Oxidase	Dịch hóa gelatin	H <sub>2</sub> S	Indole
Lb01	1	Que ngắn	+	-	-	-	-	-	-
Lb02	1	Que dài	+	-	-	-	-	-	-
Lb03	1	Que dài	+	-	-	-	-	-	-
Lb04	2	Que ngắn	+	-	-	-	-	-	-
Lb05	1	Que ngắn	+	-	-	-	-	-	-
Lb06	1	Que ngắn	+	-	-	-	-	-	-
Lb07	2	Que dài	+	-	-	-	-	-	-
Lb08	1	Que dài	+	-	-	-	-	-	-
Lb09	2	Que ngắn	+	-	-	-	-	-	-
Lb10	1	Que dài	+	-	-	-	-	-	-
Lb11	1	Que ngắn	+	-	-	-	-	-	-
Lb12	1	Que dài	+	-	-	-	-	-	-
Lb13	2	Que dài	+	-	-	-	-	-	-
Lb14	1	Que dài	+	-	-	-	-	-	-
Lb15	1	Que ngắn	+	-	-	-	-	-	-
Lb16	1	Que dài	+	-	-	-	-	-	-
Lb17	2	Que ngắn	+	-	-	-	-	-	-
Lb18	1	Que ngắn	+	-	-	-	-	-	-
Lb19	1	Que ngắn	+	-	-	-	-	-	-
Lb20	1	Que ngắn	+	-	-	-	-	-	-
Lb21	3	Que dài	+	-	-	-	-	-	-
Lb22	2	Que ngắn	+	-	-	-	-	-	-
Lb23	2	Que dài	+	-	-	-	-	-	-
Lb24	2	Que ngắn	+	-	-	-	-	-	-
Lb25	2	Que dài	+	-	-	-	-	-	-
Lb26	2	Que ngắn	+	-	-	-	-	-	-
Lb27	1	Que ngắn	+	-	-	-	-	-	-
Lb28	2	Que ngắn	+	-	-	-	-	-	-
Lb29	1	Que dài	+	-	-	-	-	-	-
Lb30	2	Que ngắn	+	-	-	-	-	-	-
Lb31	1	Que ngắn	+	-	-	-	-	-	-
Lb32	1	Que ngắn	+	-	-	-	-	-	-
Lb33	2	Que dài	+	-	-	-	-	-	-
Lb34	1	Que ngắn	+	-	-	-	-	-	-
Lb35	1	Que ngắn	+	-	-	-	-	-	-
Lb36	1	Que dài	+	-	-	-	-	-	-
Lb37	3	Que ngắn	+	-	-	-	-	-	-
Lb38	3	Que ngắn	+	-	-	-	-	-	-
Lb39	1	Que ngắn	+	-	-	-	-	-	-
Lb40	1	Que ngắn	+	-	-	-	-	-	-
Lb41	1	Que dài	+	-	-	-	-	-	-
Lb42	2	Que dài	+	-	-	-	-	-	-
Lb43	1	Que ngắn	+	-	-	-	-	-	-
Lb44	1	Que ngắn	+	-	-	-	-	-	-
Lb45	1	Que ngắn	+	-	-	-	-	-	-

\* (1) Trắng đục, tròn, bìa nguyên, nhô cao; (2) Trắng đục, tròn, bìa nguyên, lồi; (3) Trắng trong, tròn, bìa nguyên, nhô cao. (+): Gram dương; (-): không hình thành bào tử, không sinh H<sub>2</sub>S, Indole, không dịch hóa gelatin, âm tính với catalase, oxidase

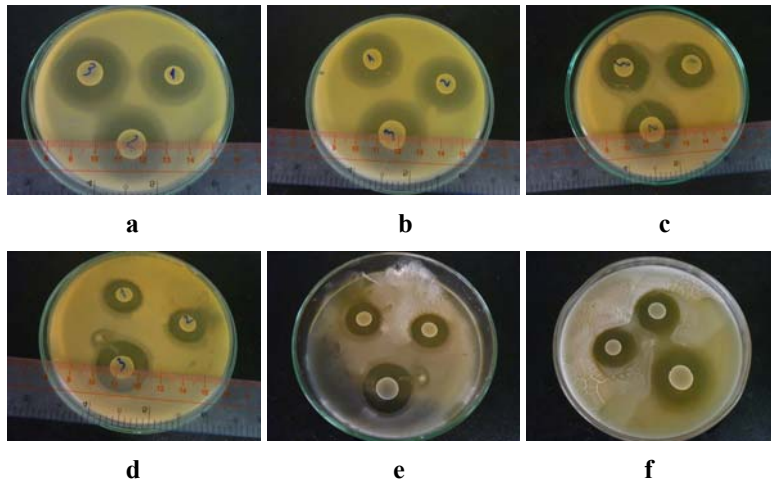
### 3.2 Kiểm tra khả năng ức chế *Aeromonas hydrophila* và *Edwardsiella ictaluri* của 45 dòng vi khuẩn *Lactobacillus* spp. phân lập được

#### 3.2.1 Phương pháp nhỏ giọt

**Khả năng ức chế *E. ictaluri*:** Dòng Lb12 tạo ĐKVVK lớn nhất (18,7mm), hai dòng Lb19 và Lb26 tạo đường kính vòng vô khuẩn (ĐKVVK) nhỏ nhất (0,3mm) trong 45 dòng *Lactobacillus* spp. được kiểm tra. Xét về khả năng ức chế theo quy ước của Galindo (2004) thì 2 dòng (Lb19 và Lb26) không có khả năng ức chế *E. ictaluri* (ĐKVVK < 1mm), 8 dòng (Lb02, Lb04, Lb06, Lb07, Lb13, Lb15, Lb29 và Lb39) ức chế yếu (1mm ≤ ĐKVVK ≤ 5mm) và 35 dòng ức chế với mức độ trung bình (6mm ≤ ĐKVVK ≤ 20mm), không có dòng *Lactobacillus* sp. phân lập nào ức chế mạnh *E. ictaluri*.

**Khả năng ức chế *A. hydrophila*:** Dòng Lb11 tạo ĐKVVK lớn nhất (22,7mm), dòng Lb26 tạo ĐKVVK nhỏ nhất (0,7mm) trong 45 dòng *Lactobacillus* spp. phân lập. Mặc dù ĐKVVK do dòng Lb11 tạo ra không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với ĐKVVK được tạo ra bởi các dòng Lb09 (21,3mm), Lb10 (20,3mm), Lb35 (20,0mm), Lb44 (20,3mm) nhưng so với các dòng còn lại thì giá trị này có sự khác biệt ý nghĩa. Xét về khả năng ức chế theo quy ước của Galindo (2004) thì 45 dòng *Lactobacillus* spp. phân lập đều ức chế *A. hydrophila*. Trong đó, 2 dòng (Lb11 và Lb09) ức chế mạnh *A. hydrophila* (ĐKVVK ≥ 21mm), 6 dòng (Lb02, Lb04, Lb07, Lb19, Lb26 và Lb39) ức chế yếu *A. hydrophila* (1mm ≤ ĐKVVK ≤ 5mm) còn lại 37 dòng ức chế *A. hydrophila* với mức độ trung bình (6mm ≤ ĐKVVK ≤ 20mm).

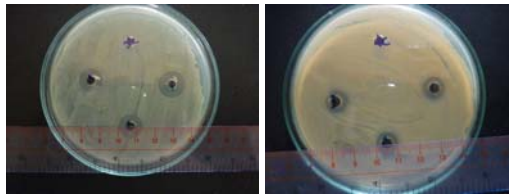
Kết quả thí nghiệm cũng cho thấy khả năng ức chế của các dòng *Lactobacillus* spp. phân lập lên *A. hydrophila* mạnh hơn lên *E. ictaluri*. Ngoài việc ức chế lại hai loài vi khuẩn gây bệnh trên, thực tế thí nghiệm cũng ghi nhận các dòng vi khuẩn *Lactobacillus* spp. phân lập còn ức chế được cả một số loài nấm nhiễm vào đĩa petri khi kiểm tra bằng phương pháp nhỏ giọt (Hình 1). Điều này cho thấy tiềm năng ức chế lại các loài vi khuẩn, nấm gây bệnh khác của các dòng *Lactobacillus* spp. phân lập được là rất lớn.



**Hình 1:** Khả năng ức chế lại *A. hydrophila* (a,b), *E. ictaluri* (c,d) và nấm (e,f) của một số dòng *Lactobacillus* spp. phân lập khi được kiểm tra bằng phương pháp nhỏ giọt

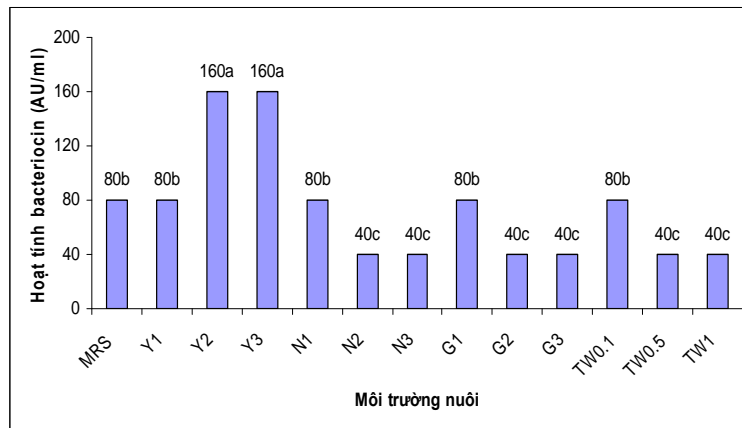
3.2.2 Phương pháp khuếch tán giếng thạch

Trong số 45 dòng *Lactobacillus* spp. phân lập chỉ duy nhất dòng Lb12 sinh bacteriocin và bacteriocin này ức chế được cả *E. ictaluri* và *A. hydrophila*. Tuy nhiên, khả năng ức chế của bacteriocin do dòng Lb12 sinh ra lên 2 dòng vi khuẩn gây bệnh này là khác nhau. ĐKVVK tạo ra đối với *A. hydrophila* là 8,3mm và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với ĐKVVK của chính bacteriocin này tạo ra đối với *E. ictaluri* (4,7mm) (Hình 2). Qua đó chứng tỏ được *A. hydrophila* nhạy cảm hơn *E. ictaluri* đối với bacteriocin do dòng Lb12 tạo ra. Tuy nhiên, việc sử dụng sinh vật đối kháng và bacteriocin để ức chế lại *E. ictaluri* là vấn đề tương đối mới vì hiện nay chưa tìm thấy nghiên cứu nào được thực hiện trong và ngoài nước sử dụng *Lactobacillus* sp. hay bacteriocin do vi khuẩn này sinh ra để ức chế lại *E. ictaluri*. Từ đó cho thấy khả năng sử dụng dòng Lb12 để điều trị bệnh gan thận mũ cũng như bệnh đốm đỏ cho cá tra là rất lớn.



Hình 2: Khả năng ức chế của bacteriocin do dòng Lb12 sinh ra lên *A. hydrophila* (bên trái) và *E. ictaluri* (bên phải)

3.3 Ảnh hưởng của thành phần môi trường nuôi cấy lên sự hình thành bacteriocin của vi khuẩn *Lactobacillus* sp.



Hình 3: Biểu đồ hoạt tính bacteriocin của dòng Lb12 ở các môi trường nuôi cấy khác nhau

MRS: Môi trường MRS broth; Y1, Y2, Y3: MRS broth + 1%, 2%, 3% yeast extract; N1, N2, N3: MRS broth + 1%, 2%, 3% NaCl; G1, G2, G3: MRS broth + 1%, 2%, 3% Glucose; TW0.1, TW0.5, TW1: MRS broth + 0,1%, 0,5%, 1% Tween 80. Trên đỉnh các cột, các số có chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không ý nghĩa ở 1% qua phép thử LSD.

Kết quả thí nghiệm cho thấy thành phần môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng rất lớn đến hoạt tính bacteriocin của dòng Lb12 (Hình 3). Hoạt tính bacteriocin tăng gấp đôi (160AU/ml) so với môi trường MRS broth (đối chứng) và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại khi yeast extract được thêm 2% hoặc 3% (w/v) vào môi trường MRS broth. Điều này có thể giải thích là việc bổ sung yeast



extract đã cung cấp nguồn acid amin cũng như nguồn nitơ để dòng Lb12 tăng sinh khối và tổng hợp bacteriocin. Tuy nhiên, ở các nghiệm thức còn lại thì việc bổ sung một số thành phần môi trường chỉ làm giảm hoặc không tăng hoạt tính của bacteriocin. Kết quả tương tự đã được báo cáo bởi Ogunbanwo *et al.* (2003), Sarika *et al.* (2010).

**3.4 Định danh dòng Lb12 bằng phương pháp giải trình tự đoạn gen 16S rRNA**

Dòng Lb12 sinh bacteriocin được định danh bằng phương pháp giải và phân tích trình tự gen 16S rRNA. Kết quả giải trình tự đoạn gen 16S của Lb12 như sau:

```
GGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCG
AGCAGAACCAGCAGATTTACTTCGGTAATGACGCTGGGGACGCGAGCG
GCGGATGGGTGAGTAACACGTGGGGAACCTGCCCATAGTCTAGGATA
CCACTTGAAACAGGTGCTAATACCGGATAATAAAGCAGATCGCATGA
TCAGCTTATAAAAGGCGGCGTAAGCTGTGCTATGGGATGGCCCCGCG
GTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAATGATGCA
TAGCCGAGTTGAGAGACTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCC
CAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCA
AGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTA
AAGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGATAGAGGTAGTAAGTGGCCTTTATT
TGACGGTAATCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTG
```

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">AY675251.1</a>	Lactobacillus suntoryeus strain LH5 16S ribosomal RNA gene, complete	959	959	100%	0.0	100%
<a href="#">AY675248.1</a>	Lactobacillus suntoryeus strain LH 16S ribosomal RNA gene, complete	959	959	100%	0.0	100%

**Hình 4: So sánh trình tự gen 16S rRNA của Lb12 và của chủng Lactobacillus suntoryeus với số đăng ký AY675251.1**

Trình tự đoạn gen được giải gồm 519 base nitrogen và đoạn gen này được so sánh với các gen 16S rRNA vi khuẩn trên Genbank với phần mềm BLASTN. Kết quả nhận được cho thấy đoạn gen 16S rRNA của dòng Lb12 có độ tương đồng lên đến 100% so với trình tự gen 16S rRNA của Lactobacillus suntoryeus LH5 với số đăng ký trên ngân hàng gen quốc tế là AY675251.1 (Hình 4).

Lactobacillus suntoryeus là loài mới thuộc giống Lactobacillus (Cachat và Priest, 2005). Tuy nhiên, dựa vào những phân tích sinh học phân tử, Naser *et al.* (2006) cho rằng dòng *Lactobacillus suntoryeus* đồng danh với *Lactobacillus helveticus*.

Một nghiên cứu khác của Bonadè *et al.* (2001) về đặc điểm của bacteriocin được tạo ra bởi *Lactobacillus helveticus* chứng minh rằng bacteriocin được sinh ra bởi *Lactobacillus helveticus* G51 có khả năng ức chế nhiều dòng *Lactobacillus helveticus* khác nhưng lại không ức chế được dòng *Aeromonas hydrophila* IMPC2. Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy bacteriocin do dòng Lb12 sinh ra có khả năng ức chế không chỉ dòng *A. hydrophila* mà cả dòng *E. ictaluri* mặc dù khả năng ức chế không mạnh lắm. Điều này cho thấy bacteriocin từ dòng Lb12 có nhiều tính năng hơn so với bacteriocin từ *Lactobacillus helveticus* G51, và cho thấy triển vọng có thể sản xuất bacteriocin có hoạt tính mạnh hơn từ dòng Lb12 bởi nghiên cứu tối ưu hóa môi trường nuôi cấy.

#### 4 KẾT LUẬN

Bốn mươi lăm (45) dòng vi khuẩn thuộc giống *Lactobacillus* đã được phân lập từ dạ dày - ruột của các mẫu cá tra và cá rô phi thu ở Cần Thơ, Bến Tre, Hậu Giang, Trà Vinh và Vĩnh Long. Tất cả các dòng này đều có khả năng ức chế *Aeromonas hydrophila* nhưng chỉ 43/45 dòng có khả năng ức chế *Edwardsiella ictaluri* khi được kiểm tra bằng phương pháp nhỏ giọt. Tuy nhiên, duy nhất dòng Lb12 sinh bacteriocin và bacteriocin này có khả năng ức chế cả *A. hydrophila* và *E. ictaluri*. Hoạt tính bacteriocin của dòng Lb12 tăng lên gấp đôi (160AU/ml) khi môi trường MRS broth được bổ sung 2% và 3% (w/v) yeast extract, trong khi việc thêm vào các thành phần khác (NaCl, Glucose, Tween 80) chỉ làm giảm hoặc không thay đổi hoạt tính bacteriocin. Việc giải và phân tích trình tự gen 16S rRNA cho thấy dòng Lb12 đồng hình 100% với *Lactobacillus suntoryeus* LH5. Kết quả thí nghiệm cho thấy dòng Lb12 phân lập được rất có triển vọng trong ứng dụng sản xuất chế phẩm probiotics và bacteriocin để phòng và trị bệnh cho cá tra mà đặc biệt là bệnh gan thận mũ và bệnh đốm đỏ.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Aly, E. and Abo-Amer. 2007. Characterization of a Bacteriocin-Like inhibitory substance produced by *Lactobacillus plantarum* isolated from Egyptian home-made Yogurt. *ScienceAsia*, 33: pp. 313 - 319.
- Bonadè, A., F. Murelli, M. Vescovo and G. Scolari. 2001. Partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus*. *Letters in Applied Microbiology*, 33: pp. 153 – 158.
- FAO/WHO. 2001. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, Argentina.
- Galindo, A. B. 2004. *Lactobacillus plantarum* 44A as a live feed supplement for freshwater fish. Ph.D Thesis. pp. 1 – 131.
- Hartemink, R., V. R. Domenech and F. M. Rombouts. 1997. LAMVAB – A new selective medium for the isolation of lactobacilli from faeces. *Journal of Microbiological Methods*, 29: pp. 77 – 84.
- Kandler, O. and N. Weiss, (1986). In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (Eds), Vol 2, Baltimore: Williams and Wilkins, pp. 1209 - 1234.
- Karthikeyan, V. and S.W. Santosh. 2009. Isolation and partila characterization of bacteriocin produced from *Lactobacillus plantarum*. *African Journal of Microbiology Research*, 3: pp. 233 – 239.
- Lewus, C. B., A. Kaiser, and T. J. Montville. 1991. Inhibition of Food – borne bacterial pathogens by bacteriocin from lactic acid bacteria isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: pp. 1683 – 1688.
- Mary-Harting, A., A. J. Hedges and R. C. W. Berkeley. 1972. Methods for studying bacteriocins. *Methods in Microbiology*, Vol.7, Part 1, pp. 315 – 422.
- Nguyễn Đức Hiền. 2008. Giải pháp giúp tăng hiệu quả điều trị các bệnh nhiễm khuẩn trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Tap chí Khoa Học*, Trường Đại học Cần Thơ, 2: tr. 202-206.
- Nguyễn Thúy Hương và Trần Thị Tường An. 2008. Thu nhận bacteriocin bằng phương pháp lên men bởi tế bào *Lactococcus lactis* cố định trên chất mang cellulose vi khuẩn (BC) và ứng dụng trong bảo quản thịt tươi sơ chế tối thiểu. *Tap chí Khoa học và Công nghệ*, 11: tr. 100 – 109.

- Ogunbanwo, S.T., A.I. Sanni and A.A. Onilude. 2003. Influence of cultural conditions on the production of bacteriocin by *Lactobacillus brevis* OG1. *African Journal of Biotechnology* Vol. 2 (7), pp. 179-184.
- Sarika, A. R., A. P. Lipton and M. S. Aishwarya. 2010. Bacteriocin production by a new isolate of *Lactobacillus rhamnosus* GP1 under different culture conditions. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 2: pp. 291 – 297.
- Schillinger, U. and F. K. Lucke. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 55: pp. 1901-1906.
- Từ Thanh Dung, Đặng Thị Hoàng Oanh và Trần Thị Tuyết Hoa. 2005. *Giáo trình Bệnh học thủy sản*. Đại học Cần thơ.