

DOI:10.22144/ctu.jos.2026.167

ẢNH HƯỞNG CỦA ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY ĐẾN KHẢ NĂNG KHÁNG KHUẨN VÀ TIẾT ENZYME PROTEASE CỦA LỢI KHUẨN *Lactiplantibacillus plantarum* LAB8.1CM

Phan Thị Cẩm Tú, Vũ Hùng Hải, Nguyễn Thị Kim Hà và Huỳnh Trường Giang*

Trường Thủy sản, Đại học Cần Thơ, Việt Nam

*Tác giả liên hệ (Corresponding author): htgiang@ctu.edu.vn

Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received): 12/01/2026

Sửa bài (Revised): 22/02/2026

Duyệt đăng (Accepted): 15/06/2026

Title: The influence of culture conditions on enzyme activities and antimicrobial activity of probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* LAB8.1CM

Author(s): Phan Thi Cam Tu, Vu Hung Hai, Nguyen Thi Kim Ha and Huynh Truong Giang*

Affiliation(s): College of Aquaculture and Fisheries, Can Tho University, Viet Nam

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá tốc độ tăng trưởng, khả năng kháng *Vibrio parahaemolyticus* và tiết protease ngoại bào bởi chủng *Lactiplantibacillus plantarum* LAB8.1CM ở các điều kiện nuôi cấy khác nhau trong in vitro. Chủng LAB8.1CM được nuôi trong canh trường MRS đã điều chỉnh các giá trị pH (3 - 9) và độ mặn (0 - 6% NaCl) và ủ ở các mức nhiệt độ (15 - 50°C) khác nhau. Hoạt tính kháng khuẩn và protease của chủng LAB8.1CM cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở các điều kiện nuôi cấy khác nhau ($p < 0,05$). Giá trị OD₆₀₀ đạt cao nhất ở điều kiện pH từ 6,0 đến 7,0, nồng độ NaCl từ 0 đến 2% và nhiệt độ từ 30 đến 40°C sau 48 giờ lên men. Đồng thời, hoạt tính protease và khả năng đối kháng *V. parahaemolyticus* của dịch lên men đạt tối đa ở các ngưỡng giá trị trên. Ngược lại, khi ủ ở nhiệt độ cao hơn 40°C, môi trường có tính acid hoặc kiềm cao (pH 3,0 hoặc 9,0) hoặc độ mặn cao (4 - 6% NaCl) cho thấy sự sinh trưởng và hoạt động tổng hợp các hợp chất sinh học của *Lb. plantarum* LAB8.1CM bị suy giảm đáng kể, thậm chí có thể bị ức chế hoàn toàn.

Từ khóa: Điều kiện nuôi cấy, hoạt tính enzyme, hoạt tính kháng khuẩn, *Lactobacillus*, yếu tố lên men

ABSTRACT

The study aimed to evaluate the growth rate, antibacterial activity against *Vibrio parahaemolyticus*, and extracellular protease enzyme secretion by the *Lactiplantibacillus plantarum* strain LAB8.1CM under different in vitro culture conditions. The strain was cultured in MRS broth, which adjusted pH levels (3 - 9) and salinity levels (0 - 6% NaCl), and incubated at various temperatures (15 - 50°C). Results showed significant differences in the growth of LAB8.1CM under different conditions ($p < 0.05$). The highest OD₆₀₀ values were observed at pH 6.0 to 7.0, NaCl concentrations of 0 to 2%, and temperatures from 30 to 40°C after 48 hours of fermentation. Concurrently, the protease activity and the antagonistic effect against *V. parahaemolyticus* reached their maximum levels under the above conditions. Conversely, incubation at temperatures exceeding 40°C, in highly acidic or alkaline conditions (pH 3.0 or 9.0), or under elevated salinity levels (4 - 6% NaCl) markedly inhibited the growth and biosynthetic activities of *Lb. plantarum* LAB8.1CM, occasionally resulting in complete suppression.

Keywords: Antagonistic activity, culture condition, enzyme activity, fermentation factor, *Lactobacillus*

1. GIỚI THIỆU

Những năm gần đây, việc sử dụng vi khuẩn probiotic như chất thay thế kháng sinh trong thực phẩm thủy sản đang rất được quan tâm. Nhóm vi khuẩn acid lactic (LAB) được công nhận là chủng lợi khuẩn an toàn (GRAS) và đóng vai trò quan trọng trong quá trình bảo quản, lên men các loại thực phẩm cũng như thức ăn chăn nuôi, với vai trò là hệ vi sinh vật tự nhiên hoặc được sử dụng làm chủng khởi động trong các điều kiện được kiểm soát (Daeschel, 1989). Trong đó, giống *Lactobacillus* thuộc nhóm vi khuẩn LAB được công nhận là các chủng probiotic an toàn trong nuôi thủy sản, với khả năng cải thiện tăng trưởng và sức đề kháng của tôm thông qua những tác động tích cực đến hệ miễn dịch và cân bằng hệ vi sinh đường ruột của vật nuôi (Huynh et al., 2019; Naiel et al., 2020). Trong thực tế, *Lactobacillus* được ứng dụng bổ sung vào thức ăn của vật nuôi nhằm tăng khả năng hấp thu chất dinh dưỡng và kiểm soát sự phát triển của các chủng vi khuẩn gây bệnh như *Vibrio*, *Aeromonas*, *Streptococcus*,... (Ringø et al., 2020), thông qua khả năng sinh tổng hợp nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học như các hợp chất kháng khuẩn (bacteriocin, hydrogen peroxide, các acid hữu cơ và diacetyl) và các enzyme thủy phân protein hoặc các chất bột đường (Oyetayo et al., 2003; Giang và ctv., 2020). Do đó, các nghiên cứu gần đây tập trung vào việc phân lập và đánh giá các đặc tính probiotic của chủng lợi khuẩn LAB nhằm phát triển giải pháp an toàn, thân thiện với môi trường và có tác động có lợi với vật nuôi. Kết quả nghiên cứu của Giang và ctv. (2020) đã phân lập được các chủng lợi khuẩn thuộc nhóm LAB từ ruột tôm thẻ chân trắng, trong đó 5 chủng *Lactobacillus* spp. thể hiện khả năng sinh hoạt tính protease mạnh cùng với khả năng đối kháng *Vibrio parahaemolyticus* vượt trội. Hay kết quả nghiên cứu của Thành và Trai (2012) nhận dạng được 45 chủng *Lactobacillus* spp. từ cá tra và cá rô phi, trong đó các chủng này có khả năng đối kháng với *Aeromonas hydrophila*, nhưng chỉ 43 chủng có khả năng ức chế vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* và duy nhất chủng Lb12 có khả năng tổng hợp bacteriocin ức chế đồng thời cả hai loại vi khuẩn gây bệnh trên. Bên cạnh việc đánh giá các đặc tính probiotic của chủng phân lập, việc khảo sát các đặc điểm sinh lý của vi khuẩn cũng đóng vai trò then chốt, đồng thời là cơ sở quan trọng để xác định tiềm năng ứng dụng của chủng trong sản xuất và thực nghiệm. Kết quả các nghiên cứu trước đây đã chứng minh các điều kiện lên men như nhiệt độ, pH và độ mặn hay nồng độ NaCl có ảnh hưởng đến tốc độ sinh trưởng, cũng như khả năng sinh tổng hợp các hợp

chất có hoạt tính sinh học quan trọng của vi khuẩn LAB như hoạt tính kháng khuẩn và enzyme (Gobbettia et al., 1999; Tomás et al., 2002; Ślizewska et al., 2020). Gần đây, nhóm tác giả đã phân lập và chọn lọc được chủng lợi khuẩn *Lactiplantibacillus plantarum* LAB8.1CM từ ruột tôm thẻ chân trắng *Litopenaeus vannamei* có các đặc tính probiotic vượt trội. Chủng hiện được lưu giữ tại Phòng thí nghiệm Chế phẩm Sinh học Thủy sản, Trường Thủy sản, Đại học Cần Thơ. Nhằm cung cấp thông tin về các đặc điểm sinh lý về khả năng chịu nhiệt độ, pH và độ mặn của chủng này phục vụ cho phát triển synbiotic trong nuôi trồng thủy sản, việc nghiên cứu các điều kiện nuôi cấy ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của LAB cũng như khả năng sinh hoạt tính kháng khuẩn và enzyme là cần thiết. Điều này không chỉ giúp bổ sung các đặc điểm sinh lý mà còn góp phần tối ưu hóa quá trình nuôi cấy sinh khối lợi khuẩn cho nuôi trồng thủy sản.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Chuẩn bị vi khuẩn

Chủng *Lactiplantibacillus plantarum* LAB8.1CM với đặc tính probiotic được phân lập từ ruột tôm *Litopenaeus vannamei*, thuộc bộ sưu tập giống vi khuẩn của Phòng Thí nghiệm Chế phẩm sinh học thủy sản (Trường Thủy sản, Đại học Cần Thơ). Chủng LAB8.1CM được phục hồi và nuôi tăng sinh trong canh trường MRS (HiMedia Laboratories, Ấn Độ) trong tủ ủ yếm khí Forma Steri-Cycle i250 (Thermo Scientific, Đức) ở 37°C trong 24 giờ. Dung dịch tế bào vi khuẩn được ly tâm để loại bỏ phần dịch nổi và rửa với nước muối sinh lý (0,9% NaCl) ở vận tốc 3.000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C (Giang và ctv., 2020). Huyền phù tế bào được điều chỉnh bằng nước muối sinh lý để đạt giá trị OD xấp xỉ 0,5 tại bước sóng 600 nm và trữ 4°C cho các đánh giá tiếp theo.

2.2. Ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy lên khả năng sinh trưởng, kháng khuẩn và tiết hoạt tính protease ngoại bào

Để đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ, pH và nồng độ NaCl đến sự sinh trưởng và các đặc tính probiotic của chủng lợi khuẩn, thí nghiệm được tiến hành dựa trên phương pháp của Yang et al. (2018) và Linh (2021) với một vài thay đổi như sau:

2.2.1. Nhiệt độ

Huyền phù tế bào vi khuẩn sau khi điều chỉnh giá trị OD được cấy vào bình tam giác chứa 20 mL canh trường MRS tiệt trùng (pH 6,5) với tỷ lệ nạp giống 1% (v/v). Quá trình lên men được tiến hành trong điều kiện yếm khí trong 48 giờ ở các mức nhiệt

độ khác nhau (15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 và 50°C). Trong suốt quá trình lên men, tốc độ sinh trưởng, hoạt tính enzyme và khả năng kháng khuẩn của chủng LAB8.1CM được theo dõi. Mỗi mức nhiệt độ được đánh giá 3 lần lặp lại, với dung dịch nước muối sinh lý (0,9%) được sử dụng làm đối chứng.

2.2.2. pH

Canh trường MRS được điều chỉnh giá trị pH ban đầu bằng dung dịch NaOH 3N và HCl 3N để đạt các giá trị pH 3, 4, 5, 6, 7, 8 và 9. Sau đó, 200 μ L huyền phù tế bào ($OD_{600} = 0,5$) được cấy vào các bình tam giác chứa 20 mL canh trường MRS đã tiệt trùng và điều chỉnh pH tương ứng. Nghiệm thức đối chứng được chuẩn bị bằng cách bổ sung 200 μ L nước muối sinh lý (0,9% NaCl) tiệt trùng vào canh trường MRS. Các bình thí nghiệm được ủ yếm khí ở 38°C trong 48 giờ để đánh giá tốc độ sinh trưởng, hoạt tính protease và khả năng kháng *Vibrio parahaemolyticus*. Mỗi giá trị khảo sát được đánh giá lặp lại 3 lần.

2.2.3. NaCl

Thí nghiệm được thực hiện theo quy trình mô tả tại mục 2.2.2, với việc bổ sung NaCl vào canh trường MRS (pH 6,5) nhằm đạt các nồng độ 0, 1, 2, 3, 4, 5 và 6% (w/v). Dung dịch nước muối sinh lý (0,9%) được sử dụng làm đối chứng. Tốc độ sinh trưởng, hoạt tính enzyme và hoạt tính kháng khuẩn của chủng vi khuẩn được đánh giá trong quá trình lên men. Thí nghiệm được bố trí 3 lần lặp lại.

2.3. Các chỉ tiêu theo dõi

2.3.1. Tăng trưởng của vi khuẩn

Phương pháp đánh giá được thực hiện như nghiên cứu của Huynh et al. (2018). Sự phát triển của chủng vi khuẩn được quan sát thông qua độ hấp thụ ở bước sóng 600 nm tại các thời điểm 0, 4, 6, 12, 24, 36 và 48 giờ bằng máy so màu quang phổ UV-VIS 1900i (Shimadzu, Nhật Bản). Mỗi mẫu được đo 3 lần lặp lại.

2.3.2. Khả năng kháng *Vibrio parahaemolyticus*

Dịch nuôi cấy được ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C để loại bỏ tế bào vi khuẩn và thu phần dịch nổi (CFS) để phân tích khả năng kháng khuẩn *V. parahaemolyticus* bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch (Balouiri et al., 2012). Theo đó, chủng *V. parahaemolyticus* được sử dụng là chủng gây bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm được lưu trữ tại phòng thí nghiệm Chế phẩm sinh học, Trường Thủy sản, Đại học Cần Thơ (Ngân và ctv., 2021; Xuân, 2021). Chủng khuẩn được phục hồi và nuôi tăng sinh trong canh trường Tryptone

Soya Broth (TSB, HiMedia Laboratories, Ấn Độ) có bổ sung 1,5% NaCl và được chuẩn bị ở mật độ 10^8 CFU/mL. Môi trường thạch Mueller Hinton Agar (MHA, HiMedia Laboratories, Ấn Độ) được chuẩn bị. Dung dịch vi khuẩn *V. parahaemolyticus* được trải đều lên môi trường MHA, sau đó tiến hành đục lỗ với đường kính $d = 6$ mm trên bề mặt thạch. Tiếp theo, 100 μ L dịch CFS của chủng LAB8.1CM đã được chuẩn bị được thêm vào lỗ thạch, sau đó ủ 10 phút ở 4°C, kể đến ủ ở 37°C trong 24 giờ. Khả năng kháng khuẩn được xác định bằng sự hiện diện của vòng kháng khuẩn. Đường kính vòng kháng khuẩn (mm) được tính như sau: $DK = Di - dw$ (trong đó Di là đường kính vòng ức chế vi khuẩn bao gồm đường kính lỗ (mm) và dw là đường kính lỗ (mm)). Đường kính vòng kháng khuẩn lớn hơn hoặc bằng 6 mm được xem là có khả năng ức chế (Cheikhyyoussef et al., 2009).

2.3.3. Hoạt tính protease ngoại bào

Dịch nuôi cấy loại bỏ tế bào (CFS) được chuẩn bị tương tự như mục 2.3.2 để phân tích hoạt tính enzyme. Phương pháp xác định hoạt tính protease được thực hiện ở 40°C trong môi trường đệm Tris-HCl 100 mmol/L (pH 9,0) dựa theo mô tả của Huynh et al. (2018). Thử nghiệm 100 μ L dung dịch CFS được ủ với 100 μ L casein 1% (chuẩn bị trong đệm Tris-HCl, pH 9,0) trong 10 phút ở 37°C. Phản ứng được dừng lại sau khi thêm 500 μ L dung dịch trichloroacetic acid 5%. Sau 20 phút, hỗn hợp được ly tâm ở tốc độ 3.000 vòng/phút, ở 4°C trong 10 phút để loại bỏ tế bào. Phần CFS được tiếp tục phân tích hoạt tính enzyme protease bằng phương pháp Lowry's. Mỗi đơn vị (Unit) hoạt tính enzyme protease tương đương với lượng enzyme cần thiết để phân giải casein và phóng thích 1 μ g tyrosine/mL/phút.

2.4. Xử lý số liệu

Các số liệu thu thập được tính giá trị trung bình, độ lệch chuẩn và phân tích ANOVA một nhân tố. Chương trình Excel phiên bản 2016 được sử dụng để xử lý số liệu và việc so sánh thống kê các giá trị trung bình giữa các nghiệm thức được tiến hành bằng phần mềm SPSS phiên bản 20.0 ở mức ý nghĩa $p = 0,05$ bằng phép thử TUKEY.

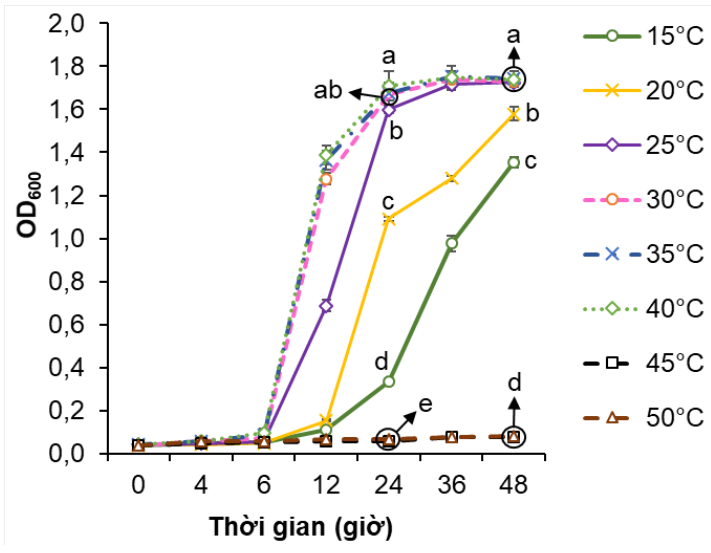
3. KẾT QUẢ

3.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Kết quả cho thấy chủng LAB8.1CM sinh trưởng trong khoảng nhiệt độ từ 15 đến 40°C và đạt pha tăng trưởng sau 12 giờ nuôi cấy ở ngưỡng 30 - 40°C (Hình 1). Cụ thể, giá trị OD_{600} sau 24 giờ tại các mức 30°C, 35°C và 40°C lần lượt đạt $1,671 \pm 0,048$;

1,673±0,051 và 1,709±0,066. Mặc dù, sinh trưởng của vi khuẩn chậm hơn ở mức 25°C sau 24 giờ với giá trị OD₆₀₀ trung bình đạt 1,599±0,017, nhưng sau 48 giờ giá trị OD₆₀₀ khác biệt không có ý nghĩa so với mức nhiệt độ 30 - 40°C. Ngược lại, khi nhiệt độ 15 - 20°C, tốc độ sinh trưởng của chủng vi khuẩn

giảm đáng kể, với giá trị OD₆₀₀ trung bình sau 24 giờ đạt 0,335±0,005 và 1,092±0,009 tương ứng và khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$) so với các mức nhiệt cao hơn. Trong khi đó, ở nhiệt độ 45 - 50°C, không ghi nhận sự phát triển của chủng LAB8.1CM.



Hình 1. Tốc độ tăng trưởng của lợi khuẩn LAB8.1CM ở các nhiệt độ nuôi cấy khác nhau

Ghi chú: Các giá trị ở các nghiệm thức trong cùng ngày có ký tự (a, b, c, d) giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$).

Hoạt tính kháng khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* khác biệt có ý nghĩa giữa các mức nhiệt độ ủ ($p<0,05$) sau 48 giờ nuôi cấy (Bảng 1). Theo đó, vòng kháng khuẩn lớn nhất ở mức nhiệt độ từ 25 đến 40°C, với dao động 8,0 - 9,3 mm sau 24 giờ và 10,7

- 12,0 mm sau 48 giờ lên men. Khi nhiệt độ giảm thấp ở mức 15°C và 20°C, đường kính vòng kháng khuẩn giảm tương ứng còn 2,7±0,6 mm và 7,7±0,6 mm sau 48 giờ. Khi nhiệt độ vượt trên 40°C, không xuất hiện bất kỳ vòng kháng khuẩn.

Bảng 1. Vòng kháng khuẩn và hoạt tính protease của chủng LAB8.1CM ở các nhiệt độ khác nhau

Nhiệt độ	Vòng kháng khuẩn (mm)		Protease (U/mL)	
	24 giờ	48 giờ	24 giờ	48 giờ
15°C	0±0 ^c	2,7±0,6 ^c	86,5±13,7 ^c	133,9±5,8 ^c
20°C	3,3±0,6 ^b	7,7±0,6 ^b	95,2±7,7 ^c	151,3±9,0 ^c
25°C	8±1,0 ^a	10,7±0,6 ^a	110,2±12,4 ^c	160,1±13,7 ^{bc}
30°C	8,3±1,2 ^a	11,7±0,6 ^a	145,6±14,4 ^b	181±12,7 ^b
35°C	8,7±0,6 ^a	12,0±1,0 ^a	171,3±8,5 ^{ab}	221,7±12 ^a
40°C	9,3±0,6 ^a	12,0±1,0 ^a	177,6±6,4 ^a	240,1±12,2 ^a
45°C	0±0 ^c	0±0 ^d	0,3±0,1 ^d	0,3±0,1 ^d
50°C	0±0 ^c	0±0 ^d	0,4±0,1 ^d	0,5±0,1 ^d

Ghi chú: Các ký tự trong cùng một cột giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$).

Tương tự, khả năng sinh protease của chủng LAB8.1CM chịu ảnh hưởng đáng kể bởi nhiệt độ lên men (Bảng 1). Theo đó, khoảng nhiệt độ tối ưu là từ 35 đến 40°C với hoạt tính cao nhất sau cả 24 và 48 giờ lên men, khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$) so với các mức nhiệt độ còn lại. Hoạt tính protease giảm dần khi nhiệt độ lên men giảm, đặc biệt trong

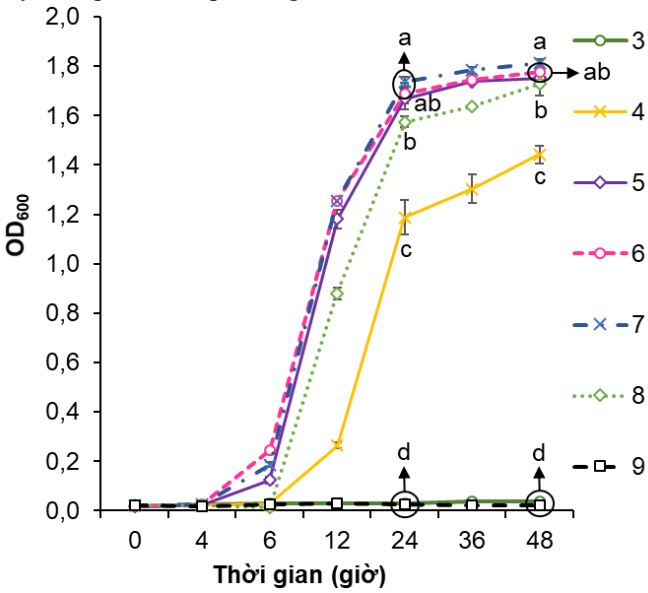
khoảng 15 - 30°C. Ở mức nhiệt độ 45°C và 50°C, một lượng nhỏ hoạt tính đã được phát hiện mặc dù không ghi nhận được sự phát triển của vi khuẩn, điều này có thể là do phần enzyme nội bào của vi khuẩn cấy nạp ban đầu phóng thích vào môi trường nuôi cấy. Nhìn chung, nhiệt độ lên men chi phối đáng kể sự sinh trưởng, hoạt tính kháng khuẩn và khả năng

sản xuất protease của chủng vi khuẩn. Mặc dù hiệu quả sinh học cao nhất đạt được trong khoảng 35 - 40°C, nhiệt độ 35°C được xem là điều kiện tối ưu hơn khi xét đến khả năng ứng dụng thực tiễn, do duy trì hoạt tính sinh học ở mức cao trong khi giảm yêu cầu năng lượng cho quá trình ủ.

3.2. Ảnh hưởng của pH

Chủng LAB8.1CM có khả năng thích nghi và sinh trưởng trong khoảng pH từ 4 đến 8; tuy nhiên, khi pH nằm ngoài khoảng này, không ghi nhận được sự phát triển của vi khuẩn trong 48 giờ lên men (Hình 2). Kết quả cho thấy chủng LAB đạt pha tăng

trường sớm nhất ở ngưỡng pH 5,0; 6,0 và 7,0 sau 24 giờ với giá trị OD₆₀₀ lần lượt là 1,667±0,041; 1,69±0,042 và 1,737±0,019. Sau 48 giờ lên men, giá trị OD₆₀₀ đạt cao nhất ở pH 7,0 với trung bình 1,813±0,017, khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$) so với pH 5,0 và 6,0, tương ứng 1,751±0,003 và 1,776±0,011. Trong khi đó, ở pH 8,0 thì giá trị OD₆₀₀ đạt trung bình 1,729±0,05, khác biệt có ý nghĩa ($p<0,05$) so với pH 7,0. Tốc độ tăng trưởng của vi khuẩn thấp nhất ở pH 4,0 với giá trị OD₆₀₀ trung bình đạt 1,442±0,037 và khác biệt có ý nghĩa ($p<0,05$) so với các ngưỡng pH cao hơn.



Hình 2. Tốc độ tăng trưởng của lợi khuẩn LAB8.1CM ở điều kiện pH khác nhau

Ghi chú: Các giá trị ở các nghiệm thức trong cùng ngày có ký tự (a, b, c, d) giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$).

Bảng 2. Vòng kháng khuẩn và hoạt tính protease của chủng LAB8.1CM ở các giá trị pH khác nhau

pH	Vòng kháng khuẩn (mm)		Protease (U/mL)	
	24 giờ	48 giờ	24 giờ	48 giờ
3	0±0 ^c	0±0 ^d	0±0 ^d	0±0 ^c
4	6,7±0,6 ^b	9,7±0,6 ^{bc}	124,4±4,9 ^c	162,5±14,8 ^b
5	7,7±0,6 ^{ab}	11,7±0,6 ^{ab}	150,3±2,2 ^b	171,9±22,3 ^b
6	10,3±1,5 ^a	12,3±0,6 ^a	164,1±10,7 ^{ab}	215,3±23,1 ^a
7	10,7±1,5 ^a	12,7±1,2 ^a	178,1±3,8 ^a	223,1±15,0 ^a
8	6,3±2,1 ^b	8,7±1,5 ^c	116,2±16,3 ^c	150,8±13,1 ^b
9	0±0 ^c	0±0 ^d	0±0 ^d	0±0 ^c

Ghi chú: Các ký tự trong cùng một cột giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$).

Đồng thời, pH môi trường lên men cũng ảnh hưởng đến khả năng sinh hoạt tính kháng khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* và enzyme ngoại bào protease (Bảng 2). Cụ thể, đường kính vòng kháng khuẩn đạt trung bình cao nhất ở ngưỡng pH trung

tính (6,0 - 7,0) sau 24 và 48 giờ, nhưng khác biệt không có ý nghĩa so với môi trường có tính acid nhẹ (pH 5,0). Khi pH môi trường có tính acid ($\leq 4,0$) hoặc kiềm cao ($\geq 8,0$), vòng kháng khuẩn giảm đáng kể, thấp hơn có ý nghĩa ($<0,05$) so với môi trường

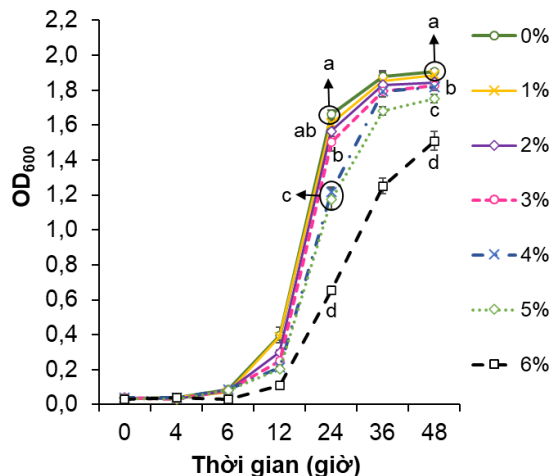
pH trung tính (6,0 - 7,0). Tương tự, hoạt tính protease tiết ra bởi vi khuẩn khi lên men môi trường trung tính (pH 6,0 - 7,0) cao hơn và khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$) so với các điều kiện còn lại. Tuy nhiên, chủng LAB8.1CM có khả năng sinh enzyme protease trong điều kiện môi trường có tính acid (pH 4,0 và 5,0) hoặc kiềm nhẹ (pH 8,0). Nhìn chung, điều kiện pH quá thấp hoặc quá cao gây ức chế sinh trưởng của chủng vi khuẩn, đồng thời làm giảm quá trình sinh tổng hợp các hợp chất có hoạt tính kháng khuẩn và enzyme.

3.3. Ảnh hưởng của độ mặn

Kết quả cho thấy chủng LAB8.1CM có khả năng chịu mặn ở nồng độ từ 0 đến 6% NaCl và khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nồng độ (Hình 3). Cụ thể, giá trị OD_{600} ở nồng độ 0% và 1% NaCl đạt cao nhất với trung bình lần lượt là $1,663 \pm 0,022$ và $1,609 \pm 0,022$ sau 24 giờ và $1,904 \pm 0,018$ và $1,886 \pm 0,013$ sau 48 giờ lên men. Khi nồng độ NaCl tăng lên 2%, 3% và 4% thì tốc độ tăng trưởng của vi khuẩn diễn ra chậm hơn với giá trị OD_{600} tương ứng $1,845 \pm 0,018$; $1,827 \pm 0,019$ và $1,815 \pm 0,018$ vào cuối giai đoạn lên men. Trong khi đó, giá trị OD_{600} của lợi khuẩn đạt thấp nhất ở nồng độ 5% và 6% NaCl với trung bình lần lượt là $1,752 \pm 0,023$ và $1,509 \pm 0,054$. Điều này cho thấy tốc độ tăng trưởng của chủng LAB8.1CM giảm dần theo sự gia tăng nồng độ NaCl.

Bên cạnh đó, vòng kháng khuẩn và hoạt tính protease tiết ra bởi chủng LAB8.1CM có xu hướng giảm dần theo sự gia tăng của nồng độ NaCl (Bảng 3). Theo đó, vòng kháng khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* của dịch lên men sau 48 giờ đạt kích cỡ tối đa ở nồng độ 0% và 1% NaCl, khác biệt không ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) so với nồng độ 2%

và 3% NaCl. Trong khi đó, đường kính vòng kháng khuẩn của dịch lên men trong khoảng 4 - 6% NaCl đạt thấp hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với các nồng độ còn lại. Tương tự, protease của dịch lên men sau 48 giờ đạt hoạt tính cao nhất ở nồng độ 0% và 1% NaCl, trong khi hoạt tính thấp nhất ở nồng độ 5 - 6% NaCl. Hoạt tính protease trong dịch lên men ở các nồng độ còn lại có xu hướng giảm thấp, nhưng khác biệt không có ý nghĩa ($p > 0,05$) giữa nồng độ 3% so với 2% và 4%. Nhìn chung, nồng độ NaCl tăng cao không chỉ ảnh hưởng đến tốc độ sinh trưởng của vi khuẩn mà còn ức chế khả năng sinh tổng hợp các hợp chất kháng khuẩn và enzyme của chủng LAB8.1CM.



Hình 3. Tốc độ tăng trưởng của lợi khuẩn LAB8.1CM ở các nồng độ muối khác nhau

Ghi chú: Các giá trị ở các nghiệm thức trong cùng ngày có ký tự (a, b, c, d) giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Bảng 3. Vòng kháng khuẩn và hoạt tính protease của chủng LAB8.1CM ở các nồng độ NaCl khác nhau

NaCl (%)	Vòng kháng khuẩn (mm)		Protease (U/mL)	
	24 giờ	48 giờ	24 giờ	48 giờ
0%	$8,0 \pm 1,0^a$	$11,7 \pm 0,6^a$	$170,2 \pm 13^a$	$247,4 \pm 12,2^a$
1%	$7,7 \pm 0,6^a$	$11,3 \pm 0,6^a$	$161,6 \pm 16,8^a$	$242,2 \pm 7,9^a$
2%	$7,3 \pm 0,6^a$	$10,7 \pm 0,6^{ab}$	$137,5 \pm 20,7^{ab}$	$218,9 \pm 24,7^{ab}$
3%	$6,7 \pm 0,6^a$	$10,2 \pm 0,8^{ab}$	$136 \pm 23,2^{ab}$	$197,7 \pm 14,1^{bc}$
4%	$6,3 \pm 0,6^a$	$9,5 \pm 0,5^{bc}$	$117,6 \pm 15,4^b$	$162,7 \pm 13,0^{cd}$
5%	$3,3 \pm 0,6^b$	$8,3 \pm 0,6^{cd}$	$107 \pm 5,1^{bc}$	$142,7 \pm 8,8^d$
6%	$0,8 \pm 0,3^c$	$7,3 \pm 0,6^d$	$73,4 \pm 5,1^c$	$134,9 \pm 9,8^d$

Ghi chú: Các ký tự trong cùng một cột giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

4. THẢO LUẬN

Trong nghiên cứu hiện tại, các điều kiện nuôi cấy bao gồm nhiệt độ, pH và NaCl có ảnh hưởng đáng kể đến tốc độ sinh trưởng và khả năng kháng khuẩn

và sinh tổng hợp enzyme protease của chủng *Lb. plantarum* LAB8.1CM. Theo đó, ngưỡng nhiệt độ 35 - 40°C là tối ưu để đạt tốc độ tăng trưởng và hiệu quả của các hợp chất có hoạt tính sinh học cao nhất. Kết quả tương đồng với báo cáo của Lương và ctv.

(2020), trong đó *Lb. acidophilus* VTCC 12257 có khả năng sinh trưởng trong khoảng nhiệt độ 20 - 40°C và đạt sinh khối cao nhất (0,575 - 0,587 g/L) ở 35 - 40°C. Tương tự, Śliżewska et al. (2020) ghi nhận các chủng *Lactobacillus* (*Lb. paracasei*, *Lb. pentosus*, *Lb. plantarum*, *Lb. reuteri* và *Lb. rhamnosus*) có khả năng sinh trưởng trong khoảng nhiệt độ từ 20 đến 44°C, với mật độ tế bào đạt cao nhất ở 37°C. Nhiệt độ này cũng được xem là tối ưu cho sự tăng sinh tế bào và tổng hợp hoạt chất kháng khuẩn bacteriocin ở một số loài vi khuẩn LAB thuộc các giống *Lactobacillus*, *Enterococcus* và *Streptococcus* (Yang et al., 2018). Hầu hết các chủng LAB thuộc nhóm ưa ấm (mesophilic), với nhiệt độ sinh trưởng tối ưu trong khoảng 35 - 40°C; trong khoảng nhiệt độ này, các hoạt động trao đổi chất bao gồm quá trình sinh tổng hợp các chất kháng khuẩn như bacteriocin cũng đạt hiệu quả cao (Abas et al., 2012). Sự suy giảm hoạt tính kháng khuẩn ở các mức nhiệt độ cao hơn hoặc thấp hơn có thể liên quan đến sự sinh trưởng chậm của vi khuẩn, từ đó làm giảm tốc độ tổng hợp các hợp chất kháng khuẩn do quá trình trao đổi chất bị hạn chế (Khay et al., 2013). Kết quả nghiên cứu của Sun et al. (2019) còn cho thấy hoạt tính protease của chủng *Lb. fermentum* R6 khi lên men ở 17°C tương đối thấp (5,3 U/mL), đạt giá trị tối đa ở 37°C (26,4 U/mL) và giảm nhanh chóng khi nhiệt độ vượt quá 37°C. Vi khuẩn LAB có khả năng sản xuất các enzyme phân giải protein cả nội bào và ngoại bào. Nhiệt độ thấp ức chế sự sinh trưởng và phát triển của nhóm vi khuẩn này, đồng thời làm giảm hoạt tính enzyme; trong khi ở các mức nhiệt độ cao hơn, ngưỡng tối ưu cho sinh trưởng có thể nhanh chóng làm bất hoạt các enzyme phân giải protein (Kieliszek et al., 2021).

pH môi trường nuôi cấy là yếu tố ảnh hưởng mạnh mẽ đến sự sinh trưởng của vi khuẩn và quá trình sinh tổng hợp các hợp chất sinh học, bao gồm bacteriocin và các enzyme thủy phân protein (Abbasiliasi et al., 2017). Kết quả nghiên cứu của Lương và ctv. (2020) ghi nhận *Lb. acidophilus* VTCC 12257 đạt tốc độ sinh trưởng cao nhất ở pH 6,0 - 7,0 sau 48 giờ lên men. Tương tự, Tomás et al. (2002) cho thấy chủng *Lb. salivarius* CRL 1328 đạt pha tăng trưởng và khả năng sinh bacteriocin cao nhất sau 24 giờ lên men trong canh trường MRS ở pH 6,5 và 37°C, khác biệt đáng kể so với các ngưỡng pH 5,0 và 8,0. Theo Śliżewska et al. (2020), pH tối ưu cho sinh trưởng của các loài *Lactobacillus* phụ thuộc vào từng chủng, thường dao động trong khoảng 5,5 - 6,5. Tuy nhiên, Kieliszek et al. (2021) cho rằng sự tăng sinh tế bào và tổng hợp hoạt tính phân giải protein trong sữa bởi các chủng LAB đạt

tối đa ở ngưỡng pH 7,0 - 7,5. Bên cạnh đó, Gobbettia et al. (1999) ghi nhận hoạt tính protease của *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B397, *Lc. lactis* subsp. *lactis* T12 và *Lb. plantarum* đạt mức cao nhất khi môi trường lên men ở ngưỡng pH từ 6 đến 8. Các kết quả ghi nhận trên chủng LAB8.1CM trong nghiên cứu hiện tại phù hợp với các nhận định trước đây, trong đó pH 6,0 - 7,0 được xác định là điều kiện tối ưu cho sự sinh trưởng và tổng hợp các hợp chất sinh học.

Khả năng chịu mặn hay nồng độ NaCl là một trong các yếu tố quan trọng đánh giá khả năng thích nghi và tiềm năng ứng dụng của chủng probiotic. Kết quả ghi nhận chủng LAB8.1CM có khả năng phát triển và sinh tổng hợp các hợp chất kháng khuẩn và enzyme trong môi trường bổ sung NaCl ở nồng độ lên đến 6%, trong đó khoảng 0 - 2% NaCl được coi là thích hợp nhất. Trong nghiên cứu của Linh (2021), các chủng LAB được phân lập từ các rô phi có khả năng sinh trưởng tốt trong khoảng độ mặn 0 - 25‰ (tương ứng 0 - 2,5% NaCl), nhưng có xu hướng phát triển chậm hơn khi vượt quá ngưỡng này. Tương tự, Neysens et al. (2003) ghi nhận ảnh hưởng của NaCl trên chủng *Lb. amylovorus* DCE 471, với tốc độ sinh trưởng riêng cực đại ở nồng độ 0,5% NaCl và hoạt tính bacteriocin cao nhất ở 1% NaCl; trong khi ở nồng độ cao hơn (2 - 4%), quá trình lên men kéo dài, biểu hiện đặc điểm hai pha do stress thẩm thấu. Ngoài ra, Gobbettia et al. (1999) cho thấy tác động của NaCl đến hoạt tính protease phụ thuộc vào chủng, khi hoạt tính protease của chủng *Lc. lactis* subsp. *lactis* T12 giảm ở nồng độ muối cao ((2,5-7,5% NaCl), nhưng các hoạt tính phân giải peptide của chủng *Lb. plantarum* 2739 vẫn duy trì, thậm chí tăng nhẹ ở nồng độ đến 5% NaCl. Trái ngược, kết quả báo cáo khác cho rằng chủng *Lb. plantarum* 17.2b đạt tốc độ tăng trưởng và hoạt tính bacteriocin cao nhất khi môi trường lên men không có sự hiện diện của NaCl (Delgado et al., 2007). Qua đó, kết quả cho thấy khả năng chịu mặn phụ thuộc vào đặc điểm sinh lý của từng chủng LAB, đặc biệt là nguồn gốc của chủng vi khuẩn được phân lập.

Từ các kết quả thu được, có thể nhận thấy rằng chủng *Lb. plantarum* LAB8.1CM không chỉ cho thấy xu hướng sinh trưởng và hoạt tính sinh học tương đồng với các chủng LAB đã được công bố, mà còn duy trì đồng thời khả năng sinh trưởng, hoạt tính kháng khuẩn và hoạt tính protease ở ngưỡng điều kiện nuôi cấy tương đối rộng, đặc biệt trong khoảng nhiệt độ 35 - 40°C, pH 6,0 - 7,0 và nồng độ NaCl lên đến 6%. Đây là những đặc điểm có ý nghĩa thực tiễn, cho thấy tiềm năng ứng dụng thực tiễn của

chủng LAB8.1CM. Tuy nhiên, nghiên cứu chỉ dừng lại ở việc đánh giá tác động riêng lẻ của từng yếu tố, trong khi trong điều kiện sản xuất thực tế, các yếu tố này thường tác động đồng thời và có thể tương tác lẫn nhau. Hơn nữa, mối quan hệ giữa sự gia tăng hoạt tính kháng khuẩn liên quan đến hàm lượng các axit hữu cơ, các hợp chất kháng khuẩn cũng được tập trung ở các nghiên cứu tiếp theo.

5. KẾT LUẬN

Chủng lợi khuẩn *Lb. plantarum* LAB8.1CM đạt pha tăng trưởng với giá trị OD₆₀₀ cao nhất trong môi trường pH trung tính từ 6,0 đến 7,0, nồng độ NaCl từ 0 đến 2% và khoảng nhiệt độ 30 - 40°C. Dưới các thông số nuôi cấy này, hoạt tính protease và khả năng kháng *Vibrio parahaemolyticus* của dịch lên men cải thiện đáng kể. Ngược lại, khi nhiệt độ vượt

quá 40°C, pH quá thấp hoặc quá cao (3,0 hoặc 9,0), cũng như nồng độ NaCl trên 4% làm suy giảm đáng kể, thậm chí ức chế hoàn toàn sự sinh trưởng và hoạt động sinh học của chủng LAB8.1CM.

LỜI CẢM ƠN

Đề tài được tài trợ bởi Bộ Giáo dục và Đào tạo thuộc nhiệm vụ Khoa học Công nghệ cấp Bộ “Nghiên cứu phát triển synbiotic từ các probiotic và prebiotic có nguồn gốc tự nhiên nhằm cải thiện enzyme tiêu hóa, tăng trưởng, miễn dịch và sức đề kháng của tôm thẻ chân trắng *Litopenaeus vannamei* ở Đồng bằng sông Cửu Long” (Mã số đề tài: B2024-TCT-03). Nhóm nghiên cứu xin chân thành cảm ơn em Nguyễn Thị Ngọc Hân đã hỗ trợ trong quá trình thí nghiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abas, S., Wendawi, A., Abead, A., & Saady, A. (2012). Screening for bacteriocins production in Enteric Bifidobacterium isolates and study of some production affecting factors. *Medical Journal of Babylon*, 9(2), 386-396.
- Abbasiliasi, S., Tan, J. S., Ibrahim, T. a. T., Bashokouh, F., Ramakrishnan, N. R., Mustafa, S., & Ariff, A. B. (2017). Fermentation factors influencing the production of bacteriocins by lactic acid bacteria: a review. *RSC Advances*, 7(47), 29395-29420. <https://doi.org/10.1039/C6RA24579J>
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2012). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6, 71-79.
- Cheikhyyoussef, A., Pogori, N., Chen, H., Zhao, J., Tang, J., Chen, W., & Zhang, H. (2009). Comparison of three different methods for the isolation of bacteriocin-like inhibitory substances from *Bifidobacterium infantis* BCRC 14602. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology*, 17, 182-194. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4581.2009.00167.x>
- Daeschel, M. A. (1989). Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technology*, 43(1), 164-167.
- Delgado, A., López, F. N. A., Brito, D., Peres, C., Feveireiro, P., & Garrido-Fernández, A. (2007). Optimum bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* 17.2b requires absence of NaCl and apparently follows a mixed metabolite kinetics. *Journal of Biotechnology*, 130(2), 193-201. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.01.041>
- Giang, H. T., Uyên, N. H. N., Hải, V. H., Ngân, P. T. T., & Út, V. N. (2020). Đánh giá hoạt tính của vi khuẩn *Lactobacillus* từ ruột tôm thẻ chân trắng có tiềm năng probiotic để bổ sung vào thức ăn tôm. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, 56(1), 102-111. <https://doi.org/10.22144/ctu.jsi.2020.012>
- Gobbettia, M., Lanciotti, R., De Angelis, M., Corbo, M. R., Massini, R., & Fox, P. (1999). Study of the effects of temperature, pH, NaCl, and aw on the proteolytic and lipolytic activities of cheese-related lactic acid bacteria by quadratic response surface methodology. *Enzyme and Microbial Technology*, 25(10), 795-809. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00110-6](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00110-6)
- Huynh, T. G., Chi, C., Nguyen, T. P., Tran, T. T. H., Cheng, A., & Liu, C. (2018). Effects of synbiotic containing *Lactobacillus plantarum* 7-40 and galactooligosaccharide on the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*, 49(7), 2416-2428. <https://doi.org/10.1111/are.13701>
- Huynh, T. G., Hu, S., Chiu, C., Truong, Q. P., & Liu, C. (2019). Bacterial population in intestines of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* fed a synbiotic containing *Lactobacillus plantarum* and galactooligosaccharide. *Aquaculture Research*, 50(3), 807-817. <https://doi.org/10.1111/are.13951>
- Khay, E. O., Ouhasssi, M., Harsal, A. E., Idaomar, M., & Abrini, J. (2013). Optimization of bacteriocin-like production by *Enterococcus durans* E204 isolated from camel milk of Morocco. *Current Research in Microbiology and Biotechnology*, 1(4), 155-159.
- Kieliszek, M., Pobiega, K., Piwowarek, K., & Kot, A. M. (2021). Characteristics of the proteolytic

- enzymes produced by lactic acid bacteria. *Molecules*, 26(7), 1858.
<https://doi.org/10.3390/molecules26071858>
- Linh, N. T. T. (2021). Phân lập và sàng lọc các chủng vi khuẩn lactic có khả năng kháng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*, gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính trên tôm thẻ chân trắng. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 3(124), 121-127.
https://tapchi.vaas.vn/sites/tapchi.vaas.vn/files/tapchi/2021-09/tc20_4.pdf
- Lương, Đ. T., Hằng, H. T., & Hợp, D. V. (2020). Điều kiện nuôi thích hợp cho sinh trưởng của vi khuẩn probiotic *Lactobacillus acidophilus* VTCC 12257 ở quy mô phòng thí nghiệm và thiết bị lên men 30 l. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 62(6), 58-64.
<https://vjol.info.vn/index.php/most/article/view/50555/41362>
- Naiel, M. A. E., Farag, M. R., Gewida, A. G. A., Elnakeeb, M. A., Amer, M. S., & Alagawany, M. (2020). Using lactic acid bacteria as an immunostimulants in cultured shrimp with special reference to *Lactobacillus* spp. *Aquaculture International*, 29(1), 219-231.
<https://doi.org/10.1007/s10499-020-00620-2>
- Neysens, P., Messens, W., & De Vuyst, L. (2003). Effect of sodium chloride on growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471. *International Journal of Food Microbiology*, 88(1), 29-39.
[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00079-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00079-5)
- Ngân, P. T. T., Hải, V. H., Út, V. N., & Giang, H. T. (2021). Phân lập và tuyển chọn một số chủng xạ khuẩn có khả năng phân hủy chất hữu cơ và kháng khuẩn ứng dụng trong nuôi trồng thủy sản. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, 57(CĐ Thủy Sản), 99-106.
<https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2021.069>
- Oyetayo, V. O., Adetuyi, F. C., & Akinyosoye, F. A. (2003). Safety and protective effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* used as probiotic agent in vivo. *African Journal of Biotechnology*, 2, 448-452.
<https://doi.org/10.5897/AJB2003.000-1090>
- Ringø, E., Van Doan, H., Lee, S., Soltani, M., Hoseinifar, S., Harikrishnan, R., & Song, S. (2020). Probiotics, lactic acid bacteria and bacilli: interesting supplementation for aquaculture. *Journal of Applied Microbiology*, 129(1), 116-136.
<https://doi.org/10.1111/jam.14628>
- Śliżewska, K., & Chlebicz-Wójcik, A. (2020). Growth kinetics of probiotic *Lactobacillus* strains in the alternative, cost-efficient semi-solid fermentation medium. *Biology*, 9(12), 423.
<https://doi.org/10.3390/biology9120423>
- Sun, F., Hu, Y., Yin, X., Kong, B., & Qin, L. (2019). Production, purification and biochemical characterization of the microbial protease produced by *Lactobacillus fermentum* R6 isolated from Harbin dry sausages. *Process Biochemistry*, 89, 37-45.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.10.029>
- Thành, N. V., & Trai, N. N. (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*, 23(a), 224-234.
<https://ctujsvn.ctu.edu.vn/index.php/ctujsvn/article/view/267>
- Tomás, J., Bru, E., Wiese, B., De Ruiz Holgado, A., & Nader-Macias, M. (2002). Influence of pH, temperature and culture media on the growth and bacteriocin production by vaginal *Lactobacillus salivarius* CRL 1328. *Journal of Applied Microbiology*, 93(4), 714-724.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01753.x>
- Xuân, L. T. (2021). *Nghiên cứu ứng dụng vi khuẩn Bacillus sp. đối kháng với Vibrio parahaemolyticus gây bệnh hoại tử gan tụy cấp trong nuôi tôm công nghiệp* (Luận án Tiến sĩ). Đại học Cần Thơ.
- Yang, E., Fan, L., Yan, J., Jiang, Y., Doucette, C., Fillmore, S., & Walker, B. (2018). Influence of culture media, pH and temperature on growth and bacteriocin production of bacteriocinogenic lactic acid bacteria. *AMB Express*, 8(1), 1-14.
<https://doi.org/10.1186/s13568-018-0536-0>