

SÀNG LỌC CÁC CHỦNG VI KHUẨN LACTIC TỪ RUỘT MỘT SỐ LOÀI CÁ DA TRON CÓ TIỀM NĂNG SỬ DỤNG LÀM PROBIOTIC

Trần Thị Ngọc Phương và Đặng Thị Hoàng Oanh

Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 18/12/2015

Ngày chấp nhận: 25/07/2016

Title:

Screening of lactic acid bacteria from the gastrointestinal tracts of some freshwater catfish for their potential use as probiotics

Từ khóa:

Vi khuẩn lactic, *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella ictaluri*, chế phẩm sinh học (probiotic), khả năng kháng khuẩn

Keywords:

Lactic acid bacteria, *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella ictaluri*, probiotic, antimicrobial activity

ABSTRACT

The research was conducted to isolate and screen acid lactic bacteria which had antimicrobial activity against pathogens *Edwardsiella ictaluri* and *Aeromonas hydrophila* causing Bacillary necrosis pangasius (BNP) and Hemorrhagic disease in cultured Tra catfish in the gastrointestinal tracts of wild freshwater catfish. As the result, 96 strains of lactic acid bacteria (LAB) were selected which had inhibitory activity against indicator bacteria *Escherichia coli* with 29 strains isolated from Stripped catfish (*Pangasius hypophthalmus* (Sauvage, 1878)), 24 strains from *Mystus nemurus* (Valenciennes, 1839), 21 strains from *Pangasius larnaudii* (Bocourt, 1866), 12 strains from *Clarias macrocephalus* (Gunther, 1864) and 8 strains from *Pangasius larnaudii* (Bocourt, 1866). The result of gram staining and biochemical characteristic tests illustrated most of selected strains of lactic acid bacteria were gram-positive; spherical, oval, short rod or long rod shape; negative oxidase and negative catalase. Result from determination of antagonist activity and bacteriocin producing, there were 46 strains showed the inhibitory activity against *A. hydrophila*, 42 strains could inhibit *E. ictaluri* which were Gram-positive, spherical or rod in shape and especially, three strains of obtained LAB presented the antibacterial activities (produced bacteriocin) which all of them inhibited *A. hydrophila* and only one of three strains could inhibit *E. ictaluri* when the culture supernatants were neutralized to pH 6.5-7.0. Nucleotide sequences of their 16sRNA showed 100% (548/548bp) and 99% (551/552bp) homology to *Lactobacillus reuteri* HFI-LD5 CL2, CL 2.20, respectively and 100% (539/539bp) homology to *Lactobacillus fermentum* JCM- 1173 CT3.7.

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm phân lập và sàng lọc các chủng vi khuẩn lactic từ đường ruột cá da trơn tự nhiên có khả năng kháng với vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* và *Aeromonas hydrophila* gây bệnh gan thận mũ (BNP) và bệnh xuất huyết trên cá tra. Kết quả cho thấy, 96 chủng vi khuẩn lactic có khả năng đối kháng với vi khuẩn chỉ thị *Escherichia coli* được chọn, với 29 chủng phân lập từ cá tra (*Pangasius hypophthalmus* (Sauvage, 1878)), 24 chủng từ cá lăng (*Mystus nemurus* (Valenciennes, 1839)), 21 chủng từ cá võ đốm (*Pangasius larnaudii* (Bocourt, 1866)), 12 chủng từ cá trê (*Clarias macrocephalus* (Gunther, 1864)) và 8 chủng từ cá hủ (*Pangasius larnaudii* (Bocourt, 1866)). Kết quả nhuộm gram và kiểm tra sinh hóa cho thấy hầu hết các chủng vi khuẩn lactic được chọn đều là vi khuẩn gram dương, hình cầu, hình oval, que ngắn hay que dài, oxidase và catalase âm tính. Kết quả xác định tính đối kháng và khả năng sinh bacteriocin, thu được 46 chủng thể hiện tính đối kháng với *A. hydrophila*, 42 chủng đối kháng với *E. ictaluri* và 3 chủng vi khuẩn thể hiện khả năng kháng khuẩn (sinh bacteriocin), với cả 3 chủng đều kháng *A. hydrophila* và chỉ 1 chủng kháng *E. ictaluri*. Phương pháp giải trình tự gen 16sRNA định danh được CL2, CL20 là loài *Lactobacillus reuteri* HFI-LD5 với độ tương đồng theo thứ tự 100% (548/548bp) và 99% (551/552bp), và CT3.7 là loài *Lactobacillus fermentum* JCM- 1173 với độ tương đồng 100% (539/539bp).

Trích dẫn: Trần Thị Ngọc Phương và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2016. Sàng lọc các chủng vi khuẩn lactic từ ruột một số loài cá da trơn có tiềm năng sử dụng làm probiotic. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 44b: 76-85.

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Với khoảng 600.000 ha diện tích mặt nước ngọt, Đồng bằng sông Cửu Long được đánh giá có tiềm năng to lớn cho sự phát triển ngành nuôi trồng thủy sản. Bên cạnh các đối tượng nuôi như tôm thẻ chân trắng, tôm sú,... cá tra cũng được xem là đối tượng nuôi chủ lực, đem lại lợi nhuận cao cho người nuôi và góp phần vào giá trị xuất khẩu của cả nước. Theo báo cáo của Hiệp hội cá tra Việt Nam, tính đến ngày 30/6/2015 diện tích nuôi thả mới tại ĐBSCL là 1.959 ha (tăng 0,21% so với cùng kỳ năm 2014), sản lượng đạt 516.140 tấn (tăng 1,22% so với cùng kỳ), tổng kim ngạch xuất khẩu cá tra đến 31/5/2015 đạt hơn 616 triệu USD. Tuy nhiên, trong hiện trạng thâm canh hóa mô hình nuôi cá tra như hiện nay, tình hình dịch bệnh đang diễn ra phức tạp và khó kiểm soát gây ra thiệt hại lớn cho người nuôi cá tra, trong đó, bệnh gan thận mũ (BNP) (gây ra bởi vi khuẩn *E.ictaluri*) và bệnh xuất huyết (tác nhân gây bệnh là *A.hydrophila*) là hai bệnh nguy hiểm với tần suất xuất hiện từ 60% đến 80% đối với bệnh gan thận mũ và 88% đối với bệnh xuất huyết trong các hộ nuôi được khảo sát so với các bệnh khác và gây thiệt hại lớn cho người nuôi.

Trước tình trạng sử dụng thuốc kháng sinh không đúng cách dẫn đến nhiều tác hại nghiêm trọng như hiện tượng kháng thuốc ở vi khuẩn gây bệnh, hay dư lượng thuốc kháng sinh trong vật nuôi có thể gây hại đến sức khỏe con người. Đặc biệt, đối với hai chủng vi khuẩn gây bệnh *E.ictaluri* và *A. hydrophila*, hiện tượng kháng thuốc kháng sinh diễn ra ngày càng phức tạp. Quách Văn Cao Thi và ctv. (2014) đã chỉ ra rằng hầu hết các chủng *E.ictaluri* kháng cao với các kháng sinh như tetracyclin, enrofloxacin, streptomycin và kháng sinh nhóm fennicol; kháng hoàn toàn với trimetoprim/sunfamethoxazol; trong khi *A. hydrophila* kháng hoàn toàn với kháng sinh nhóm penicillin, cefalexin và trimetoprim/sunfamethoxazol. Vì vậy, việc nghiên cứu để tìm những giải pháp thay thế tốt hơn cho phòng và trị bệnh là việc cần thiết. Trong số những giải pháp tìm được, chế phẩm sinh học được xem như một giải pháp thay thế tiềm năng vì vi khuẩn hữu ích có khả năng bám dính cao trong biểu mô ruột và còn nâng cao hệ miễn dịch của động vật. Trong đó, vi khuẩn lactic được chứng minh có chức năng như probiotics, có lợi với sức khỏe vật chủ khi được bổ sung đủ số lượng trong đường ruột (Nirunya B., et al., 2008), vi khuẩn lactic có thể được phân lập từ nhiều nguồn khác nhau như các sản phẩm lên men, đường ruột gia súc, đường ruột các loài thủy sản,...

Vi khuẩn lactic là vi khuẩn Gram dương, tế bào hình cầu hoặc hình que, catalase âm tính, không sinh bào tử. Ngoài ra, vi khuẩn lactic còn tạo ra acid lactic, ethanol, hợp chất thơm và bacteriocin (Chen and Hoover, 2003).

Tuy việc sàng lọc vi khuẩn lactic từ ruột cá không còn là chủ đề mới, và những chủng vi khuẩn có khả năng sử dụng làm probiotic đã được tìm thấy trước đây bao gồm *Lactobacillus acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. casei*, *L. gasseri*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *Bifidobacterium longum*, *B. breve*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *Enterococcus faecalis* và *Enterococcus faecium* (Kaur et al., 2002) nhưng hầu hết những nghiên cứu trước đây vẫn chưa thực hiện nhiều trên cá da trơn nước ngọt thu từ tự nhiên.

Do vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân lập và sàng lọc các chủng vi khuẩn lactic từ đường ruột cá da trơn tự nhiên có khả năng kháng với vi khuẩn *E.ictaluri* và *A.hydrophila* gây bệnh gan thận mũ (BNP) và bệnh xuất huyết trên cá tra, có tiềm năng sử dụng làm probiotics, tạo bộ sưu tập vi khuẩn cho những nghiên cứu sâu hơn về vi sinh hữu ích từ các loài cá tự nhiên hoặc cho các thí nghiệm trong điều kiện *in vivo* để phòng bệnh gan thận mũ và bệnh xuất huyết trên cá tra.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Phương pháp thu mẫu

Mẫu cá da trơn: cá tra, cá lăng, cá trê, cá vồ đem được mua từ chợ và từ các ghe cào, tình trạng cá thu mẫu còn khỏe, bên ngoài không thấy xước, không xuất huyết. Mỗi loại cá thu 10 con sẽ được chuyển bằng thùng xốp có sục khí về phòng thí nghiệm để phân tích. Mẫu cá được tiết trùng bên ngoài, sau đó lấy đoạn ruột giữa, dạ dày trong điều kiện vô trùng để phân tích tiếp theo.

2.2 Phương pháp nuôi tăng sinh vi khuẩn (Nirunya et al., 2008)

Các loài vi khuẩn chỉ thị *E. ictaluri*, *A. hydrophila* và *E. coli* được nuôi khoảng 20 giờ trong 10 ml môi trường TSB ở 28°C. 1 ml vi khuẩn đã nuôi cấy được lấy chuyển sang 9 ml môi trường lỏng và ủ trong 18 giờ ở 37°C, mật độ vi khuẩn sau đó được điều chỉnh để đạt 10⁶CFU/ml dùng cho việc xác định hoạt động kháng khuẩn.

2.3 Phương pháp phân lập vi khuẩn (Nirunya et al., 2008)

Mẫu ruột được lấy khoảng 25 gram/cá, nghiền và pha loãng với nước muối sinh lý (0,9% NaCl) đã tiết trùng ở các độ pha loãng 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ và

10^{-4} . Lấy 1 ml mỗi dung dịch pha loãng và trộn với 20 ml MRS (45°C) rồi đổ lên đĩa Petri đã được tiệt trùng. Ủ đĩa ở 37°C trong 24 giờ.

2.4 Phương pháp chọn lọc vi khuẩn có tính kháng khuẩn (Nirunya *et al.*, 2008)

Chọn lấy những đĩa petri có từ 50 khuẩn lạc của vi khuẩn lactic. Phủ lên đĩa petri đã chọn 10 ml môi trường MHB (0,75% agar) chứa vi khuẩn chỉ thị *E.coli* với mật độ 10^5 - 10^6 CFU/ml và ủ trong 24h ở 37°C. Quan sát và ghi nhận kích thước vòng tròn vô trùng xuất hiện quanh khuẩn lạc vi khuẩn.

2.5 Phương pháp xác định tính đối kháng và khả năng sinh bacteriocin (Nirunya *et al.*, 2008)

Tiến hành đổ đĩa môi trường NA, sau đó tráng lên 10 ml MHA(0,75% agar) có bổ sung vi khuẩn gây bệnh (*E. ictaluri*, *A. hydrophila*) nồng độ $10^5 - 10^6$ CFU/ml agar; và tạo các giếng trên đĩa thạch (d= 5-6mm). Vi khuẩn lactic sau khi nuôi trong MRS lỏng ở 37°C trong 48 giờ, đem ly tâm 7000 vòng/phút trong 15 phút. Thu phần dung dịch bên trên và chia làm hai phần. Với phần (i) không xử lý, phần (ii) điều chỉnh pH (6,5 – 7,0) dung dịch bằng NaOH 1M để thu dung dịch có khả năng có bacteriocin thô. Sau đó cho 80 µl phần mỗi dung dịch (i) và (ii) vào mỗi giếng. Dung dịch Doxycycline 100 ppm và MRS broth được sử dụng để làm đối chứng dương và đối chứng âm. Ủ ở 37°C trong 24 giờ.

Xác định tính đối kháng của các chủng vi khuẩn lactic đối với vi khuẩn gây bệnh thông qua đường kính các vòng vô trùng theo Aslim *et al.* (2005).

2.6 Phương pháp định danh vi khuẩn

Hình dạng, kích thước và tính rờng của vi khuẩn được xác định bằng phương pháp nhuộm Gram (Barrow and Feltham, 1993). Đặc điểm sinh

lý sinh hóa được kiểm tra bằng phản ứng catalase, oxidase và xác định theo cẩm nang của Cowan và Steels (Barrow and Feltham, 1993). Sau đó các chủng có tính đối kháng mạnh với *A.hydrophila* và *E.ictaluri* và có khả năng sinh bacteriocin đối kháng được giải trình tự định danh tại công ty công nghệ sinh học Nam Khoa bằng phương pháp sinh học phân tử.

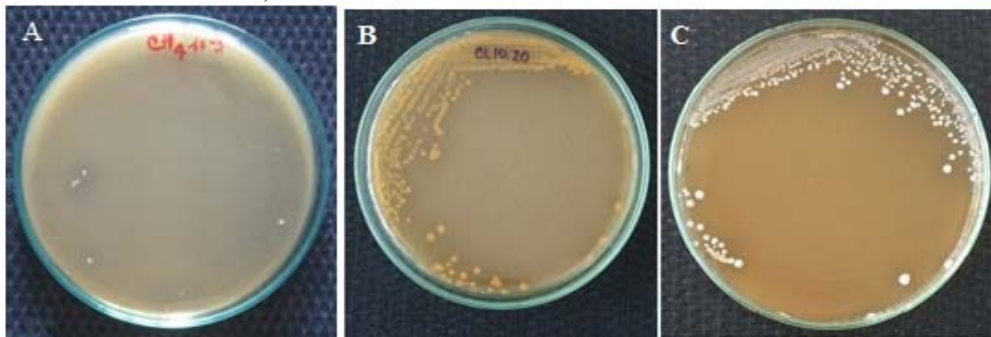
2.7 Phương pháp xử lý số liệu

Sử dụng phần mềm Microsoft Office Excel 2007 để thống kê và so sánh đường kính vòng vô trùng gây ra bởi các chủng vi khuẩn lactic. Từ đó, xác định được các chủng có tính kháng khuẩn cao từ các loài cá và xác định chủng tốt nhất thuộc loài cá nào.

3 KẾT QUẢ

3.1 Phân lập và sàng lọc vi khuẩn lactic có tính kháng khuẩn từ đường ruột cá da trơn

Kết quả phân lập từ 5 loài cá da trơn nước ngọt và xác định khả năng kháng vi khuẩn *E.coli*, được 96 chủng vi khuẩn lactic, trong đó có 29 chủng được phân lập từ cá tra (*P.hypophthalmus*), 24 chủng từ cá lăng (*M.nemurus*), 21 chủng từ cá rô đồng (*P.larnerudii*), 12 chủng từ cá trê (*C.macrocephalus*) và 8 chủng từ cá hủ (*P.larnerudii*). Những chủng được chọn tiến hành kiểm tra đặc điểm sinh lý sinh hóa trước khi tiếp tục thực hiện thử tính đối kháng với các chủng vi khuẩn *A.hydrophila* và *E.ictaluri*; cho thấy hầu hết chúng là những vi khuẩn gram dương, hình cầu, hình oval, hình que ngắn hay que dài, catalase và oxidase âm tính, có khả năng phân giải $CaCO_3$ khi phát triển trên môi trường MRS có 0,75% $CaCO_3$ và có đường kính dao động từ 0,5 mm đến 1,2 mm (Hình 1). Trong đó, vi khuẩn hình oval và hình que ngắn chiếm ưu thế với số chủng theo thứ tự là 43 chủng (45%) và 39 chủng (41%) (Bảng 1).



Hình 1: A: Khuẩn lạc vi khuẩn lactic trên đĩa thạch MRS được tráng bằng MHB 0.75% agar chứa vi khuẩn *E.coli*; B, C: Vi khuẩn lactic có khả năng làm tan vôi khi phát triển trên đĩa thạch MRS có chứa 0,75% $CaCO_3$

Bảng 1: Đặc điểm hình thái của các dòng vi khuẩn lactic phân lập được từ ruột cá da trơn tự nhiên

Nguồn phân lập	Hình thái tế bào vi khuẩn			
	Hình cầu	Hình oval	Hình que ngắn	Hình que dài
Cá tra (<i>Pangasius hypophthalmus</i> (Sauvage, 1878))	CT1.1	CT1.2	CT2.8	CT4.8
	CT10.2	CT2.1	CT2.9	CT8.3
		CT4.6	CT3.3	
		CT4.9	CT3.4	
		CT4.14	CT3.6	
		CT7.1	CT3.7	
		CT7.2	CT3.8	
		CT7.3	CT4.4	
		CT8.6	CT4.10	
		CT10.1	CT8.7	
			CT8.10	
			CT8.11	
			CT8.15	
		CT8.16		
		CT10.8		
Cá lăng (<i>Mystus nemurus</i> (Valenciennes, 1839))	CL9.5	CL2	CL1	
	CL10.20	CL3	CL8.23	
		CL10.3	CL8.26	
		CL4	CL10.1	
		CL8.20	CL10.4	
		CL8.21	CL10.6	
		CL9.3	CL10.7	
		CL9.6	CL10.10	
		CL10.8	CL10.37	
		CL10.14		
		CL10.22		
	CL10.23			
	CL10.29			
Cá trê (<i>Clarias macrocephalus</i> (Gunther, 1864))	TV8.7	TV2	TV3	
		TV8.3	TV4	
		TV8.6	TV8.10	
		TV8.11		
		TV8.14		
		TV8.15		
		TV8.16		
		TV8.17		
		TV8.18		
		TV8.23		
Cá hú (<i>Pangasius conchophilus</i> (Roberts & Vidthayanon, 1991))		CH4.1	CH2	CH5.1
		CH4.2		
		CH4.3		
		CH4.4		
		CH4.5		
		CH4.7		
Cá vồ đém (<i>Pangasius larnaudii</i> (Bocourt, 1866))	VD1.4	VD3.3	VD1.5	VD4.6
	VD4.3	VD3.8	VD1.6	VD5.3
	VD4.11	VD3.11	VD2.1	
	VD5.2	VD4.1	VD2.2	
			VD3.6	
			VD3.7	
			VD3.10	
			VD3.12	
			VD4.7	
			VD4.8	
		VD5.1		

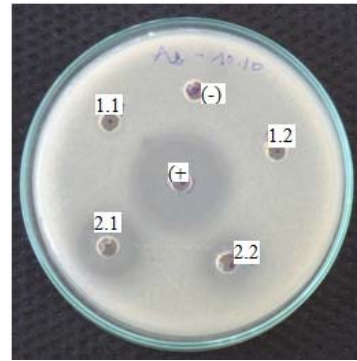
3.2 Tính đối kháng và khả năng sinh bacteriocin

3.2.1 Đối với *A. hydrophila*

Thí nghiệm được thực hiện theo phương pháp khuếch tán giếng thạch với chủng *A. hydrophila* từ bộ sưu tập vi khuẩn của bộ môn Sinh học và Bệnh học Thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ.

Kết quả cho thấy, trong 96 chủng vi khuẩn lactic chọn lọc được, có 46 chủng thể hiện tính đối kháng và 3 chủng có khả năng sinh bacteriocin. Trong đó, các chủng vi khuẩn lactic phân lập từ cá tra chiếm số lượng nhiều nhất với 22 chủng, 15 chủng phân lập từ cá lãng. Vi khuẩn lactic phân lập từ cá vồ đốm có 7 chủng, từ cá trê chỉ có 2 chủng thể hiện tính đối kháng và vi khuẩn phân lập từ cá hú không thể hiện tính đối kháng với *A. hydrophila*. Hầu hết các chủng vi khuẩn lactic đều thể hiện tính kháng trung bình (với đường kính vòng vô trùng trung bình (đ) từ 4,5 mm đến 9,5mm) và yếu (d= 2mm ÷ 4mm) (Aslim *et al.*, 2005) (Bảng 2). Bên cạnh đó, 3 chủng CL2, CL10.20 và CT3.7 thể hiện khả năng sinh bacteriocin trung bình và yếu với

đường kính vòng vô trùng lần lượt là 9 mm, 4 mm và 2 mm.



Hình 2: Đường tròn vô trùng tạo ra bởi vi khuẩn lactic có khả năng sinh bacteriocin đối với vi khuẩn *Aeromonas hydrophila*. (+): đối chứng dương (kháng sinh Doxycycline 100ppm); (-) : đối chứng âm (môi trường MRSlông); 1.1, 2.1: dung dịch ly tâm từ vi khuẩn lactic không xử lý; 1.2, 2.2: dung dịch ly tâm từ vi khuẩn lactic chuẩn pH (6.5-7) bằng dung dịch NaOH 1M

Bảng 2: Bảng đường kính vòng vô trùng gây ra bởi hoạt động kháng khuẩn của các chủng vi khuẩn chỉ kháng với *Aeromonas hydrophila*

Nguồn phân lập	Tên chủng	<i>A. hydrophila</i>			
		Khả năng đối kháng		Khả năng sinh bacteriocin	
		Đường kính vòng vô trùng (mm)	Độ nhạy ^(*)	Đường kính vòng vô trùng (mm)	Độ nhạy ^(*)
Cá tra	CT8.3	8	(++)	0	(-)
	CT7.3 ⁽²⁾	7	(++)	0	(-)
	CT8.7 ⁽²⁾	7	(++)	0	(-)
	CT8.15 ⁽²⁾	7	(++)	0	(-)
	CT3.6	6	(++)	0	(-)
	CT3.7^(**)	6	(++)	2	(+)
	CT4.4 ⁽²⁾	6	(++)	0	(-)
	CT8.11 ⁽²⁾	6	(++)	0	(-)
	CT8.16 ⁽²⁾	6	(++)	0	(-)
	CT10.8 ⁽²⁾	6	(++)	0	(-)
	CT7.1 ⁽²⁾	5	(++)	0	(-)
	CT8.6 ⁽²⁾	5	(++)	0	(-)
	CT10.2 ⁽²⁾	5	(++)	0	(-)
	CT3.8 ⁽²⁾	4	(+)	0	(-)
	CT4.9 ⁽²⁾	4	(+)	0	(-)
	CT4.10 ⁽²⁾	4	(+)	0	(-)
	CT2.8 ⁽²⁾	3	(+)	0	(-)
	CT2.1 ⁽²⁾	2	(+)	0	(-)
	CT2.9	2	(+)	0	(-)
	CT3.3	2	(+)	0	(-)
	CT3.4	2	(+)	0	(-)
	CT7.2 ⁽²⁾	2	(+)	0	(-)

Cá lăng	CL2	13	(++)	9	(++)
	CL10.20	6	(++)	4	(+)
	CL8.20	3	(+)	0	(-)
	CL8.21 ⁽²⁾	3	(+)	0	(-)
	CL9.3	3	(+)	0	(-)
	CL9.6	3	(+)	0	(-)
	CL10.14	3	(+)	0	(-)
	CL10.22 ⁽²⁾	3	(+)	0	(-)
	CL10.29	3	(+)	0	(-)
	CL3 ⁽²⁾	2	(+)	0	(-)
	CL8.26	2	(+)	0	(-)
	CL10.7	2	(+)	0	(-)
	CL10.10	2	(+)	0	(-)
	CL10.23 ⁽²⁾	2	(+)	0	(-)
CL10.37	2	(+)	0	(-)	
Cá trê	TV3	4	(+)	0	(-)
	TV4	4	(+)	0	(-)
Cá vồ đém	VD4.8 ⁽²⁾	10	(++)	0	(-)
	VD4.11 ⁽²⁾	9	(++)	0	(-)
	VD5.3	9	(++)	0	(-)
	VD1.5	5	(++)	0	(-)
	VD4.6 ⁽²⁾	5	(++)	0	(-)
	VD4.7 ⁽²⁾	5	(++)	0	(-)
	VD1.6	2	(+)	0	(-)
Đối chứng	DC(+)	14	(++)		
	DC(-)	0	(-)		

(*) (+): khả năng kháng khuẩn yếu ($d=2\div 4mm$), (++) khả năng kháng khuẩn trung bình ($d=4\div 14mm$), (+++) khả năng kháng khuẩn mạnh ($d=14\div 24mm$), (-) Không nhạy ($d=0$); (**) Chủng vi khuẩn có tính đối kháng và sinh bacteriocin đối với cả 2 chủng vi khuẩn gây bệnh; (2) Chủng vi khuẩn có tính đối kháng đối với cả 2 chủng vi khuẩn gây bệnh

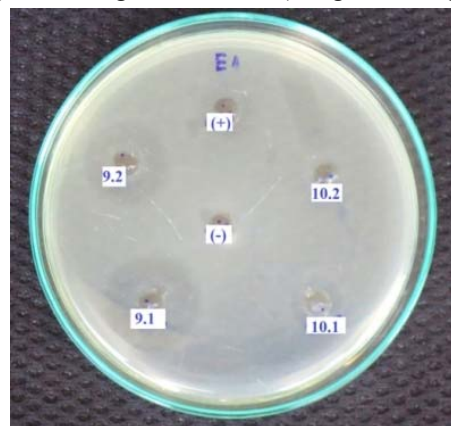
3.2.2 Đối với vi khuẩn *E.ictaluri*

Kết quả có 42 chủng vi khuẩn lactic thể hiện tính đối kháng với *E.ictaluri* và 1 chủng có khả năng sinh bacteriocin. Trong đó, các chủng vi khuẩn lactic phân lập từ cá tra vẫn chiếm số lượng nhiều nhất với 22 chủng, sau đó là các chủng phân lập từ cá vồ đém với 13 chủng và 7 chủng phân lập từ cá lăng; các chủng phân lập từ cá trê và cá hú không thể hiện tính đối kháng với *E.ictaluri*. Đa số các chủng thể hiện tính đối kháng trung bình và yếu, tuy nhiên, chủng CL3.7 lại thể hiện khả năng đối kháng mạnh ($d=17mm$) và khả năng sinh bacteriocin trung bình ($d=14mm$) (Bảng 3). Các chủng vi khuẩn phân lập từ cá tra đa số thể hiện tính đối kháng cao so với các chủng vi khuẩn phân lập từ các loài cá khác.

3.2.3 Đối với cả 2 loài vi khuẩn *A.hydrophila* và *E.ictaluri*

Như vậy, chủng CT3.7 có khả năng sinh bacteriocin đối với cả hai chủng vi khuẩn gây bệnh. Ngoài ra, kết quả cũng cho thấy, có 25 chủng vi khuẩn có khả năng kháng với cả 2 chủng gây bệnh;

với 17 chủng được phân lập từ cá tra, 4 chủng từ cá lăng và 4 chủng từ cá vồ đém (Bảng 1 và Bảng 2).



Hình 3: Đường tròn vô trùng tạo ra bởi vi khuẩn lactic có khả năng sinh bacteriocin đối với vi khuẩn *Ewardsiella ictaluri*. (+): đối chứng dương (kháng sinh Doxycycline 100ppm); (-): đối chứng âm (môi trường MRS lỏng); 9.1, 10.1: dung dịch ly tâm từ vi khuẩn lactic không xử lý; 9.2, 10.2: dung dịch ly tâm từ vi khuẩn lactic chuẩn pH (6.5-7)

Bảng 3: Bảng đường kính vòng vô trùng gây ra bởi hoạt động kháng khuẩn của các chủng vi khuẩn với *Edwardsiella ictaluri*

Nguồn phân lập	Tên chủng	<i>E.ictaluri</i>			
		Khả năng đối kháng		Khả năng sinh bacteriocin	
		Đường kính vòng vô	Độ nhạy ^(*)	Đường kính vòng vô	Độ
Cá tra	CT3.7 ^(**)	17	(+++)	14	(++)
	CT4.9 ⁽²⁾	11	(++)	0	(-)
	CT4.14	11	(++)	0	(-)
	CT8.7 ⁽²⁾	11	(++)	0	(-)
	CT4.10 ⁽²⁾	9	(++)	0	(-)
	CT7.1 ⁽²⁾	9	(++)	0	(-)
	CT8.6 ⁽²⁾	9	(++)	0	(-)
	CT8.10	9	(++)	0	(-)
	CT1.1	8	(++)	0	(-)
	CT8.11 ⁽²⁾	8	(++)	0	(-)
	CT10.2 ⁽²⁾	8	(++)	0	(-)
	CT2.1 ⁽²⁾	7	(++)	0	(-)
	CT2.8 ⁽²⁾	7	(++)	0	(-)
	CT3.3	7	(++)	0	(-)
	CT7.2 ⁽²⁾	7	(++)	0	(-)
	CT8.16 ⁽²⁾	7	(++)	0	(-)
	CT10.8 ⁽²⁾	7	(++)	0	(-)
	CT3.8 ⁽²⁾	6	(++)	0	(-)
	CT7.3 ⁽²⁾	6	(++)	0	(-)
	CT10.1	6	(++)	0	(-)
CT4.4 ⁽²⁾	5	(++)	0	(-)	
CT8.15 ⁽²⁾	2	(+)	0	(-)	
Cá lăng	CL10.3	5	(++)	0	(-)
	CL10.4	5	(++)	0	(-)
	CL1	3	(+)	0	(-)
	CL3 ⁽²⁾	3	(+)	0	(-)
	CL8.21 ⁽²⁾	2	(+)	0	(-)
	CL10.22 ⁽²⁾	2	(+)	0	(-)
	CL10.23 ⁽²⁾	2	(+)	0	(-)
Cá vồ đém	VD5.2	7	(++)	0	(-)
	VD2.1	5	(++)	0	(-)
	VD4.1	4	(+)	0	(-)
	VD4.11 ⁽²⁾	4	(+)	0	(-)
	VD5.1	4	(+)	0	(-)
	VD3.3	3	(+)	0	(-)
	VD3.7	3	(+)	0	(-)
	VD3.12	3	(+)	0	(-)
	VD4.6 ⁽²⁾	3	(+)	0	(-)
	VD4.7 ⁽²⁾	3	(+)	0	(-)
	VD1.6	2	(+)	0	(-)
	VD3.11	2	(+)	0	(-)
VD4.8 ⁽²⁾	2	(+)	0	(-)	
Đối chứng	DC (+)	9	(++)		
	DC(-)	0	(-)		

(*) (+): khả năng kháng khuẩn yếu ($d=2\div 4mm$), (++) khả năng kháng khuẩn trung bình ($d=4\div 14mm$), (+++) khả năng kháng khuẩn mạnh ($d=14\div 24mm$), (-) Không nhạy ($d=0$); (**) Chủng vi khuẩn có tính đối kháng và sinh bacteriocin đối với cả 2 chủng vi khuẩn gây bệnh; (2) Chủng vi khuẩn có tính đối kháng đối với cả 2 chủng vi khuẩn gây bệnh

3.3 Định danh

Sau khi đã tìm được 3 chủng có khả năng sinh bacteriocin, phục hồi và tách rỗng trên đĩa thạch MRS, sau đó gửi mẫu đến Công ty TNHH Thương mại và Dịch vụ Nam Khoa, thực hiện định danh, giải trình tự gen 16S rRNA. Kết quả, 2 chủng CL2 và CL10.20 phân lập từ cá lăng có độ tương đồng theo thứ tự 100% (548/548bp) và 99% (551/552bp) với trình tự gen là

```
GGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAA
CGCCGGCGGTGTGCCTAATACATGCAAGTC
GTACGCACTGGCCCAACTGATTGATGGTGC
TTGCACCTGATTGACGATGGATCACCAGTG
AGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGT
AACCTGCCCGGAGCGGGGATAACATTTG
GAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACA
AAAGCCACATGGCTTTTGTGGAAAGATGG
CTTTGGCTATCACTCTGGGATGGACCTGCG
GTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCT
TACCAAGGCGATGATGCATAGCCGAGTTGA
GAGACTGATCGGCCACAATGGAAGTGA
CACGGTCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAG
TAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCT
GATGGAGCAACACCGCGTGAGTGAAGAAG
GGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTGGA
GAAGAACGTGCGTGAGAGTAACTGTTTAC
GCAGTGACGGTATCCAACAGAAAGTCAC
GGCTAACTACGTGCCAG
```

và được tra cứu trên BLAST SEARCH, xác định là chủng *Lactobacillus reuteri* HFI-LD5

Trong khi đó, chủng CT3.7 phân lập từ cá tra có độ tương đồng 100% (539/539bp) với trình tự gen là

```
ATCCTGGCTCAGGATGAACGCCGGCGGT
GTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGCGTTG
GCCCAATTGATTGATGGTGTCTGCACCTGA
TTGATTTTGGTCGCCAACGAGTGGCGGACG
GGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGCCAG
AAGCGGGGACCAACATTTGAAACAGATG
CTAATACCGCATAACAACGTTGTTTCGCATG
AACAAACGCTTAAAAGATGGCTTCTCGCTAT
CACTTCTGGATGGACCTGCGGTGCATTAGC
TTGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCG
ATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATC
GGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCCAT
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATC
TTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCA
ACACCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTCGGCT
CGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACACG
TATGAGAGTAACTGTTTCATACGTTGACGGT
```

```
ATTTAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGT
GCCAG
```

và kết quả tra cứu trên BLAST SEARCH đã xác định là chủng *Lactobacillus fermentum* JCM-1173.

4 THẢO LUẬN

Từ việc nghiên cứu để tìm ra các vi khuẩn lactic có tiềm năng làm probiotics với khả năng sinh chất kháng khuẩn, như bacteriocin, cho thấy, vi khuẩn lactic ngoài sự hiện diện từ các thức ăn lên men, còn tồn tại trong đường ruột cá và các loài thủy sản khác. Cụ thể, Nirunya *et al.* (2008) đã phân lập được 106 chủng vi khuẩn lactic từ đường ruột cá biển, tôm và động vật thân mềm và tìm được 2 chủng *Pediococcus pentosaceus* và *Enterococcus faecium* sinh acid và H₂O₂ kháng với *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp. và *Escherichia coli*. Nguyễn Văn Thành và Nguyễn Ngọc Trai (2012) đã phân lập được 45 dòng vi khuẩn từ dạ dày, ruột cá tra và cá rô phi thu từ các ao nuôi thâm canh. Noordiana *et al.* (2013) đã phân lập được 30 chủng vi khuẩn lactic từ cá hồi và tôm cỏ. Dương Thị Kim Loan (2013) đã phân lập được 64 chủng vi khuẩn lactic từ ruột cá tra và cá rô phi được thu từ chợ và ao nuôi.

Cùng với những nghiên cứu trên, nghiên cứu này đã phân lập được 96 chủng vi khuẩn lactic từ đường ruột cá da trơn nước ngọt, có khả năng kháng khuẩn *E.coli*., cho thấy không những trong đường ruột các loài nước mặn, mà ở các loài thủy sản nước ngọt cũng tồn tại vi khuẩn lactic với số lượng lớn. Bên cạnh đó, nghiên cứu còn tìm ra 46 chủng thể hiện tính đối kháng với *A.hydrophila*, 42 chủng đối kháng với *E.ictaluri*, trong đó, có đến 25 chủng có khả năng đối kháng với cả 2 chủng vi khuẩn gây bệnh này và 3 chủng vi khuẩn thể hiện khả năng sinh bacteriocin, với cả 3 chủng đều kháng *A.hydrophila* và chỉ 1 chủng kháng *E.ictaluri*. Kết quả định danh chủng CL2, CL20 là loài *Lactobacillus reuteri* HFI-LD5 với độ tương đồng theo thứ tự 100% (548/548bp) và 99% (551/552bp). Chủng CT3.7 là loài *Lactobacillus fermentum* JCM- 1173 với độ tương đồng 100% (539/539bp).

Lactobacillus fermentum được tìm thấy trong quá trình lên men nguyên liệu động vật và thực vật. Allameh *et al.*, (2013), khi phân lập từ dạ dày cá lóc (*Channa striatus*) đã xác định *L. fermentum* có tính kháng khuẩn cao với *A.hydrophila*. Tuy nhiên, nghiên cứu chỉ xác định hoạt động đối kháng bằng

phương pháp khuếch tán giếng thạch với dịch huyền phù được lọc vô trùng, không sử dụng dịch huyền phù có chuẩn pH để xác định khả năng sinh bacteriocin thô, hơn nữa nghiên cứu vẫn chưa thực hiện đối với vi khuẩn *E.ictaluri*. Mặt khác, trong nghiên cứu này đã tìm ra được chủng *L.fermentum* JCM- 1173 từ đường ruột cá, có tính đối kháng và sinh bacteriocin cao không những với *A.hydrophila* mà còn với đối với *E.ictaluri*, trong đó, đường kính vòng tròn vô trùng với vi khuẩn *E.ictaluri* lớn hơn cả kháng sinh Doxycycline.

Loài *Lactobacillus reuteri*, là vi khuẩn lên men hỗn tạp, sống tự nhiên trong đường ruột, được tìm thấy ở ruột động vật có vú và chim và được định danh vào năm 1980 bởi Kandler, bacteriocin được sinh ra bởi loài này là reuterin. *Lactobacillus reuteri* ATCC 1428 có khả năng ức chế sự phát triển của *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella tiphimurium*, *Staphylococcus aureus* và *Vibrio cholera* (Helen et al., 2010). Chưa ghi nhận các nghiên cứu trước đây xác định chủng này được phân lập từ động vật thủy sản. Nghiên cứu này được xem như nghiên cứu khởi phát cho việc phát hiện *L.reuteri* tồn tại trong ruột động vật thủy sản, cụ thể là cá lăng sống tự nhiên với khả năng đối kháng với *A.hydrophila* và sinh bacteriocin.

5 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

5.1 Kết luận

96 chủng vi khuẩn lactic đã được phân lập và tuyển chọn được 46 chủng đối kháng với *A.hydrophila*, 41 chủng đối kháng với *E.ictaluri* và 3 chủng sinh bacteriocin. Kết quả định danh 3 loài có khả năng sinh bacteriocin. Trong đó, CL2, CL20 là loài *Lactobacillus reuteri* HFI-LD5 với độ tương đồng theo thứ tự 100% (548/548bp) và 99% (551/552bp). Chủng CT3.7 là loài *Lactobacillus fermentum* JCM- 1173 với độ tương đồng 100% (539/539bp).

5.2 Đề xuất

Tiếp tục nghiên cứu sâu hơn về tiềm năng sử dụng làm probiotic của 2 loài vi khuẩn *L.reuteri* HFI-LD5 và *L.fermentum* JCM- 1173 như nghiên cứu hợp chất bacteriocin, thực hiện trong điều kiện *in vivo*, khảo sát khả năng làm chế phẩm sinh học,...

LỜI CẢM ƠN

Các nội dung nghiên cứu trong báo cáo này được thực hiện từ nguồn kinh phí nghiên cứu đề tài

“Sàng lọc các chủng vi khuẩn lactic trong ruột một số loài cá da trơn nước ngọt có tiềm năng làm probiotic” (Mã số TSV2015-66 do Trường Đại học Cần Thơ tài trợ kinh phí.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Allameh, S.K., F.M. Yusoff, H.M. Daud, E. Ringø, A.Ideris and C. R.Saad, 2013. Characterization of probiotic *Lactobacillus fermentum* isolated from snakehead, *Channa striatus*, stomach. Journal of the World Aquaculture Society, Volume 44, Issue 6, pages 835–844, December 2013
- Aslim, B., Z. N. Yuksekdog, E. Sarikaya and Y. Beyatli, 2005. Determination of the bacteriocin-like substances produced by some lactic acid bacteria isolated from Turkish dairy products. LWT. 38: 691-694.
- Barrow, G.I. and Feltham, R.K.A., 1993. Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria. 3rd edition, Cambridge University Press, Cambridge.
- Chen, H. and Hoover, D., 2003. Bacteriocins and their Food Applications. Compr. Rev. Food Science. Food Safety, 2: 82-89
- Dương Thị Kim Loan, 2013. Phân lập và đánh giá khả năng kháng khuẩn của vi khuẩn lactic đối với vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây bệnh gan thận mù trên cá tra (*Pangasius hypothalamus*). Luận văn cao học ngành nuôi trồng thủy sản, 2013, Trường Đại học Cần Thơ.
- Helen, S.S, R.J. Ramos, A. Cirolin, M. Miotto, A.M. Bassegio and C.R.W. Vieira, 2010. Antimicrobial activity of *Lactobacillus reuteri* against bacteria of nourishment concern. Brief Communication, 29.12.2010
- Kandler, O., K. Stetter and R. Kohl, 1980; *Lactobacillus reuteri* sp. nov., a new species of heterofermentative lactobacilli. Zentralblatt für Bakteriologie: I. Abt. Originale C: Allgemeine, angewandte und ökologische Mikrobiologie, Volume 1, Issue 3, September 1980, Pages 264–269.
- 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, 2012:23a 224-234.

Nirunya, B., C. Suphitchaya and H. Tipparat, 2008. Screening of lactic acid bacteria from gastrointestinal tracts of marine fish for their potential use as probiotics. Songklanakarin J. Sci. Technol.30 (Suppl.1), 141-148, April 2008.

Noordiana, N., A.B. Fatimah and A.S. Mun, 2013. Antibacterial agents produced by lactic acid bacteria isolated from Thread fin

Salmon and Grass Shrimp; International Food Research Journal 10 (1): 117-124.

Quách Văn Cao Thi, Từ Thanh Dung và Đặng Phạm Hòa Hiệp, 2014. Hiện trạng kháng thuốc kháng sinh trên hai loài vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* và *Aeromonashydrophila* gây bệnh trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) ở Đồng bằng sông Cửu Long. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ, Số chuyên đề: Thủy Sản (2014) (2): 7-14.