

PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN VÀ NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM CỦA CHỦNG VI KHUẨN *Enterococcus faecalis* ET04 CÓ KHẢ NĂNG SINH BACTERIOICIN

Dương Văn Hoàn, Đặng Thị Thanh Tâm,
Đinh Trường Sơn, Nguyễn Xuân Trường, Phạm Thị Dung, Nguyễn Xuân Cảnh*

Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

*Tác giả liên hệ: nxcanh@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 19.09.2022

Ngày chấp nhận đăng: 29.06.2023

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu xác định được chủng *Enterococcus* có khả năng sinh bacteriocin, định hướng ứng dụng bổ sung vào thức ăn nuôi trồng thủy sản và thay thế việc sử dụng thuốc kháng sinh hiện nay. Trong nghiên cứu này, chủng ET04 được phân lập và đánh giá khả năng đối kháng với vi sinh vật kiểm định *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas jandaei*. Kết quả nghiên cứu cho thấy, chủng ET04 được xác định là có khả năng sinh bacteriocin ức chế sự phát triển của các vi sinh vật kiểm định. Hợp chất bacteriocin sinh ra bởi chủng ET04 hoạt động ổn định ở pH 2,0 đến 8,0. Trên môi trường MRS có bổ sung 3% glucose và cao nấm men, chủng ET04 cho thấy khả năng sinh bacteriocin cao với đường kính vòng kháng khuẩn $14,16 \pm 0,81$ đến $21,67 \pm 0,47$ mm. Kết hợp các đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hoá và phân tích trình tự gen mã hoá 16S rRNA, chủng ET04 được xác định là *Enterococcus faecalis*.

Từ khoá: Bacteriocin, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas jandaei*.

Isolation, Selection, and Characterisation of *Enterococcus faecalis* ET04 Capable of Producing Bacteriocin

ABSTRACT

The study was carried out to identify *Enterococcus* strains capable of producing bacteriocins, orienting the applications as a supplement to aquaculture feeds and replacing the current use of antibiotics. In this study, bacterial strain ET04 was isolated and evaluated for its ability to antagonize against *Staphylococcus aureus* and *Aeromonas jandaei*. The research results showed that the bacterial strain ET04 was determined to have the ability to produce bacteriocin that inhibited the growth of the tested microorganisms. The bacteriocin compound produced by strain ET04 was stable at pH 2.0 to 8.0 and most of the antibacterial activity was lost at pH 10; at pH 12.0 the antibacterial activity was completely lost. On MRS medium supplemented with 3% glucose and yeast extract, bacterial strain ET04 showed the best bacteriocin production ability. Combining morphological, physiological, biochemical, and sequence analysis of 16S rRNA genes, strain ET04 was identified as *Enterococcus faecalis* ET04.

Keywords: Bacteriocin, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas jandaei*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nuôi trồng thủy sản là ngành thực phẩm có tốc độ phát triển nhanh nhất và chiếm 50% sản lượng thực phẩm trên toàn cầu, đóng góp cho an ninh thực phẩm và phát triển kinh tế xã hội ở nhiều quốc gia (Subasinghe, 2017). Tại Việt Nam, theo số liệu của Tổng cục Thống kê, tổng sản lượng khai thác của cả nước năm 2020 là

3.863,7 nghìn tấn, đạt 102,3% so với năm 2019. Hiện nay việc sử dụng các chất kháng sinh trong lĩnh vực nuôi trồng thủy sản được coi là một phương pháp hiệu quả giúp giảm ảnh hưởng của các mầm bệnh gây ra bởi vi khuẩn. Tuy nhiên, việc sử dụng các chất kháng sinh trong kiểm soát các mầm bệnh đang được giảm thiểu tại nhiều quốc gia trên thế giới do gặp phải vấn đề kháng kháng sinh và tồn dư kháng

sinh trên một số loại thủy sản (Assefa & Abunna, 2018).

Probiotic được biết đến với tiềm năng thay thế chất kháng sinh như một tác nhân kiểm soát mầm bệnh sinh học. Mặt khác, probiotic là một chiến lược để cải thiện phản ứng miễn dịch và hiệu suất tăng trưởng của thủy sản (Ramos & cs., 2017). Các chủng vi khuẩn *Enterococcus* được biết đến như một loại probiotic mới, chúng bao gồm các chủng *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*,... đã được chứng minh là có hiệu quả chống lại các vi sinh vật gây bệnh trên thủy sản bằng cách sản xuất các hợp chất kháng khuẩn như bacteriocin (Baccouri & cs., 2019). Bacteriocin có bản chất là các phân tử protein được tổng hợp ở ribosome của vi khuẩn, có khả năng kháng lại các tác nhân gây bệnh là vi khuẩn do sự tạo thành các kênh làm thay đổi tính thấm của màng tế bào. Một số loại bacteriocin còn có khả năng phân giải DNA, RNA và tấn công vào lớp peptidoglycan để làm suy yếu thành tế bào.

Hachin & cs. (2018), đã báo cáo rằng các chủng vi khuẩn thuộc chi *Enterococcus* có tiềm năng sử dụng như một chất bảo quản sinh học nguồn gốc từ tự nhiên, có khả năng bổ sung vào các chế phẩm sinh học hay các chế phẩm probiotic giúp thay thế thuốc kháng sinh do có khả năng sản xuất bacteriocin giúp ngăn chặn sự phát triển của các chủng vi sinh vật gây bệnh. Đặc tính, phổ kháng khuẩn và khối lượng phân tử của bacteriocin sinh ra từ vi khuẩn này cho thấy rằng nó là một loại bacteriocin mới có giá trị nghiên cứu, tiềm năng trong các lĩnh vực như chăn nuôi, nuôi trồng thủy sản. Lui & cs. (2019) báo cáo rằng chủng vi khuẩn *E. faecalis* Gr17 được phân lập từ cá muối truyền thống của Trung Quốc có khả năng sinh bacteriocin thuộc loại enterocin Gr17, bacteriocin do chủng này sinh ra hoạt động ổn định ở nhiệt độ cao (60°C, 30 phút và 121°C, 15 phút) và hoạt động trong phổ pH rộng (2-10), enterocin Gr17 có giá trị tiềm năng như một chất bảo quản sinh học thực phẩm.

Tuy nhiên, kiến thức về tiềm năng probiotic của các chủng vi khuẩn *Enterococcus* tại Việt Nam hiện nay vẫn còn hạn chế. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện với mong muốn phát

hiện và xác định các chủng vi khuẩn *Enterococcus* có khả năng sinh bacteriocin kiểm soát mầm bệnh trong nuôi trồng thủy sản.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thu thập mẫu

Mẫu cá phục vụ cho nghiên cứu được thu thập từ các ao nuôi cá nước ngọt tại một số khu vực trên địa bàn Hưng Yên, Thái Bình và Nam Định theo phương pháp mô tả bởi Sahoo & cs. (2015). Mẫu vật sau khi thu thập được bảo quản trong điều kiện lạnh và vận chuyển ngay về phòng thí nghiệm. Sau khi vận chuyển về phòng thí nghiệm, các mẫu cá được rửa sạch bề mặt ngoài bằng nước và dung dịch Natri clorid 0,9%, sau đó các mẫu này được tiến hành giải phẫu để lấy phần ruột bên trong cơ thể.

Các chủng vi sinh vật kiểm định gồm *Staphylococcus aureus* SA12 và *Aeromonas jandaei* AJ07 được phân lập từ mẫu cá chép bị bệnh thu thập tại Hưng Yên, được bảo quản, lưu trữ tại phòng thí nghiệm Bộ môn Công nghệ vi sinh, Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

2.2. Phân lập vi khuẩn *Enterococcus*

Các chủng vi khuẩn *Enterococcus* được phân lập theo phương pháp mô tả bởi Sahoo & cs. (2015). Một gram mẫu ruột cá từ các mẫu đã qua xử lý được cắt nhỏ và nghiền mịn để giải phóng toàn bộ vi sinh vật bên trong ruột cùng với 99ml dung dịch nước muối sinh lý vô trùng. Các mẫu sau khi đã đồng nhất được cấy trải trên đĩa môi trường MRS agar (g/l: Glucose 20,0; Meat extract 10,0; yeast extract 5,0; peptone 10,0; tween 80 1ml, triamonium citrate 2,0; K₂HPO₄.3H₂O 2,0; CH₃COONa 5,0; MgSO₄.7H₂O 0,58; MnSO₄.4H₂O 0,28; CaCO₃ 5,0; agar 15,0; pH = 6,5 ± 0,2) nuôi ở 30°C trong 48 giờ tại điều kiện kỵ khí. Từ các mẫu phân lập chọn ra các chủng vi khuẩn có hình dạng đặc trưng cho vi khuẩn *Enterococcus* như: khuẩn lạc kích thước nhỏ, màu trắng đục hoặc không màu, có khả năng phân giải CaCO₃. Các chủng vi khuẩn này sau đó được cấy chuyển nhiều lần trên môi trường MRS agar cho đến khi thu được khuẩn lạc đồng nhất. Sau đó được tiến

Phân lập, tuyển chọn và nghiên cứu đặc điểm của chủng vi khuẩn *Enterococcus faecalis* ET04 có khả năng sinh bacteriocin

hành nhuộm gram để xác định đặc điểm hình thái tế bào và chọn lọc các chủng *Enterococcus*.

2.3. Sàng lọc khả năng sinh bacteriocin của các chủng phân lập

2.3.1. Khảo sát khả năng kháng vi sinh vật kiểm định của các chủng phân lập

Khả năng kháng các chủng vi sinh vật kiểm định *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas jandaei* được sàng lọc bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch theo mô tả bởi Hernandez & cs. (2005). Các chủng *Enterococcus* được nuôi cấy trong môi trường MRS dịch thể ở 30°C trong 48 giờ. Dịch nuôi cấy vi khuẩn sau đó được ly tâm với tốc độ 10.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C để thu phần dịch nổi phía trên (phần dịch nổi phía trên được điều chỉnh pH về 6,5 bằng dung dịch NaOH để loại bỏ tác dụng của axit lactic). Một trăm micro-lit dịch sau khi xử lý được chuyển vào các giếng thạch trên đĩa Petri đã cấy trải chủng vi khuẩn kiểm định (chủng vi khuẩn kiểm định trước đó được nuôi cấy trong môi trường LB dịch thể ở 30°C trong 24 giờ). Đĩa thạch được đặt ở 4°C trong 2 giờ để dung dịch thí nghiệm khuếch tán hết toàn bộ, sau đó ủ ở 30°C và quan sát kết quả sau 12 giờ nuôi cấy. Hoạt tính kháng khuẩn của các chủng *Enterococcus* được thể hiện qua vòng kháng khuẩn xuất hiện quanh giếng thạch và được xác định bằng hiệu số giữa đường kính vòng kháng khuẩn và đường kính giếng thạch. $\Delta D = D - d$ (D: đường kính vòng kháng khuẩn (mm), d: đường kính giếng thạch (mm)).

2.3.2. Nhận biết khả năng sinh bacteriocin của các chủng phân lập

Phương pháp xử lý bởi nhiệt độ: Thí nghiệm xác định khả năng sinh bacteriocin bằng phương pháp xử lý bởi nhiệt độ được tiến hành theo mô tả bởi Rajaram & cs. (2010). Các chủng *Enterococcus* có khả năng ức chế sinh trưởng đối với chủng vi sinh vật kiểm định được nuôi cấy và xử lý dịch sau nuôi cấy theo phương pháp mô tả trong mục 2.3. Dung dịch sau khi loại bỏ tác dụng của acid lactic được xử lý ở các nhiệt độ 40°C, 60°C, 80°C, 100°C và 121°C trong 30 phút. Dịch sau khi xử lý ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau được kiểm tra hoạt tính kháng

khẩn bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch như đã mô tả ở trên.

Phương pháp xử lý với enzyme phân giải protein: Các chủng *Enterococcus* có khả năng kháng vi sinh vật kiểm định do có khả năng sinh bacteriocin được kiểm tra bằng cách xử lý với enzyme phân giải proteinase K (Bio Basic), trypsin để khẳng định bản chất protein của chất kháng khuẩn bacteriocin. Thí nghiệm được thực hiện theo Marwa & cs. (2015), hai trăm micro-lit dịch nuôi cấy đã qua xử lý (nuôi cấy và xử lý sau nuôi cấy theo phương pháp mô tả trong mục 2.3) được ủ với 10µl enzyme phân giải protein (10 mg/ml) ở 37°C trong 2 giờ, sau đó đun nóng ở 100°C trong 2 phút để loại bỏ các tác dụng còn lại của enzyme. Dịch đã xử lý với enzyme được kiểm tra hoạt tính kháng khuẩn bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch. Các giếng thạch không thể hiện hoặc suy giảm khả năng kháng khuẩn cho thấy chất kháng khuẩn có bản chất là protein nên bị phân giải bởi enzyme phân giải có thể là bacteriocin và ngược lại cho thấy chất kháng khuẩn không có bản chất là protein.

2.4. Định danh chủng vi khuẩn có khả năng sinh bacteriocin

DNA của các chủng *Enterococcus* được tách chiết theo phương pháp mô tả bởi Han & cs. (2018). Vùng gen mã hoá 16S rRNA của chủng tuyển chọn được nhân lên bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGC TCAG-3') và 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTCGACTT-3'). Phản ứng được thực hiện theo chu trình nhiệt: 95°C - 5 phút, 29 chu kỳ (95°C - 30 giây, 56°C - 30 giây, 72°C - 1 phút), 72°C trong 10 phút, giữ mẫu ở 4°C. Sản phẩm PCR được giải trình tự bằng phương pháp Sanger cải tiến tại công ty 1st BASE (Singapore). So sánh mức độ tương đồng về trình tự gen mã hoá 16S rRNA trên cơ sở dữ liệu GenBank bằng công cụ BLAST. Các trình tự tương đồng được căn bằng phần mềm BioEdit (version 7.2.5) sau đó xây dựng cây phát sinh loài của chủng tuyển chọn bằng phần mềm MEGA X (version 10.1.8), độ tin cậy được tính bằng thuật toán Bootstrap với 1.000 lần lặp lại. Dựa vào cây phát sinh loài, mức độ tương đồng trên cơ sở dữ liệu của GenBank và giá trị Bootstrap để xác định mối quan hệ di truyền của chủng tuyển chọn.

2.5. Ảnh hưởng của một số yếu tố đến hoạt tính kháng khuẩn của bacteriocin

2.5.1. Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính bacteriocin

Tác động của pH đối với hoạt tính kháng khuẩn được khảo sát bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch ở dải pH từ 2,0 đến 12,0 thực hiện theo phương pháp mô tả bởi Ogunbanwo & cs. (2003). Bacteriocin sinh ra bởi chủng tuyển chọn được điều chỉnh pH về 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 12,0 bằng dung dịch HCl và NaOH. Các mẫu đã xử lý được ủ ở 28°C trong 16 giờ. Hoạt tính kháng khuẩn được khảo sát bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch.

2.5.2. Khảo sát ảnh hưởng của thành phần môi trường đến khả năng sinh bacteriocin của chủng tuyển chọn

Ảnh hưởng của thành phần môi trường được thực hiện theo phương pháp mô tả bởi Nguyễn Văn Thành & Nguyễn Ngọc Trai (2012). Chủng tuyển chọn được nuôi cấy trên môi trường MRS dịch thể có bổ sung glucose, cao nấm men và NaCl với hàm lượng 1, 2, 3% w/v để kiểm tra ảnh hưởng của các thành phần môi trường đến khả năng sản sinh bacteriocin. Hoạt tính bacteriocin ở môi trường bổ sung các nguồn carbon và nitơ với hàm lượng khác nhau được khảo sát bằng

phương pháp khuếch tán đĩa thạch.

2.6. Xử lý số liệu

Số liệu được thu thập và xử lý sơ bộ bằng phần mềm thống kê Statgraphics Centurion (version 19.1.2). Phần mềm GraphPad Prism 9.0.2 được sử dụng để xây dựng biểu đồ và xử lý thống kê. Sự sai khác giữa các giá trị trung bình được phân tích bằng phân tích phương sai ANOVA với độ tin cậy $P < 0,05$ (nested one-way ANOVA). Hậu kiểm các giá trị trung bình theo cặp được so sánh bằng phương pháp Tukey's test.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập vi khuẩn *Enterococcus*

Trên môi trường MRS agar, thu được 12 chủng vi khuẩn có khả năng phân giải CaCO_3 từ 8 mẫu cá thu thập được tại các địa bàn trong khu vực Hưng Yên, Thái Bình và Nam Định. Các chủng phân lập được đều có màu trắng đục, khuẩn lạc hình tròn có kích thước nhỏ. Trong đó, 4/12 chủng (chiếm tỷ lệ 33,33%) có đặc trưng của chủng *Enterococcus* là cầu khuẩn, Gram dương, có khả năng di động và âm tính với catalase theo khoá phân loại của Bergey (Vos & cs., 2011) (Bảng 1). Các chủng *Enterococcus* được tuyển chọn để sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

Bảng 1. Đặc tính sinh học của các chủng *Enterococcus*

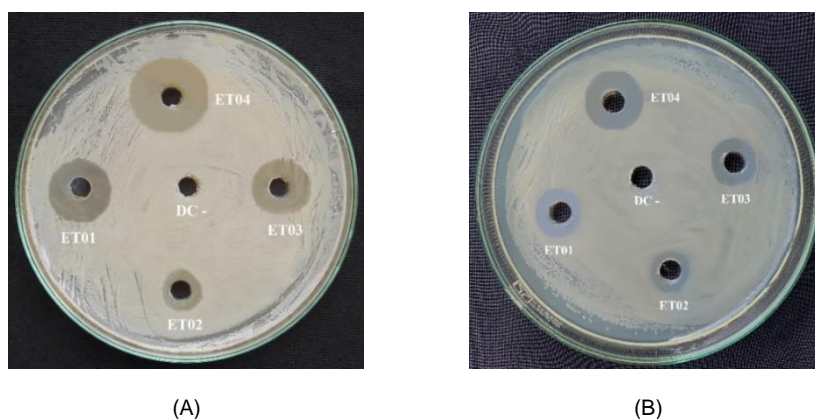
Chủng vi khuẩn	Đặc điểm hình thái	Đặc điểm tế bào	Thử nghiệm catalase	Khả năng di động
ET01	Tròn, bìa nguyên, nổi mô, trắng sữa	Cầu khuẩn, Gram (+)	-	+
ET02	Tròn nhỏ, bìa nguyên, nổi mô, trắng sữa	Cầu khuẩn, Gram (+)	-	+
ET03	Tròn, bìa nguyên, nổi mô, trắng sữa	Cầu khuẩn, Gram (+)	-	+
ET04	Tròn, bìa nguyên, dẹt, trắng sữa	Cầu khuẩn, Gram (+)	-	+

Ghi chú: (-): Âm tính; (+) Dương tính.

Bảng 2. Đường kính vòng kháng khuẩn của các chủng phân lập

Chủng vi khuẩn	Hoạt tính kháng khuẩn (D – d) mm	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Aeromonas jandaei</i>
ET01	15,73 ± 0,64	11,56 ± 0,51
ET02	10,20 ± 0,20	10,73 ± 0,64
ET03	15,93 ± 0,30	13,20 ± 0,20
ET04	21,67 ± 0,47	14,16 ± 0,81

Phân lập, tuyển chọn và nghiên cứu đặc điểm của chủng vi khuẩn *Enterococcus faecalis* ET04 có khả năng sinh bacteriocin



Hình 1. Khả năng đối kháng của các chủng *Enterococcus* với chủng vi sinh vật kiểm định *Staphylococcus aureus* (A) và *Aeromonas jandaei* (B)

3.2. Khảo sát khả năng kháng vi sinh vật kiểm định của các chủng *Enterococcus*

Các chủng *Enterococcus* được kiểm tra khả năng ức chế chủng vi sinh vật kiểm định *Staphylococcus aureus* và *Aeromonas jandaei* bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Tất cả 4 chủng phân lập đều cho thấy khả năng ức chế sinh trưởng đối với vi sinh vật kiểm định (Hình 1). Trong đó, chủng ET04 cho thấy khả năng kháng mạnh nhất với *Staphylococcus aureus* và *Aeromonas jandaei*, đường kính vòng kháng khuẩn có kích thước lần lượt là $21,67 \pm 0,47\text{mm}$ và $14,16 \pm 0,81\text{mm}$. Các chủng còn lại có khả năng kháng khuẩn với hoạt tính thấp hơn so với chủng ET04 với đường kính vòng kháng khuẩn trong khoảng $7,16 \pm 0,23 - 15 \pm 0,41\text{mm}$.

Kết quả này tương đồng với nghiên cứu đã được công bố của các tác giả như: Indira & cs. (2018) về chủng *E. casseliflavus* MI001 cho thấy khả năng đối kháng với *Staphylococcus aureus* với đường kính vòng kháng khuẩn $15 \pm 1\text{mm}$. Abanoz & cs. (2018) đã công bố rằng chủng *E. faecalis* KT11 được phân lập từ phô mai Kargý Tulum có khả năng đối kháng với chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus* với đường kính vòng kháng khuẩn là $16,0 \pm 1,8$. Nghiên cứu của Cui & cs. (2020) về chủng *E. faecalis* CG-9 đã chỉ ra rằng chủng vi khuẩn này đã tạo ra một thành phần ức chế sự phát triển của vi khuẩn Gram dương và Gram âm, chống lại nhiều đối tượng gây hư hỏng thực phẩm và vi khuẩn gây bệnh như *Escherichia coli*, *Listeria*

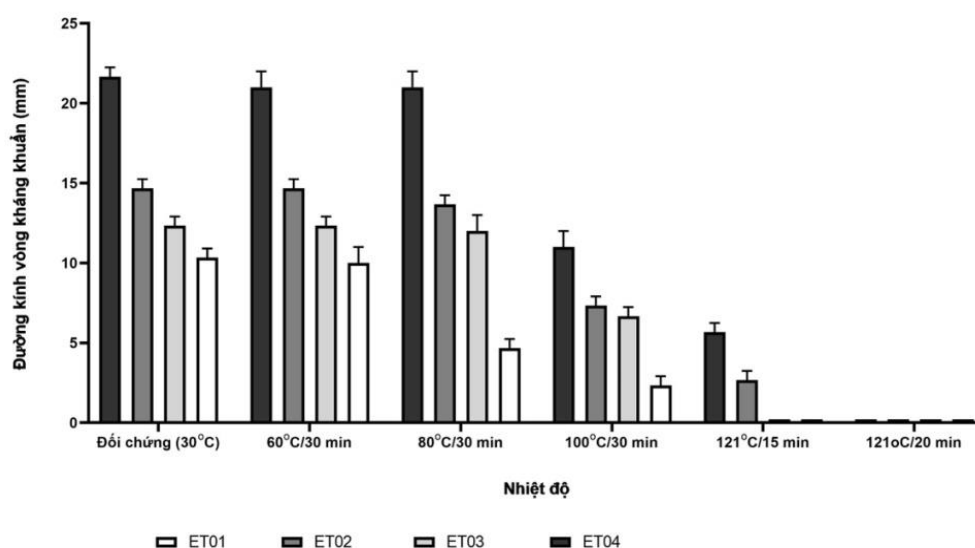
monocytogenes, *Staphylococcus aureus*. Đặc tính, phổ kháng khuẩn và khối lượng phân tử của bacteriocin sinh ra từ vi khuẩn này cho thấy rằng nó là một loại bacteriocin mới có giá trị nghiên cứu và ứng dụng tiềm năng trong ngành công nghiệp thực phẩm.

3.3. Sàng lọc khả năng sinh bacteriocin của các chủng vi khuẩn *Enterococcus*

3.3.1. Xử lý nhiệt

Bacteriocin có bản chất là các phân tử peptide-protein, hoạt tính và chức năng của chúng được quyết định bởi các cấu trúc bậc ba. Chúng được tạo thành bởi các liên kết disulfua và các liên kết hidro. Ở nhiệt độ cao, các liên kết hidro bị phá vỡ, làm thay đổi cấu trúc không gian ba chiều của protein, làm cho protein thay đổi hoặc mất chức năng (biến tính). Các chủng *Enterococcus* có khả năng đối kháng với hai chủng vi sinh vật kiểm định *Staphylococcus aureus* và *Aeromonas jandaei* được kiểm tra bản chất của chất kháng khuẩn bằng phương pháp xử lý với nhiệt độ.

Kết quả thí nghiệm cho thấy, chất kháng khuẩn sinh ra bởi 04 chủng tuyển chọn đều bền với nhiệt độ cao trong khoảng từ 60°C đến 100°C . Trong đó, chất kháng khuẩn sinh ra bởi các chủng này bị giảm hoạt tính đáng kể khi xử lý ở 100°C trong 30 phút, hoạt tính bị giảm 60% khi xử lý ở 121°C trong 15 phút và mất hoạt tính khi xử lý ở 121°C trong 30 phút (Hình 2).



Hình 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng bền nhiệt của chất kháng khuẩn sinh ra bởi 04 chủng vi khuẩn *Enterococcus*

Nhiều nghiên cứu trước đây đã báo cáo rằng hầu hết bacteriocin sinh ra bởi các chủng *Enterococcus* có khả năng điều chỉnh để thích nghi với nhiệt độ cao. Toit & cs. (2000) chỉ ra rằng chất kháng khuẩn enterocin sinh ra bởi *E. faecium* và *E. faecalis* thể hiện hoạt tính thấp hơn khi bị xử lý ở 121°C trong 15 phút. Losteinkit & cs. (2001) đã chỉ ra rằng chất kháng khuẩn sinh ra bởi chủng *E. faecium* N15 có bản chất là bacteriocin và vẫn còn hoạt tính khi xử lý ở 100°C trong 2 giờ, hoạt tính bị mất hoàn toàn khi xử lý ở 121°C trong 15 phút. Hwanhlem & cs. (2017) cũng đã báo cáo rằng chủng *E. faecium* được phân lập từ ruột gà thể hiện hoạt tính bacteriocin trong 30 phút ở nhiệt độ 100°C và sau đó bị mất hoạt tính khi xử lý ở 121°C trong 15 phút. Xi & cs. (2018), nghiên cứu về hoạt tính bacteriocin sinh ra bởi chủng *E. faecalis* TG2 có hoạt tính ổn định khi xử lý ở 121°C trong 20 phút, sau 40 phút hoạt tính giảm xuống còn 50%, hoạt tính bacteriocin của chủng này có khả năng điều nhiệt khi xử lý ở 121°C trong 60 phút. Dựa vào kết quả thu được trong nghiên cứu này kết hợp với các kết quả đã được công bố trước đó, có thể thấy chất kháng khuẩn sinh ra bởi 04 chủng vi khuẩn có bản chất là protein và có thể là bacteriocin được sử dụng trong nghiên cứu tiếp theo.

3.3.2. Xử lý bởi enzyme phân giải protein

Chất kháng khuẩn sinh ra bởi 04 chủng *Enterococcus* tiếp tục được xác định bản chất là bacteriocin bằng cách xử lý với các enzyme có khả năng thủy phân protein như enzyme proteinase K và enzyme trypsin. Kết quả thí nghiệm cho thấy các mẫu sau khi xử lý với enzyme thủy phân protein đều bị mất hoạt tính kháng khuẩn với các chủng vi sinh vật kiểm định *Staphylococcus aureus* và *Aeromonas jandaei*. Qua đó, chất kháng khuẩn sinh ra bởi chủng ET04 có bản chất là protein, bị thủy phân khi xử lý với enzyme Proteinase K và trypsin (Bảng 3).

Những đặc điểm này tương tự với các công bố trước đây về tác động của enzyme thủy phân protein đến hoạt tính bacteriocin của các tác giả như: nghiên cứu của Toit & cs. (2000) về bacteriocin sinh ra bởi các chủng *Enterococcus* phân lập từ phân lợn, kết quả cho thấy bacteriocin sinh ra bởi các chủng này bị mất hoạt tính khi xử lý với enzyme proteinase K, α -chymotrypsin, trypsin, pronase, papain và pepsin. Nghiên cứu của Ahmadova & cs. (2013) về vi khuẩn *E. faecium* AQ71 cũng chỉ ra rằng chất kháng khuẩn sinh ra bởi chủng này bị mất hoàn toàn hoạt tính khi xử lý với các enzyme thủy phân protein như protease X, pronase E,

Phân lập, tuyển chọn và nghiên cứu đặc điểm của chủng vi khuẩn *Enterococcus faecalis* ET04 có khả năng sinh bacteriocin

protease VII và chymotrypsin II. Từ các kết quả của thí nghiệm kết hợp với các kết quả được nghiên cứu trước đó cho thấy chất kháng khuẩn sinh ra bởi các chủng *Enterococcus* trong nghiên cứu này có bản chất là peptide/protein và là bacteriocin. Chủng ET04 có khả năng sinh bacteriocin và thể hiện hoạt tính đối kháng vượt trội hơn so với các chủng còn lại, bacteriocin sinh ra bởi chủng này thể hiện hoạt tính kháng khuẩn ngay cả khi bị xử lý ở nhiệt độ cao được tuyển chọn để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.

3.3. Định danh chủng vi khuẩn có khả năng sinh bacteriocin

Trong nghiên cứu này, chủng ET04 có các đặc điểm giống với chủng vi khuẩn *Enterococcus* như khuẩn lạc hình tròn, bìa nguyên, dẹt, màu trắng sữa. Kết quả quan sát đặc điểm hình thái tế bào bằng kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 1000X cho thấy chủng ET04 là vi khuẩn Gram dương, tế bào có hình cầu (Hình 3).

Để định danh chính xác chủng vi khuẩn này, phương pháp sinh học phân tử được sử dụng dựa trên mức độ tương đồng của đoạn gen mã hoá 16S rRNA của chủng này với các chủng đã được công bố trên Genbank. DNA của chủng ET04 được tách chiết theo phương pháp mô tả bởi Han & cs. (2018). Cặp mồi 27F và 1492R được sử dụng để khuếch đại đoạn gen 16S rRNA, kết quả thu được một băng vạch duy nhất có kích thước khoảng 1.500bp phù hợp với kích thước lý thuyết khi nhân đoạn gen bằng cặp mồi này. Kết quả so sánh trình tự và cây phát sinh loài cho thấy chủng ET04 có mức độ tương đồng với chủng vi khuẩn *E. faecalis* P26-24 là 99,46%, nằm cùng nhánh với chủng *E. faecalis* P26-24 với giá trị bootstrap 99% (Hình 4). Xét về giá trị tin cậy và mức độ tương đồng cho thấy chủng ET04 và chủng *E. faecalis* P26-24 là giống nhau. Kết hợp các đặc điểm sinh học và sinh học phân tử có thể thấy chủng ET04 có quan hệ họ hàng gần gũi với *E. faecalis* và được đặt tên là *E. faecalis* ET04.

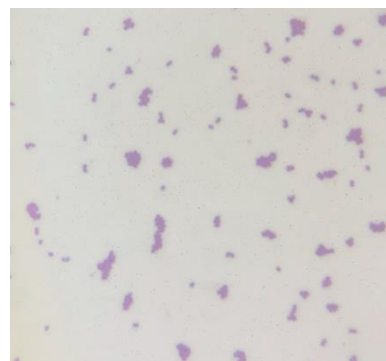
Bảng 3. Ảnh hưởng của enzyme phân giải protein đến hoạt tính của chất kháng khuẩn của chủng ET04

Yếu tố tác động	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Aeromonas jandaei</i>
Đối chứng	21,67 ± 0,47	14,16 ± 0,81
Proteinase K	0	0
Trypsin	0	0

Ghi chú: Đối chứng: Chất kháng khuẩn không được xử lý với enzyme phân giải protein



(A)



(B)

Hình 3. Hình thái khuẩn lạc trên môi trường MRS agar (A); hình thái tế bào ở độ phóng đại 1000X (B) của chủng ET04

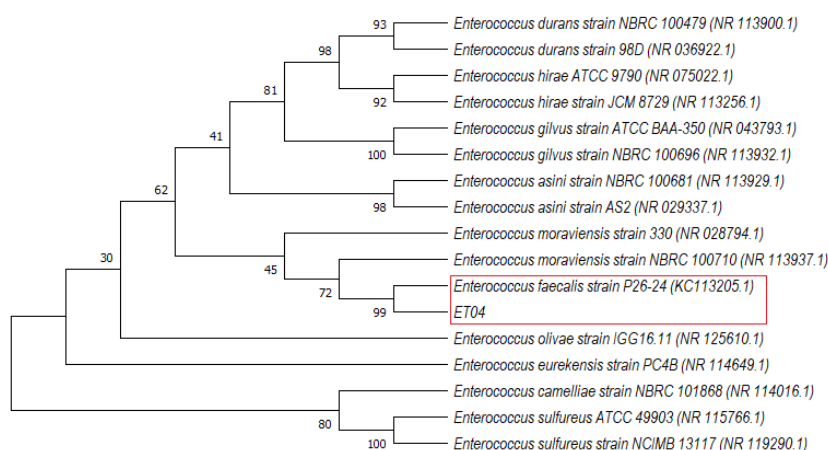
Chủng *E. faecalis* ET04 trong nghiên cứu này cho thấy hiệu quả kháng khuẩn thông qua cơ chế sản sinh hợp chất bacteriocin. Bacteriocin được sinh ra bởi chủng này cho thấy cơ chế hoạt động ổn định ở nhiệt độ cao phù hợp với điều kiện sản xuất chế phẩm sinh học phục vụ trong nuôi trồng thủy sản.

3.5. Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính bacteriocin

Kết quả thí nghiệm cho thấy, hoạt tính kháng khuẩn của chủng vi khuẩn ổn định ở pH 2,0-8,0. Trong đó ở pH = 2,0 hoạt tính kháng khuẩn đối với các chủng *Staphylococcus aureus* và *Aeromonas jandaei* giảm so với đối chứng, cụ thể là giảm lần lượt là 23% và 25%. Ở pH = 10,0 hoạt tính kháng khuẩn bị giảm đáng kể, giảm

50-66,6% so với khi xử lý ở pH từ 6,0-8,0 và giảm xuống 66,6-69,2% so với đối chứng. Khi xử lý bacteriocin ở pH = 12,0 hoạt tính kháng khuẩn bị mất hoàn toàn, qua đó cho thấy bacteriocin sinh tổng hợp bởi chủng vi khuẩn này bị ức chế hoạt động ở pH cao (Bảng 4).

Nhiều báo cáo gần đây đã báo cáo rằng hầu hết các loại bacteriocin sinh ra bởi *Enterococcus* có khả năng hoạt động trong phạm vi pH rộng. Toit & cs. (2000) đã báo cáo về bacteriocin sinh ra bởi chủng *E. faecium* và *E. faecalis* có hoạt tính kháng khuẩn cao nhất ở pH = 7,0. Trong một nghiên cứu tương tự, bacteriocin được sinh tổng hợp bởi chủng *E. faecium* AQ71 cho thấy hoạt tính kháng khuẩn ổn định ở dải pH từ 3,0 đến 10,0 (Ahmadova & cs., 2013).



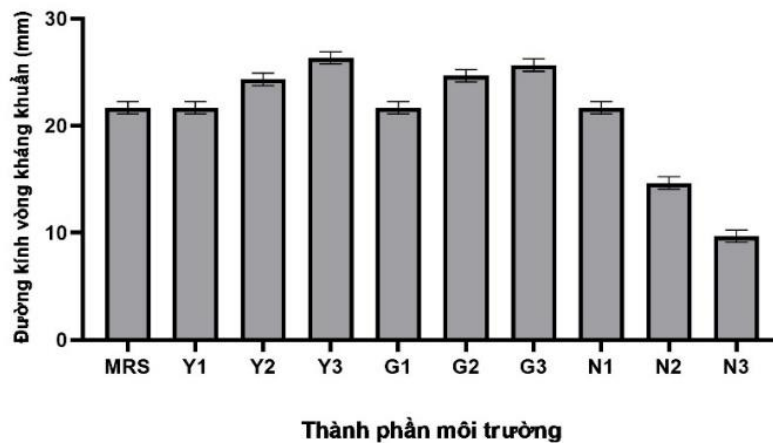
Hình 4. Cây phân loại của chủng *Enterococcus faecalis* ET04

Bảng 4. Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính bacteriocin sản xuất bởi chủng *Enterococcus faecalis* ET04

Giá trị pH	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Aeromonas jandaei</i>
Đối chứng (pH = 6,5)	21,67 ± 0,47	12 ± 0,81
pH = 2,0	16,67 ± 0,58	9 ± 0,72
pH = 4,0	18,67 ± 0,33	11 ± 0,80
pH = 6,0	21,67 ± 0,46	14,16 ± 0,81
pH = 8,0	21,67 ± 0,29	10 ± 0,79
pH = 10,0	6,67 ± 0,36	4 ± 0,71
pH = 12,0	0	0

Ghi chú: Đối chứng: *Enterococcus faecalis* ET04 được nuôi cấy trong môi trường MRS dịch thể ở pH = 6,5; Kết quả trung bình của ba lần lặp lại ± SD.

Phân lập, tuyển chọn và nghiên cứu đặc điểm của chủng vi khuẩn *Enterococcus faecalis* ET04 có khả năng sinh bacteriocin



Ghi chú: MRS: Môi trường MRS broth; Y1, Y2, Y3: MRS broth + 1%, 2%, 3% cao nấm men; G1, G2, G3: MRS broth + 1%, 2%, 3% Glucose; N1, N2, N3: MRS broth + 1%, 2%, 3% NaCl.

Hình 5. Ảnh hưởng của thành phần môi trường đến khả năng sinh bacteriocin của chủng *Enterococcus faecalis* ET04

3.6. Ảnh hưởng của thành phần môi trường đến khả năng sinh bacteriocin của chủng tuyển chọn

Chủng *E. faecalis* ET04 được nuôi cấy trên môi trường MRS có sự thay đổi nồng độ các chất theo tỷ lệ khác nhau nhằm xác định điều kiện môi trường nuôi cấy tối ưu cho quá trình phát triển và sinh chất kháng khuẩn bacteriocin.

Kết quả thí nghiệm cho thấy, thành phần môi trường có ảnh hưởng rất lớn đến hoạt tính bacteriocin sinh ra bởi chủng *E. faecalis* ET04. Hoạt tính kháng khuẩn tăng 54,8% khi nuôi cấy trong môi trường MRS có bổ sung 3% cao nấm men so với môi trường có bổ sung 1% cao nấm men. Tương tự như vậy, khi nuôi trong môi trường có bổ sung 3% glucose hoạt tính kháng khuẩn tăng 54,2% so với môi trường chứa 1%. Việc bổ sung glucose và cao nấm men đã cung cấp nguồn nitơ, acid amin để chủng vi khuẩn *E. faecalis* ET04 phát triển và tăng khả năng sinh tổng hợp bacteriocin. Tuy nhiên, khi bổ sung NaCl làm giảm hoạt tính kháng khuẩn của bacteriocin. Điều này cho thấy hàm lượng NaCl trong môi trường quá cao làm giảm quá trình phát triển của chủng này, dẫn đến hoạt tính bacteriocin giảm 30,8% khi bổ sung 3% NaCl so với môi trường có bổ sung 1% NaCl (Hình 5).

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chủng *Enterococcus faecalis* ET04 thể hiện hoạt tính kháng khuẩn mạnh thông qua cơ chế sản xuất hợp chất bacteriocin với đường kính vòng vô khuẩn $14,16 \pm 0,81$ đến $21,67 \pm 0,47$ mm. Bacteriocin do chủng này sinh ra cho thấy khả năng ức chế sinh trưởng đối với hai chủng vi sinh vật kiểm định *Staphylococcus aureus* và *Aeromonas jandaei*. Hoạt tính bacteriocin ổn định ở điều kiện nhiệt độ cao là 121°C trong 15 phút và có phổ pH rộng. Đồng thời, nghiên cứu cũng xác định điều kiện môi trường MRS có bổ sung 3% glucose và cao nấm men là thích hợp nhất cho khả năng sản xuất bacteriocin của chủng này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abanoz H.S. & Kunduhoglu B. (2018). Antimicrobial activity of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* KT11 against some pathogens and antibiotic-resistant bacteria. Korean Journal for food science of animal resources. 38(5): 1064.
- Ahmadova A., Todorov S.D., Choiset Y., Rabesona H., Zadi T.M., Kuliyevev A., De Melo Franco B.D.G., Chobert J.M. & Haertlé T. (2013). Evaluation of antimicrobial activity, probiotic properties, and safety of wild strain *Enterococcus faecium* AQ71 isolated from Azerbaijani Motal cheese. Food Control. 30(2): 631-641.

- Assefa A. & Abunna F. (2018). Maintenance of fish health in aquaculture: review of epidemiological approaches for prevention and control of infectious disease of fish. *Veterinary medicine international*.
- Baccouri O., Boukerb A.M., Farhat L.B., Zébré A., Zimmermann K., Domann E., Cambronel M., Barreau M., Maillot O. & Rincé I. (2019). Probiotic potential and safety evaluation of *Enterococcus faecalis* OB14 and OB15, isolated from traditional tunisian testouri cheese and rigouta, using physiological and genomic analysis. *Frontiers in Microbiology*. 10: 881.
- Cui G., Pan C., Xu P., Li Y., Wang L., Gong B., Li X. & Huang S. (2020). Purification and characterization of a novel bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* CG-9 from human saliva. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 34(1): 1224-1233.
- Han Z., Sun J., Lv A., Sung Y., Sun X., Shi H., Hu X., Wang A. & Xing K. (2018). A modified method for genomic DNA extraction from the fish intestinal microflora. *AMB Express*. 8(1): 1-8.
- Hanchi H., Mottawea W., Sebei K. & Hammami R. (2018). The genus *Enterococcus*: between probiotic potential and safety concerns - an update. *Frontiers in Microbiology*. 9: 1791.
- Hernandez D., Cardell E. & Zarate V. (2005). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. *Journal of Applied Microbiology*. 99(1): 77-84.
- Hwanhlem N., Ivanova T., Biscola V., Choiset Y. & Haertlé T. (2017). Bacteriocin producing *Enterococcus faecalis* isolated from chicken gastrointestinal tract originating from Phitsanulok, Thailand: Isolation, screening, safety evaluation and probiotic properties. *Food Control*. 78: 187-195.
- Indira M., Venkateswarulu T., Prabhakar K.V., Peele K.A. & Krupanidhi S. (2018). Isolation and characterization of bacteriocin producing *Enterococcus casseliflavus* and its antagonistic effect on *Pseudomonas aeruginosa*. *Karbala International Journal of Modern Science*. 4(4): 361-368.
- Liu G., Wang Y., Li X., Hao X., Xu D., Zhou Y., Mehmood A. & Wang C. (2019). Genetic and biochemical evidence that *Enterococcus faecalis* Gr17 produces a novel and sec-dependent bacteriocin, Enterocin Gr17. *Frontiers in Microbiology*. 10: 1806.
- Losteinkit C., Uchiyama K., Ochi S., Takaoka T., Nagahisa K. & Shioya S. (2001). Characterization of bacteriocin N15 produced by *Enterococcus faecium* N15 and cloning of the related genes. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 91(4): 390-395.
- Marwa A.S., Hamdi M.A, Ekbal M.I.A., Adham M.A. & Sobhy A.El.S. (2015). Effect of pH, heat treatments and proteinase K enzyme on the activity of *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin. *Benha Veterinary Medical Journal*. 28 (1): 210-215.
- Nguyễn Văn Thành & Nguyễn Ngọc Trai. (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 Trường Đại học Cần Thơ*. 23a: 224-234.
- Ogunbanwo S., Sanni A. & Onilude A. (2003). Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. *African Journal of Biotechnology*. 2(8): 219-227.
- Rajaram G., Manivasagan P., Thilagavathi B. & Saravanakumar A. (2010). Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus lactis* isolated from marine environment. *Advance Journal of Food Science and Technology*. 2(2): 138-144.
- Ramos M., Batista S., Pires M., Silva A., Pereira L., Saavedra M., Ozório R. & Rema P. (2017). Dietary probiotic supplementation improves growth and the intestinal morphology of Nile tilapia. *Animal*. 11(8): 1259-1269.
- Sahoo T.K., Jena P.K., Nagar N., Patel A.K. & Seshadri S. (2015). In vitro evaluation of probiotic properties of lactic acid bacteria from the gut of *Labeo rohita* and *Catla catla*. *Probiotics and antimicrobial proteins*. 7(2): 126-136.
- Subasinghe R. (2017). Regional review on status and trends in aquaculture development in Asia-Pacific-2015. *FAO Fisheries and Aquaculture Circular*. (C1135/5): I.
- Toit M.D., Franz C., Dicks L. & Holzapfel W. (2000). Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces. *Journal of Applied Microbiology*. 88(3): 482-494.
- Tổng cục Thủy sản (2022). Kết quả sản xuất ngành thủy sản năm 2019. Truy cập từ <https://tongcucthuysan.gov.vn/Tin-tuc/-Tin-van/doc-tin/014196?2020-01-15> = Banner+002 ngày 06/09/2022.
- Vos P., Garrity G., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Karl-Heinz Schleifer & Whitman W. B. (Eds.). (2011). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer Science & Business Media. Vol. 3: 594-611
- Xi Q., Wang J., Du R., Zhao F., Han Y. & Zhou Z. (2018). Purification and characterization of bacteriocin produced by a strain of *Enterococcus faecalis* TG2. *Applied biochemistry and biotechnology*. 184(4): 1106-1119.