

PHÂN LẬP VÀ KIỂM TRA KHẢ NĂNG KHÁNG VI KHUẨN GÂY BỆNH CỦA *Lactococcus garvieae* TỪ HỆ TIÊU HÓA TÔM

Isolation and evaluation anti-pathogenic activities of *Lactococcus garvieae* from shrimp intestinal system

Lê Mỹ Tiểu Ngọc¹, Đặng Quang Nguyên², Đỗ Trần Hương Duyên¹, Trần Thúy Lan¹, Nguyễn Quang Đức Tiến²,
Nguyễn Duy Quỳnh Trâm³, Nguyễn Đức Huy^{1*}

¹ Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế, tỉnh lộ 10, Phú Thượng, Phú Vang, Thừa Thiên Huế, Việt Nam

² Trường đại học Khoa học, Đại học Huế, 77 Nguyễn Huệ, Huế, Thừa Thiên Huế, Việt Nam

³ Trường đại học Nông Lâm, Đại học Huế, 102 Phùng Hưng, Huế, Thừa Thiên Huế, Việt Nam

* Tác giả liên hệ Nguyễn Đức Huy (Thư điện tử: ndhuy@hueuni.edu.vn)

(Ngày nhận bài (received): 4–9–2019; Ngày chấp nhận đăng (accepted): 3–10–2019)

Tóm tắt: Sử dụng chế phẩm sinh học đối kháng tác nhân gây bệnh thay thế kháng sinh là định hướng nghiên cứu có tiềm năng cao trong ứng dụng kiểm soát vi khuẩn gây bệnh. Qua quá trình phân lập và sàng lọc ban đầu, chúng tôi thu được 17 chủng vi khuẩn lactic có khả năng ức chế *Vibrio parahaemolyticus* từ 23 mẫu hệ tiêu hóa tôm thu thập trên địa bàn tỉnh Thừa Thiên Huế. Kết quả phân tích trình tự nucleotide của đoạn 16S rRNA cho thấy 4 chủng tương đồng cao với *Lactococcus garvieae*. Chủng phân lập có hoạt tính mạnh nhất được sử dụng để đánh giá hoạt tính ức chế sự sinh trưởng cộng đồng vi khuẩn *Vibrio* spp., *Escherichia coli* ATCC 85922 và *Staphylococcus aureus* ATCC 25023. Đường kính vòng kháng khuẩn cho thấy các chủng phân lập có khả năng ức chế với nhiều loại *Vibrio* sp. khác nhau với đường kính vòng đối kháng lớn nhất đạt 23 mm. Trong khi đó, khả năng đối kháng của chủng vi khuẩn phân lập này đối với *S. aureus* ATCC 25023 và *E. coli* ATCC 85922 đạt đường kính vòng lần lượt là 15 mm và 11 mm. Đây là nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam sử dụng *L. garvieae* đối kháng nhóm vi sinh vật gây bệnh trên tôm và động vật thủy sản.

Từ khóa: đối kháng, *Lactococcus garvieae*, tôm, *Vibrio* spp.

Abstract. The bioproducts to inhibit pathogenic bacteria have become an alternative to replace antibiotics. In this study, we isolated 17 potential lactic bacteria strains from 23 shrimp samples in Thua Thien Hue province with *Vibrio parahaemolyticus* inhibition activity. The molecular identification based on 16S rRNA nucleotide sequence comparison indicated that 4 strains are highly identity with *Lactococcus garvieae*. The isolate with the highest antagonistic activity was selected to evaluate the growth inhibition against *Vibrio* spp., *Escherichia coli* ATCC 85922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25023. The inhibition zone demonstrated that the isolate was capable to inhibit various *Vibrio* spp. with the highest inhibition diameter of 23 mm. Meanwhile, the isolate showed a 15 mm and 11 mm inhibition diameter against *S. aureus* ATCC 25023 and *E. coli* ATCC 85922, respectively. This is the first study in Vietnam conducting the isolation and evaluation of *L. garvieae* against pathogenic bacteria causing disease on shrimps and other aqua animals.

Keywords: antagonistic activity, *Lactococcus garvieae*, shrimp, *Vibrio* spp.

1 Đặt vấn đề

Trong tự nhiên tồn tại rất nhiều nhóm vi sinh vật có lợi có thể ức chế sự sinh trưởng và phát triển của nhiều loài vi sinh vật gây bệnh. Nhóm vi sinh vật này thường được gọi là chế phẩm sinh học (probiotic), trong đó có chi *Bacillus* và *Lactobacillus*. Chế phẩm sinh học được xem là liệu pháp thay thế hiệu quả và được nhiều nhà nghiên cứu quan tâm. Có thể ứng dụng rộng rãi chế phẩm sinh học để thay thế kháng sinh trong phòng trị bệnh trong nhiều lĩnh vực khác nhau bao gồm chăn nuôi, nuôi trồng thủy sản và sức khỏe con người [1, 2].

Vi khuẩn lactic được phân lập từ nhiều nguồn khác nhau và các chất kháng khuẩn do chúng sản xuất ra giúp chúng có lợi thế cạnh tranh so với các vi sinh vật khác. Đây là nhóm vi khuẩn probiotic thường sử dụng cho người và động vật, bao gồm *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* và *Pediococcus* [3, 4]. Những chế phẩm sinh học probiotic đã được chứng minh có hiệu quả trong việc thúc đẩy tốc độ sinh trưởng đồng thời nâng cao hệ số chuyển đổi thức ăn ở động vật nuôi. Các chủng thuộc chi *Lactococcus* thường được sử dụng cho nhiều loại sản phẩm sữa lên men và là vi sinh vật được công nhận là an toàn [5]. Các hợp chất kháng khuẩn do vi khuẩn lactic sản xuất có vai trò quan trọng trong việc ngăn chặn sự phát triển của vi khuẩn gây hư hỏng và gây bệnh. Ứng dụng các hợp chất kháng khuẩn từ vi khuẩn lactic hiện đang được nghiên cứu rộng rãi sử dụng làm chất bảo quản thực phẩm tự nhiên [6, 7].

Lactococcus garvieae là vi khuẩn thuộc nhóm vi khuẩn lactic, gram dương, có mặt trong sữa bò nguyên chất, phô mai và các sản phẩm thịt và cá [8]. Villani và cs. đã tách chiết thành công hợp chất kháng khuẩn có bản chất bacteriocine ở *L. garvieae* phân lập từ sữa bò tươi và đặt tên là garvicin L1-5 [5]. Sau đó, một số chất kháng khuẩn khác của *L. garvieae* cũng được phát hiện bao gồm garvicin ML [9], garvieacin Q [10], garvicin A [11] và garvicin KS [12]. Một số hợp chất kháng khuẩn khác do *L. garvieae* sản xuất cũng được phát hiện nhưng chưa tinh sạch [13].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi phân lập và định danh chủng *L. garvieae* từ hệ tiêu hóa tôm thu nhận tại Thừa Thiên Huế. Sau đó, chúng tôi kiểm tra khả năng đối kháng lên các nhóm *Vibrio spp.* phân lập từ tôm cá bị bệnh cũng như *Escherichia coli* và *Staphylococcus aureus*. Đây là cơ sở tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo về khả năng sản xuất các chất kháng khuẩn từ chủng vi khuẩn này.

2 Đối tượng và phương pháp

2.1 Đối tượng và nguyên liệu

Môi trường MRS (Man, Rogosa and Sharpe) có thành phần gồm peptone, cao thịt, cao nấm men, glucose, tween 80, $C_6H_{14}N_2O_7$, CH_3COONa , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnSO_4 \cdot H_2O$ và K_2HPO_4 mua từ công ty Biokar Diagnostics, Ấn Độ và được sử dụng nuôi cấy chọn lọc nhóm vi khuẩn lactic theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Môi trường peptone kèm gồm các thành phần peptone, NaCl, pH 8,6 được sử dụng nuôi cấy *Vibrio sp.* theo TCVN 7905-1:2008(ISO/TS 21872-1:2007).

Môi trường LB (Luria Bertani) gồm 1% tryptone, 0,5% cao nấm men, 1% NaCl sử dụng trong nuôi cấy vi khuẩn bằng khuếch tán đĩa thạch.

Các chủng vi khuẩn *Vibrio* spp. phân lập từ tôm xác định bị bệnh gan tụy cấp được Phòng thí nghiệm Công nghệ Gen, Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế cung cấp. Chủng vi khuẩn *E. coli* ATCC 85922 và *S. aureus* ATCC 25023 được sử dụng làm đối chứng cho khả năng đối kháng nhóm vi khuẩn gram âm và gram dương của vi khuẩn lactic phân lập.

2.2 Phương pháp

Phân lập vi khuẩn lactic từ mẫu tôm

Tôm thu nhận ở các ao thuộc huyện Quảng Điền và Phú Vang, Thừa Thiên Huế, sau khi mang về phòng thí nghiệm được rửa sạch và khử trùng bên ngoài bằng ethanol 70%; tôm thu ở các địa điểm khác nhau được giải phẫu riêng biệt để thu nhận hệ tiêu hóa. Mỗi hệ tiêu hóa tôm được đồng hóa trong 500 μ L dung dịch muối sinh lý, sau đó hút 200 μ L dịch cấy chuyển qua ống nghiệm chứa 5 mL môi trường MRS đã được hấp khử trùng, ủ ở 30 °C trong 24 giờ ở điều kiện kỵ khí. Sau khi ủ, dịch nuôi cấy được cấy chuyển qua môi trường MRS agar. Khuẩn lạc đơn được chọn lọc và tiếp tục cấy chuyển lên môi trường MRS 4 lần để thuần khiết khuẩn lạc.

Những khuẩn lạc trắng đục hoặc trắng trong, không màu, bờ láng, lồi, bìa nguyên, nằm trên đường cấy chuyển và không lẫn với những khuẩn lạc có hình thái và màu sắc lạ, có khả năng phân giải CaCO_3 có trong môi trường được chọn lọc cho nghiên cứu tiếp theo [14].

Sàng lọc khả năng đối kháng với *Vibrio parahaemolyticus*

Khả năng đối kháng *V. parahaemolyticus* của các chủng vi khuẩn được sàng lọc bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch với một vài điều chỉnh nhỏ. Khả năng đối kháng *V. parahaemolyticus* được xác định thông qua vòng đối kháng xuất hiện trên đĩa thạch [15]. Dịch huyền phù của dòng chỉ thị *Vibrio* sp. được nhân sinh khối và điều chỉnh để đạt mật độ 10^8 tế bào/mL. 50 μ L dịch nuôi cấy được cấy trải lên môi trường LB đã hấp khử trùng sẵn. Các giếng với đường kính 6 mm được tạo trên trên mặt môi trường bằng thanh kim loại vô trùng. Vi khuẩn lactic được nhân sinh khối trong 5 mL môi trường MRS, lắc 180 vòng/phút ở 30 °C. Sau 24 giờ nuôi cấy, mật độ tế bào được điều chỉnh đến mật độ 10^8 tế bào/mL và ly tâm 8.000 vòng/phút trong 15 phút ở 4 °C để loại bỏ tế bào. 50 μ L dung dịch sau ly tâm được cho vào từng giếng trên đĩa thạch đã chứa vi khuẩn *V. parahaemolyticus*. Mẫu được ủ ở 4 °C trong 15 phút đến khi dung dịch trong giếng khuếch tán đều. Sau đó, đĩa được tiếp tục ủ ở 30 °C trong 24 giờ và kiểm tra đường kính vòng vô khuẩn (zone diameter of inhibition) (ZDI) xuất hiện trên bề mặt đĩa.

Mức độ đối kháng được đánh giá dựa vào ZDI: Không đối kháng: ZDI = 0 mm; Đối kháng yếu: $0 < \text{ZDI} \leq 10$ mm ; Đối kháng trung bình: $11 < \text{ZDI} \leq 14$ mm; Đối kháng mạnh: $\text{ZDI} \geq 15$ mm [15].

Hoạt tính kháng khuẩn được tính theo công thức:

$$\text{AU/mL} = (\text{ZDI} \times 1000) / V \text{ (dịch cho vào giếng) } (\mu\text{L}) [16].$$

Xác định một số đặc điểm hóa sinh và định danh phân tử

Các dòng vi khuẩn lactic đối kháng *V. parahaemolyticus* được tiến hành nhuộm gram, xác định hoạt tính catalase và quan sát hình thái dưới kính hiển vi quang học (Nikon eclipse 55i, Nhật Bản). Dòng vi khuẩn có hình dạng khác nhau được lựa chọn định danh phân tử nhằm xác định chính xác loài.

Các chủng vi khuẩn thể hiện khả năng đối kháng *V. parahaemolyticus* mạnh được chọn nuôi tăng sinh trong 5 mL môi trường MRS. Sinh khối vi khuẩn được thu nhận bằng ly tâm 8000 vòng/phút trong 3 phút. DNA tổng số được tách chiết sử dụng đệm CTAB như mô tả của của Sambrook và cs. với một vài điều chỉnh nhỏ [17]. Sau khi kiểm tra chất lượng bằng điện di trên gel agarose 0,8%, DNA tổng số được sử dụng làm khuôn mẫu cho phản ứng PCR khuếch đại trình tự 16S rRNA bằng cặp primer 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1492R (5' GGTTACCTTGTTACGACTT-3). Sản phẩm PCR được tinh sạch và giải trình tự nucleotide tại công ty Firstbase (Malaysia). Trình tự nucleotide được so sánh đối chiếu với dữ liệu trên Genbank. Cây phát sinh loài được xây dựng với phần mềm MEGA X [18].

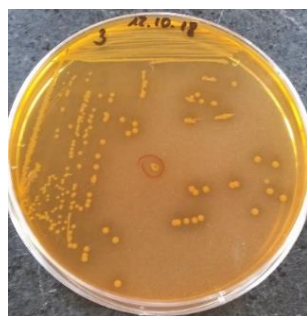
Khả năng đối kháng *E. coli* ATCC 85922 và *S. aureus* ATCC 25023

Khả năng kháng vi khuẩn gram âm và gram dương của chủng vi khuẩn lactic kháng *V. parahaemolyticus* mạnh nhất được tiến hành trên vi sinh vật chuẩn *E. coli* ATCC 85922 và *S. aureus* ATCC 25023 bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch như mô tả ở trên. Đường kính vòng đối kháng được đo và so sánh đối chiếu xác định mức độ đối kháng.

3 Kết quả và thảo luận

Phân lập nhóm vi khuẩn lactic

Từ 23 mẫu hệ tiêu hóa tôm thu nhận trên địa bàn tỉnh Thừa Thiên Huế, nhóm vi khuẩn lactic tiềm năng được phân lập trên môi trường MRS agar có bổ sung CaCO_3 . Trong quá trình sinh trưởng và phát triển, các chủng vi khuẩn lactic tiềm năng giải phóng acid hữu cơ trung hòa CaCO_3 làm xuất hiện vòng trong (vòng halo) quanh khuẩn lạc. Các chủng vi khuẩn phát triển trên môi trường đồng thời xuất hiện vòng hòa tan CaCO_3 được thu nhận cho bước sàng lọc tiếp theo (Hình 1). Kết quả sàng lọc cho thấy có tổng số 27 chủng vi khuẩn đáp ứng các đặc tính của nhóm vi khuẩn lactic như tròn, bóng, bìa nguyên theo mô tả của Kandler và Weiss [14]. Do đó, các chủng vi khuẩn được tuyển chọn cho nghiên cứu khả năng đối kháng *V. parahaemolyticus*.



Hình 1. Khuẩn lạc các chủng vi khuẩn trên môi trường MRS agar có bổ sung CaCO_3

Sàng lọc khả năng đối kháng *V. parahaemolyticus*

Các chủng vi khuẩn lactic được kiểm tra khả năng ức chế sinh trưởng của *V. parahaemolyticus* thông qua nuôi cấy khuếch tán bề mặt. Đã thu được 17 chủng đối kháng *V. parahaemolyticus*. Khả năng đối kháng *V. parahaemolyticus* ở các chủng khác nhau có sự phân hóa rõ rệt (Hình 2). Vòng vô khuẩn tồn tại xung quanh lỗ thạch chứng tỏ các chủng vi khuẩn đã tiết chất kháng khuẩn ức chế khả năng sinh trưởng của *V. parahaemolyticus*. Đây là kết quả sàng lọc sơ bộ ban đầu để thu nhận các chủng có hoạt tính kháng khuẩn có tiềm năng probiotic.

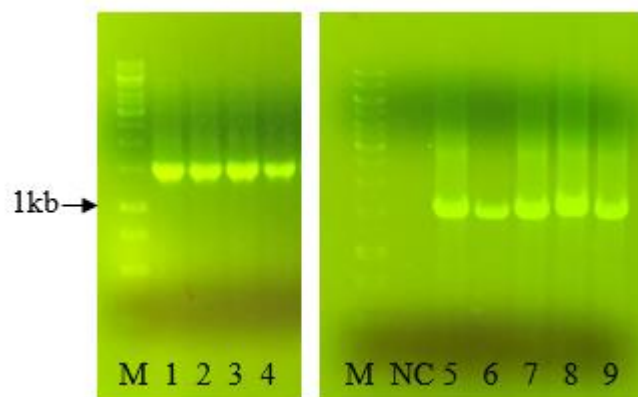
Định danh phân tử chủng tuyển chọn

Một số đặc điểm hình thái và hóa sinh cơ bản của các chủng vi khuẩn đối kháng *V. parahaemolyticus* như nhuộm gram, hoạt tính catalase được phân tích và quan sát hình thái dưới kính hiển vi. Đã thu được 9 chủng gram dương và 8 chủng gram âm. Tất cả đều âm tính với catalase và không hình thành bào tử.

Tất cả các chủng gram dương được nuôi cấy để thu sinh khối và tách chiết DNA tổng số làm khuôn mẫu cho phản ứng PCR khuếch đại đoạn 16S rRNA với cặp primer 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1492R (5' GGTTACCTTGTTACGACTT-3). Từ phản ứng PCR đã thu nhận được các band có kích thước khoảng 1500 bp. Sản phẩm PCR có band đặc hiệu và không xuất hiện sản phẩm phụ (Hình 3).



Hình 2. Hình ảnh đối kháng *V. parahaemolyticus* của một số chủng vi khuẩn lactic phân lập

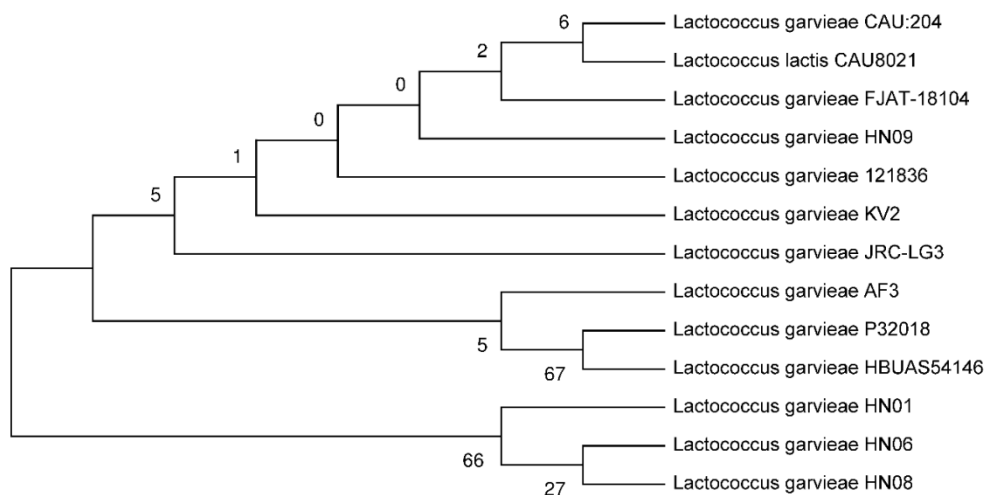


Hình 3. Sản phẩm PCR đoạn 16S rRNA trên gel agarose, M: GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo), NC: đối chứng âm, 1–9: sản phẩm PCR của khuẩn lạc 1–9

Các sản phẩm PCR được giải trình tự nucleotide. Phân tích đối chiếu dữ liệu trên Genbank cho thấy có 4 chủng tương đồng với trình tự 16S rRNA của *L. garvieae* như *L. garvieae* JRC-LG3 (LC377166), *L. garvieae* KV2 (KX261615), *L. garvieae* 121836 (LC004105), *L. garvieae* FJAT-18104 (MF385039), *L. garvieae* CAU:204 (MF369865), *L. garvieae* strain AF3 (KY438193), *L. garvieae* P32018 (MK559546), *L. garvieae* HBUAS54146 (MH701935). Các chủng vi sinh vật được đặt tên là *L. garvieae* HN01, *L. garvieae* HN06, *L. garvieae* HN08 và *L. garvieae* HN09. Trình tự 16S rRNA của các chủng *L. garvieae* cũng được đăng ký trên ngân hàng gen Genbank với các mã số lần lượt là MK989998, MK990003, MK990005 và MK990006. Các chủng *L. garvieae* HN061, *L. garvieae* HN06 và *L. garvieae* HN08 có mức độ tương đồng cao trong khi *L. garvieae* HN09 có mức độ tương đồng thấp hơn và xếp vào các nhóm phát sinh khác nhau (Hình 4).

Nghiên cứu phổ kháng *Vibrio* spp. của *L. garvieae*

Kết quả khảo sát sơ bộ khả năng đối kháng *V. parahaemolyticus* bằng các chủng *L. garvieae* cho thấy chủng HN09 có đường kính vòng vô khuẩn cao nhất (16 mm) (Bảng 1). Vì vậy, chủng *L. garvieae* HN09 được chúng tôi lựa chọn cho nghiên cứu sâu hơn về phổ kháng nhóm vi sinh vật gây bệnh. Kết quả ở Bảng 1 cho thấy *L. garvieae* HN09 đối kháng mạnh với các chủng *Vibrio* spp. phân lập từ mẫu tôm được chẩn đoán mắc hội chứng gan tụy cấp, cá bị bệnh lở loét.



Hình 4. Cây phát sinh loài của các chủng *L. garvieae* phân lập và một số chủng *L. garvieae* trên ngân hàng Genbank.

Cây phát sinh được xây dựng dựa trên thuật toán Maximum Likelihood method. Cây có mức độ tương đồng likelihood cao nhất được lựa chọn. Các chữ số biểu diễn phần trăm của cây phát sinh có liên quan đến nhóm phân loại tiếp theo.

Bảng 1. Đường kính vòng vô khuẩn của *L. garvieae* HN09 đối với *Vibrio* spp. phân lập trên tôm, cá bị bệnh

Nguồn gốc <i>Vibrio</i> spp.	Ký hiệu chủng <i>Vibrio</i>	Đường kính vòng vô khuẩn ZDI (mm)	Hoạt tính kháng khuẩn (AU/mL)
Tôm nhiễm bệnh	VTVV4(3)	22	440
	VTVV2(8)	15	300
	VTVV3(3)	17	340
	VTVX3a(13)	18	360
	VTVX2a(11)	14	280

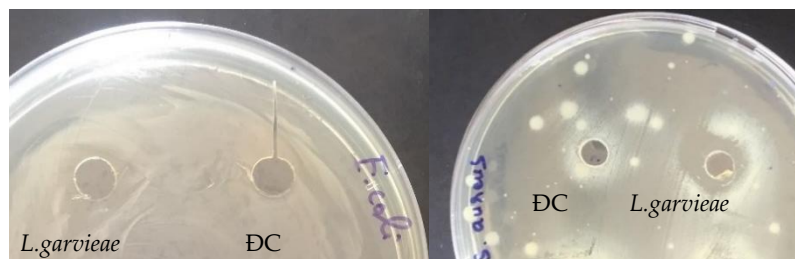
Nguồn gốc <i>Vibrio</i> spp.	Ký hiệu chủng <i>Vibrio</i>	Đường kính vòng vô khuẩn ZDI (mm)	Hoạt tính kháng khuẩn (AU/mL)
	VTVV4(1)	12	240
	VTVV1(6)	17	340
	VTVX1a(9)	8	160
	VTVX4a	13	260
	VTVV4(4)	22	440
	VTVV2(7)	23	460
	VC7	18	360
	VC1	19	380
	VC13	18	360
Cá nhiễm bệnh	VC14	18	360
	VC9	18	360
	VC12	16	320
	VC5	18	360

Các số liệu thu được cho thấy chủng *L. garvieae* phân lập từ hệ tiêu hóa tôm khỏe mạnh có phổ kháng *Vibrio* spp. rất rộng. *L. garvieae* HN09 ức chế sự sinh trưởng của 11 chủng *Vibrio* spp. phân lập từ tôm được chẩn đoán mắc bệnh gan tụy cấp và 7 chủng *Vibrio* spp. phân lập từ cá được chẩn đoán bị loét. Theo cách đánh giá khả năng đối kháng của Tagg và cs. thì ZDI của *L. garvieae* HN09 đối với các chủng *Vibrio* spp. khác nhau thì khác nhau [15]. ZDI đối với VTVV4(3), VTVV2(8), VTVV3(3), VTVX3a(13), VTVV1(6), VTVV4(4), VTVV2(7) và tất cả *Vibrio* spp. trên cá hiện có đều ≥ 15 mm, chứng tỏ *L. garvieae* HN09 có hoạt tính kháng khuẩn mạnh.

Rahman và cs. khi phân lập các chủng *Lactobacillus* như *L. fermentum*, *L. casei* và *L. acidophilus* từ sữa trâu cho thấy có sự ức chế đối với *V. cholerae*, *S. typhi*, *E. coli*, và *Shigella* với ZDI từ 10 đến 22 mm [19]. Manzoor và cs. đã chứng minh rằng các chủng *Lactobacillus* bao gồm *L. plantarum*, *L. fermentum* và *L. salivarius* phân lập từ rau quả lên men có phổ kháng khuẩn rộng (ZDI: 26–28 mm) và có khả năng chống lại các vi khuẩn gây bệnh [20].

Hoạt tính kháng *E. coli* và *S. aureus*

Vòng đối kháng đối với chủng vi khuẩn *E. coli* và *S. aureus* của *L. garvieae* HN09 cho thấy *L. garvieae* HN09 kháng *E. coli* ATCC 85922 ở mức độ trung bình (đường kính vòng đối kháng là 11 mm, tương ứng 220 AU/mL), trong khi thể hiện kháng khá mạnh trên *S. aureus* ATCC 25023 (đường kính vòng đối kháng 15 mm, 300 AU/mL) (Hình 5). *S. aureus* là một trong những vi khuẩn sản sinh độc tố phổ biến nhất và nó được coi là nguyên nhân chính gây ngộ độc thực phẩm do tụ cầu và viêm dạ dày ruột trên toàn thế giới. Mức độ nguy hiểm của nội độc tố do chủng này sinh ra đối với sức khỏe cộng đồng đã được ghi nhận trong các loại phô mai khác nhau [21]. Trong khi đó, *E. coli* – một loại vi khuẩn đường ruột – là tác nhân chính gây tiêu chảy ở gia súc còn nhỏ như lợn con, bê, nghé, dê, cừu con [22].



Hình 5. Vòng đối kháng *E. coli* ATCC 85922 và *S. aureus* ATCC 25023 của *L. garvieae* HN09 (ĐC: đối chứng âm)

L. garvieae phân lập từ sữa thô và các sản phẩm từ sữa có khả năng ức chế các chủng vi khuẩn gây bệnh do khả năng tạo bacteriocin [5]. Abdelfatah và cs. đã chứng minh *L. garvieae* sản xuất các chất có hoạt tính ức chế tốt đối với *S. aureus* trong phô mai bị ô nhiễm nhân tạo trong quá trình bảo quản trong tủ lạnh [23]. Alomar và cs. cho rằng hydro peroxide có thể đóng vai trò trong việc ức chế *S. aureus* của *L. garvieae* [24]. Hiệu quả của *L. garvieae* trong việc ức chế *S. aureus* cũng có thể phụ thuộc vào sự tương tác của cả hai sinh vật này với hệ vi sinh vật sữa thô [25]. *Lactococcus* khác như *Lactococcus lactis* RM39 thể hiện hoạt tính bacteriocin mạnh (1600 AU/mL) ức chế *Klebsiella pneumoniae* ATCC 12296, trong khi bốn chủng vi khuẩn lactic khác có hoạt tính ức chế là 800 AU/mL đối với *E. coli* [26].

4 Kết luận

Nghiên cứu đã phân lập và định danh được 4 chủng *L. garvieae* từ hệ tiêu hóa tôm khỏe mạnh có hoạt tính đối kháng nhóm vi khuẩn *Vibrio* spp.. Trong đó, chủng *L. garvieae* HN09 đối kháng mạnh với nhiều loài *Vibrio* spp. phân lập từ tôm nhiễm hội chứng hoại tử gan tụy cấp và cá nhiễm bệnh lở loét, hoạt tính kháng khuẩn cao nhất đạt 460 AU/mL. Ngoài ra, chủng vi khuẩn phân lập *L. garvieae* HN09 thể hiện hoạt tính ức chế đối với sự phát triển của *E. coli* ATCC 85922 và *S. aureus* ATCC 25023, hoạt tính kháng khuẩn đạt tương ứng là 220 AU/mL và 300 AU/mL. Đây là nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam phân lập *L. garvieae* từ hệ tiêu hóa tôm có hoạt tính đối kháng *Vibrio* spp. Kết quả nghiên cứu tạo tiền đề cho các nghiên cứu sâu hơn về tiềm năng ứng dụng chủng *L. garvieae* HN09 tạo chế phẩm sinh học nhằm kiểm soát nhóm vi khuẩn *Vibrio* spp. gây bệnh trên tôm cá, cũng như nhóm vi khuẩn gram âm và gram dương khác, một giải pháp tiềm năng thay thế việc điều trị bằng kháng sinh đối với các loại vi khuẩn gây bệnh.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ từ Bộ Giáo dục và Đào tạo qua đề tài khoa học và công nghệ cấp Bộ (mã số: CT-2018-DHH-06).

Tài liệu tham khảo

1. Abdullah SA, Osman MM. Isolation and identification of lactic acid bacteria from raw cow milk, white cheese and rob in Sudan. Pak J Nutr. 2010;9(12):1203-6.
2. Kaktcham PM, Zambou NF, Tchouanguép FM, El-Soda M, Choudhary MI. Antimicrobial and safety properties of *Lactobacilli* isolated from two cameroonian traditional fermented foods. Sci Pharm. 2012 Jan-Mar;80(1):189-203.

3. Brashears MM, Jaroni D, Trimble J. Isolation, selection, and characterization of lactic acid bacteria for a competitive exclusion product to reduce shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle. *J Food Prot.* 2003 Mar;66(3):355-63.
4. Chen YJ, Son KS, Min BJ, Cho JH, Kwon OS, Kim IH. Effects of dietary probiotic on growth performance, nutrients digestibility, blood characteristics and fecal noxious gas content in growing pigs. *Asian-Australas J Anim Sci.* 2005;18(10):1464-8.
5. Villani F, Aponte M, Blaiotta G, Mauriello G, Pepe O, Moschetti G. Detection and characterization of a bacteriocin, garviecin L1-5, produced by *Lactococcus garvieae* isolated from raw cow's milk. *J Appl Microbiol.* 2001 Mar;90(3):430-9.
6. Holzapfel WH, Geisen R, Schillinger U. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int J Food Microbiol.* 1995 Jan;24(3):343-62.
7. Nettles CG, Barefoot SF. Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. *J Food Prot.* 1993 Apr;56(4):338-56.
8. Wang CY, Shie HS, Chen SC, Huang JP, Hsieh IC, Wen MS, et al. *Lactococcus garvieae* infections in humans: possible association with aquaculture outbreaks. *Int J Clin Pract.* 2007 Jan;61(1):68-73.
9. Borrero J, Brede DA, Skaugen M, Diep DB, Herranz C, Nes IF, et al. Characterization of garviecin ML, a novel circular bacteriocin produced by *Lactococcus garvieae* DCC43, isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Appl Environ Microbiol.* 2011 Jan;77(1):369-73.
10. Tosukh Wong A, Zendo T, Visessanguan W, Roytrakul S, Pumpuang L, Jaresitthikunchai J, et al. Garvieacin Q, a novel class II bacteriocin from *Lactococcus garvieae* BCC 43578. *Appl Environ Microbiol.* 2012 Mar;78(5):1619-23.
11. Maldonado-Barragan A, Cardenas N, Martinez B, Ruiz-Barba JL, Fernandez-Garayzabal JF, Rodriguez JM, et al. Garviecin A, a novel class II d bacteriocin from *Lactococcus garvieae* that inhibits septum formation in *L. garvieae* strains. *Appl Environ Microbiol.* 2013 Jul;79(14):4336-46.
12. Ovchinnikov KV, Chi H, Mehmeti I, Holo H, Nes IF, Diep DB. Novel group of leaderless multipetide bacteriocins from gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 2016 Sep 1;82(17):5216-24.
13. Suneel D, Basappa K. Identification and characterization of *Lactococcus garvieae* and antimicrobial activity of its bacteriocin isolated from cow's milk. *Asian J Pharm Clin Res.* 2013;6(3):104-8.
14. Kandler O, Weiss N. Regular, non-sporing gram-positive rods. In: Sneath HA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1986.
15. Tagg JR, McGiven AR. Assay system for bacteriocins. *Appl Microbiol.* 1971 May;21(5):943.
16. Iyapparaj P, Maruthiah T, Ramasubburayan R, Prakash S, Kumar C, Immanuel G, et al. Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus* sp. MSU3IR against shrimp bacterial pathogens. *Aquat Biosyst.* 2013 Jun 1;9(1):12.
17. Sambrook S., Russell RD. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor; 2003.
18. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol.* 2018 Jun 1;35(6):1547-9.
19. Forhada MH, Rahmana SMK, Rahmana S, Saikota FK, Biswasb KC. Probiotic properties analysis of isolated lactic acid bacteria from buffalo milk. *Arch Clin Microbiol.* 2015;7(1):5.
20. Manzoor A, Ul-Haq I, Baig S, Qazi JI, Seratlic S. Efficacy of locally isolated lactic acid bacteria against antibiotic-resistant uropathogens. *Jundishapur J Microbiol.* 2016 Jan;9(1):e18952.
21. Meyrand A, Boutrand-Loei S, Ray-Gueniot S, Mazuy C, Gaspard CE, Jaubert G, et al. Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of Camembert-type cheeses from raw goats' milk. *J Appl Microbiol.* 1998 Sep;85(3):537-44.
22. Morin M, Lariviere S, Lallier R. Pathological and microbiological observations made on spontaneous cases of acute neonatal calf diarrhea. *Can J Comp Med.* 1976 Jul;40(3):228-40.

23. Abdelfatah EN, Mahboub HHH. Studies on the effect of *Lactococcus garvieae* of dairy origin on both cheese and Nile tilapia (*O. niloticus*). Int J Vet Sci Med. 2018 Dec;6(2):201-7.
24. Alomar J. Study of physiological properties of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garvieae* for the control of *Staphylococcus aureus* in technology Cheese. Nancy: National Polytechnic Institute of Lorraine; 2007.
25. Delbes-Paus C, Dorchies G, Chaabna Z, Callon C, Montel MC. Contribution of hydrogen peroxide to the inhibition of *Staphylococcus aureus* by *Lactococcus garvieae* in interaction with raw milk microbial community. Food Microbiol. 2010 Oct;27(7):924-32.
26. Shehata MG, El Sohaimy SA, El-Sahn MA, Youssef MM. Screening of isolated potential probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering property and bile salt hydrolase activity. Ann Agric Sci. 2016;61(1):65-75.