Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ
Số chuyên đề: Nông nghiệp bền vững vì an ninh lương thực và an toàn thực phẩm
ISSN 1859-2333 | e-ISSN 2815-5599

DOI:10.22144/ctujos.2025.217

TUYỂN CHỌN VI KHUẨN LACTIC TỪ TÔM THẺ CHÂN TRẮNG CÓ TIỀM NĂNG SINH BACTERIOCIN ỨC CHẾ *Escherichia coli* VÀ *Staphylococcus aureus*

Huỳnh Ngọc Thanh Tâm[1*], Trần Hữu Hậu[1], Trần Văn Bé Năm[1] và Nguyễn Thị Như Hạ[2]
[1]*Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Đại học Cần Thơ, Việt Nam*
[2]*Trường Thủy sản, Đại học Cần Thơ, Việt Nam*
**Tác giả liên hệ (Corresponding author): hnttam@ctu.edu.vn*

Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received): 15/06/2025
Sửa bài (Revised): 30/06/2025
Duyệt đăng (Accepted): 03/10/2025

Title: *Selection of Lactic Acid Bacteria from Whiteleg Shrimp with Potential Bacteriocin Production Against Escherichia coli and Staphylococcus aureus*

Author: *Huynh Ngoc Thanh Tam[1*], Tran Huu Hau[1], Tran Van Be Nam[1] and Nguyen Thi Nhu Ha[2]*

Affiliation(s): *[1]Institute of Food and Biotechnology, Can Tho University, Viet Nam; [2]College of Aquaculture and Fisheries, Can Tho University, Viet Nam*

TÓM TẮT

Hiện nay, bacteriocin được tổng hợp từ vi khuẩn lactic là hướng đi tiềm năng thay thế kháng sinh trong nuôi trồng thủy sản và chất bảo quản trong thực phẩm. Trong nghiên cứu, các chủng vi khuẩn lactic có khả năng sinh bacteriocin được tuyển chọn bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch nhằm ức chế sự phát triển của Escherichia coli và Staphylococcus aureus được phân lập từ tôm thẻ chân trắng (Litopenaeus vannamei). Tổng cộng 21 chủng vi khuẩn lactic đã được phân lập từ các trại nuôi tôm tại tỉnh Kiên Giang, trong đó 9 chủng thể hiện khả năng sinh bacteriocin ức chế cả hai loại vi khuẩn E. coli (Gram âm) và S. aureus (Gram dương), với đường kính vòng ức chế từ 4,0 đến 9,7 mm. Đáng chú ý, chủng VT3 cho thấy hoạt tính kháng khuẩn mạnh nhất và có độ tương đồng trình tự gen 16S rRNA đến 99,4% so với Weissella cibaria. Khả năng phát triển và sinh tổng hợp bacteriocin của chủng VT3 cao nhất khi được nuôi cấy trong môi trường MRS bổ sung 2% yeast extract, với hoạt tính kháng khuẩn 160 AU/mL và sinh khối 1,45 g/100 mL.

Từ khoá: *Bacteriocin, kháng khuẩn, vi khuẩn lactic, Weissella cibaria*

ABSTRACT

Currently, bacteriocins produced by lactic acid bacteria are being considered as a potential alternative to antibiotics in aquaculture and preservatives in food. This research was conducted to select lactic acid bacteria strains capable of producing bacteriocin by agar well diffusion method to inhibit the growth of Escherichia coli and Staphylococcus aureus, isolated from whiteleg shrimp (Litopenaeus vannamei). A total of 21 lactic acid bacteria strains were isolated from shrimp farms in Kien Giang province. Among them, 9 strains showed the ability to produce bacteriocin that inhibited both E. coli (Gram-negative) and S. aureus (Gram-positive) bacteria, with inhibition zone diameters ranging from 4.0 to 9.7 mm. Notably, strain VT3 exhibited the strongest antibacterial activity and had a 99.4% sequence similarity to Weissella cibaria based on the 16S rRNA gene. The growth and bacteriocin production of strain VT3 were highest when cultured in MRS medium supplemented with 2% yeast extract, with antibacterial activity reaching 160 AU/mL and biomass production of 1.45 g/100 mL.

Keywords: *Antibacteria, bacteriocin, lactic acid bacteria, Weissella cibaria*

1. GIỚI THIỆU

Vi khuẩn lactic (*Lactic Acid Bacteria* – LAB) là một nhóm vi sinh vật Gram dương, không sinh bào tử, có hình dạng cầu hoặc que và có khả năng lên men carbohydrate để tạo thành acid lactic. Nhóm LAB bao gồm nhiều chi khác nhau như *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* và *Weissella* (Axelsson et al., 2004). Dựa vào quá trình chuyển hóa đường, LAB được phân thành hai nhóm chính: lên men đồng hình và dị hình. Trong đó, nhóm đồng hình chỉ tạo acid lactic, trong khi nhóm dị hình tạo acid lactic cùng với các sản phẩm phụ như acid acetic, ethanol hoặc CO_2 (Bustos et al., 2005). Ngoài ra, một số chủng LAB còn có khả năng tổng hợp các hợp chất có hoạt tính sinh học như hydrogen peroxidase, diacetyl và đặc biệt là bacteriocin (Kanagaraj et al., 2015).

LAB có khả năng tạo ra các sản phẩm chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính sinh học. Trong số đó, bacteriocin (peptide hoặc protein) được biết đến với hoạt tính kháng khuẩn mạnh và đã được quan tâm nghiên cứu. *Lactococcus lactis* có khả năng sản xuất nisin và đã được sử dụng rộng rãi trong bảo quản thực phẩm. Kết quả nghiên cứu của Al-Juboory et al. (2023) cho thấy, nisin tinh sạch khi được bổ sung vào sản phẩm thịt đã cho thấy hiệu quả bảo quản, trong đó nồng độ 100% đạt hiệu quả tối ưu nhất, với số lượng vi sinh vật giảm rõ rệt trong vòng 7 ngày bảo quản. Bên cạnh đó, *Pediococcus acidilactici* ST3522BG và *P. pentosaceus* ST3633BG được ghi nhận là những chủng có khả năng sản xuất bacteriocin pediocin PA-1, có tính đặc hiệu cao trong việc ức chế sự phát triển của các chủng *Listeria* và *Enterococcus* kháng vancomycin. Đồng thời, cả hai chủng này còn thể hiện khả năng sinh các chất chuyển hóa chống nấm hiệu quả, có tiềm năng ứng dụng trong kiểm soát các loài nấm sinh độc tố (Fugaban et al., 2022). Một loài LAB dị hình khác, *Weissella cibaria*, cũng được ghi nhận có khả năng kháng lại các vi khuẩn gây bệnh như *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* và *Streptococcus mutans*, cũng như khả năng ức chế sự hình thành màng sinh học (Björkroth et al., 2002; Kang et al., 2023).

Tại Việt Nam, nhiều nghiên cứu đã ghi nhận tiềm năng ứng dụng của các chủng *Lactobacillus* trong nuôi trồng thủy sản. Huynh et al. (2020) đã phân lập các chủng *Lactobacillus* từ ruột tôm thẻ chân trắng với khả năng ức chế *Vibrio parahaemolyticus* và sinh các enzyme ngoại bào như protease và amylase. Ngoài ra, việc bổ sung *L. plantarum* (dạng bất hoạt) vào khẩu phần ăn đã giúp cải thiện sức đề kháng và tăng trưởng ở tôm thẻ chân trắng (Pham et al., 2017). Tương tự, *L. plantarum* cũng cho thấy hiệu quả tích cực trong việc nâng cao miễn dịch và giảm tỷ lệ chết ở cá tra sau khi thử thách với *Edwardsiella ictaluri* (Bui et al., 2022).

Hiện nay, nhu cầu giảm thiểu sử dụng kháng sinh trong nuôi trồng thủy sản và các chất bảo quản hóa học trong thực phẩm ngày càng tăng cao. Vì vậy, việc khai thác và ứng dụng các chủng LAB có khả năng thích ứng tốt với môi trường và sản xuất bacteriocin tự nhiên là một hướng ứng dụng có nhiều tiềm năng. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm tuyển chọn các chủng vi khuẩn lactic (LAB) có khả năng sinh bacteriocin từ ruột tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*), làm cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo về tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy, tinh sạch và phát triển sản phẩm bacteriocin ứng dụng trong phòng ngừa bệnh và nâng cao hiệu quả sản xuất trong nuôi trồng thủy sản.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu và hóa chất

Mẫu tôm thẻ chân trắng có kích thước trung bình khoảng 10 cm (40 con/kg) được thu tại 4 huyện An Minh (AM), U Minh Thượng (UM), An Biên (AB) và Vĩnh Thuận (VT) tỉnh Kiên Giang. Mỗi địa điểm thu 10 con và được bảo quản trong thùng chứa mẫu ở nhiệt độ 4 - 10°C và vận chuyển về phòng thí nghiệm.

Vi khuẩn *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 và *Escherichia coli* ATCC 25922 được lưu trữ tại Bộ môn Công nghệ sinh học Vi sinh vật, Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Đại học Cần Thơ.

Môi trường MRS (De Man, Rogosa và Sharpe, Himedia, Ấn Độ), tryptone (Himedia, Ấn Độ), yeast extract (Himedia, Ấn Độ), NaCl (Merck, Đức), glucose (Xilong, Trung Quốc), bộ nhuộm Gram (Nam Khoa, Việt Nam), thuốc thử catalase (Xilong, Trung Quốc,), oxidase (Nam Khoa, Việt Nam) và indole (Merck, Đức).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập và nhận diện chủng vi khuẩn lactic

Xử lý mẫu: Sau khi vận chuyển về phòng thí nghiệm, tôm được rửa sạch bằng nước và khử trùng bên ngoài bằng ethanol 70%. Tách lấy hệ tiêu hóa (gan tụy và ruột) cho vào bình tam giác và đồng nhất mẫu bằng máy nghiền mẫu (Retsch, Đức). Sau đó, sinh lượng vi sinh vật trong mẫu được tăng bằng môi

trường MRS lỏng với tỉ lệ 1:9 (w/v), ủ trong điều kiện kỵ khí bằng cách đậy kín nắp ống nghiệm và để yên ở 37°C, 48 giờ.

Tiến hành phân lập: Mẫu sau khi tăng sinh được pha loãng trong nước muối sinh lý 0,85% đến 10^{-5}. Mẫu được trải 100 µL trên môi trường thạch MRS và ủ ở 37°C. Sau thời gian ủ 48 giờ, các khuẩn lạc điển hình của vi khuẩn lactic (màu trắng sữa hoặc vàng nhạt, bề mặt nhẵn và hơi lồi ở trung tâm) được lựa chọn để tiến hành cấy chuyển tiếp trên môi trường thạch MRS cùng loại (Tian et al., 2024). Quá trình cấy chuyển được lặp lại nhiều lần cho đến độ thuần vi khuẩn được xác định.

2.2.2. Kiểm tra hình thái khuẩn lạc và sinh hóa

Hình thái khuẩn lạc trên môi trường MRS được quan sát dưới kính hiển vi soi nổi (Carl Zeiss, Đức). Hình thái tế bào được quan sát dưới kính hiển vi quang học (Primo Star iLed, Carl Zeiss, Đức) ở độ phóng đại x1000 sau khi nhuộm Gram. Các đặc điểm sinh hóa được kiểm tra bao gồm: phản ứng nhuộm Gram (đặc điểm vách tế bào), các enzym oxy hóa-khử như catalase và oxidase, khả năng phân giải cơ chất như $CaCO_3$ và gelatin, cùng với khả năng hình thành indole được thực hiện theo phương pháp của Kandler et al. (1986).

2.2.3. Xác định khả năng ức chế vi khuẩn

Chuẩn bị dịch nuôi lỏng không tế bào: Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy kỵ khí trong môi trường MRS lỏng ở 37°C trong 48 giờ. Dịch nuôi cấy sau đó được ly tâm ở 13.000 vòng/phút trong 10 phút ở 5°C và để thu phần dịch nổi. Sau đó, phần dịch nổi được điều chỉnh pH về 6,5 bằng dung dịch NaOH 1M. Dung dịch này có khả năng chứa bacteriocin được tiết ra bởi vi khuẩn trong quá trình nuôi cấy.

Khả năng ức chế vi khuẩn *E. coli* và *S. aureus* được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán qua giếng thạch trên môi trường NA. Vi khuẩn được nuôi cấy qua đêm và đạt mật số 10^6 CFU/mL, trải 100 µL dịch huyền phù vi khuẩn trên môi trường NA. Sau đó, các giếng với đường kính 5 mm được tạo ra và bơm 50 µL dung nuôi lỏng không tế bào vào các giếng, sử dụng ampicillin (0,1 mg/mL) làm đối chứng dương. Các đĩa được ủ mẫu ở 37°C, sau 48 giờ xác định đường kính vòng vô khuẩn (ĐKVVK).

$$ĐKVVK = D – 5 \text{ mm}.$$

Trong đó: D là đường kính vòng vô khuẩn thực tế đo được (bao gồm cả giếng thạch) và 5 mm là đường kính giếng thạch.

2.2.4. Định danh vi khuẩn đã tuyển chọn

Chủng vi khuẩn có khả năng sinh bacteriocin và thể hiện hoạt tính kháng khuẩn mạnh nhất đối với vi khuẩn chỉ thị được lựa chọn để định danh đến mức loài bằng phương pháp sinh học phân tử, kết hợp với quan sát đặc điểm hình thái và các thử nghiệm sinh hóa. Vùng trình tự gen 16S ribosomal RNA được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC-3') và 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACT-3') (Ren et al., 2015) và giải trình tự tại công ty Genlab (địa chỉ: 112 Trung Kính, P. Yên Hòa Q. Cầu Giấy, Hà Nội). Kết quả giải trình tự được kiểm tra bằng phần mềm Bioedit. Trình tự DNA được so sánh với cơ sở dữ liệu của ngân hàng gen thông qua công cụ BLASTN (NCBI).

2.2.5. Khảo sát ảnh hưởng môi trường nuôi cấy đến khả năng ức chế vi khuẩn

Vi khuẩn được nuôi trong môi trường MRS có bổ sung 3 thành phần khác nhau (yeast extract, glucose hoặc NaCl), mỗi thành phần được khảo sát ở ba mức nồng độ (1, 2, 3% w/v). Sau 48 giờ tiến hành thu nhận và xác định hoạt tính của bacteriocin trong môi trường nuôi cấy. Hoạt tính bacteriocin được xác định bằng phương pháp pha loãng và tính theo công thức (Daba et al., 1991):

$$\text{Hoạt tính bacteriocin (Au/mL)} = (1000/V) \times D$$

Trong đó: D là độ pha loãng cao nhất có vòng vô khuẩn (đường kính lớn hơn 2 mm), V là thể tích bacteriocin (µL).

2.2.6. Phương pháp xử lý số liệu

Tất cả thí nghiệm được lặp lại 3 lần và số liệu được thu thập bằng phần mềm Microsoft Excel (2013). Số liệu thí nghiệm được phân tích ANOVA một nhân tố ($p < 0,05$) bằng phần mềm Minitab 16.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Vi khuẩn phân lập từ hệ tiêu hóa tôm thẻ chân trắng

Phân lập được 21 chủng vi khuẩn trên môi trường MRS từ các mẫu tôm tại 4 huyện thuộc tỉnh Kiên Giang (Bảng 1, Hình 1). Trong đó, 10 chủng phân lập (chiếm 47%) ở huyện U Minh Thượng (UM1, UM2, UM3, UM4, UM5, UM6, UM7, UM8, UM9, UM10), 6 chủng (chiếm 28%) ở huyện An Minh (AM1. AM2, AM3, AM4, AM5, AM6), 2 chủng (chiếm 9%) ở huyện An Biên (AB1, AB2) và 3 chủng (chiếm 14%) ở huyện Vĩnh Thuận (VT1, VT2, VT3).

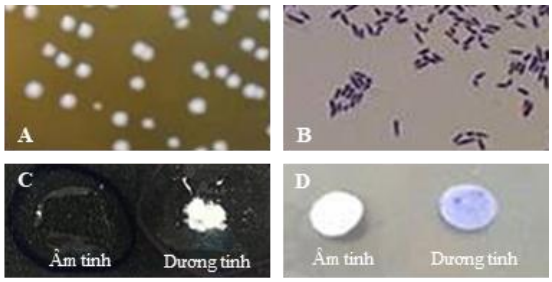
Bảng 1. Đặc điểm sinh học của các chủng vi khuẩn phân lập

Chủng vi khuẩn	Khuẩn lạc				Tế bào		Sinh hóa						
	Hình dạng	Màu sắc	Dạng bìa	Độ nổi	Kích thước (mm)	Hình dạng	Di động	Gram	Catalase	Oxidase	$CaCO_3$	Gelatinase	Indole
AM1	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Nhô cao	2,0	Que ngắn, kết đôi	-	+	-	-	+	-	-
AM2	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Nhô cao	2,0	Que dài	-	+	-	-	+	-	-
AM3	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Lài	3,0	Que ngắn	-	+	-	-	+	-	-
AM4	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Nhô cao	2,0	Que ngắn, kết chuỗi	-	+	-	-	+	-	-
AM5	Tròn	Trắng trong	Nguyên	Nhô cao	1,0	Que ngắn	-	+	-	-	+	-	-
AM6	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Nhô cao	1,5	Que ngắn	-	+	-	-	+	-	-
UM1	Tròn	Trắng trong	Nguyên	Nhô cao	1,0	Que ngắn	-	+	-	-	+	-	-
UM2	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Lài	2,0	Que ngắn, kết chuỗi	-	+	-	-	+	-	-
UM3	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Nhô cao	1,5	Que ngắn, kết chuỗi	-	+	-	-	+	-	-
UM4	Tròn	Trắng trong	Nguyên	Nhô cao	1,5	Que ngắn, kết đôi	-	+	-	-	+	-	-
UM5	Tròn	Trắng trong	Nguyên	Nhô cao	2,5	Que ngắn	-	+	-	-	+	-	-
UM6	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Nhô cao	1,0	Que ngắn	-	+	-	-	+	-	-
UM7	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Lài	2,0	Que ngắn	-	+	-	-	+	-	-
UM8	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Nhô cao	2,0	Que ngắn, kết chuỗi	-	+	-	-	+	-	-
UM9	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Nhô cao	2,0	Que ngắn, kết đôi	-	+	-	-	+	-	-
UM10	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Nhô cao	1,5	Que ngắn, kết chuỗi	-	+	-	-	+	-	-
AB1	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Lài	1,5	Que dài	-	+	-	-	+	-	-
AB2	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Nhô cao	1,0	Que ngắn	-	+	-	-	+	-	-
VT1	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Nhô cao	2,0	Que ngắn	-	+	-	-	+	-	-
VT2	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Nhô cao	2,0	Que ngắn	-	+	-	-	+	-	-
VT3	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Nhô cao	1,5	Que ngắn, kết chuỗi	-	+	-	-	+	-	-

Ghi chú: (-) âm tính, (+) dương tính; hình thái khuẩn lạc được quan sát trên môi trường MRS sau 24 giờ.

Sau 48 giờ nuôi cấy trên môi trường MRS, khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn đều có dạng hình tròn, bề mặt láng, bìa nguyên. Trong đó, 17 chủng có khuẩn lạc màu trắng đục, nổi nhô cao (80%) và 4 chủng có khuẩn lạc màu trắng trong, nổi lài (20%).

Về hình thái tế bào: Có 9 chủng vi khuẩn được ghi nhận có tế bào hình que ngắn (42%), 3 chủng dạng que dài (15%), 3 chủng dạng que ngắn kết đôi (15%) và 6 chủng dạng que ngắn kết chuỗi (28%). Tất cả các chủng vi khuẩn (100%) đều có phản ứng Gram dương, khả năng phân giải $CaCO_3$, âm tính với catalase và oxidase, không dịch hóa gelatin và không tạo indole.



Hình 1. Hình thái và sinh hóa của vi khuẩn

Hình thái khuẩn lạc, (B) hình thái tế bào, (C) catalasse, (D) oxidase

Chủng vi khuẩn Gram dương được phân lập trên môi trường thạch MRS có bổ sung 1,5% $CaCO_3$. Quá trình phát triển của vi khuẩn dẫn đến sự sản sinh các acid hữu cơ, gây hiện tượng hòa tan $CaCO_3$ xung quanh khuẩn lạc. Hình thái khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn lactic trên môi trường MRS được Angadi et al. (2021) mô tả như sau trên môi trường MRS chủng Lactobacillus sp. Lb1 tạo khuẩn lạc có bề mặt nhẵn, bìa nguyên, màu trắng kem; tế bào dạng trực khuẩn, đầu tròn, sắp xếp đơn lẻ hoặc theo chuỗi. Trong khi đó, Weissella sp. W3 hình thành khuẩn lạc tròn, nhô cao, màu trắng hoặc trắng kem; tế bào có dạng ellipsoid với đầu thuôn nhọn, thường phân bố thành cặp hoặc chuỗi. Những đặc điểm này cũng được quan sát trong nghiên cứu hiện tại, cho thấy sự tương đồng về hình thái giữa các chủng phân lập và các chủng đã được công bố. Bên cạnh đó, các nghiên cứu trước như của Ngo et al. (2011), Nguyen & Nguyen (2012) và Goa et al. (2022), sự hiện diện của vi khuẩn lactic từ nhiều nguồn khác nhau như thực phẩm lên men truyền thống, hệ tiêu hóa cá rô phi và sữa bò lên men tự nhiên cũng đã được ghi nhận. Các loài phổ biến bao gồm L. acidophilus, L. suntoryeus, L. lactis subsp. lactis, Lactiplantibacillus plantarum, Limosilactobacillus fermentum và Leuconostoc lactis, điều này phản ánh sự phân bố rộng rãi và vai trò sinh học quan trọng của vi khuẩn lactic trong nhiều hệ sinh thái vi sinh vật.

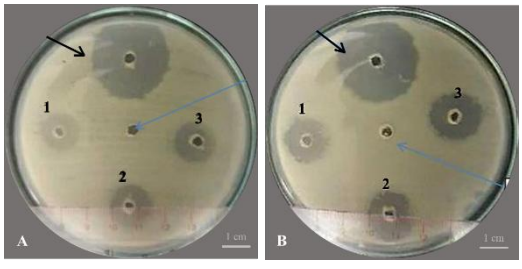
3.2. Khả năng ức chế *E. coli* và *S. aureus*

Dịch chiết bacteriocin thô từ các chủng vi khuẩn lactic (LAB) cho thấy hiệu quả ức chế đáng kể đối với cả *E. coli* và *S. aureus*, được đánh giá thông qua đường kính vòng vô khuẩn (Hình 2).

Đối với *E. coli*, hoạt tính kháng khuẩn dao động từ 5,333 mm đến 19,333 mm. Trong đó, ba chủng AB2, AM4 và VT3 thể hiện khả năng ức chế mạnh nhất, trong khi chủng UM5 cho thấy hiệu quả thấp nhất (5,333 mm). Ở *S. aureus*, có 9 trong số 21 chủng (AM3, AM4, UM6, UM7, UM9, UM10, AB1, VT2 và VT3) cho thấy khả năng kháng khuẩn, với đường kính vòng vô khuẩn từ 4,0 mm đến 9,667 mm. Chủng VT3 ghi nhận mức độ ức chế cao nhất trong nhóm này.

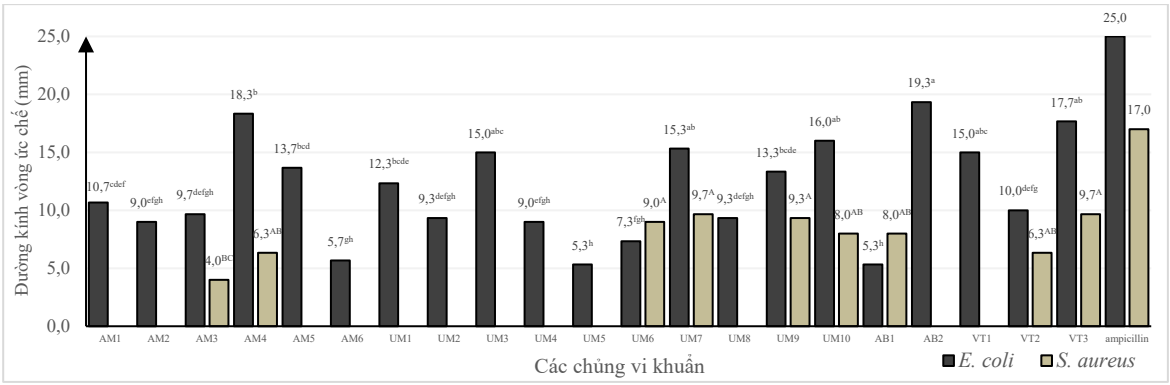
Kết quả ở các nghiên cứu trước đây đã cho thấy LAB có khả năng tổng hợp các protein kháng khuẩn hiệu quả, đặc biệt là các bacteriocin (Verschuere et al., 2000). Ngoài ra, dịch chiết thô từ các chủng LAB cũng được ghi nhận có hoạt tính ức chế nhiều vi sinh vật gây hại, bao gồm cả các tác nhân kháng kháng sinh (Rossland et al., 2005; Imade et al., 2021). Những phát hiện này gợi ý rằng bacteriocin từ LAB có tiềm năng ứng dụng như các tác nhân probiotic, góp phần kiểm soát sự phát triển của vi khuẩn gây bệnh.

Dựa trên kết quả hoạt tính kháng khuẩn, chủng VT3 được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo do thể hiện khả năng ức chế mạnh cả *E. coli* và *S. aureus*.



Hình 2. Khả năng ức chế vi khuẩn

Chú thích: (A) vi khuẩn E. Coli, (B) vi khuẩn S. aureus, (1,2,3) các lần lặp lại, (↑đen) ampicillin, (↑ xanh) môi trường



Hình 3. Khả năng ức chế vi khuẩn *Escherichia coli* và *Staphylococcus aureus* của bacteriocin

Ghi chú: Các giá trị trung bình có ký hiệu chữ cái khác nhau (theo sau) cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% theo phép thử Tukey.

3.3. Dinh dưỡng ảnh hưởng đến hình thành bacteriocin của vi khuẩn VT3

Thành phần dinh dưỡng ảnh hưởng đáng kể đến khả năng sinh bacteriocin của chủng VT3 trong việc ức chế *E. coli* (Bảng 2). Ở môi trường MRS đối chứng, sinh khối đạt 0,99 g/100 mL, đường kính vòng vô khuẩn 7,00 mm và hoạt tính bacteriocin là 80 AU/mL.

Việc khảo sát bổ sung glucose (1 - 3%) vào môi trường không làm tăng sinh khối và không cải thiện hoạt tính kháng khuẩn. Tương tự, việc bổ sung NaCl ở nồng độ 1 - 2% cũng không mang lại hiệu quả rõ rệt, với sinh khối dao động từ 0,83 đến 0,99 g/100 mL. Khi nồng độ NaCl vượt quá 2%, hoạt tính bacteriocin giảm rõ rệt, có thể do áp suất thẩm thấu cao gây ức chế sự phát triển tế bào và tổng hợp protein. Khi nồng độ NaCl tăng lên 3%, sinh khối và khả năng ức chế vi khuẩn giảm rõ rệt so với môi trường đối chứng, với sinh khối chỉ đạt 0,83 g/100 mL và đường kính vòng vô khuẩn giảm còn 3 mm so với 7 mm. Do đó, việc kiểm soát hàm lượng muối trong môi trường nuôi cấy là yếu tố quan trọng cần được cân nhắc trong quá trình tối ưu hóa điều kiện lên men nhằm nâng cao hiệu suất sản xuất bacteriocin.

Ngược lại, việc bổ sung yeast extract cho thấy hiệu quả tích cực rõ rệt. Ở nồng độ 3%, sinh khối tăng lên 1,68 g/100 mL, đường kính vòng vô khuẩn đạt 11,7 mm và hoạt tính bacteriocin tăng gấp đôi, đạt 160 AU/mL. Yeast extract được xem là nguồn cung cấp các hợp chất giàu nitơ, vitamin và yếu tố tăng trưởng thiết yếu, từ đó thúc đẩy quá trình sinh trưởng và tổng hợp bacteriocin. Các nghiên cứu trước đây cũng ghi nhận xu hướng tương tự, Nguyen and Nguyen (2012) với chủng *L. suntoryeus* LH5 và Khoa (2014) với chủng *Lactobacillus* sp. Tre-1 đều cho thấy sự gia tăng hoạt tính bacteriocin khi bổ sung 3% (w/v) yeast extract vào môi trường MRS.

Bảng 2. Khả năng kháng khuẩn và hoạt tính bacteriocin

Môi trường	Tỉ lệ (%)	Sinh khối (g/100mL)	pH	ĐKVVK (mm)	Hoạt tính (AU/mL)
MRS broth	0	0,99^{d}	4,90^{a}	7,00^{b}	80
	1	0,98^{d}	4,89^{a}	3,70^{bc}	40
MRS+glucose	2	0,95^{d}	5,04^{a}	6,33^{bc}	80
	3	0,95^{d}	5,13^{a}	6,30^{bc}	80
	1	0,92^{de}	4,86^{a}	6,00^{bc}	80
MRS+NaCl	2	0,83^{de}	4,86^{a}	4,33^{bc}	40
	3	0,78^{e}	4,93^{a}	3,00^{c}	40
	1	1,27^{c}	4,82^{a}	6,00^{b}	80
MRS+Yeast extract	2	1,45^{b}	4,83^{a}	10,3^{a}	160
	3	1,68^{a}	4,87^{a}	11,7^{a}	160

Ghi chú: Các giá trị trung bình trong cùng 1 cột có ký hiệu chữ cái khác nhau (theo sau) cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% theo phép thử Tukey.

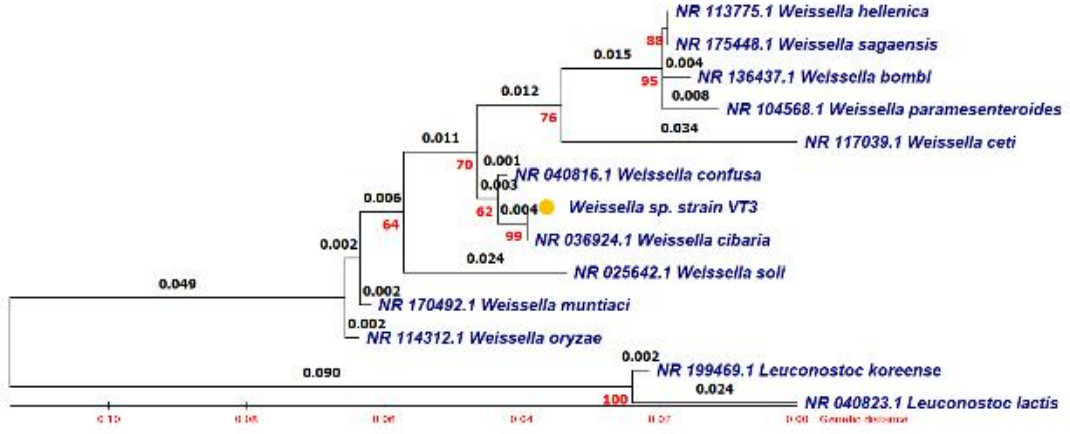
3.4. Định danh chủng VT3

Trình tự gen 16S rRNA của chủng vi khuẩn VT3 sau khi hiệu chỉnh chiều dài 1325 bp. Khi đối chiếu với dữ liệu của Ngân hàng gen NCBI, mức độ tương đồng di truyền với *Weissella cibaria* (NR_036924.1) được ghi nhận là 99,4% (Bảng 3). Bên cạnh đó, các đặc điểm hình thái học (Bảng 1) và các phản ứng sinh hóa của chủng VT3 cũng tương đồng với mô tả về *W. cibaria* được ghi nhận trong nghiên cứu của Sanni et al. (1999). **Kết quả p**hân tích giản đồ phả hệ từ gen 16S rRNA cho thấy chủng VT3 nằm cùng nhánh với *Weissella cibaria* và có độ tương đồng 99,6 % (mã gen NR 036924.1) (Hình 4). Kết hợp với giá trị bootstrap 99 %, dữ liệu này ủng hộ mạnh mẽ việc định danh sơ bộ VT3 là *Weissella cibaria*.

Bảng 3. Độ tương đồng của trình tự vùng gen 16S của vi khuẩn VT3 với cơ sở dữ liệu NCBI

Vi khuẩn	Độ phủ (%)	Độ tương đồng (%)	Mã gen
Weissella cibaria	100	99,40	NR_036924.1
Weissella confusa	100	98,87	NR_040816.1
Weissella muntiaci	100	97,15	NR_170492.1
Weissella oryzae	100	96,85	NR_114312.1
Weissella sagaensis	100	96,25	NR_175448.1

W. cibaria đã được khai thác rộng rãi như một probiotic đường miệng: chủng CMU làm giảm halitosis, ức chế *Streptococcus mutans* và giảm viêm nha chu trong thử nghiệm lâm sàng (Han et al., 2023; Kim et al., 2020). Ngoài ra, loài này còn sinh tổng hợp exopolysaccharide (EPS) bền nhiệt giúp cải thiện cấu trúc thực phẩm lên men và thể hiện hoạt tính chống oxy hóa, kháng viêm (Li et al., 2022; Nguyen et al., 2024). Mối quan hệ di truyền gần gũi giữa chủng VT3 và *W. cibaria* mở ra tiềm năng ứng dụng trong sản phẩm probiotic và công nghệ lên men thực phẩm. Mặt khác, chủng VT3 và *W. cibaria* cũng có đặc điểm di truyền gần với *W. confusa* (bootstrap 62 %). Loài vi khuẩn này dù có khả năng sản xuất EPS cao cũng đã được ghi nhận gây nhiễm trùng huyết kháng vancomycin ở người (Azim et al., 2023). Do đó, thông tin về quan hệ di truyền cho thấy tầm quan trọng của việc đánh giá tính an toàn của chủng VT3 trong quá trình khai thác, ứng dụng.



Hình 4. Mối quan hệ phát sinh chủng loại giữa chủng vi khuẩn VT3 và các loài *Weissella* dựa trên trình tự gen 16S rRNA

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu, việc phân lập được 21 chủng vi khuẩn lactic từ tôm thẻ chân trắng có khả năng ức chế *Escherichia coli* và *Staphylococcus aureus* đã được thực hiện. Trong số các chủng được phân lập, chủng VT3 được định danh là *Weissella cibaria* đã thể hiện tiềm năng nổi bật nhờ khả năng sinh trưởng mạnh mẽ trong môi trường MRS bổ sung yeast extract, cùng với hoạt tính kháng khuẩn cao. Kết quả nghiên cứu cho thấy việc bổ sung yeast extract ở nồng độ từ 2 đến 3% có thể làm gia tăng đáng kể hoạt tính của bacteriocin. Điều này khẳng định tiềm năng ứng dụng của chủng *Weissella cibaria* VT3 trong nuôi trồng thủy sản và công nghiệp chế biến thực phẩm theo định hướng an toàn và phát triển bền vững.

TÀI LIỆU THAM KHẢO (REFERENCES)

Al-Juboory, Y. H. O., Al-Dulaimi, D. A. R. A., & Mahmood, A. E. (2023). Extraction and purification nisin from *Lactobacillus* lactis and determine the optimal conditions for its production and evaluation its effectiveness in food preservation. *In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, *1262*(6), 062032. https://doi.org/10.1088/1755-1315/1262/6/062032

Angadi, V., Ramkumar, C., Hiremath, J. P., & Prabha, R. (2021). Phenotypic identification of lactic isolates obtained from fermented Idli batter. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, *10*(3), 1718–1724. https://doi.org/10.20546/ijcmas.2021.1003.214

Axelsson, L. (2004). Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In S. Salminen, A. von Wright, & A. Ouwehand (Eds.), *Lactic acid bacteria: Microbiological and Functional aspects.* Marcel Dekker, 1–66. https://doi.org/10.1201/9780824752033.ch1

Azim, A., Singh, N., Venkatesh, V., Verma, S., Agarwal, A., & Singh Sr, N. (2023). *Weissella confusa* causing vancomycin-resistant septicemia infection in a pediatric patient: A case report from a university teaching hospital in North India. *Cureus*, *15*(4), e38292. https://doi.org/10.7759/cureus.3829

Björkroth, K. J., Schillinger, U., Geisen, R., Weiss, N., Hoste, B., Holzapfel, W. H., ... & Vandamme, P. (2002). Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov., detected in food and clinical samples. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *52*(1), 141-148. https://doi.org/10.1099/00207713-52-1-141

Bui, T. B. H., Balami, S., & Nguyen, T. P. (2022). Effect of *Lactobacillus plantarum* on growth performance, immune responses, and disease resistance of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation*, *15*(1), 174-187.

Bustos, G., Moldes, A. B., Cruz, J. M., & Dominguez, J. M. (2005). Influence of the metabolism pathway on lactic acid production from hemicellulosic trimming vine shoots hydrolyzates using *Lactobacillus pentosus*. *Biotechnology Progress*, *21*(3), 793-798. https://doi.org/10.1021/bp049603v

Daba, H., Pandian, S., Gosselin, J. F., Simard, R. E., Huang, J., & Lacroix, C. (1991). Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides. Applied and Environmental Microbiology*, *57*(12), 3450-3455. https://doi.org/10.1128/aem.57.12.3450-3455.1991

Fugaban, J. I. I., Vazquez Bucheli, J. E., Park, Y. J., Suh, D. H., Jung, E. S., Franco, B. D. G. D. M., & Todorov, S. D. (2022). Antimicrobial properties of *Pediococcus acidilactici* and *Pediococcus pentosaceus* isolated from silage. *Journal of Applied Microbiology*, *132*(1), 311-330. https://doi.org/10.1111/jam.15205

Goa, T., Beyene, G., Mekonnen, M., & Gorems, K. (2022). Isolation and characterization of lactic acid bacteria from fermented milk produced in Jimma Town, Southwest Ethiopia, and evaluation of their antimicrobial activity against selected pathogenic bacteria. *International journal of food science*, *1*, 2076021. https://doi.org/10.1155/2022/2076021

Han, H. S., Yum, H., Cho, Y. D., & Kim, S. (2023). Improvement of halitosis by probiotic bacterium *Weissella cibaria* CMU: a randomized controlled trial. *Frontiers in Microbiology*, *14*, 1108762. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1108762

Huynh, G. T., Vu, H. N., Vu, V. U., Nguyen, H. N. U., & Pham, T. T. N. (2020). Characterization of potential probiotic *Lactobacillus* from whiteleg shrimp intestines for possible additives in pellet feeding. *CTU Journal of Science*, *56*(Fisheries) 102-111. https://doi.org/10.22144/ctu.jsi.2020.012

Imade, E. E., Omonigho, S. E., Babalola, O. O., & Enagbonma, B. J. (2021). Lactic acid bacterial bacteriocins and their bioactive properties against food-associated antibiotic-resistant bacteria. *Annals of Microbiology*, *71*, 1-14. https://doi.org/10.1186/s13213-021-01652-6

Kanagaraj, C., Muthuvel, P., & Ayyappadas, M. P. (2015). Screening of bacteriocin production and associated enzyme activity from *Lactobacillus acidophilus*. *International Journal of Biotechnology and Bioengineering Research*, *6*, 13-18.

Kandler, O., & Weiss, N. (1986). Regular, Non-Sporing Gram-Positive Rods. In. Sneath, H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., & Holt, J. G. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* Williams and Wilkins, Baltimore, 1208-1234.

Kang, C. E., Park, Y. J., Kim, J. H., Lee, N. K., & Paik, H. D. (2023). Probiotic *Weissella cibaria* displays antibacterial and anti-biofilm effects against cavity-causing *Streptococcus mutans*. *Microbial Pathogenesis*, *180*, 106151. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106151

Kim, D. H., Kang, M. S., Yeu, J. E., Lee, M. G., & Cho, J. W. (2020). Inhibitory effect of the probiotic bacteria, *Weissella cibaria* CMU on

halitosis: a randomized placebo-controlled study. *Journal of Korean Academy of Oral Health*, *44*(4), 246-252. https://doi.org/10.11149/jkaoh.2020.44.4.246

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, *35*(6), 1547-1549. https://doi.org/10.1093/molbev/msy096

Li, J., Ai, L., Xu, F., Hu, X., Yao, Y., & Wang, L. (2022). Structural characterization of exopolysaccharides from *Weissella cibaria* NC516. 11 in distiller grains and its improvement in gluten-free dough. *International Journal of Biological Macromolecules*, *199*, 17-23. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.12.089

Ngo, T. P. D., Huynh, Y. L., & Huynh, X. P. (2011). Isolation and selection of lactic acid bacteria producing anti-bacterial substances. *CTU Journal of Science*, (19a), 176-184 *(in Vietnamese)*.

Khoa, N. T. T. (2014). Isolation of *Lactobacillus* bacteria from several catfish species with the ability to inhibit *Edwardsiella ictaluri*, the causative agent of bacillary necrosis of *Pangasius* (Master's thesis). Can Tho University (*in Vietnamese*).

Nguyen, V. L., Nguyen, N. N., Do, A. D., Nguyen, T. S., & Nguyen, Q. D. (2024). Exopolysaccharides from *Weissella cibaria* isolated from oats: isolation, characterisation and its application in improving the texture of set-type yogurt. *International Journal of Food Science and Technology*, *59*(12), 9532-9546. https://doi.org/10.1111/ijfs.17603

Nguyen, V. T. & Nguyen, N. T. (2012). Isolation of *Lactobacillus* sp. inhibiting bacteria causing "red-sore disease" and "white spot in the internal organs" on *Pangasianodon hypophthalmus*. *CTU Journal of Science*, *23*(a), 224-234 *(in Vietnamese)*.

Pham, M. D., Tran, T. T. H., Chau, T. T., Cao, M. A., Hua, T. N., Tran, N. H., Tran, T. T. H., & Onoda, S. (2017). Effects of heat-killed *Lactobacillus plantarum* strain L-137 on larvae quality and growth performance of white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) juveniles. *IJSRP, 7*(7), 41-48.

Ren, Y., Liu, W., & Zhang, H. (2015). Identification of coccoidal bacteria in traditional fermented milk products from Mongolia, and the fermentation properties of the predominant species, *Streptococcus thermophilus*. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, *35*(5), 683. https://doi.org/10.5851/kosfa.2015.35.5.683

Rossland, E., Langsrud, T., & Sorhaug, T. (2005). Influence of controlled lactic fermentation on growth and sporulation of *Bacillus cereus* in milk. *International journal of food microbiology*, *103*(1), 69-77. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.11.027

Sanni, A. I., Onilude, A. A., Ogunbanwo, S. T., & Smith, S. I. (1999). Antagonistic activity of bacteriocin produced by *Lactobacillus* species from ogi, an indigenous fermented food. *Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms*, *39*(3), 189-195. https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4028(199906)39:3<189::AID-JOBM189>3.0.CO;2-R

Tian, C., Wang, L., Liu, M., Liu, J., Qiu, M., & Chen, Y. (2024). Isolation and identification of chicken-derived lactic acid bacteria: in vitro probiotic properties and antagonistic effects against *Salmonella pullorum*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli*. *Microorganisms*, *12*(4), 795. https://doi.org/10.3390/microorganisms12040795

Verschuere, L., Heang, H., Criel, G., Sorgeloos, P., & Verstraete, W. (2000). Selected bacterial strains protect *Artemia* spp. from the pathogenic effects of *Vibrio proteolyticus* CW8T2. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(3), 1139-1146. https://doi.org/10.1128/AEM.66.3.1139-1146.2000