

PHÂN LẬP VÀ KHẢO SÁT MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CỦA CÁC CHỦNG VI KHUẨN NỘI SINH TỪ RỄ CÂY HỒ TIÊU

Nguyễn Thu Trang¹, Trần Thị Thúy Hà²,
Nguyễn Xuân Trường³, Nguyễn Văn Giang¹

TÓM TẮT

Thí nghiệm này được thực hiện với mục đích phân lập, tuyển chọn và đánh giá một số đặc tính sinh học của các chủng vi khuẩn nội sinh được phân lập từ rễ cây hồ tiêu 1 năm tuổi trồng ở huyện Lâm Hà, tỉnh Lâm Đồng. Trong số 23 chủng đã được phân lập, 15 chủng có khả năng sinh IAA, 20 chủng tổng hợp siderophore, 4 chủng phân giải phosphate khó tan và 9 chủng có khả năng đối kháng với nấm *Phytophthora capsici*. Hai chủng vi khuẩn nổi bật là chủng LĐ15 và LĐ18 được tuyển chọn. Chủng LĐ15 có khả năng sinh IAA, sản xuất siderophore và phân giải phosphate khó tan, và chủng LĐ18 có khả năng sinh IAA, sản xuất siderophore và đối kháng nấm gây bệnh *Phytophthora capsici*. Kết quả phân tích, so sánh trình tự nucleotide 16S rRNA của chủng LĐ18 trên NCBI cho phép kết luận chủng LĐ18 có quan hệ rất gần gũi với chủng *Bacillus sonorensis* SRCM 101395 do đó được đặt tên là *Bacillus sonorensis* LĐ18.

Từ khóa: Hồ tiêu, vi khuẩn nội sinh, *Phytophthora capsici*, IAA, siderophore, *Bacillus* sp.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi khuẩn nội sinh cư trú ở bề mặt hoặc phân bố bên trong thực vật, chúng sản xuất ra hàng loạt các chất chuyển hóa sinh học và enzyme thủy phân để duy trì môi trường hóa học bình thường của thực vật (Strobel, 2003). Các hoạt động chuyển hóa của chúng góp phần tăng sức đề kháng, tăng trưởng và phát triển của thực vật như tăng cường khả năng cố định đạm, phân giải phosphate khó tan và khả năng sinh kháng sinh hoặc siderophores để kháng lại vi sinh vật gây bệnh. Nghiên cứu về vi khuẩn nội sinh là một trong những hướng nghiên cứu quan trọng để hiểu về vai trò sinh thái của chúng trong tự nhiên và để phát hiện các vi sinh vật mới có tiềm năng ứng dụng trong công nghệ sinh học (Mercado-Blanco and Lugtenberg, 2014).

Hồ tiêu (*Piper nigrum* L.) được gọi là “vua của các loại gia vị” và là cây công nghiệp mang lại giá trị kinh tế cao đối với ngành nông nghiệp. Năm 2016, ngành hồ tiêu Việt Nam đã có được thành công ấn tượng với thành tích xuất khẩu đạt kỷ lục cao nhất từ trước tới nay cả về sản lượng (179.233 tấn hạt hồ tiêu các loại) và giá trị (kim ngạch xuất khẩu đạt 1 tỷ 439,87 triệu USD) (Nguyễn Vĩnh, 2017). Cây hồ tiêu dễ bị mắc các bệnh nguy hiểm gây chết hàng loạt do nấm gây nên như bệnh chết nhanh, chết chậm, thán thư ảnh hưởng nghiêm trọng đến sản lượng và chất lượng hồ tiêu. Phương pháp kiểm soát bệnh phổ biến vẫn là sử dụng các loại thuốc bảo vệ thực vật. Xử lý bằng phương pháp hóa học có thể diệt được các loại sâu bệnh nhưng tồn dư của chúng

ảnh hưởng xấu đến chất lượng sản phẩm, sức khỏe con người, môi trường. Nghiên cứu các kỹ thuật và phương pháp bảo vệ thực vật an toàn thay thế biện pháp sử dụng thuốc hóa học là rất cần thiết, giúp người trồng hồ tiêu tạo ra sản phẩm hồ tiêu đạt chuẩn năng suất và chất lượng để có thể cạnh tranh, thâm nhập vào các thị trường tiềm năng. Trên thế giới đã có nhiều công trình nghiên cứu về vi khuẩn nội sinh trên cây hồ tiêu và tìm được các chủng có khả năng sinh phytohormones, kháng lại một số loại nấm gây bệnh như bệnh héo rũ, bệnh chết nhanh (do nấm *Phytophthora capsici* gây nên). Tuy nhiên, vấn đề này còn chưa được nghiên cứu nhiều ở Việt Nam.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Mẫu rễ hồ tiêu 1 năm tuổi được thu thập tại xã Liên Hà, huyện Lâm Hà, tỉnh Lâm Đồng.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập vi khuẩn nội sinh

Mẫu rễ được thu thập từ các cây hồ tiêu khỏe mạnh, không có triệu chứng bệnh và được bảo quản ở 4°C cho đến khi phân lập. Phân lập vi khuẩn nội sinh từ rễ cây hồ tiêu theo phương pháp của Kumar và cộng tác viên (2016). Mẫu rễ được rửa nhiều lần dưới vòi nước để loại bỏ đất sau đó cắt thành những đoạn nhỏ và tiến hành khử trùng bề mặt bằng cách lần lượt rửa các mẫu rễ với 70% C₂H₅OH, 3 phút, 0,5% NaOCl, 3 phút và 70% C₂H₅OH, 30 giây, sau đó

¹ Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

² Trung tâm CNSH Thủy sản, Viện NC Nuôi trồng Thủy sản I

³ Viện Sinh học Nông nghiệp, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

rửa với nước cất vô trùng 5 lần để loại bỏ hóa chất còn lại. Để kiểm tra sự vô trùng của bề mặt mẫu, mỗi mẫu rễ lấy 0,1 ml nước rửa mẫu lần cuối cấy trải trang trên đĩa petri chứa môi trường NA (g/l: Pepton 5; NaCl 5; cao thịt 2; cao nấm men 3; agar 18). Đặt các đĩa petri này trong tủ nuôi trong điều kiện nhiệt độ 30°C trong 2 - 4 ngày trước khi cấy các mẫu rễ. Nếu không có sự phát triển của vi khuẩn và nấm trong các đĩa này chứng tỏ việc khử trùng đã đạt yêu cầu. Các mẫu rễ được cắt nhỏ và đặt vào các đĩa petri chứa môi trường NA và nuôi ở 30°C trong 2 - 4 ngày trong tủ nuôi. Các khuẩn lạc xuất hiện quanh vùng cấy được chọn và cấy ria trên môi trường NA mới để làm thuần.

2.2.2. Xác định khả năng sinh IAA

Các chủng vi khuẩn được nuôi trong các ống nghiệm chứa môi trường NA lỏng có bổ sung L-Tryptophan (100 mg/l), lắc 200 vòng/phút trong tối để tránh IAA sinh ra bị phân hủy bởi ánh sáng. Định lượng IAA do vi khuẩn tổng hợp được bằng phương pháp so màu thuốc thử Salkowski (Glickmann and Dessaux, 1995). Hút cẩn thận 1ml phần dịch trong sau khi ly tâm dịch nuôi vi khuẩn cho vào các ống nghiệm và bổ sung 2 ml thuốc thử Salkowski (300 ml H₂SO₄ 98%, 15 ml FeCl₃ 0,5M). Ủ hỗn hợp trên trong tối 30 phút để phản ứng xảy ra hoàn toàn, sau đó đo OD ở bước sóng λ = 530 nm. Kết quả đo OD của các chủng phân lập được thay vào phương trình đồ thị đường chuẩn y = 0,0079x + 0,0046, R² = 0,9976, từ đó suy ra được nồng độ IAA của các chủng vi khuẩn.

2.2.3. Khảo sát khả năng phân giải phosphate khó tan

Các chủng vi khuẩn được cấy chấm điểm trên môi trường NBRIP (g/l: glucose 10 ; Ca₃(PO₄)₂ 5; MgCl₂.6H₂O 5 ; MgSO₄.7H₂O 0,25 ; KCl 0,2; (NH₄)₂SO₄ 0,1; agar 18, pH 7,0) và được nuôi ở 30°C trong 3 ngày. Chủng vi khuẩn có khả năng phân giải phosphate khó tan sẽ tạo vòng sáng trong suốt xung quanh khuẩn lạc (Chung *et al.*, 2005). Hoạt độ phân giải phosphate khó tan của các chủng vi khuẩn được xác định bằng phương pháp Xanh molipdate (Ames, 1966). Các chủng vi sinh vật được nuôi trong môi trường NBRIP lỏng ở 30°C, 4 ngày, tốc độ lắc 200 vòng/phút. Dịch nuôi được ly tâm 10.000 vòng/phút, 10 phút, 4°C, thu dịch nổi để kiểm tra hàm lượng PO₄³⁻.

2.2.4. Khảo sát khả năng sinh siderophore

Thực hiện thí nghiệm theo phương pháp của Schwyn và Neilands (1987). Khả năng tổng hợp

siderophore: các chủng vi khuẩn tuyển chọn được nuôi trên môi trường thạch CAS (Chrome azzurol S). Nếu chủng vi khuẩn tổng hợp siderophore, môi trường thạch xung quanh khuẩn lạc sẽ có màu vàng chanh hay vàng đậm. Môi trường CAS: chrome azurol S (CAS) 60,5 mg; hexadecyltrimethyl amoni bromua (HDTMA) 72,9 mg; Piperazin-1,4-bis (acid 2-ethanesulfonic) (PIPETS) 30,24 g; 1 mM FeCl₃.6H₂O trong 10 mM HCl 10 ml. Agar (0,9% w/v).

2.2.5. Khảo sát khả năng đối kháng với nấm *Phytophthora capsici*

Vi khuẩn được kiểm tra khả năng kháng với *Phytophthora capsici* bằng cách đồng nuôi cấy trên môi trường PDA. Đặt thỏi thạch nấm có đường kính 0.8 cm ở trung tâm đĩa PDA (g/l: glucose 15, agar 15, dịch chiết từ 200 g khoai tây) và vi khuẩn được cấy cách thành đĩa 1 cm. Đĩa đối chứng chứa thỏi thạch nấm *P.capsici*, không có vi khuẩn (Nascimento *et al.*, 2015). Đĩa được nuôi ở 30°C trong 4 ngày. Hoạt lực đối kháng được tính bằng cách đo bán kính hệ sợi nấm *P.capsici* trên đĩa đối chứng và đĩa thí nghiệm. Hoạt lực kháng nấm được thể hiện bằng phần trăm ức chế nấm *Phytophthora capsici* và được tính toán theo công thức sau:

$$RI (\%) = (R - r) / R \times 100\%$$

Trong đó: R: bán kính của nấm *P. capsici* ở đĩa đối chứng, r: bán kính của nấm *P. capsici* ở đĩa có vi khuẩn đối kháng.

2.2.6. Định danh chủng vi khuẩn được tuyển chọn

Chủng vi khuẩn được gửi tới Công ty TNHH Phú Sa để giải trình tự nucleotide 16S rRNA. So sánh trình tự nucleotide của chủng vi khuẩn thí nghiệm với các trình tự nucleotide 16S rRNA có sẵn trên ngân hàng gene NCBI (www. ncbi.nlm.nih.gov) bằng phần mềm BLAST.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Thí nghiệm được thực hiện tại Khoa Công nghệ sinh học - Học viện Nông nghiệp Việt Nam từ tháng 5/2017 đến tháng 6/2018.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập các chủng vi khuẩn nội sinh

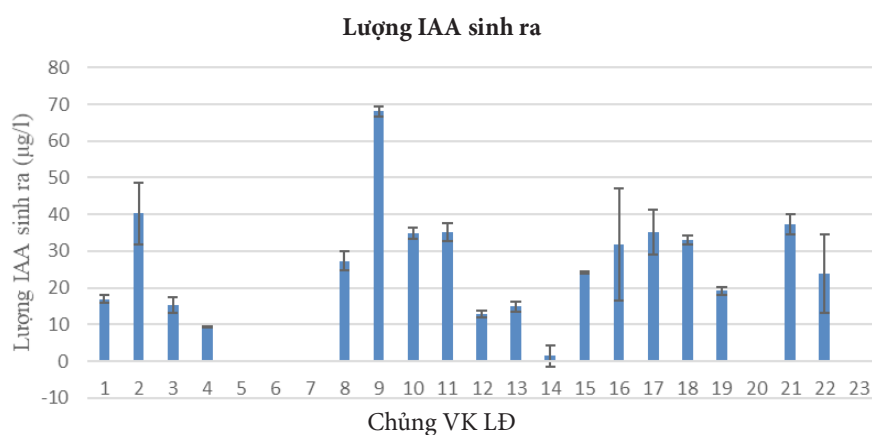
Từ các mẫu rễ hồ tiêu thu thập tại huyện Lâm Hà, tỉnh Lâm Đồng, 23 chủng vi khuẩn nội sinh được kí hiệu LĐ1 đến LĐ23 đã được phân lập. Đa số khuẩn lạc có màu trắng sữa và vàng, bề mặt trơn nhẵn hoặc

trơn bóng, đại đa số là trực khuẩn, gram dương. Trong số 23 chủng vi khuẩn nội sinh phân lập được có 17 chủng vi khuẩn Gram dương và 6 chủng vi khuẩn gram âm. Đặc điểm hình thái của vi khuẩn nội sinh được phân lập từ rễ cây Xuyên chi trong nghiên cứu của Lương Thị Hồng Diệp và cộng tác viên (2011) có sự tương đồng với các vi khuẩn phân lập được trong nghiên cứu này.

3.2. Khảo sát đặc tính sinh học của các chủng vi khuẩn nội sinh

3.2.1. Khả năng sinh IAA

Dịch nuôi các chủng vi khuẩn được ly tâm, thu phần dịch nổi để đo độ hấp phụ ánh sáng tại $\lambda = 530$ nm. Kết quả đo được so sánh với đường chuẩn, từ đó tính toán được lượng IAA được tổng hợp (Hình 1).



Hình 1. Hàm lượng IAA được tổng hợp bởi các chủng vi khuẩn nội sinh

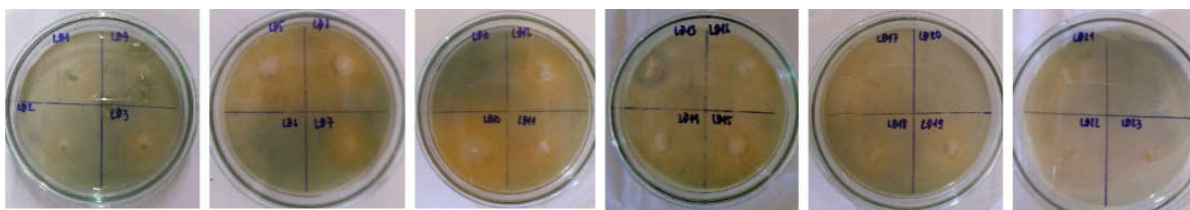
Hàm lượng IAA được tổng hợp bởi các chủng vi khuẩn nội sinh có sự khác nhau rõ rệt. Bốn chủng vi khuẩn nội sinh tổng hợp IAA cao nhất là chủng LĐ2 (40 µg/ml), LĐ9 (68 µg/ml), chủng LĐ15 là 24 µg/ml và LĐ18 là 33 µg/ml. Nguyễn Thị Thúy Nga (2015) khi khảo sát lượng IAA sinh ra từ vi khuẩn nội sinh phân lập từ cây thông đã thu được 2 chủng có khả năng sinh IAA cao là QI8 và QI1 có khả năng tổng hợp được 15,382 và 11,872 mg/l IAA (theo thứ tự), thấp hơn hàm lượng IAA được tổng hợp bởi một số chủng trong nghiên cứu này (Hình 1). Tuy nhiên hàm lượng IAA sinh ra bởi các chủng nội sinh phân lập được lại thấp hơn dòng Burk 5 phân lập từ cây dứa huyện Tân Phước, tỉnh Tiền Giang, với hàm lượng IAA đạt 98,54 mg/l (Trần Thanh Phong, 2012).

3.2.2. Sàng lọc vi khuẩn có khả năng sinh siderophore

Siderophore là hợp chất do vi khuẩn tiết vào

môi trường để thu nhận các ion sắt có trọng lượng phân tử thấp từ môi trường xung quanh khi chúng sống trong điều kiện thiếu sắt, do đó chúng giúp cây trồng chống lại stress do thiếu sắt gây nên. Các vi sinh vật gây bệnh cần sắt để tăng trưởng, do vậy dẫn đến hiện tượng cạnh tranh sắt, tuy nhiên ái lực với sắt của vi khuẩn có lợi với thực vật cao hơn các loài sinh vật và nấm gây bệnh có hại trên thực vật, kết quả làm hạn chế mầm bệnh trong môi trường (Chung *et al.*, 2005).

Sau khi nuôi cấy 23 chủng vi khuẩn nội sinh trên môi trường CAS, màu sắc môi trường xung quanh khuẩn lạc của 20 chủng vi khuẩn nội sinh chuyển sang màu da cam (Hình 2), chứng tỏ chúng có khả năng sản xuất siderophore vì theo như mô tả về đặc tính vi sinh vật sinh siderophore của Chung và cộng tác viên (2005), các vi sinh vật sinh siderophore sẽ có màu vàng, cam trên môi trường CAS.



Hình 2. Khả năng sinh siderophore của các chủng vi khuẩn thí nghiệm

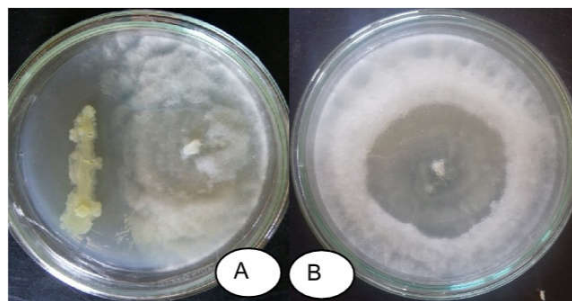
3.2.3. Khảo sát khả năng phân giải phosphate khó tan

Dựa vào đường kính vòng phân giải phosphate trên môi trường thạch NBRIP, trong số 23 chủng vi khuẩn nội sinh được khảo sát, 4 chủng có khả năng phân giải phosphate khó tan là LĐ8, LĐ9, LĐ15 và LĐ18. Kết quả này tương đương với kết quả đánh giá khả năng phân giải phosphate của các vi khuẩn nội sinh được phân lập từ rễ cây hồ tiêu của Jasim và cộng tác viên (2013), có 3 trên 12 chủng vi khuẩn nội sinh có khả năng phân giải phosphate khó tan. Hàm lượng PO_4^{3-} được các chủng vi khuẩn giải phóng vào môi trường nuôi cấy được tính toán dựa trên kết quả so màu theo phương pháp Xanh molipdate. Kết quả cho thấy, lượng PO_4^{3-} được giải phóng bởi các chủng vi khuẩn LĐ15, LĐ9, LĐ18, LĐ8 lần lượt là 3,59; 0,81; 0,166 và 0,162 mg/l.

3.2.4. Khả năng đối kháng với nấm gây bệnh *Phytophthora capsici*

Phytophthora là loại nấm gây bệnh chết nhanh đối với cây hồ tiêu, thông thường *Phytophthora* kết hợp với các loại nấm sống trong đất khác như *Pythium*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*... cùng tấn công lên cây hồ tiêu làm cây tiêu chết rất nhanh. Nấm bệnh có thể xâm nhập hầu hết các bộ phận của cây như lá, rễ, thân, nhánh... đặc biệt là các bộ phận nằm trong và sát mặt đất. Bằng cách đồng nuôi cấy các chủng vi khuẩn với nấm *P. capsici*, 9 chủng vi khuẩn (LĐ1, 2, 9, 10, 12, 13, 18, 19, 23) biểu hiện khả năng đối kháng với chủng nấm gây bệnh này, trong đó chủng LĐ18 có khả năng đối kháng và duy trì đối kháng mạnh nhất với nấm bệnh *Phytophthora capsici* với hiệu lực đối kháng đạt 44,4% (Hình 3). Theo nghiên cứu của Toh và cộng tác viên (2016), khả năng đối

kháng nấm *Phytophthora capsici* của các chủng vi khuẩn nội sinh rễ cây hồ tiêu dao động từ 40,32 - 48,39%, vậy khả năng đối kháng của chủng LĐ18 ở mức tương đương.



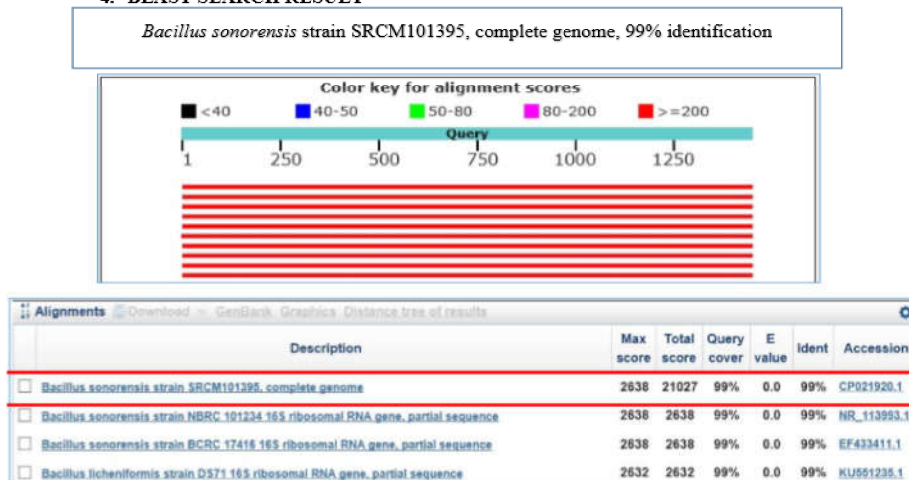
Hình 3. Khả năng đối kháng nấm *P. capsici* của chủng vi khuẩn LĐ18

Ghi chú: A-đồng nuôi cấy vi khuẩn và nấm *P. capsici*; B-đĩa đối chứng, chỉ cấy nấm *P. capsici*, không có vi khuẩn

3.2.5. Kết quả định danh chủng LĐ18

Trong số 23 chủng vi khuẩn nội sinh được khảo sát, chủng LĐ18 có khả năng sinh tổng hợp IAA, đối kháng mạnh với nấm *P.capsici*, phân giải phosphate khó tan được chọn để gửi tới công ty TNHH Phú Sa để giải trình tự nucleotide 16S rRNA và định danh bằng phần mềm BLAST. Kết quả phân tích, so sánh trình tự nucleotide 16S rRNA của chủng LĐ18 với trình tự nucleotide 16S rRNA trên ngân hàng gene NCBI cho thấy mức độ tương đồng của các trình tự lên đến 99% với điểm số phù hợp (alignment scores) rất cao (hình 4). Như vậy, chủng vi khuẩn nội sinh LĐ18 có quan hệ chặt với chủng vi khuẩn *Bacillus sonorensis* SRCM 101395, và do đó chủng này được đặt tên là *Bacillus sonorensis* LĐ18.

4. BLAST SEARCH RESULT



Hình 4. Kết quả định danh và cây phân loại của chủng vi khuẩn LĐ18

IV. KẾT LUẬN

Từ mẫu rễ hồ tiêu, 23 chủng vi sinh vật nội sinh đã được phân lập, trong đó 15 chủng có khả năng sinh IAA, 20 chủng có khả năng sản xuất siderophore, 4 chủng có khả năng phân giải phosphate khó tan và 9 chủng có khả năng đối kháng với nấm gây bệnh *Phytophthora capsici*.

Hai chủng vi khuẩn nổi bật là chủng LĐ15 và LĐ18 đã được tuyển chọn. Chủng LĐ15 có khả năng sinh IAA, sản xuất siderophore và phân giải phosphate khó tan, và chủng LĐ18 có khả năng sinh IAA, sản xuất siderophore và đối kháng nấm gây bệnh *Phytophthora capsici*.

Kết quả phân tích, so sánh trình tự nucleotide 16s rRNA cho thấy chủng LĐ18 có quan hệ gần với *Bacillus sonorensis* SRCM 101395, nên được đặt tên là *B. sonorensis* LĐ18.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Lương Thị Hồng Diệp và Cao Ngọc Diệp, 2011. Phân lập và nhận diện vi khuẩn nội sinh trong Cây cúc xuyên chi (*Wedelia trilobata* (L) Hitchc) bằng kỹ thuật PCR. *Tạp chí khoa học*, 18a, 168-176.

Nguyễn Thị Thúy Nga, 2015. Phân lập, tuyển chọn một số chủng vi khuẩn nội sinh tạo chất kích thích sinh trưởng Indole-3-acetic acid (IAA) và đối kháng nấm gây bệnh thối cổ rễ cây thông. *Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp*, số 3, tr. 3948-3959.

Trần Thanh Phong, 2012. *Đánh giá khả năng cố định đạm của vi khuẩn nội sinh đến năng suất và chất lượng của trái khóm trồng tại huyện Tân Phước, tỉnh Tiền Giang*. Luận án Tiến sĩ, Trường ĐH Cần Thơ. 117 trang.

Nguyễn Vịnh, 2017. *Sản xuất - xuất khẩu hồ tiêu Việt Nam 2017*. Hiệp hội hồ tiêu Việt Nam.

Ames B.N, 1966. Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphate. *Methods in Enzymology*, Volume 8, 1996, pages 115-118.

Chung H., Park M, Madhaiyan M, Seshadri S, Song J, Cho H, Sa T, 2005. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea. *Soil Biol Biochem*, 37 (10): 1970-1974.

Glickmann E., And Y. Dessaux, 1995. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 61(2): 793-796.

Jasim, B., Jimtha John, C., Mathew, J., Radhakrishnan, E.K., 2013. Plant growth promoting potential of endophytic bacteria isolated from *Piper nigrum*. *Plant Growth Regulation*, Volume 71, Issue 1, pp 1-11.

Kumar, R. Singh, A. Yadav, 2016. Isolation and characterization of bacterial endophytes of *Curcuma longa* L. *3 Biotech* 6:60. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4752947>.

Mercado-Blanco J., Lugtenberg B. J. J., 2014. Biotechnological applications of bacterial endophytes. *Curr. Biotechnol*, 3: 60-75.

Nascimento S.B., A.M. Lima, B.N. Borges and C.R.B. de Souza, 2015. Endophytic bacteria from *Piper tuberculatum* Jacq.: isolation, molecular characterization, and in vitro screening for the control of *Fusarium solani* f. sp *piperis*, the causal agent of root rot disease in black pepper (*Piper nigrum* L.). *Genetics and Molecular Research*, 14 (3): 7567-7577.

Schwyn B. and Neilands J.B., 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160, 47-56.

Strobel G., 2003 Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes Infect*, 5: 535-544.

Toh S.C., Samuel L. and Awang A. S. A. H., 2016. Screening for antifungal-producing bacteria from *Piper nigrum* plant against *Phytophthora capsici*. *International Food Research Journal* 23(6): 2616-2622.

Isolation and characterization of endophytic bacteria from roots of black pepper

Nguyen Thu Trang, Tran Thi Thuy Ha,
Nguyen Xuan Truong, Nguyen Van Giang

Abstract

The study aimed to isolate and identify endophytic bacteria associated with roots of the black pepper (*Piper nigrum*). A total of 23 bacterial strains from root of black pepper were isolated and screened for various plant growth promoting properties containing IAA, siderophore production, phosphate solubilization, and fungal antagonism. Among 23 bacterial strains, 15 strains produced IAA, 20 strains produced siderophores, 4 strains solubilized phosphate and 9 strains exhibited antifungal *Pcapsici* activity. The two most prominent strains, namely LĐ15 and LĐ18 were selected.

The strain LĐ15 produced IAA, siderophore and solubilized phosphate. The strain LĐ18 produced IAA, siderophore and exhibited antifungal *Phytophthora capsici* activity. Based on the analysis of 16S rRNA nucleotide sequence of strain LĐ18 by BLAST programme, strain LĐ18 had closely relationship with *Bacillus sonorensis* SRCM 101395, therefore named *Bacillus sonorensis* LĐ18.

Keywords: Black pepper (*Piper nigrum* L.), endophytic bacteria, *Phytophthora capsici*, IAA, siderophore, *Bacillus* sp.

Ngày nhận bài: 16/7/2018

Người phản biện: TS. Trần Thị Huệ

Ngày phản biện: 24/7/2018

Ngày duyệt đăng: 18/9/2018

KHẢO SÁT VÀ ĐỊNH TÊN VI KHUẨN *Lactobacillus* sp. CÓ ĐẶC TÍNH PROBIOTIC TỪ MỘT SỐ THỰC PHẨM LÊN MEN TRUYỀN THỐNG

Nguyễn Thị Lâm Đoàn¹

TÓM TẮT

Bước đầu nghiên cứu xác định một số đặc tính sinh lý, sinh hóa của 40 chủng vi khuẩn lactic có hình dạng tế bào trực khuẩn được phân lập từ thực phẩm lên men và sơ bộ phân loại 7 chủng thuộc chi *Carnobacterium* và 33 chủng thuộc chi *Lactobacillus*. Các vi khuẩn *Lactobacillus* sp. hay được sử dụng trong nhiều sản phẩm probiotic, nghiên cứu này đã tuyển chọn vi khuẩn *Lactobacillus* sp. có một số đặc tính probiotic. Kết quả nghiên cứu đã chọn được chủng *Lactobacillus* sp. D5.5 có triển vọng probiotic như có khả năng kháng được môi trường acid trong dạ dày người pH2, pH3; Khả năng chịu được muối mật cao sau 4 h; Đối kháng vi khuẩn gây bệnh *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium và *Escherichia coli*; Kháng 04 chất kháng sinh Ampicillin, Penicillin, Chloramphenicol và Gentamycin, sinh cả 02 enzyme ngoại bào amylase và protease với kích thước vòng phân giải cơ chất 11 - 16 mm. Bằng phương pháp phân tích trình tự gene *pheS* đã xác định chủng D5.5 là loài *Lactobacillus fermentum*. Chủng này có thể ứng dụng tạo giống khởi động cho thực phẩm lên men có đặc tính probiotic hoặc tiếp tục được nghiên cứu sâu hơn để tạo chế phẩm probiotic cho người.

Từ khóa: *Lactobacillus*, probiotic, thực phẩm lên men, PCR, gene *pheS*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi khuẩn lactic (LAB) đóng vai trò quan trọng trong cuộc sống của chúng ta, chúng tạo ra các thực phẩm lên men, bảo quản thực phẩm khỏi bị hư hỏng và có những đặc tính probiotic tốt cho sức khỏe của vật chủ (Ramos *et al.*, 2013). Nhiều nghiên cứu đã tuyển chọn các chủng có đặc tính probiotic từ LAB được công bố trên các tạp chí khoa học trong và ngoài nước (Hoàng Quốc Khánh và Phạm Thị Lan Thanh, 2011; Ramos *et al.*, 2013); trong đó, *Lactobacillus* là một chi của LAB được sử dụng phổ biến tạo chế phẩm probiotic vì tính an toàn của chúng. Chúng phát huy tác dụng có lợi bởi tăng cường khả năng miễn dịch của vật chủ, khả năng bám dính tốt, ngăn ngừa ung thư, giảm cholesterol, hoạt tính kháng khuẩn cao chống lại tác nhân gây bệnh và cân bằng thành phần vi sinh vật ruột (Zhang *et al.*, 2015). Giraffa và cộng tác viên (2010) đã chỉ ra nhiều chủng thuộc chi *Lactobacillus* có đặc tính probiotic như *Lb. acidophilus* LA1, *Lb. rhamnosus* GG, *Lb. plantarum*

Lp01, *Lb. fermentum* RC14 đã được sử dụng rộng rãi và sản xuất ở quy mô công nghiệp.

Lactobacillus được tìm thấy nhiều và chúng chiếm ưu thế trong các thực phẩm lên men truyền thống (Nguyen *et al.*, 2013, Ramos *et al.*, 2013). Tuy nhiên, chủng vi khuẩn thuộc chi *Lactobacillus* có tiềm năng probiotic có mặt trong các loại thực phẩm lên men truyền thống vẫn chưa được biết đến nhiều. Các nghiên cứu chủ yếu mới nghiên cứu đặc tính probiotic của nhóm vi khuẩn lactic từ ruột gà và ứng dụng cho gà (Dương Thu Hương và Phạm Kim Đăng, 2015; Nguyễn Thị Lâm Đoàn và Nguyễn Thị Thanh Thủy, 2018). Do vậy, thực phẩm lên men truyền thống đặc biệt ở Việt Nam như Tôm chua, dưa muối, thịt chua... sẽ là các nguồn để tìm kiếm các chủng mới với các đặc tính probiotic mong muốn. Mục đích của nghiên cứu này kiểm tra một số đặc tính probiotic thông qua các thí nghiệm *in vitro* như khả năng chịu được acid và muối mật giống trong đường tiêu hóa của người, đối kháng các vi khuẩn gây bệnh,

¹ Khoa Công nghệ thực phẩm, Học viện Nông nghiệp Việt Nam