



MỘT SỐ CHỦNG VI KHUẨN LACTIC TIỀM NĂNG PHÂN LẬP TỪ MẮM CÁ CƠM SỬ DỤNG LÀM PROBIOTIC TRONG NUÔI TRỒNG THỦY SẢN

Nguyễn Thị Xuân Hồng¹*, Nguyễn Ngọc Phước¹, Nguyễn Thị Huế Linh¹, Đỗ Thị Bích Thủy¹,
Nguyễn Thị Diễm Hương¹, Nguyễn Thị Thu Giang²

¹ Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế, 102 Phùng Hưng, Huế, Việt Nam

² Trung tâm Khuyến nông Thừa Thiên Huế, 14 Phùng Hưng, Huế, Việt Nam

* Tác giả liên hệ: Nguyễn Thị Xuân Hồng <nguyenthixuanhong@huaf.edu.vn>
(Ngày nhận bài: 13-4-2021; Ngày chấp nhận đăng: 7-6-2021)

Tóm tắt. Nghiên cứu này phân lập chủng vi khuẩn lactic có nguồn gốc từ mắm cá cơm lên men truyền thống. Bằng phương pháp định danh MADLI-TOF MS và giải trình tự gen *PheS*, chúng tôi đã phân lập được ba chủng vi khuẩn thuộc loài *Lactobacillus fermentum* và *Pediococcus pentosaceus*. Cả ba chủng vi khuẩn này đều có khả năng chịu mặn, chịu axit và khả năng tự kết dính cao, phù hợp để làm probiotic trong nuôi trồng thủy sản.

Từ khoá: vi khuẩn lactic, probiotic, nuôi trồng thủy sản

Potential lactic acid bacteria isolated from fermented anchovy sauce as probiotics in aquaculture

Nguyen Thi Xuan Hong¹*, Nguyen Ngoc Phuoc¹, Nguyen Thi Hue Linh¹, Do Thi Bich Thuy¹,
Nguyen Thi Diem Huong¹, Nguyen Thi Thu Giang²

¹ University of Agriculture and Forestry, Hue University, 102 Phung Hung St., Hue, Vietnam

² Thua Thien Hue Agriculture extension Center, 14 Phung Hung St., Hue, Vietnam

* Correspondence to Nguyen Thi Xuan Hong <nguyenthixuanhong@huaf.edu.vn>
(Submitted: April 13, 2021; Accepted: June 7, 2021)

Abstract. This study isolates lactic acid bacteria from a traditional fermented sauce of anchovy. Using the MADLI-TOF MS identification and sequencing of *PheS* gen methods, we isolated three bacterial strains verified as *Lactobacillus fermentum* and *Pediococcus pentosaceus*. All three strains exhibit tolerance to high salinity, acidity, and autoaggregation and are potentially used as probiotics in aquaculture.

Keywords: lactic acid bacteria, probiotics, aquaculture

1 Đặt vấn đề

Nuôi trồng thủy sản hiện đã trở thành một trong những ngành công nghiệp phát triển nhanh nhất trong lĩnh vực sản xuất thực phẩm [1]. Việc nuôi trồng với mật độ cao nhằm tăng sản lượng và lợi nhuận đã dẫn đến những ảnh hưởng bất lợi như giảm chất lượng môi trường nước, tăng stress, dịch bệnh và kết quả là làm giảm tốc độ tăng trưởng và tăng tỷ lệ chết của đối tượng nuôi. Hiện nay, kháng sinh và các hợp chất hoá học đang được sử dụng phổ biến để phòng và trị bệnh cho các đối tượng nuôi thủy sản [1].

Probiotic là một trong những giải pháp thay thế cho việc sử dụng kháng sinh để trị bệnh nhiễm khuẩn trong nuôi trồng thủy sản. Probiotic là những vi sinh vật sống ảnh hưởng có lợi đến sức khoẻ vật chủ khi sử dụng với liều lượng phù hợp [2]. Trong đó, vi khuẩn lactic (LAB) đang được sử dụng rộng rãi. Vi khuẩn lactic là những vi khuẩn gram dương, catalase âm tính, sống trong điều kiện từ vi hiếu khí đến kỵ khí nghiêm ngặt, không có khả năng tạo bào tử, tạo axit lactic là sản phẩm cuối cùng của quá trình lên men carbohydrate.

Các kết quả nghiên cứu gần đây cho thấy vi khuẩn lactic có tiềm năng sử dụng trong nuôi trồng thủy sản nhờ khả năng sản sinh các chất kháng khuẩn trong quá trình sinh trưởng và phát triển như khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh *Vibrio alginolyticus*, *Aeromonas hydrophila* và *Pseudomonas stutzeri* [3, 4]. Hiệu quả của việc bổ sung vi khuẩn lactic vào thức ăn đến tốc độ tăng trưởng, nâng cao miễn dịch và khả năng kháng bệnh của tôm chân trắng cũng đã được một số tác giả làm rõ [5, 6].

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm cung cấp thông tin về sự đa dạng, tính chất probiotic của hệ vi khuẩn lactic phân lập từ mắm cá com và khả năng ứng dụng trong lĩnh vực nuôi trồng thủy sản. Trong công trình này, chúng tôi định danh chủng vi khuẩn lactic phân lập từ mắm cá com và khảo sát một số tính chất của các chủng phân lập được như khả năng chịu mặn và một số tính năng probiotic.

2 Vật liệu và phương pháp

2.1 Vật liệu

Các chủng vi khuẩn lactic được phân lập từ mắm cá com sản xuất theo phương pháp lên men truyền thống tại xã An Truyền, huyện Phú Vang, tỉnh Thừa Thiên Huế.

2.2 Lấy mẫu và phân lập hệ sinh vật từ mắm cá com

Mẫu mắm cá com thành phẩm sau khi nghiền nhỏ trong cối chày sứ đã vô trùng được pha loãng bằng nước muối sinh lý vô trùng. 50 μ L dịch hòa loãng được dàn trên môi trường MRS agar ở các nồng độ từ 10^{-5} đến 10^{-7} , ủ ở 28 °C trong 24 và 48 giờ. Cấy ria các khuẩn lạc đơn sang

đĩa thạch nhiều lần để thu dòng thuần. Hình thái tế bào được xác định bằng phương pháp nhuộm gram. Những chủng có tế bào gram dương và catalase âm tính được dự đoán là vi khuẩn lactic.

2.3 Định danh bằng phương pháp MALDI-TOF MS

Chuẩn bị mẫu: Tế bào vi khuẩn lactic bảo quản trong môi MRS chứa 30% glycerol được cấy chuyển sang môi trường MRS agar và nuôi cấy yếm khí ở 28 °C cho đến khi thu được thể hệ thứ tư. Tế bào thể hệ thứ tư lần lượt được rửa trong 300 µL Q water và 900 µL cồn tuyệt đối. Tế bào sạch thu nhận sau khi ly tâm dịch huyền phù ở 13.000 vòng/phút trong ba phút tiếp tục được tái huyền phù trong 50 µL axit formic 70% và 50 µL acetonitrile. Dịch tái huyền phù sau đó được ly tâm ở 13.000 vòng/phút ở 4 °C trong ba phút để thu dịch nổi chính là dịch chiết protein của tế bào dùng cho phân tích MALDI-TOF MS. Cho 1 µL dịch chiết protein của tế bào vào các điểm trên đĩa MALDI (AB Sciex, Netherlands). Sau khi dịch chiết này được để khô ở nhiệt độ phòng; tiếp tục cho 1 µL dung dịch gồm axit α -cyano-4-hydroxycinnamic (α -CHCA) 0,5% trong dung dịch có tỷ lệ acetonitrile/nước/ axit trifluoroacetic là 50:48:2 vào đĩa và chờ khô. Tất cả các dịch chiết protein của tế bào được thực hiện phân tích ít nhất hai lần.

Phân tích MALDI-TOF MS: Quá trình phân tích protein tế bào được thực hiện trên hệ thống 4800 Plus MALDI TOF/TOF™ Analyzer (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) dựa trên khả năng tích điện dương của protein. Kết quả của quá trình phân tích là các khối phổ protein từ 2.000 đến 20.000 Da.

Phân tích dữ liệu MALDI-TOF MS: Các file dữ liệu từ hệ thống 4800 Plus MALDI TOF/TOF™ Analyzer được phân tích với phần mềm Data Explorer (Applied Biosystem) để chuyển thành file văn bản. Các file văn bản sau đó được đưa vào hệ thống Bionumerics để phân tích tiếp [5].

2.4 Định danh bằng phương pháp giải trình tự gen *PheS*

Tách chiết ADN: Cho dịch huyền phù vi khuẩn vào ống Eppendorf 1,5 mL đã có sẵn 20 µL dung dịch đệm (2,5 mL 10% SDS + 5,0 mL 1M NaOH + 92,5 mL MQ), ủ ở 95 °C trong 15 phút. Sau đó ly tâm ở 13.000 vòng/phút trong 10 giây, và thêm vào 180 µL nước MQ. Tiến hành ly tâm lạnh 4 °C ở 13.000 vòng/phút trong 5 phút và thu dịch nổi để thực hiện phản ứng PCR.

Phản ứng PCR: Đoạn mồi PheS-21-F (5'-CAYCCNGCHCGYGAYATGC-3') và PheS-23-R (5'-GGRTGRACCATVCCNGCHCC-3') được sử dụng để nhân lên đoạn gen *PheS*. Phản ứng PCR được thực hiện trên máy Gene Amp PCR 9600 thermocycler; tiến hành trong khoảng 30 chu kỳ. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng cách điện di trên gel agarose 1%. Sau khi kiểm tra, nếu sản phẩm PCR có kích thước đúng như kích thước của đoạn gen *PheS* thì chúng sẽ được tinh sạch bằng hệ thống màng lọc Nucleofast 96 PCR. Để giải trình tự gen *PheS* thì sản phẩm PCR vừa tinh sạch ở trên sẽ được chạy PCR lần thứ hai với mồi xuôi và mồi ngược tách biệt. Sau đó, sản phẩm

PCR của môi xuôi và sản phẩm PCR của môi ngược được đưa đi giải trình bằng máy ABI PRISM 3100.

Phân tích trình tự gen PheS và xác định loài: Số liệu trình tự thô được nhập vào phần mềm AutoAssemble 1.40 hoặc GeneBuilder và trình tự liên tục của gen *PheS* được xác định. Trình tự liên tục này sẽ được nhập vào chương trình Bionumeric 5.1 và giá trị tương đồng của các loài được tạo. Trình tự của chủng này được so sánh với các loài trong ngân hàng gen BCCM/LMG của Trường Đại học Ghent (Vương quốc Bỉ) hoặc ngân hàng trình tự nucleotit quốc tế (EMBL). Sử dụng chương trình FASTA để xác định loài có mối quan hệ gần nhất đã biết của trình tự trong phần gen *PheS*.

2.5 Khảo sát khả năng chịu mặn

Khả năng chịu mặn của các chủng vi khuẩn lactic được khảo sát theo phương pháp của Kobayashi và cs. [7]. Cụ thể, các chủng vi khuẩn lactic được nuôi tăng sinh trong môi trường MRS lỏng ở nhiệt độ phòng trong 48 giờ. Sau đó, 0,1 mL huyền phù vi khuẩn được nuôi trong 10 mL môi trường MRS có bổ sung dung dịch NaCl với các nồng độ 10, 20 và 30‰. Khả năng chịu mặn của các chủng vi khuẩn lactic được đánh giá qua giá trị OD_{600nm} sau thời gian nuôi cấy 0 (thời điểm bắt đầu thí nghiệm), 1, 2, 3, 4, 5 và 6 ngày.

2.6 Khảo sát khả năng chịu axit

Các chủng vi khuẩn lactic được nuôi tăng sinh trong môi trường MRS lỏng ở nhiệt độ phòng trong 48 giờ; thu lấy sinh khối vi khuẩn bằng cách ly tâm 5.000 vòng/phút ở 4 °C trong 10 phút; sau đó rửa sinh khối thu được bằng nước cất vô trùng; chuyển dịch huyền phù vi khuẩn vào môi trường MRS đã hiệu chỉnh tới pH 2 [8]. Sau đó, xác định số tế bào vi khuẩn sống sót qua giá trị OD_{600nm} trước và sau khi ủ ba giờ ở pH 2.

2.7 Khảo sát khả năng tự kết dính

Thí nghiệm được tiến hành theo phương pháp của Kos và cs. [9]. Sinh khối tế bào của vi khuẩn thu được sau khi nuôi cấy được rửa hai lần bằng đệm PBS (8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄, 0,24 g KH₂PO₄ và nước cất đủ một lít); pH 7,2 vô trùng; sau đó được tái huyền phù trong đệm PBS (OD_{600nm} = 1) (OD ban đầu). Để yên huyền phù này ở 28 °C trong năm giờ để tạo điều kiện cho các vi khuẩn lactic tự kết dính và lắng xuống và đo OD của dịch trên bề mặt. Khả năng tự kết dính là phần trăm độ giảm OD_{600nm} dịch bề mặt của mẫu đã để yên trong năm giờ so với ban đầu.

Giá trị tự kết dính (%) của vi khuẩn được tính theo công thức:

$$\% \text{ Tự kết dính} = 1 - \left(\frac{A_t}{A_0} \right) \times 100$$

trong đó A_t là giá trị OD_{600nm} tại thời điểm t ($t = 5$ giờ); A_0 là giá trị OD_{600nm} tại thời điểm $t = 0$.

2.8 Xử lý số liệu

Chúng tôi sử dụng phần mềm SPSS 20.0 và Excel 2007 để xử lý số liệu.

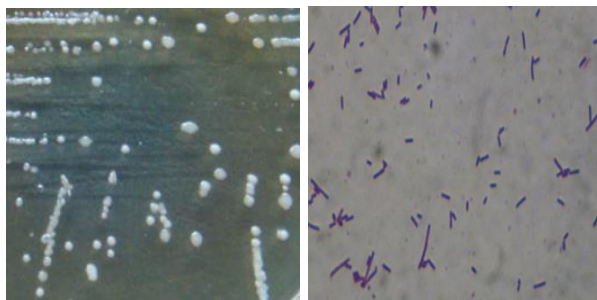
3 Kết quả và thảo luận

3.1 Phân lập

Chúng tôi phân lập được ba chủng vi khuẩn lactic từ mắm cá cơm. Các chủng vi khuẩn có hình thái khuẩn lạc và tế bào khác nhau, ký hiệu là R6, NU1 và R18 (Hình 1). Tất cả các chủng có khuẩn lạc dạng hình tròn, màu trắng.

Kết quả phân tích các chỉ tiêu hình thái, sinh lý và sinh hóa của các chủng vi khuẩn phân lập được trình bày ở Bảng 1.

Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu của Klaenhammer [10]. Vi khuẩn lactic là một nhóm các vi khuẩn Gram dương; chúng là trực khuẩn ngắn hay que và cầu khuẩn không sinh bào tử. Kết quả này cũng được Ngô Thị Phương Dung và cs. [11] xác nhận. Những dòng vi khuẩn lactic phân lập được có hình cầu hoặc hình que, không sinh bào tử, gram dương, oxydase, catalase âm tính.



Hình 1. Hình thái khuẩn lạc và hình thái tế bào (X40) của chủng vi khuẩn R18

Bảng 1. Các chỉ tiêu hình thái, sinh lý và sinh hóa của các chủng vi khuẩn phân lập được

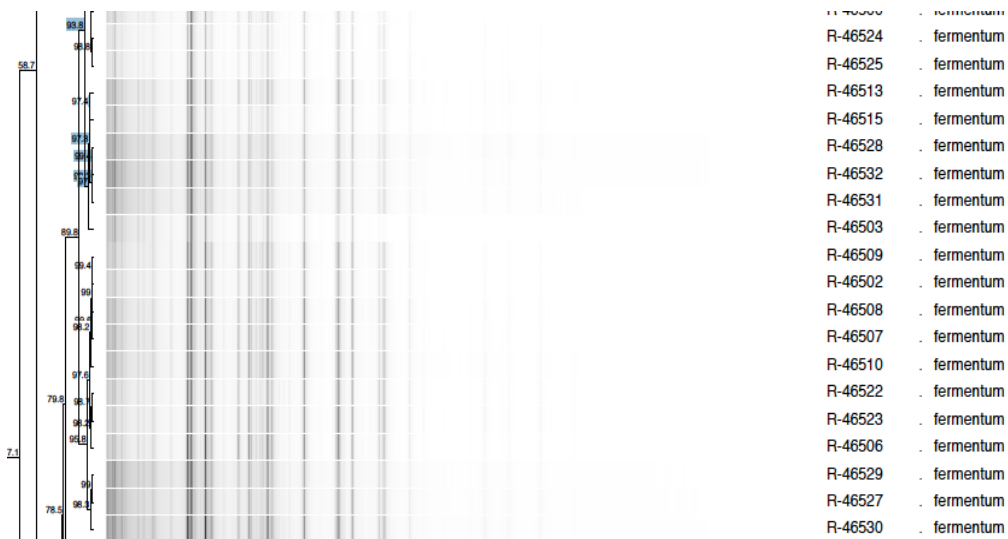
Chủng vi khuẩn	Đặc điểm hình thái			Đặc điểm sinh lý		Đặc điểm sinh hóa	
	Hình dạng	Kích thước (mm)	Khả năng làm tan $CaCO_3$	Hình dạng vi khuẩn	Nhuộm gram	Oxidase	Catalase
R6	Tròn lồi trắng	1–2,5	+	Hình cầu	+	–	–
NU1	Tròn lồi trắng đục	1–2	+	Hình que	+	–	–
R18	Tròn lồi trắng đục	1,5–2,5	+	Hình que	+	–	–

Ngoài ra, Ponce và cs. [12] cũng công bố rằng vi khuẩn lactic có khả năng tiết ra axit hữu cơ làm giảm pH của môi trường dẫn đến hòa tan CaCO_3 . Đặc điểm sinh hóa đã chỉ ra rằng tất cả các chủng vi khuẩn khi kiểm tra các chỉ tiêu oxydase và catalase đều âm tính, không có khả năng di động.

Kết hợp giữa đặc điểm hình thái và đặc điểm sinh hoá, chúng tôi nhận định các chủng vi khuẩn phân lập được là các chủng vi khuẩn lactic.

3.2 Định danh vi khuẩn lactic

Ba chủng vi khuẩn lactic đã phân lập ở trên được định danh bằng phương pháp MALDI-TOF MS cùng một số chủng đã được phân lập từ các nguồn thực phẩm lên men khác. Kết quả phân tích khối phổ sau khi định danh bằng phương pháp MALDI-TOF MS cho thấy rằng ba chủng này được chia làm hai nhóm. Mỗi nhóm gồm các chủng có phổ tương đồng với nhau MALDI-TOF MS. Trong đó, hai chủng R18 (R-46528) và NU1 (R-46506) thuộc nhóm thứ nhất (Hình 2), còn chủng R6 thuộc nhóm thứ hai (Hình 3).



Hình 2. Kết quả phổ MALDI-TOF MS của các chủng thuộc nhóm 1



Hình 3. Kết quả phổ MALDI-TOF MS của các chủng thuộc nhóm 2

So sánh phổ thu được với phổ của ngân hàng lưu trữ dữ liệu cho thấy nhóm 1 thuộc loài *Lactobacillus fermentum*. Điều đó có nghĩa là hai chủng R18 và NU1 thuộc loài *L. fermentum*.

Đối với chủng R6 (thuộc nhóm thứ hai) (R-52016), chúng tôi chưa xác định được tên do trong ngân hàng lưu trữ dữ liệu chưa có khối phổ của các loài của chủng này. Vì vậy, để xác định được tên chi và loài cụ thể, chúng tôi tiếp tục chọn ngẫu nhiên một chủng thuộc nhóm này để tiến hành định danh bằng phương pháp giải trình tự gen *PheS* và so sánh đối chiếu với ngân hàng gen. Kết quả trình tự gene của chủng này (Hình 4) có sự tương đồng 100% với trình tự tham khảo của chủng *Pediococcus pentosaceus* AM749815. Vì vậy, các chủng thuộc nhóm này trong đó có chủng R6 thuộc loài *P. pentosaceus*.

3.3 Đánh giá tiềm năng probiotic của các chủng vi khuẩn lactic

Khả năng chịu mặn

Kết quả về khả năng chịu mặn của các chủng vi khuẩn phân lập được trình bày ở Bảng 2.

Nhìn chung, cả ba chủng vi khuẩn lactic phân lập được có giá trị OD₆₀₀ tương đối cao ở cả ba nồng độ muối 10, 20 và 30‰ sau sáu ngày nuôi cấy.

Sau một ngày nuôi cấy, mật độ vi khuẩn bắt đầu giảm ở cả ba nồng độ muối thử nghiệm. Chủng R18 có mật độ vi khuẩn thấp nhất ở hai nồng độ muối 20 và 30‰ sau một ngày nuôi cấy. Nguyên nhân là các chủng chưa thích nghi với môi trường. Sau đó, khả năng tăng sinh của các chủng vi khuẩn dần ổn định và đạt mật độ cao nhất sau sáu ngày nuôi cấy do lúc này các chủng vi khuẩn đã thích nghi với môi trường mới và phát triển tốt. Nhìn chung, cả ba nồng độ muối thí nghiệm 10, 20 và 30‰ đều phù hợp cho ba chủng vi khuẩn lactic phát triển tốt. Tuy nhiên, nồng độ muối 10‰ cho giá trị OD cao nhất ở cả ba chủng R6, NU1 và R18 sau sáu ngày nuôi cấy.

Đối với khả năng chịu muối, ở nồng độ muối càng cao thì khả năng sống sót của các tế bào vi khuẩn lactic càng giảm đi. Điều này hoàn toàn tương đồng với nghiên cứu của Udomsil và cs. [13]. Các tác giả đã công bố rằng *Tetragelococcus halophilus* có khả năng chịu muối tại nồng độ 25‰; *Tetragenococcus halophilus* vẫn sống sót trong nước mắm (25‰) sau bảy tháng [13].

GCAAGATACATTTTACATCACGGACGAAGTTTTGATGCGCTCTCAAACCTTCTCCAGTTCA
AGCTCGAACAATGGAAAACATGACTTTTCAAAGGGACCATTAAAAATGATCTCACCA
GGGGTAGTTTACCGTCGCGATACTGATGATGCTACTCATTACACCAATTCCATCAAATT
GAAGGATTAGTGATTGATAAGAACATTACGATGGGTGATTTGAAAGGTACTTTAGTAAC
TTTGGCTAAGGAACTTTTTGGTGATCGTTTTCGAAGTACGCTTGCGTCCAAGTTATTTCCA
TTTACAGAACCTTCTGTTGAAGCAGACGTTACTTGCTTTAATTGTATGGGAAAAGGCTGT
TCAGTATGTAAGTCAACCGTTGGATAGAAGTATTA

Hình 4. Trình tự nucleotide gene *PheS* của chủng được lựa chọn ngẫu nhiên của nhóm 2

Bảng 2. Mật độ vi khuẩn (OD₆₀₀) ở các nồng độ muối khác nhau

Ngày	Nồng độ muối (‰)	R6	NU1	R18
0	10	0,9 ± 0,01 ^a	0,9 ± 0,01 ^a	0,8 ± 0,01 ^a
	20	0,9 ± 0,01 ^a	0,9 ± 0,01 ^a	0,8 ± 0,01 ^a
	30	0,9 ± 0,01 ^a	0,9 ± 0,01 ^a	0,8 ± 0,02 ^a
1	10	0,8 ± 0,04 ^a	0,8 ± 0,01 ^a	0,8 ± 0,01 ^a
	20	0,8 ± 0,08 ^a	0,8 ± 0,03 ^a	0,2 ± 0,01 ^b
	30	0,8 ± 0,02 ^a	0,8 ± 0,04 ^a	0,2 ± 0,02 ^b
2	10	0,7 ± 0,04 ^b	0,9 ± 0,09 ^a	0,8 ± 0,01 ^a
	20	0,9 ± 0,11 ^a	0,9 ± 0,07 ^a	0,5 ± 0,2 ^b
	30	1,0 ± 0,01 ^a	0,9 ± 0,01 ^a	0,2 ± 0,05 ^c
3	10	0,9 ± 0,08 ^a	0,8 ± 0,1 ^b	0,9 ± 0,01 ^a
	20	0,9 ± 0,04 ^a	1,0 ± 0,01 ^a	0,6 ± 0,27 ^b
	30	1 ± 0,01 ^a	1,0 ± 0,01 ^a	0,3 ± 0,01 ^c
4	10	0,9 ± 0,1 ^a	0,9 ± 0,03 ^b	0,9 ± 0,01 ^a
	20	1,0 ± 0,02 ^a	0,9 ± 0,03 ^b	0,6 ± 0,24 ^c
	30	1,0 ± 0,01 ^a	1,0 ± 0,02 ^a	0,7 ± 0,07 ^b
5	10	1,1 ± 0,03 ^a	1,1 ± 0,03 ^a	1,0 ± 0,01 ^a
	20	1,0 ± 0,01 ^b	1,0 ± 0,02 ^b	0,9 ± 0,01 ^b
	30	0,9 ± 0,01 ^c	1,0 ± 0,02 ^b	0,8 ± 0,02 ^c
6	10	1,1 ± 0,01 ^a	1,0 ± 0,02 ^a	0,9 ± 0,01 ^a
	20	1 ± 0,01 ^b	1,0 ± 0,07 ^a	0,8 ± 0,01 ^b
	30	0,9 ± 0,02 ^c	0,9 ± 0,01 ^b	0,8 ± 0,02 ^b

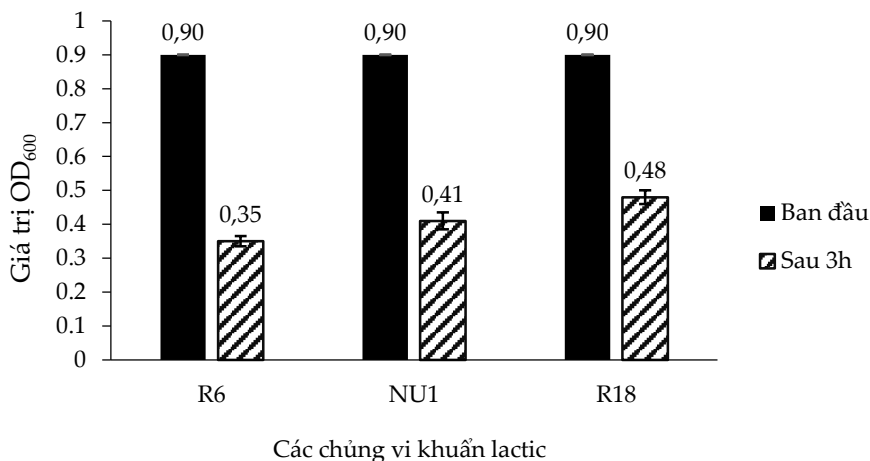
Chú thích: Giá trị trong bảng là giá trị trung bình của ba lần lặp lại ± độ lệch chuẩn. Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột, cùng một thời gian, cho biết sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

cs. [14] đã công bố rằng *Tetragenococcus halophilus* có khả năng phát triển tại nồng độ muối 25 và 28,5‰ ở pH 7. Ba chủng vi khuẩn lactic phân lập được vẫn có khả năng chịu muối đến nồng độ 30‰, nhưng nồng độ 10 và 20‰ là điều kiện thích hợp và phát triển tốt của ba chủng vi khuẩn lactic này. Như vậy, khả năng chịu muối của ba chủng R6, NU1 và R18 là tương đối cao. Chính vì vậy, cả ba chủng vi khuẩn lactic phân lập được từ mắm cá cơm có khả năng sử dụng làm probiotic trong nuôi trồng thủy sản.

Khả năng chịu axit

Khả năng chịu axit của các chủng vi khuẩn lactic được khảo sát bằng cách xác định số tế bào sống sau ba giờ nuôi cấy trong môi trường pH 2 (Hình 5). Kết quả cụ thể như sau:

Giá trị OD₆₀₀ của chủng vi khuẩn R6 giảm từ 0,9 xuống còn 0,35, tương đương với tỉ lệ sống là 38,8%.



Hình 5. Mật độ (OD_{600}) của các chủng vi khuẩn lactic khảo sát trong điều kiện pH 2

Giá trị OD_{600} của chủng vi khuẩn NU1 giảm từ 0,9 xuống còn 0,41, tương đương với tỉ lệ sống là 45,5%.

Giá trị OD_{600} của chủng vi khuẩn R18 giảm từ 0,9 xuống còn 0,48, tương đương với tỉ lệ sống là 53,3%.

Kết quả này cho thấy khả năng chịu axit của các chủng vi khuẩn lactic phân lập được trong ở môi trường pH 2 sau khi ủ ba giờ là tương đối cao. Có sự sai khác có ý nghĩa thống kê về tỷ lệ sống của các chủng R6, NU1 và R18 ($p < 0,05$).

Kết quả của nghiên cứu này tương đồng với nghiên cứu của Maragkoudakis và cs. [15]. Các tác giả đã khảo sát khả năng chịu axit của một số chủng *Lactobacillus* và nhận thấy các vi khuẩn chịu axit mạnh nhất là *Lactobacillus paracasei*, *Lb. plantarum* ACA-DC 146 và *Lb. rhamnosus* ACA-DC 112, với mức giảm $\log CFU \cdot mL^{-1}$ từ 8,6 xuống còn lần lượt là 6,8, 5,7 và 7,1 $CFU \cdot mL^{-1}$ sau ba giờ ở pH 2. Huỳnh Ngọc Thanh Tâm và cs. [8] cũng kết luận rằng 7/8 chủng vi khuẩn *Lactobacillus* spp. phân lập được có tỷ lệ sống tương đối cao trong môi trường pH 2.

Khả năng tự kết dính của các chủng vi khuẩn lactic

Khả năng tự kết dính của vi khuẩn là lactic là một trong những chỉ tiêu nghiên cứu có ý nghĩa thực tiễn vì đây là một trong những đặc tính quyết định khả năng thương mại hóa của sản phẩm. Đặc tính này mang lại nhiều lợi ích cho vi khuẩn lactic trong quá trình sinh trưởng và phát triển: giúp vi khuẩn bám dính tốt vào biểu mô ruột, chống lại sự đào thải do quá trình tiêu hóa cơ học của ruột, làm tăng khả năng đồng kết dính với các vi khuẩn khác để tạo thành một hàng rào ngăn chặn sự xâm nhập của các vi khuẩn gây bệnh [16]. Chính vì vậy, chúng tôi đã tiến hành khảo sát khả năng tự kết dính của các chủng vi khuẩn lactic phân lập từ mắm cá com. Kết quả ở Bảng 3 cho thấy khả năng kết dính của các chủng vi khuẩn lactic khác nhau là khác nhau. Trong

Bảng 3. Khả năng kết tụ kết dính của các chủng vi khuẩn lactic

Chủng vi khuẩn lactic	Khả năng tụ kết dính (%)
NU1	36 ± 2,6 ^c
R18	45 ± 1,6 ^b
R6	47 ± 2,5 ^a

Chú thích: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột, cùng một thời gian, cho biết sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

đó, khả năng tụ kết dính của chủng R6 là cao nhất (47%) và thấp nhất là của chủng NU1 (36%). Có sự sai khác có ý nghĩa thống kê về khả năng tụ kết dính của các chủng vi khuẩn lactic phân lập được ($p < 0,05$).

Khả năng tụ kết dính giúp cho vi khuẩn lactic kết dính lại với nhau để hình thành một quần thể lớn, giúp tăng cường sức sống và sự phát triển của chủng quần theo kiểu mối quan hệ hỗ trợ cùng loài. Ngoài ra, khả năng tụ kết dính còn liên quan đến khả năng bám dính của vi khuẩn vào niêm mạc ruột. Đây là cơ chế đặc biệt làm tăng khả năng lưu lại trong ống tiêu hóa của các chủng vi sinh vật và giúp cạnh tranh với các vi khuẩn gây bệnh khác. Maria [17] đã nhận thấy khả năng tụ kết dính của *Lactobacillus* và *Bifidobacterium* có sự biến động lớn trong khả năng tụ kết dính của các chủng; năm chủng được khảo sát có kết quả tụ kết dính là 55, 15, 23, 75 và 77% ở nhiệt độ phòng. Tỷ lệ kết dính của chủng *Lactobacillus fermentum* DC1 sau năm giờ là 24,5% [18]. Điều này cho thấy khả năng tụ kết dính của vi khuẩn lactic phân lập từ mắm cá com là tương đối cao và tương đồng với kết quả công bố của các nhà khoa học trên.

4 Kết luận

Từ các mẫu mắm cá com, chúng tôi đã phân lập được ba chủng vi khuẩn lactic. Các chủng này thuộc hai loài *Pediococcus pentosaceus* và *Lactobacillus fermentum* và có khả năng chịu NaCl ở các nồng độ 10, 20 và 30%. Trong đó, nồng độ NaCl 10 và 20% là điều kiện thích hợp để các chủng sinh trưởng và phát triển tốt. Khả năng chịu axit của các chủng vi khuẩn lactic phân lập được trong môi trường pH 2 sau khi ủ ba giờ là tương đối cao với tỷ lệ sống tương ứng của các chủng R6, NU1 và R18 lần lượt là 38,8, 45,5 và 53,3%. Chủng *Pediococcus pentosaceus* có khả năng tụ kết dính cao nhất (47%) và chủng *Lactobacillus fermentum* có khả năng tụ kết dính thấp nhất (36%).

Thông tin tài trợ

Nghiên cứu này được Đại học Huế tài trợ thông qua đề tài mã số DHH 2020-02-141.

Tài liệu tham khảo

1. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization (2014), The State of World Fisheries and Aquaculture. Available at: <http://www.fao.org/3/a-i3720e.pdf>.
2. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization (2002), Working Group Report on Drafting Guidelines for the evaluation of Probiotics in Food. <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>.
3. Trịnh Hùng Cường (2011), *Phân lập vi khuẩn Lactobacillus sp. trên tôm sú nuôi công nghiệp có khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh Vibrio sp.*, Luận văn Cao học, Đại học Cần Thơ.
4. Feliatra F., Muchlisin Z. A., Teruna H. Y., Utamy W. R., Nursyirwani N., Dahliaty A. (2018), Potential of bacteriocins produced by probiotic bacteria isolated from tiger shrimp and prawns as antimicrobial to *Vibrio*, *Pseudomonas*, and *Aeromonas* species on fish, *F1000Research*, 415 (7), 1–12. doi: 10.12688/f1000research.13958.1.
5. Doan N. T. L., Van Hoorde K., Cnockaert M., De Brandt E., Aerts M., Le Thanh B. and Vandamme P. (2012), Validation of MALDI-TOF MS for rapid classification and identification of lactic acid bacteria, with a focus on isolates from traditional fermented foods in Northern Vietnam, *Letters in Applied Microbiology*, 55, 265–273.
6. Sha Y., Wang L., Liu M., Jiang K., Xin F., Wang B. (2016), Effects of lactic acid bacteria and the corresponding supernatant on the survival, growth performance, immune response and disease resistance of *Litopenaeus vannamei*, *Aquaculture*, 452, 28–36.
7. Kobayashi T., Kajiwara M., Wahyuni M., Hâmdo-Sato N., Imada C., Watanabe E. (2004), Effect of culture conditions on lactic acid production of *Tetragenococcus* species, *Journal Appl Microbiol*, 96(6), 1215–21.
8. Huỳnh Ngọc Thanh Tâm, Phan Thị Thu Sương và Lê Thị Hồng Diệp (2019), Phân lập và tuyển chọn dòng vi khuẩn *Lactobacillus* có tiềm năng probiotic từ cây môn ngọt (*Colocasia esculenta* (L.) Schott), *Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 55(1), 15–23.
9. Kos B., Suskovic M. J., Vukovic S., Simpraga M., Frece J. (2003), Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92, *Journal of Applied Microbiology*, 94, 981–987.
10. Klaenhammer T. R. (1987), Plasmid-directed mechanisms for bacteriophage defense in lactic streptococci, *FEMS Microbiol. Rev.*, 46, 313–325.
11. Ngô Thị Phương Dung, Huỳnh Thị Yến Ly và Huỳnh Xuân Phong (2011), Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn lactic có khả năng sinh chất kháng khuẩn, *Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 19(a), 176–184.

12. Ponce A. G., Moreira M. R., Del C. E., Valle S. I. Roura. (2008), Preliminary characterization of bacteriocin-like substances from lactic acid bacteria isolated from organic leafy vegetables, *LWT Food Sci. Technol.* (Campinas.), 41, 432–441.
13. Udomsil N., Rodtong S., Tanasupawat S., Yongsawatdigul J. (2010), Proteinase-producing halophilic lactic acid bacteria isolated from fish sauce fermentation and their ability to produce volatile compounds, *International Journal of Food Microbiology*, 141, 186–194.
14. Juste A., Lievens B., Frans I., Marsh T. L., Klingenberg M., Michiels C. W., Willems K. A. (2008), Genetic and physiological diversity of *Tetragnococcus halophilus* strains isolated from sugar and salt rich environment, *Microbiology*, 154, 2600–2610.
15. Maragkoudakis P. A., Zoumpopoulou G., Miarisa C., Kalantzopoulou G., Potb B., Tsakalidou E. (2006), Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products, *International Dairy Journal*, 16, 189–199.
16. Boris S., Suarez J. E., Barbes C. (1997), Characterization of the aggregation promoting factor from *Lactobacillus gasseri* a vaginal isolate, *J Appl Microbiol*, 83(4), 413–420.
17. Maria V. P. (2006), Molecular and physiological studies on the functionality of probiotic lactobacilli, *Doctor thesis on Biochemistry, Karlsruhe University, Argentina*.
18. Đỗ Thị Bích Thủy, Nguyễn Thị Diễm Hương (2012), Xác định và khảo sát một số tính chất có lợi của chủng *Lactobacillus fermentum* DC1 phân lập từ sản phẩm dưa cải Huế, *Tạp chí khoa học, Đại học Huế*, 71(2), 175–185.