



## PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN VÀ KHẢO SÁT CÁC ĐẶC TÍNH CÓ LỢI CỦA LACTOBACILLUS SPP. TỪ AO NUÔI TÔM Ở HUYỆN NHƠN TRẠCH, TỈNH ĐỒNG NAI

### Isolating, identifying and determining the probiotic properties of *Lactobacillus* spp. from shrimp ponds in Nhon Trach district, Dong Nai province

Đoàn Thị Tuyết Lê<sup>1</sup>, Đỗ Minh Anh<sup>2</sup>

<sup>1</sup>tuyetledt@gmail.com, <sup>2</sup>minhanhdo37@gmail.com

<sup>1,2</sup> Khoa Kỹ thuật Hóa học và Môi trường, Trường Đại học Lạc Hồng, Đồng Nai, Việt Nam  
Đền tòa soạn: 04/06/2017; Chấp nhận đăng: 14/06/2017

**Tóm tắt.** Các chủng lợi khuẩn *Lactobacillus* được sử dụng để tạo chế phẩm sinh học trong nuôi tôm nhờ những đặc tính có lợi như hỗ trợ tiêu hóa và ức chế các vi khuẩn gây bệnh ở tôm. Nghiên cứu này nhằm thu nhận một số chủng *Lactobacillus* có những đặc tính probiotic từ ao nuôi tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) ở huyện Nhơn Trạch, tỉnh Đồng Nai làm cơ sở sản xuất chế phẩm sinh học cho tôm. Đề tài tiến hành phân lập nhanh các chủng có khả năng sinh acid bằng cách tăng sinh mẫu trên môi trường tiên chọn lọc MRS Broth + 50mg/l Nystatin, rồi chọn lọc trên môi trường MRS agar có bổ sung 0,5% CaCO<sub>3</sub> và định tính acid lactic bằng thuốc thử Uffelmann; tuyển chọn các chủng có hoạt tính kháng khuẩn cao; định danh bằng sinh hóa và sinh học phân tử. Tiếp theo, khảo sát các đặc tính có lợi của các chủng *Lactobacillus* đã được định danh. Kết quả đã thu được hai chủng *Lactobacillus rhamnosus* L4 và *Lactobacillus salivarius* L7 có khả năng sống tốt trong môi trường pH dao động từ 4 đến 8, độ mặn từ 0‰ đến 50‰, kháng được chủng gây bệnh *Vibrio parahaemolyticus* cao ( $\Delta D = 10$  mm), đáp ứng được yêu cầu sản xuất chế phẩm probiotic.

**Từ khóa:** *Lactobacillus rhamnosus*; *Lactobacillus salivarius*; *Litopenaeus vannamei*; Probiotic; *Vibrio parahaemolyticus*.

**Abstract.** The good *Lactobacillus* bacteria are used to create probiotics in shrimp farming thanks to profitable features such as supporting digestion and inhibiting the pathogenic bacteria in shrimp. This study aims to acquire certain strains of *Lactobacillus* having probiotic properties from gut of White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Nhon Trach district, Dong Nai province as a basis for producing probiotic for the shrimp. The research was carried by isolating some strains on pre-selective medium MRS Broth + 50mg/l Nystatin and selective medium MRS agar + 0,5% CaCO<sub>3</sub>; determining lactic acid by the Uffelmann reagent; selecting strains with high antibacterial activity; identifying by biochemical and molecular biology methods. Next, examining the beneficial properties of *Lactobacillus* spp. have been identified. Two bacterial strains, *Lactobacillus rhamnosus* L4 and *Lactobacillus salivarius* L7, have been successfully isolated and identified. A wide range of tolerance to pH (4-8), salinity (0-50‰) was also recorded for both bacterial strains. Interestingly, these strains performed an excellent activity against *Vibrio parahaemolyticus* ( $\Delta D = 10$  mm). This result shows a very promising alternative to achieve a potential probiotic from the white shrimp (*Litopenaeus vannamei*).

**Keywords:** *Lactobacillus salivarius*; *Lactobacillus rhamnosus*; Probiotic; *Vibrio parahaemolyticus*

### 1. GIỚI THIỆU

Trong những năm gần đây, ngành nuôi trồng thủy sản nói chung và nuôi tôm nói riêng phát triển mạnh mẽ do nhu cầu các sản phẩm thủy hải sản gia tăng. Việc lạm dụng thuốc kháng sinh và chất khử trùng trong nuôi trồng thủy sản dễ gây nên, kiểm soát dịch bệnh đã gây nhiều hậu quả nghiêm trọng, ảnh hưởng đến sức khỏe người tiêu dùng (Dorsey & Robertson, 2013). Hiện nay, probiotics được sử dụng để thay thế chất kháng sinh trong thủy sản, giúp tăng tỉ lệ sống và phát triển của động vật thủy sản (Reyes-Becerril et al., 2014; Swain et al., 2009). Trong số các vi sinh vật probiotics, *Lactobacillus* spp. đóng vai trò quan trọng trong đường tiêu hóa của vật chủ do cải thiện khả năng miễn dịch, cân bằng hệ vi sinh đường ruột và tiết ra chất kháng khuẩn như acid lactic, acid acetic, bacteriocin... ức chế sự phát triển của các vi khuẩn gây bệnh (Ige, 2013; Maeda et al., 2014). Những nghiên cứu gần đây cho thấy khi bổ sung *Lactobacillus* spp. như *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus plantarum*... vào thức ăn tôm sú (*Penaeus monodon*) đã hỗ trợ tăng sức đề kháng, chống lại vi khuẩn gây bệnh *Vibrio* giúp tôm sinh trưởng khỏe mạnh (Võ Thị Thứ, 2006; Khuất Hữu Thanh, 2010; Chiu et al., 2007).

Ngoài ra, nguồn gốc của vi sinh vật có ích trong chế phẩm probiotic cũng ảnh hưởng tới hiệu quả của chế phẩm

(Vaseeharan & Ramasamy, 2003). Các chủng probiotic cho tôm đã được phân lập từ nước ao nuôi tôm (Vaseeharan & Ramasamy, 2003; Soundarapandian & Sankar, 2008) hoặc từ ruột tôm (Alavandi et al., 2004). Hơn nữa, hiện nay vẫn chưa có công trình nào công bố về phân lập *Lactobacillus* spp. trên tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) ở huyện Nhơn Trạch, tỉnh Đồng Nai, địa phương được Ủy ban Nhân dân tỉnh chọn để thực hiện đề án nuôi tôm siêu thâm canh (<http://baodongnai.com.vn>). Vì thế, nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu phân lập, tuyển chọn và khảo sát các đặc tính có lợi của *Lactobacillus* spp. từ ao nuôi tôm thẻ chân trắng ở Nhơn Trạch, tỉnh Đồng Nai, góp phần nâng cao hiệu quả nuôi tôm thẻ chân trắng.

### 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

#### 2.1 Vật liệu

Mẫu: 60 mẫu nội tạng tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) khỏe mạnh từ 10 ao nuôi tôm huyện Nhơn Trạch, tỉnh Đồng Nai. Chủng vi sinh vật kiểm định *Vibrio parahaemolyticus* phân lập từ ao tôm bệnh chết (được cung cấp bởi Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh).

Môi trường và hóa chất: MRSA (Man, Rogosa, Sharpe Agar) xuất xứ: Biokar - Pháp; MRSB (Man, Rogosa, Sharpe

Broth) xuất xứ: Biokar - Pháp; NA (Nutrient Agar) xuất xứ: Biokar - Pháp; APW: peptone 10g, NaCl 10g, nước cất vừa đủ 1 lít, Nystatin 100.000 UI (Pharmedic, Việt Nam)

## 2.2 Phương pháp nghiên cứu

### 2.2.1 Thu nhận mẫu

Thu nhận 500g cá thể tôm đại diện trên 1 ao trong 10 ao nuôi tôm. Các mẫu được mã hóa và bảo quản ở 4°C, chuyển về phòng thí nghiệm (Trần Linh Thước, 2007). Mẫu tôm được rửa bằng cồn 70%, giải phẫu và thu nhận 60 mẫu nội tạng (Kongnum, Hongpattarakere, 2012).

### 2.2.2 Phân lập một số chủng *Lactobacillus*

Sử dụng phương pháp pha loãng liên tục bằng nước muối vô trùng 0,9% để phân lập các chủng *Lactobacillus* có khả năng sinh acid (Nguyễn Lân Dũng et al., 1976). Cân chính xác 10 g mẫu cho vào túi PE chứa 90 ml môi trường MRS Broth có bổ sung 50mg/l Nystatin, ủ kỵ khí ở 37°C (Nguyen, 2014; Ishola & Adebayo-Tayo, 2012). Sau 24 giờ, tiến hành pha loãng mẫu tăng sinh ở độ pha loãng  $10^{-7}$ . Hút 100 µl dịch pha loãng trải trên môi trường MRS agar + 0,5% CaCO<sub>3</sub> (Khuất Hữu Thanh, 2010), ủ kỵ khí ở 37°C trong 48 giờ. Chọn các khuẩn lạc đặc trưng, có vòng phân giải CaCO<sub>3</sub> và quan sát tế bào dưới kính hiển vi. Tiếp theo, khuẩn lạc lựa chọn được tăng sinh trong MRS Broth rồi định tính acid lactic bằng thuốc thử Uffelmann, bảo quản giống trong ống nghiệm thạch nghiêng MRS agar ở 4°C. (Kongnum et al., 2012; Nguyen, 2014; Nguyễn Lân Dũng et al., 1976).

### 2.2.3 Tuyển chọn và định danh các chủng *Lactobacillus*

#### 2.2.3.1 Tuyển chọn các chủng *Lactobacillus* có khả năng kháng khuẩn

Nhằm lựa chọn các chủng *Lactobacillus* có khả năng kháng *Vibrio parahaemolyticus*. Hoạt tính kháng khuẩn được xác định bằng phương pháp đục lỗ (Schillinger & Lücke, 1989).

Môi trường thạch NA bổ sung 15% NaCl được trải *V. parahaemolyticus* ở mật độ  $10^5$  cfu/ml (Kongnum & Hongpattarakere, 2012), sau đó tạo các lỗ thạch. Hút 100µl phần dịch nuôi cấy của mỗi chủng vi khuẩn vào các lỗ thạch, ủ 37°C. Sau 24 giờ, đo đường kính vòng kháng khuẩn ( $\Delta D$ ).  $\Delta D = D - d$  (mm) với D: đường kính vòng kháng khuẩn (mm); d: đường kính lỗ thạch (mm).

#### 2.2.3.2 Định danh bằng sinh hóa

Khả năng sinh Catalase, khả năng lên men các nguồn carbohydrate, khả năng di động (Vos et al., 2011; Trần Linh Thước, 2007).

#### 2.2.3.3 Định danh bằng phương pháp sinh học phân tử

Định danh bằng phương pháp sinh học phân tử tại công ty Nam Khoa, địa chỉ: 793/58 Trần Xuân Soạn, Phường Tân Hưng, Quận 7, Thành phố HCM. Khuếch đại và giải trình tự vùng 16S rRNA bộ gen vi khuẩn phân lập được. So sánh và định danh các chủng bằng chương trình BLAST online của NCBI.

## 2.2.4 Khảo sát các đặc tính probiotics

### 2.2.4.1 Khả năng chịu mặn

Nuôi cấy các chủng *Lactobacillus* trong canh trường MRS Broth có bổ sung 0%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% muối NaCl ở 37°C. Sau 24 giờ, theo dõi sự sinh trưởng thông qua chỉ số OD<sub>600nm</sub>. (Nguyen, 2014)

### 2.2.4.2 Khả năng thích nghi pH

Các chủng *Lactobacillus* được cấy vào canh trường MRS Broth hiệu chỉnh pH lần lượt là 4, 5, 6, 7 và 8 bằng NaOH và HCl, ủ 37°C trong vòng 24 giờ tiến hành đo OD<sub>600nm</sub>. (Nguyen, 2014)

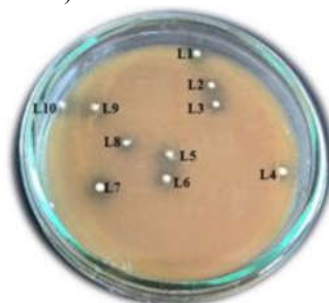
### 2.2.4.3 Hoạt tính kháng khuẩn

Nhằm đánh giá khả năng kháng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* ở các mật độ  $10^6$  cfu/ml,  $10^7$  cfu/ml của các chủng *Lactobacillus* phân lập được. Hoạt tính kháng khuẩn được xác định bằng phương pháp đục lỗ (Schillinger, & Lücke, 1989).

## 3. KẾT QUẢ THẢO LUẬN

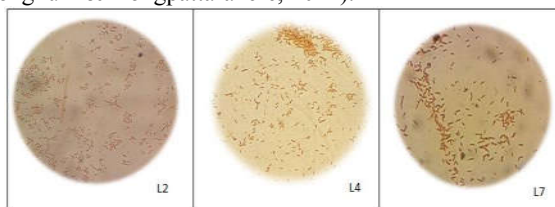
### 3.1 Kết quả phân lập

Từ 60 mẫu nội tạng tôm, phân lập được 10 chủng vi khuẩn L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7, L8, L9, L10 có khả năng phân giải CaCO<sub>3</sub> (Hình 1).



Hình 1. Khuẩn lạc các chủng vi khuẩn có khả năng phân giải CaCO<sub>3</sub>

Trong đó 3 chủng L2, L4, L7 có hình que, Gram dương (hình 2); 7 chủng còn lại bị loại vì nhuộm Gram âm và Gram dương nhưng có hình cầu (bảng 1). Quan sát kết quả thử nghiệm Uffelmann cho thấy 3 chủng L2, L4, L7 đều có khả năng sinh acid lactic (hình 3). Như vậy, ba chủng này được tuyển chọn cho những nghiên cứu tiếp sau. Kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu trước đây. (Ashmaig et al., 2009; Kongnum & Hongpattarakere, 2012).



Hình 2. Hình thái tế bào các chủng vi khuẩn L2, L4 và L7 dưới vật kính 100X

Bảng 1. Đặc điểm hình thái và nhuộm Gram của các chủng vi khuẩn phân lập

STT	Kí hiệu chủng	Hình thái	Gram
1	L1	Que ngắn	-
2	L2	Que ngắn	+
3	L3	Cầu	+
4	L4	Que ngắn	+
5	L5	Que dài	-
6	L6	Cầu	+
7	L7	Que ngắn	+
8	L8	Cầu	-
9	L9	Cầu	+
10	L10	Cầu	+

Đề tài đã cải tiến khi kết hợp tăng sinh mẫu trên môi trường tiên chọn lọc MRS Broth + 50mg/l Nystatin, chọn lọc lại trên môi trường MRS agar + 0,5% CaCO<sub>3</sub>. Điều này giúp

phân lập nhanh các chủng vi khuẩn có khả năng sinh acid. Thử nghiệm Uffelmann ngay sau khi quan sát hình thái tế bào đặc trưng của *Lactobacillus* đã giúp định tính nhanh khả năng sinh acid lactic của các chủng vi khuẩn ngay thời điểm phân lập.



**Hình 3.** Kết quả thử khả năng sinh acid lactic của các chủng L2, L4 và L7 với thuốc thử Uffelmann

Ống ĐC (-): Môi trường MRS không bổ sung dịch tăng sinh vi khuẩn, ống L2, L4, L7: dịch tăng sinh các chủng L2, L4, L7, ĐC (+): acid lactic

So với nghiên cứu của Ishola và AdebayoTayo (2012), quy trình phân lập này đã có sự cải tiến khi bổ sung Nystatin trực tiếp vào môi trường tiên chọn lọc, bước đầu kim hãm sự phát triển của nấm. Bên cạnh đó, các chủng *Lactobacillus* được đặc trưng về khả năng sinh acid, nên việc lựa chọn môi trường trải mẫu có bổ sung  $\text{CaCO}_3$  là thích hợp. Quy trình cải tiến đã giúp cho việc quan sát, lựa chọn các khuẩn lạc đặc trưng nhờ vòng phân giải  $\text{CaCO}_3$  được dễ dàng hơn.

### 3.2 Kết quả tuyển chọn và định danh các chủng vi khuẩn

#### 3.2.1 Kết quả tuyển chọn các chủng vi khuẩn có khả năng kháng khuẩn

Sau 24 giờ, đường kính vòng kháng khuẩn ( $\Delta$ ) chủng L4, L7 là 10 mm và L2 là 5 mm (Hình 4).



**Hình 4.** Đường kính vòng kháng khuẩn của chủng L2, L4 và L7

*V. parahaemolyticus* trong nước với nồng độ  $10^5$  cfu/ml được nghiên cứu thử nghiệm in vitro là có khả năng gây bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm (Ariole et al., 2013; Nguyễn Trọng Nghĩa et al., 2015). Kết quả ở hình 4 cho thấy 3 chủng L2, L4 và L7 có khả năng kháng *V. parahaemolyticus*. Trong đó L4 và L7 có khả năng kháng khuẩn cao, được tuyển chọn để thực hiện các thử nghiệm sinh hóa tiếp theo.

#### 3.2.2 Kết quả định danh sinh hóa các chủng vi khuẩn

Theo Vos và đồng tác giả (2011), Trần Linh Thuộc (2007), trên cơ sở các thử nghiệm sinh hóa, 2 chủng L4 và L7 được nghi ngờ thuộc chi *Lactobacillus*. Kết quả được chỉ ra ở bảng 2. Để phân loại đến loài, 2 chủng vi khuẩn này được giải trình tự vùng 16S rRNA và so sánh trình tự trên chương trình BLAST Online của NCBI.

**Bảng 2.** Kết quả sinh hóa của các chủng vi khuẩn

Các chỉ tiêu	Chủng	
	L4	L7
Catalase	-	-
Mantose	+	+
Lactose	+	+
Glucose	+	+
Saccharose	+	+
Fructose	+	+
Di động	-	-

#### 3.2.3 Kết quả định danh phân tử các chủng vi khuẩn phân lập

Kết quả giải trình tự đoạn gen 16S rRNA của chủng L4 và L7 được trình bày ở hình 5. Trình tự đoạn gen 16S rRNA chủng L4 và L7 được tra cứu trên BLAST SEARCH cho thấy L4 khớp với trình tự 16S rRNA của chủng *L. rhamnosus* 100% (987/987 bits), L7 khớp với trình tự 16S rRNA của chủng *L. salivarius* 100% (961/961 bits).

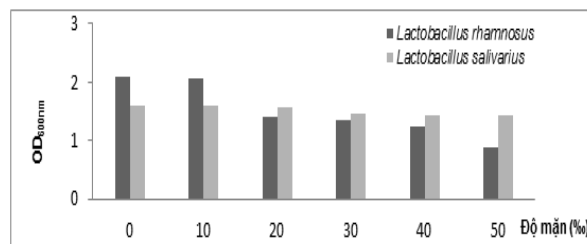
```

TTGATCCTGGCTCAGGATGA          CTGGCTCAGGACGAACGCT
ACGCGGCGTGCCTAATAC          GGGCGGTGCCTAATACATGC
ATGCAAGTCGAACGAGTCTGA      AAGTCGAACGAAACTTCTTA
TTATTGAAAGGTGCTTGCATCTT    CACCGAATGCTTGCATTACC
GATTTAATTTGAAACGAGTGGC     GTAAGAAGTTGAGTGGCGGAC
GGACGGGTGAGTAACACGTGG      GGGTGAAGTAACACGTGGGTA
GTAACCTGCCCTAAGTGGGGG      CCTGCCTAAAAGAAGGGGATA
ATAACATTTGGAAACAGATGCT     ACACTTGGAAACAGGTGCTAA
AATACCGCATAAATCCAAGAAC     TACCGTATATCTCTAAGGATC
CGCATGGTCTTGGCTGAAAGA      GCATGATCCTTAGATGAAAGA
TGGCGTAAGCTATCGTTTTGG     TGGTCTGCTATCGCTTTTAGA
ATGGACCCGCGCGTATTAGCT     TGGACCCGCGGCGTATTAAC
AGTTGGTGAGGTAACGGCTCAC     AGTTGGTGGGGTAACGGCCTA
CAAGGCAATGATACGTAGCCGA     CCAAGGTGATGATACGTAGCC
ACTGAGAGGTTGATCGGCCACA     GAAC TGAGAGGTTGATCGGCC
TTGGGACTGAGACCGGCCCAA     ACATTGGGACTGAGACACGGC
ACTCTACGGGAGGCAGCAGTA     CCAAACCTCTACGGGAGGCAG
GGGAATCTCCACAATGGACGC     CAGTAGGGAATCTCCACAAT
AAGTCTGATGGAGCAACGCCCG     GGACGCAAGTCTGATGGAGCA
GTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGG     ACGCCGCGTGAAGTGAAGAAG
TCGTAAAACCTGTGTTGGAG      GTCCTCGGATCGTAAAACCTCT
AAGAATGGTCCGAGAGTAAC      GTTGTAGAGAAGAACACGAG
GTTGTCGGCGTGACGGTATCCA     TGAGAGTAACTGTTCTTCGGA
ACCAGAAAGCCACGGCTAACTA     TGACGGTATCTAACCGCAAG
CGTGCCAG                    TCACGGCTAACTACGTGC
(A)                          (B)
    
```

**Hình 5.** Trình tự đoạn gen mã hóa 16s rRNA của chủng L4 (A) và L7 (B)

### 3.3 Kết quả khảo sát đặc tính probiotics

#### 3.3.1 Khả năng chịu mặn chủng *L. rhamnosus* L4 và *L. salivarius* L7



**Đồ thị 1.** OD<sub>600nm</sub> chủng *L. rhamnosus*, *L. salivarius* ở các nồng độ NaCl khác nhau

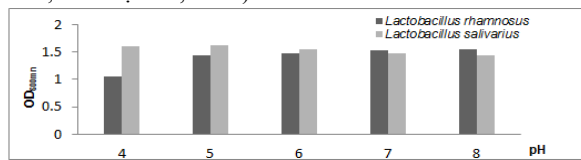
Theo Đoàn Văn Thuộc, Nguyễn Thị Bình, (2012) thì nồng độ NaCl trong môi trường nuôi cũng ảnh hưởng tới sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn. Kết quả đo OD<sub>600nm</sub> sau 24 giờ ở 37°C được biểu thị ở Đồ thị 1.

Chủng *L. rhamnosus* L4 và *L. salivarius* L7 có khả năng sinh trưởng, phát triển trong môi trường từ 0% đến 50%

NaCl. Trong đó, chủng *L. rhamnosus* L4 sinh trưởng tốt nhất ở độ mặn từ 0‰ đến 20‰. Kết quả này cũng phù hợp với những nghiên cứu trước đây (Hoque et al., 2010; Võ Thị Thứ, 2006). Ngưỡng chịu mặn của hai chủng *L. rhamnosus* L4, *L. salivarius* L7 phù hợp với điều kiện ao nuôi tôm nước ta (10‰ - 25‰). (Thái Bá Hồ, Ngô Trọng Lư, 2003)

### 3.3.2 Khả năng thích nghi pH chủng *L. rhamnosus* và *L. salivarius*

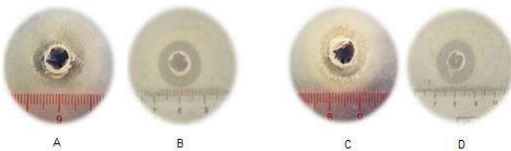
pH là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn. Trên Đồ thị 2 cho thấy hai chủng *L. rhamnosus* L4, *L. salivarius* L7 sinh trưởng, phát triển trên tất cả các khoảng pH khảo sát và thích nghi cao ở pH từ 5 đến 8. Kết quả này cho thấy 2 chủng *Lactobacillus* phân lập có ngưỡng thích nghi pH rộng, phù hợp với các công bố trước đây (Hoque et al., 2010; Nguyen, 2014). Khả năng thích nghi pH của hai chủng *L. rhamnosus* L4, *L. salivarius* L7 thích hợp với điều kiện pH ao nuôi tôm ở nước ta dao động từ 7.7 đến 8 (Thái Bá Hồ, Ngô Trọng Lư, 2003; Võ Thị Thứ, 2006).



Đồ thị 2. Giá trị OD600nm chủng *L. rhamnosus* L4, *L. salivarius* L7 ở pH khác nhau

### 3.3.3 Khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh của chủng *L. rhamnosus* L4 và *L. salivarius* L7

Hoạt tính kháng khuẩn của chủng *L. rhamnosus* L4 và *L. salivarius* L7 với vi khuẩn kiểm định *V. parahaemolyticus* ở những mật độ gây bệnh khác nhau được thể hiện trong hình 6.



Hình 6. Khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh của chủng *L. rhamnosus* L4 và *L. salivarius* L7

Chủng *L. rhamnosus* (A) và *L. salivarius* (B) đối kháng chủng *V. parahaemolyticus* ở mật độ gây bệnh  $10^6$  cfu/ml.

Chủng *L. rhamnosus* (C) và *L. salivarius* (D) đối kháng chủng *V. parahaemolyticus* ở mật độ gây bệnh  $10^7$  cfu/ml.

Kết quả ở Hình 6 cho thấy, ở mật độ vi khuẩn gây bệnh  $10^6$  cfu/ml, *L. rhamnosus* L4 và *L. salivarius* L7 thể hiện sự đối kháng mạnh, đường kính vòng kháng khuẩn gần như bằng nhau ( $\Delta D = 10$  mm). Ở mật độ vi khuẩn gây bệnh  $10^7$  cfu/ml, đường kính vòng kháng khuẩn của hai chủng đã có sự thay đổi nhưng vẫn duy trì ở mức cao (*L. rhamnosus*: 7 mm và *L. salivarius*: 8 mm).

Khảo sát trên cho thấy, *L. rhamnosus* L4, *L. salivarius* L7 đều có khả năng kháng *V. parahaemolyticus*. Tuy nhiên, *L. salivarius* L7 thể hiện sự vượt trội hơn so với *L. rhamnosus* khi đánh giá khả năng ức chế *V. parahaemolyticus* ở mật độ gây bệnh cao  $10^7$  cfu/ml.

Hoạt tính kháng vi khuẩn gây bệnh của các chủng *Lactobacillus* thể hiện ở khả năng tạo ra các hợp chất kháng khuẩn có thể là bacteriocin, hydroxy peroxide, diacetyl, reuterin (Yang, 2000). Chính khả năng này đã góp phần ức chế sự phát triển của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh từ gan tụy cấp ở tôm. Kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu đã công bố trước đây (Austin et al., 1995; Rengpipat et al, 1998; Gram et al., 1999). Ngoài ra, nghiên

cứ mới đây cho thấy *L. rhamnosus* giúp ngăn cản *E. coli* và *Salmonella* hình thành màng sinh học đồng thời ức chế sự bám dính của *V. parahaemolyticus*. Đặc biệt, *L. rhamnosus* còn có khả năng tiết chất giống Lectin là một protein có tiềm năng đặc biệt khan hiếm được tìm thấy ở vi khuẩn (Petrova et al., 2016).

Tóm lại, chủng *L. rhamnosus* L4 và *L. salivarius* L7 phân lập được là những vi khuẩn probiotic tiềm năng, đáp ứng điều kiện sản xuất chế phẩm probiotic cho tôm, có thể thay thế thuốc kháng sinh trong nuôi trồng thủy sản nói chung và nuôi tôm nói riêng.

## 4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã cải tiến quy trình phân lập và tuyển chọn các chủng *Lactobacillus* spp. bằng cách tăng sinh mẫu trên môi trường tiền chọn lọc MRS Broth + 50mg/l Nystatin, chọn lọc trên môi trường MRS agar + 0,5% CaCO<sub>3</sub> và định tính acid lactic bằng thuốc thử Uffelmann. Việc bắt đúng khuẩn lạc cũng quyết định đến thành công của quá trình phân lập và tuyển chọn vì các bước tuyển chọn và định danh tiếp theo chỉ mang tính chất xác định. Hai chủng *Lactobacillus rhamnosus* L4 và *Lactobacillus salivarius* L7 phân lập được có khả năng tiết acid lactic và kháng *Vibrio parahaemolyticus* cao ( $\Delta D = 10$  mm), có khả năng chịu mặn đến 50‰, sống được trong môi trường có pH từ 4 đến 8, thích hợp để sản xuất chế phẩm sinh học cho tôm thẻ chân trắng phòng bệnh hoại tử gan tụy cấp gây ra bởi vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*.

## 5. CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Trường Đại học Lạc Hồng, Liên hiệp các Hội Khoa học và Kỹ thuật Đồng Nai đã hỗ trợ kinh phí để chúng tôi hoàn thành nghiên cứu này.

## 6. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] S.V. Alavandi, K.K. Vijayan, T.C. Santiago, M. Poornima, K.P. Jithendran, S.A. Ali, J.J. Rajan, "Evaluation of *Pseudomonas* sp. PM 11 and *Vibrio fluvialis* PM 17 on immune indices of tiger shrimp, *Penaeus monodon*", Fish Shellfish Immunol 17(2), pp.115-20, 2004.
- [2] C. N.Ariole, G. E. Nyeche, "In vitro antimicrobial activity of *Lactobacillus* isolates against shrimp (*Penaeus monodon*) pathogens", International Journal of Biosciences, 3(1), pp. 7-12, 2013.
- [3] A. Ashmaig, A. Hasan, E.L. Gaali, "Identification of lactic acid bacteria isolated from traditional Sudanese fermented camel's milk (Gariss)", Afr. J. Microbiol. Res., 3(8), pp. 451-457, 2009.
- [4] B. Austin, L.F. Stuckey, P.A.W. Berton, I. Effendi, D. R. W. Griffith, "A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*", Journal of Fish Disease, 18, pp. 93-96, 1995.
- [5] C.H. Chiu, Y. K. Guu, T.M. Pan, W. Cheng, "Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*", Fish & Shellfish Immunology, 23, pp. 364-377, 2007.
- [6] Đoàn Văn Thược, Nguyễn Thị Bình, "Đặc điểm của chủng vi khuẩn ND153 sinh Polyhydroxybutyrate (PHB) phân lập từ đất rừng ngập mặn huyện Giao Thủy, tỉnh Nam Định", Tạp Chí Công Nghệ Sinh Học, 10(1), pp. 169-178, 2012.
- [7] D. Dorsey, W. Robertson, "Recent advances in fish diseases treatment: probiotics as alternative therapy to antibiotics in aquaculture", Eur. J. Ocean Mar 11, pp. 20-28, 2013.
- [8] L. Gram, J. Melchiorson, B. Spanggaard, L. Huber, J.F. Nielsen, "Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish", Applied Environmental Microbiology, 65, pp. 969-973, 1999.

- [9] M.Z. Hoque, F. Akter, K.M. Hossain, M. S. M. Rahman, M. M. Billah, K. M. D. Islam, "Isolation, identification and analysis of probiotic properties of *Lactobacillus* spp. from selective regional yoghurts", *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 5(1), pp. 39-46, 2010.
- [10] Thái Bá Hồ, Ngô Trọng Lư, "Kỹ thuật nuôi tôm he chân trắng", Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội, 2003.
- [11] B.A. Ige, "Probiotics use in intensive fish farming", *Afr. J. Microbiol. Res.* 7, pp. 2701-2711, 2013.
- [12] R.O. Ishola, B.C. AdebayoTayo, "Screening lactic acid bacteria isolated from Fermented food for Bio-molecules production", *Aust. J. Tech.*, 15(4), pp. 205-217, 2012.
- [13] Khuất Hữu Thanh, "Nghiên cứu ứng dụng công nghệ sinh học hoàn thiện chế phẩm BIO TS3 có khả năng tăng sức đề kháng của tôm trong nuôi tôm sú thâm canh", Trường Đại học Quốc gia Hà Nội, Viện công nghệ sinh học và công nghệ thực phẩm, 2010.
- [14] K. Kongnum, T. Hongpattarakere, "Effect of *Lactobacillus plantarum* isolated from digestive tract of wild shrimp on growth and survival of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio Harveyi*", *Fish và Shellfish Immunology*, 32, pp. 170-177, 2012.
- [15] M. Maeda, A. Shibata, G. Biswas, H. Korenaga, T. Kono, T. Itami, M. Sakai, "Isolation of lactic acid bacteria from kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) intestine and assessment of immunomodulatory role of a selected strain as probiotic", *Mar. Biotechnol.*, 16, pp. 181-192, 2014.
- [16] Nguyễn Lâm Dũng, Đoàn Xuân Mượn, Nguyễn Phùng Tiến, Đặng Đức Trạch, Phạm Văn Ty, "Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học", tập 2, NXB Khoa học Kỹ thuật, Hà Nội, 1976.
- [17] P.M. Nguyen, "Isolation, identification and characterization of *Lactobacillus* on black tiger shrimp", *International Journal of Multidisciplinary Research and Development*, 6, pp. 153-158, 2014.
- [18] Nguyễn Trọng Nghĩa, Đặng Thị Hoàng Oanh, Trương Quốc Phú và Phạm Anh Tuấn, "Phân lập và xác định khả năng gây hoại tử gan tụy của vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* phân lập từ tôm nuôi ở Bạc Liêu", *Tap chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 39, pp. 99-107, 2015.
- [19] M.I. Petrova, N.C. Imholz, T.L. Verhoeven, J. Balzarini, E.J. Van Damme, D. Schols, J. Vanderleyden, S. Lebeer, "Lectin-Like molecules of *Lactobacillus rhamnosus* GG inhibit pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella* biofilm formation", *Plos One*, pp. 1-24, 2016.
- [20] S. Rengpipat, W. Phianphak, S. Piyatiratitivorakul, P. Menasveta, "Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth", *Aquaculture* 167, pp. 301-313, 1998.
- [21] M. Reyes-Becerril, F. Ascencio, V. Gracia-Lopez, M.E. Macias, M.C. Roa, M.A. Esteban, "Single or combined effects of *Lactobacillus sakei* and inulin on growth, nonspecific immunity and IgM expression in leopard grouper (*Mycteroperca rosacea*)", *Fish Physiol. Biochem*, 40, pp. 1169-1180, 2014.
- [22] U. Schillinger, F. K. Lücke, "Antibacterial activity of *Lactobacillus sakei* isolated from meat", *Applied and Environmental Microbiology*, 55, pp. 1901-1906, 1989.
- [23] P. Soundarapandian, S. Sankar, "Effect of Probiotics on the survival and production of Black tiger shrimp *Penaeus monodon*", *Int. J. Zool.*, Re. 4(1), pp. 35-41, 2008.
- [24] S. M. Swain, C. Singh, V. Arul, "Inhibitory activity of probiotics *Streptococcus phocae* P180 and *Enterococcus faecium* MC13 against *Vibriosis* in shrimp *Penaeus monodon*", *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 25, pp.697-703, 2009.
- [25] Trần Linh Thuộc, "Phương pháp phân tích vi sinh vật trong nước, thực phẩm và mĩ phẩm", Nhà xuất bản Giáo dục, Hà Nội, 2009.
- [26] B. Vaseeharan, P. Ramasamy, "Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*", *Letters in Applied Microbiology*, 36, pp. 83-87, 2003.
- [27] Võ Thị Thứ, "Dự án hoàn thiện và triển khai công nghệ sản xuất chế phẩm sinh học phục vụ xử lý môi trường nuôi trồng thủy sản", Báo cáo tổng kết khoa học và kỹ thuật, Hà Nội, 2006.
- [28] P. Vos, G. Garrity, D. Jones, N.R. Krieg, W. Ludwig, F.A. Rainey, K.H. Schleifer, W. Whitman, "Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology", Second Edition, Volume Three, The Firmicutes, pp. 465-512, 2011.
- [29] Z. Yang, "Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: structures and properties", *Department of Food Technology*, University of Helsinki, 2000.
- <<http://baodongnai.com.vn/tintuc/201601/thuc-hien-thi-diem-mo-hinh-nuoi-tom-sieu-tham-can-2659537/>>

## TIỂU SỬ TÁC GIẢ



**Đoàn Thị Tuyết Lê**

Năm sinh 1983, Bình Định. Tốt nghiệp Đại học và Thạc sĩ tại Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM năm 2005 và 2009. Hiện là giảng viên khoa Kỹ thuật hóa học và Môi trường, Trường Đại học Lạc Hồng. Lĩnh vực nghiên cứu: Công nghệ sinh học.



**Đỗ Minh Anh**

Năm sinh 1982, Biên Hòa – Đồng Nai. Tốt nghiệp Đại học tại Trường Đại học Khoa học Tự nhiên TP.HCM năm 2004. Hiện đang công tác tại trường Đại học Lạc Hồng. Lĩnh vực nghiên cứu: vi sinh, dược lý cây thuốc