

THÔNG BÁO KHOA HỌC

**PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN LACTIC CÓ HOẠT TÍNH KHÁNG
Vibrio parahaemolyticus TỪ NỘI TẠNG TÔM THẺ CHÂN TRẮNG
(*Litopenaeus vannamei*)**

**ISOLATION AND SELECTION OF LACTIC ACID BACTERIA AGAINST *Vibrio*
parahaemolyticus FROM GASTROINTESTINAL TRACT OF PACIFIC WHITE SHRIMP
(*Litopenaeus vannamei*)**

Đoàn Thị Tuyết Lê^{1*}, Đỗ Minh Anh¹, Lê Thị Thu Hương¹

Ngày nhận bài: 20/5/2019; Ngày phản biện thông qua: 16/12/2019; Ngày duyệt đăng: 24/12/2019

TÓM TẮT

Các chủng vi khuẩn lactic (LAB) 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. Nghiên cứu này nhằm thu nhận một số chủng vi khuẩn lactic có hoạt tính kháng *Vibrio parahaemolyticus* từ tôm Thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) ở huyện Nhơn Trạch, tỉnh Đồng Nai làm cơ sở sản xuất chế phẩm sinh học cho tôm. Các chủng có khả năng sinh acid được phân lập nhanh bằng cách tăng sinh mẫu trên môi trường tiền chọn lọc MRS Broth + 50mg/l Nystatin, rồi chọn lọc trên môi trường MRS agar có bổ sung 0,5% CaCO₃ và định tính acid lactic bằng thuốc thử Uffelmann; các chủng có hoạt tính kháng *Vibrio parahaemolyticus* cao được tuyển chọn; định danh bằng sinh hóa và sinh học phân tử. Kết quả khảo sát khả năng kháng *Vibrio parahaemolyticus* của các chủng đã được định danh thu được ba chủng *Lactobacillus salivarius* LIITA1.2.2, *Lactobacillus reuteri* LIVTA2.4.1 và *Lactobacillus plantarum* LVITA3.3.9 có khả năng tiết acid lactic và kháng *V. parahaemolyticus* ở mật độ 10⁵ cfu/ml, 10⁶ cfu/ml và 10⁷ cfu/ml.

Từ khóa: Probiotic, lactic acid bacteria (LAB), *Vibrio parahaemolyticus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus reuteri*, *Litopenaeus vannamei*

ABSTRACT

The lactic acid bacteria (LAB) are used to create probiotics in shrimp farming due to beneficial effects such as supporting digestion and inhibiting pathogenic bacteria in shrimp. This study aims to acquire certain strains of lactic acid bacteria against *Vibrio parahaemolyticus* from gut of White leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Nhon Trach district, Dong Nai province in order to produce probiotic for the shrimp basically. The research was carried out by isolating some strains on pre-selective medium MRS Broth + 50mg/l Nystatin and selective medium MRS agar + 0,5% CaCO₃; determining lactic acid by the Uffelmann reagent; selecting strains with high antibacterial activity; identifying by biochemical and molecular biology methods. Next, *Vibrio parahaemolyticus* antibacterial ability of the identified strains was investigated. The results showed that *Lactobacillus salivarius* LIITA1.2.2, *Lactobacillus reuteri* LIVTA2.4.1 and *Lactobacillus plantarum* LVITA3.3.9 were selected. These strains could produce lactic acid and resistant to *V. parahaemolyticus* in density of 10⁵ cfu/ml, 10⁶ cfu/ml and 10⁷ cfu/ml.

Keywords: Probiotic, lactic acid bacteria (LAB), *Vibrio parahaemolyticus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus reuteri*, *Litopenaeus vannamei*

¹ Khoa Kỹ thuật Hóa học và Môi trường, Trường Đại học Lạc Hồng

I. MỞ ĐẦU

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 để ngăn chặn, 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 và cs, 2014; Swain và cs, 2009). Trong số vi sinh vật probiotics, các chủng vi khuẩn lactic 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 và cs, 2014). Những nghiên cứu gần đây cho thấy khi bổ sung các chủng vi khuẩn lactic vào thức ăn tôm đã hỗ trợ tăng sức đề kháng, chống lại vi khuẩn gây bệnh giúp tôm sinh trưởng khỏe mạnh (Võ Thị Thứ, 2006; Khuất Hữu Thanh, 2010; Chiu và cs, 2007). Các vi khuẩn gây bệnh trên tôm hiện nay phải kể đến là các chủng vi khuẩn *Vibrio*. Trong đó, chủng *V. parahaemolyticus* là nguyên nhân gây bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm đặc biệt ở tôm thẻ chân trắng (Vaseeharan, Ramasamy, 2003; Nguyễn Trọng Nghĩa, 2015).

Đã có một số nghiên cứu trong và ngoài nước về các chủng vi khuẩn probiotic phục vụ sản xuất probiotic cho tôm (Chiu và cs, 2007; Ariole, Nyeche, 2013; Võ Thị Thứ, 2006; Khuất Hữu Thanh, 2010). Tuy nhiên, những nghiên cứu về phân lập các chủng lactic có tiềm năng probiotic còn hạn chế trên tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*). Hơn nữa, hiện nay vẫn chưa có công trình nào công bố về phân lập vi khuẩn lactic trên tôm thẻ chân trắng 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 (báo Đồng Nai).

Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện với

mục tiêu xây dựng quy trình phân lập, tuyển chọn, định danh vi khuẩn lactic đơn giản, dễ thực hiện, không trùng lặp với các quy trình đã công bố và khảo sát hoạt tính kháng *Vibrio parahaemolyticus* từ tôm thẻ chân trắng ở Nhơn Trạch, tỉnh Đồng Nai. Trên cơ sở đó góp phần chủ động về nguồn giống sản xuất chế phẩm sinh học cho tôm, nâng cao hiệu quả nuôi tôm thẻ chân trắng.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Vật liệu

Mẫu: 60 mẫu nội tạng tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) khỏe mạnh từ 10 ao nuôi tôm ở huyện Nhơn Trạch, tỉnh Đồng Nai. Chủng vi sinh vật kiểm định *Vibrio parahaemolyticus* được 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. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Thu nhận mẫu

Mẫu được lấy ở 10 ao nuôi tôm tại Huyện Nhơn Trạch, tỉnh Đồng Nai. Lấy 500g tôm tại 5 vị trí đại diện trên 1 ao nuôi. Các mẫu được mã hóa và bảo quản ở 4°C, chuyển về phòng thí nghiệm (Trần Linh Thuốc, 2007). Mẫu tôm được rửa bằng cồn 70%, giải phẫu và thu nhận 60 mẫu nội tạng (Kongnum, Hongpattarakere, 2012). Kí hiệu mẫu lần lượt là L a b c d e. Trong đó: L: Chủng dự định phân lập; a: Số đợt lấy mẫu: I, II, III, IV, V,...; b: Loại mẫu: T (tôm); c: Ao thu mẫu: A1, A2, A3,...A10; d: Số thứ tự mẫu phân lập: 1,2,3,...; e: Số thứ tự chủng phân lập: 1,2,3,...

2.2. Phân lập

Cân chính xác 10g 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 có cải tiến). 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_3 (Khuất Hữu Thanh, 2010), ủ kỵ khí ở 37°C trong 48 giờ. Chọn các khuẩn lạc đặc trưng, có vòng phân giải CaCO_3 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 & Hongpattarakere, 2012; Nguyen, 2014; Nguyễn Lân Dũng và cs, 1976).

Định danh bằng sinh hóa: Khả năng sinh Catalase, khả năng lên men các nguồn carbohydrate, khả năng di động (Vos và cs, 2011; Trần Linh Thuộc, 2007).

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.

Hoạt tính kháng khuẩn

Hoạt tính kháng khuẩn được xác định bằng phương pháp đục lỗ (Schillinger, Lücke, 1989). Môi trường thạch NA bổ sung 15% NaCl (Kongnum & Hongpattarakere, 2012) được trải 100 μl *V. parahaemolyticus* ở mật độ 10^5 cfu/ml, sau đó tạo các lỗ thạch đường kính 10mm. Hút 100 μl phần dịch nuôi cấy của mỗi chủng vi khuẩn mục tiêu vào các lỗ thạch, ủ 37°C . Sau 24 giờ, đo đường kính vòng kháng khuẩn (ΔD). $\Delta D = D - d$ (mm) với D: đường kính vòng kháng khuẩn (mm); d: đường kính lỗ thạch (mm).

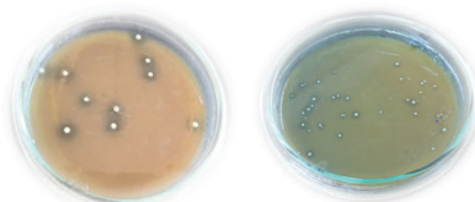
Hoạt tính kháng khuẩn theo thời gian

Nhằm ứng dụng sản xuất chế phẩm sinh học cho tôm, nên việc khảo sát khả năng kháng khuẩn của các chủng vi khuẩn tiềm năng ở các mật độ khác nhau theo thời gian được tiến hành là cần thiết. Vi sinh vật kiểm định *V. parahaemolyticus* được khảo sát ở các mật độ 10^5 cfu/ml, 10^6 cfu/ml và 10^7 cfu/ml. Quan sát và đo đường kính vòng kháng khuẩn theo thời gian (24 - 36 - 48 giờ).

III. KẾT QUẢ THẢO LUẬN

1. Phân lập

Từ 60 mẫu nội tạng tôm phân lập được 78 chủng vi khuẩn có khả năng phân giải CaCO_3 (hình 1). Trong đó, 24 chủng vi khuẩn có hình que, Gram dương; 54 chủng vi khuẩn còn lại Gram âm và Gram dương (hình cầu) bị loại bỏ. Tiến hành tăng sinh 24 chủng vi khuẩn nghi ngờ và thử nghiệm Uffelmann. Kết quả cho thấy 24 chủng vi khuẩn đều có khả năng đổi màu Uffelmann, chứng tỏ các chủng vi khuẩn đều sinh acid lactic trong quá trình nuôi cấy. Bên cạnh đó, các chủng vi khuẩn lựa chọn cũng đều có hình que, Gram dương phù hợp với các nghiên cứu đã công bố trước đây về phân lập các chủng vi khuẩn lactic (Kongnum, Hongpattarakere, 2012).



Hình 1: Các khuẩn lạc trên môi trường chọn lọc MRS có bổ sung 0,5% CaCO_3 .

Vi khuẩn lactic được phân lập từ ruột tôm có thể có nguồn gốc từ probiotics được trộn với thức ăn. Trong quá trình nuôi tôm, có thể người nông dân đã bổ sung các vi khuẩn probiotic như *Lactobacillus*, *Bacillus*... vào thức ăn. Vì thế, sự hiện diện của những vi khuẩn này trong đường tiêu hóa của tôm là hoàn toàn bình thường. Kết quả này cũng tương tự với nghiên cứu của Khuất Hữu Thanh và cs (2009), 60 dòng vi khuẩn LAB được tìm thấy trong ruột tôm.

Việc kết hợp tăng sinh mẫu trên môi trường tiên chọn lọc (MRS Broth + 50mg/l Nystatin), chọn lọc trên môi trường MRS agar + 0,5% CaCO_3 và quan sát hình thái tế bào đã giúp phân lập nhanh các chủng vi khuẩn có khả năng sinh acid. Ngoài ra, thử nghiệm khả năng chuyển màu Uffelmann ngay sau khi quan sát hình thái tế bào đặc trưng của vi khuẩn lactic giúp định tính nhanh khả năng sinh acid lactic của các chủng vi khuẩn ngay thời điểm phân lập.

Nystatin đã được Ishola và Adebayo-Tayo (2012) bổ sung vào môi trường thạch để phân lập vi khuẩn lactic. Quy trình phân lập này đã có sự cải tiến khi bổ sung Nystatin vào môi trường tiên chọn lọc, bước đầu kiểm hãm sự phát triển của nấm. Bên cạnh đó, các chủng vi khuẩn lactic được đặc trưng về khả năng sinh acid, nên việc lựa chọn môi trường trải mẫu có bổ sung CaCO_3 là thích hợp. Quy trình cải tiến này đã giúp cho việc quan sát, lựa chọn các khuẩn lạc đặc trưng và có khả năng sinh acid dễ dàng hơn. Trong quá trình phân lập, việc chọn các khuẩn lạc đặc trưng của chủng cần phân lập là một bước rất quan trọng để phân lập chính xác các chủng mục tiêu.

2. Tuyển chọn một số chủng vi khuẩn lactic có hoạt tính kháng *Vibrio parahaemolyticus*

Kết quả ở hình 2, bảng 1 cho thấy, trong 24 chủng vi khuẩn phân lập có 8 chủng không có khả năng kháng *V. parahaemolyticus*. Trong 16 chủng có khả năng kháng thì 5 chủng (LIITA1.2.2, LIITA2.1.2, LIVTA2.4.1, LIVTA2.4.3, LVIITA3.3.9) có đường kính vòng kháng *V. parahaemolyticus* cao dao động từ 5 mm - 10 mm. Các chủng này được tuyển chọn để thực hiện định danh tiếp theo. Ngoài khả năng tạo acid lactic trong quá trình phát triển, vi khuẩn lactic còn sinh ra các hợp chất có hoạt tính kháng khuẩn là tiềm năng rất quan trọng đang được khai thác trong sản xuất probiotic. Một số nghiên cứu trước đây cho thấy *V. parahaemolyticus* trong nước với mật 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, Nyeche, 2013; Nguyễn Trọng Nghĩa và cs, 2015). Trong nghiên cứu này, các chất kháng khuẩn được tạo ra bởi các chủng LAB không được xác định. Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu cho thấy rằng khả năng kháng khuẩn có thể là do sự hiện diện của acid hữu cơ như acid lactic và acid acetic (Ma và cs 2009); hydro peroxide, carbon dioxide, diacetyl và bacteriocin (Ammor và cs, 2006); cạnh tranh về chất dinh dưỡng và ngăn cản hình thành khuẩn lạc của nhiều vi khuẩn (Tambekar và cs, 2009). Những chất này có thể được tạo ra bởi các chủng LAB được phân lập và có thể ức chế

sự phát triển của *V. parahaemolyticus* gây ra bệnh hoại tử gan tụy trên tôm.

3. Định danh

• Định danh sinh hóa

Các chủng vi khuẩn LIITA1.2.2, LIITA2.1.2, LIVTA2.4.1, LIVTA2.4.3, LVIITA3.3.9 được định danh sơ bộ bằng một số thử nghiệm sinh hóa. Kết quả thử sinh hóa cho thấy cả 5 chủng đều cho Catalase âm tính, không có khả năng di động và có khả năng lên men đường (glucose, fructose, maltose, lactose, saccharose). Theo khóa phân loại vi khuẩn của Bergey, kết quả sinh hóa trên phù hợp với đặc điểm sinh hóa của vi khuẩn lactic (Vos và cs, 2011).

Qua các đặc điểm sinh hóa đặc trưng, cả 5 chủng LIITA1.2.2, LIITA2.1.2, LIVTA2.4.1, LIVTA2.4.3 và LVIITA3.3.9 đều nghi ngờ là vi khuẩn lactic. Để phân loại đến loài, 5 chủng vi khuẩn này được giải trình tự vùng 16s rRNA và so sánh trình tự trên chương trình BLAST Online của NCBI.

• Định danh phân tử

Trình tự đoạn gen mã hóa 16s rRNA của các chủng LIITA1.2.2, LIITA2.1.2, LIVTA2.4.1, LIVTA2.4.3 và LVIITA3.3.9 được tra cứu trên Genbank bằng chương trình BLAST online của NCBI.

Trong 5 chủng nghi ngờ là vi khuẩn lactic có 2 chủng là *Lactobacillus salivarius*, 2 chủng là *Lactobacillus reuteri*, 1 chủng còn lại là *Lactobacillus plantarum*. Trong kết quả định danh có xuất hiện 2 loài giống nhau *Lactobacillus salivarius* LIITA1.2.2, *Lactobacillus salivarius* LIITA2.1.2 và *Lactobacillus reuteri* LIVTA2.4.1, *Lactobacillus reuteri* LIVTA2.4.3 sẽ tiến hành lựa chọn các chủng dựa vào kết quả tuyển chọn các chủng *Lactobacillus* có khả năng kháng *V. parahaemolyticus*. Dựa vào bảng 1, đã lựa chọn ra 2 chủng có khả năng kháng *V. parahaemolyticus* cao là *Lactobacillus salivarius* LIITA1.2.2 và *Lactobacillus reuteri* LIVTA2.4.1. Tóm lại, từ các kết quả tuyển chọn và định danh trên đã lựa chọn được 3 chủng *Lactobacillus salivarius* LIITA1.2.2, *Lactobacillus reuteri* LIVTA2.4.1 và *Lactobacillus plantarum* LVIITA3.3.9 để tiến hành các khảo sát khả năng kháng khuẩn theo thời gian.

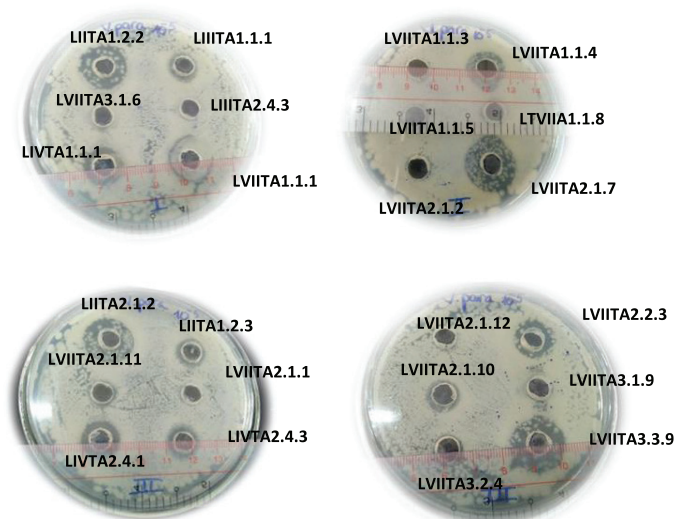
4. Khả năng kháng khuẩn theo thời gian

Đường kính vòng kháng vi sinh vật kiểm định *V. parahaemolyticus* ở mật độ 10^5 cfu/ml, 10^6 cfu/ml, 10^7 cfu/ml sau 24 giờ nuôi cấy của *L. salivarius* LIITA1.2.2, *L. plantarum* LVIITA3.3.9, *L. reuteri* LIVTA2.4.1 nằm ở khoảng từ 6 mm - 15 mm. Đường kính vòng kháng *V. parahaemolyticus* sau 36 giờ và 48 giờ nuôi cấy của 3 chủng *Lactobacillus* khảo sát với *V. parahaemolyticus* ở mật độ 10^5 cfu/ml, 10^6 cfu/ml cho thấy khả năng kháng *V. parahaemolyticus* không có sự thay đổi nhiều (bảng 2).

Tuy nhiên, trong khoảng từ 24 giờ đến 48 giờ khi mật độ vi khuẩn gây bệnh đạt 10^7 cfu/

ml, khả năng kháng *V. parahaemolyticus* của 3 chủng đã có sự thay đổi nhất định. Đường kính vòng kháng *V. parahaemolyticus* của 3 chủng phân lập hẹp dần do sự phát triển của chủng kiểm định (bảng 2). Kết quả này cũng phù hợp với những nghiên cứu về khả năng kháng *V. parahaemolyticus* của các chủng *Lactobacillus* đã công bố trước đây (Khuất Hữu Thanh và cs, 2009).

Tóm lại, từ các kết quả kháng *V. parahaemolyticus* trên cho thấy các chủng vi khuẩn lactic phân lập được có khả năng kháng vi sinh vật kiểm định *V. parahaemolyticus* ở các mật độ 10^5 cfu/ml, 10^6 cfu/ml và 10^7 cfu/ml.



Hình 2: Đường kính vòng kháng *V. parahaemolyticus* của các chủng vi khuẩn (D-d (mm)).

Lactobacillus salivarius LIITA1.2.2

CTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCTGCCTAATACATGCAAGTGAACGAACTTTCTTACACCGAATGCTTGCATTACCGTAAGAAGTTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTAAAGAAGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATATCTCTAAGGATCGCATGATCCTTAGATGAAAGATGGTTCTGCATCGCTTTAGATGGACCCGCGGCTATTAAGTGTGGTGGGTAACGGCCTACCAAGGTGATGATACGTAGCCGAACTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCTACGGGAGCGACAGTAGGGAATCTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGTCTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTAGAGAAGAACAGTAGAGTAATGTTCAATCGATGACGGTATCTAACCCAGCAAGTCACGGCTAACTACGTG

Lactobacillus reuteri LIVTA2.4.1

AGTCGTACGCACTGGCCCACTGATTGATGGTGTCTTGCACCTGATTGACGATGGATCACCAGTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGCCCGGAGCGGGGATAACATTGGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACAAAAGCCACATGGCTTTGTTTGAAAGATGGCTTTGGCTATCACTCTGGGATGGACCTGGCGGTGCTTACTAGTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGATGATGCATAGCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCCAATGGAAGTGAACACGTCATCTACCGGAGGACGACGAGTGGGAATCTCCACAATGGGCAAGCCTGATGGAGCAACACCGCTGAGTGAAGAAGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTGGAGAAGAAGCTGCGTGAGAGTAACCTGTTACCGCAGTGACGGTATCCAACAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCC

Lactobacillus plantarum LVIITA3.3.9

GAGAGTTTGATCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCTGCCTAATACATGCAAGTGAACGAACTCTGGTATTGATTGGTGTCTGCATCATGATTACATTTGAGTGAAGTGGCAACTGGTGAGTAACACGTGGGAACTGCCTGCGGAGAGCGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAATTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAGATGGCTTCGGCTATCACTTCTGGATGGTCCCGCGGCTATTAGCTAGATGTGAGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCTACGGGAGGACGAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTTGAAGAAGAATATCTGAGAGTAAGTTCAGGTATTGACGGTATTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCA

Hình 3: Trình tự đoạn gen mã hóa 16s rRNA của các chủng vi khuẩn lactic được lựa chọn.

Bảng 1: Đường kính vòng kháng *V. parahaemolyticus* của các chủng vi khuẩn lactic ($\Delta D = D-d$ (mm))

STT	Chủng	ΔD	STT	Chủng	ΔD
1	LIITA1.2.2	9,67	13	LTVIIA1.1.8	1
2	LIITA2.1.2	5	14	LVIITA2.1.2	1,67
3	LIIITA1.1.1	1,5	15	LVIITA2.1.7	0,5
4	LIITA1.2.3	4	16	LVIITA2.1.10	3,5
5	LIIITA2.4.3	1	17	LVIITA2.1.11	0
6	LIVTA1.1.1	1,5	18	LVIITA2.1.1	0
7	LIVTA2.4.1	8	19	LVIITA2.2.3	4
8	LIVTA2.4.3	6,17	20	LVIITA2.1.12	0
9	LVIITA1.1.1	0	21	LVIITA3.1.6	1
10	LVIITA1.1.3	0	22	LVIITA3.1.9	0
11	LVIITA1.1.4	0	23	LVIITA3.2.4	2
12	LVIITA1.1.5	0	24	LVIITA3.3.9	10

Bảng 2: Đường kính vòng kháng *V. parahaemolyticus* của các chủng vi khuẩn lactic theo thời gian

	<i>V. parahaemolyticus</i> (cfu/ml)	Thời gian (giờ)		
		24	36	48
<i>L. salivarius</i> LIITA1.2.2 ($\Delta D = D-d$, mm)	10^5	15,5 $\pm$ 0,1	9,5 $\pm$ 0,1	9 $\pm$ 0,1
	10^6	12 $\pm$ 0,1	8,7 $\pm$ 0,5	7 $\pm$ 0,1
	10^7	11,7 $\pm$ 0,5	7,2 $\pm$ 0,3	7,3 $\pm$ 0,5
<i>L. reuteri</i> LIVTA2.4.1 ($\Delta D = D-d$, mm)	10^5	10,8 $\pm$ 0,6	5,3 $\pm$ 0,2	4,7 $\pm$ 0,5
	10^6	7,2 $\pm$ 0,3	4,2 $\pm$ 0,1	4 $\pm$ 0,1
	10^7	6,3 $\pm$ 0,5	4 $\pm$ 0,1	3 $\pm$ 0,1
<i>L. plantarum</i> LVIITA3.3.9 ($\Delta D = D-d$, mm)	10^5	15,7 $\pm$ 0,5	12,3 $\pm$ 0,5	7,3 $\pm$ 0,5
	10^6	12,2 $\pm$ 0,3	10,3 $\pm$ 0,5	7,7 $\pm$ 0,5
	10^7	11,8 $\pm$ 0,6	8,7 $\pm$ 0,1	7,3 $\pm$ 0,5

IV. KẾT LUẬN

Ba chủng *Lactobacillus salivarius* LIITA1.2.2, *Lactobacillus reuteri* LIVTA2.4.1 và *Lactobacillus plantarum* LVIITA3.3.9 phân lập được có khả năng tiết acid lactic và kháng *V. parahaemolyticus* ở mật độ 10^5 cfu/ml, 10^6 cfu/ml và 10^7 cfu/ml.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Trường Đại học Lạc Hồng đã hỗ trợ kinh phí để chúng tôi hoàn thành nghiên cứu này (Mã đề tài: LHU-RS-TE-18-01-10).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt

1. Khuất Hữu Thanh, Nguyễn Đăng, Phúc Hải, Bùi Văn Đạt, Võ Văn Nha, 2009. Phân lập và tuyển chọn một số chủng vi khuẩn có đặc tính probiotic trong tạo chế phẩm nuôi tôm sú. Tạp chí khoa học & công nghệ các trường đại học kỹ thuật 47: 113-116.
2. Khuất Hữu Thanh, Bùi Văn Đạt, Bùi Kim Hoa, Nguyễn Thị Hoàng Mai, 2010. 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. Nhiệm vụ Khoa học và Công nghệ quốc gia. Trường Đại học quốc gia Hà Nội, Viện công nghệ sinh học và công nghệ thực phẩm.
3. Nguyễn Lâm Dũng, Đoàn Xuân Mượng, Nguyễn Phùng Tiến, Đặng Đức Trạch, Phạm Văn Ty, 1976. Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học, tập 2. Nhà xuất bản khoa học Kỹ thuật, Hà Nội.
4. Nguyễn Trọng Nghĩa, Đặng Thị Hoàng Oanh, Trương Quốc Phú và Phạm Anh Tuấn, 2015. Phân lập và xác định khả năng gây hoại tử gan tụy của vi khuẩn *Vibrio paraheamolyticus* phân lập từ tôm nuôi ở Bạc Liêu. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ 39: 99-107.
5. Trần Linh Thuốc, 2007. Phương pháp phân tích vi sinh vật trong nước, thực phẩm và môi trường. Nhà xuất bản Giáo dục, Hà Nội.
6. Võ Thị Thứ, 2006. 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.
7. <http://baodongnai.com.vn/tintuc/201601/thuc-hien-thi-diem-mo-hinh-nuoi-tom-sieu-tham-canhh-2659537/>

Tiếng Anh

8. Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E., and Chevallier, I., 2006. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 1-Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control*, 17(6): 454-461.
9. Ariole, C. N., Nyeche G. E., 2013. In vitro antimicrobial activity of *Lactobacillus* isolates against shrimp (*Penaeus monodon*) pathogens. *International Journal of Biosciences*, 3 (1): 7-12.
10. Chiu, C.H., Guu, Y.K., Pan, T.M., Cheng, W., 2007. Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. *Fish & Shellfish Immunology*, 23: 364-377.
11. Dorsey, D., Robertson, W., 2013. Recent advances in fish diseases treatment: probiotics as alternative therapy to antibiotics in aquaculture. *Eur. J. Ocean*, Mar 11: 20-28.
12. Ige, B.A. 2013. Probiotics use in intensive fish farming. *Afr. J. Microbiol. Res*, 7: 2701-2711.
13. Ishola, R.O., Adebayo Tayo, B.C., 2012. Screening lactic acid bacteria isolated from Fermented food for Bio-molecules production. *Aust. J. Tech*, 15(4): 205-217.
14. Kongnum, K., Hongpattarakere, T., 2012. 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 and Shellfish Immunology*, 32: 170-177.
15. Ma, C.W., Cho, Y.S., and Oh, K.H., 2009. Removal of pathogenic bacteria and nitrogens by *Lactobacillus* spp. JK-8 and JK-11. *Aquaculture*, 287: 266-270.
16. Maeda, M., Shibata, A., Biswas, G., Korenaga, H., Kono, T., Itami, T., Sakai, M., 2014. Isolation of lactic acid bacteria from kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) intestine and assessment of immunomodulatory role of a selected strain as probiotic. *Biotechnol*, 16: 181-192.

17. Nguyen, P.M., 2014. Isolation, identification and characterization of *Lactobacillus* on black tiger shrimp. *International Journal of Multidisciplinary Research and Development*, 6: 153-158.
18. Reyes-Becerril, M., Ascencio, F., Gracia-Lopez, V., Macias, M.E., Roa, M.C., Esteban, M.A., 2014. 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: 1169-1180.
19. Schillinger, U., Lücke, F. K., 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sakei* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 55: 1901-1906.
20. Swain, S.M., Singh, C., Arul, V., 2009. Inhibitory activity of probiotics *Streptococcus phocae* PI80 and *Enterococcus faecium* MC13 against Vibriosis in shrimp *Penaeus monodon*. *World J. Microbiol. Biotechnol* 25:697-703.
21. Tambekar, D.H., Bhutada, S.A., Choudhary, S.D., and Khond, M.D., 2009. Assessment of potential probiotic bacteria isolated from milk of domestic animals. *Journal of applied biosciences*, 15: 815-819.
22. Vaseeharan, B., Ramasamy, P., 2003. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Letters in Applied Microbiology*, 36: 83-87.
23. Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., , W., Rainey, F.A., Schleifer, K.H., Whitman, W., 2011. *Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology*, Second Edition, Volume Three, The Firmicutes: 465-512.