Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam 2026, 24(9): 1263-1273 https://doi.org/10.31817/tckhnnvn.2026.24.9.10
vie.vjas.vn

NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CỦA CHỦNG VI KHUẨN *Enterococcus lactis* E22 CÓ TIỀM NĂNG SINH TỔNG HỢP ENTEROCIN A PHÂN LẬP TỪ CÁ CHÉP (*Cyprinus carpio*)

Dương Văn Hoàn, Trần Thị Đào, Nguyễn Thị Thu,
Vũ Hiền Anh, Trịnh Thị Thu Thủy, Hoàng Đình Dương, 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: 20.03.2026 Ngày chấp nhận đăng: 25.08.2026

TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm phân lập và xác định đặc điểm của chủng *Enterococcus* sinh tổng hợp bacteriocin từ cá nước ngọt, hướng đến ứng dụng trong nuôi trồng thủy sản. Từ 10 mẫu cá thu thập tại các tỉnh phía Bắc Việt Nam, 36 chủng vi khuẩn lactic (LAB) được phân lập. Trong số các chủng phân lập, E22 thể hiện hoạt tính ức chế mạnh nhất đối với *Aeromonas hydrophila* (12,69 ± 0,19mm). Chất kháng khuẩn do E22 sinh ra duy trì hoạt tính khi xử lý ở nhiệt độ từ 60 đến 100°C, nhưng giảm mạnh ở 121°C và mất hoàn toàn hoạt tính sau 30 phút. Hoạt tính bị loại bỏ khi xử lý bằng proteinase K và trypsin, cho thấy hợp chất có bản chất là peptide/protein. Phản ứng PCR cho thấy E22 chỉ mang gen *enterocin A*. Trình tự 16S rRNA của E22 có mức tương đồng 99,76% với *Enterococcus lactis* MHH, được đặt tên là *E. lactis* E22.

Từ khóa: Bacteriocin, *Enterococcus*, enterocin A.

Characterization of *Enterococcus lactis* strain E22 isolated from Common Carp (*Cyprinus carpio*) with potential for Enterocin A production

ABSTRACT

This study was conducted to isolate and characterize bacteriocin-producing *Enterococcus* strains from freshwater fish, with the aim of applications in aquaculture. From 10 fish samples collected in Northern Vietnam, 36 lactic acid bacteria (LAB) strains were isolated. Among the isolates, strain E22 exhibited the highest inhibitory activity against *Aeromonas hydrophila* (12.69 ± 0.19mm). The antimicrobial substance produced by E22 demonstrated thermal stability from 60°C to 100°C, but its activity declined sharply at 121°C and was completely lost after 30 minutes. The activity was completely eliminated upon treatment with proteinase K and trypsin, confirming the peptidic/proteinaceous nature of the compound. PCR analysis revealed that strain E22 carried the *enterocin A* gene exclusively. Furthermore, 16S rRNA gene sequence analysis showed 99.76% identity to *Enterococcus lactis* MHH, thereby identifying it as *E. lactis* E22.

Keywords: Bacteriocin, *Enterococcus*, enterocin A.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nhiều loài vi khuẩn lactic (LAB) đã được ghi nhận là thành phần của hệ vi sinh vật tự nhiên trên động vật thủy sản. LAB có các đặc tính quan trọng như khả năng chịu axit, chịu muối mật, thích nghi với môi trường có độ mặn cao và có khả năng sinh tổng hợp bacteriocin. Nhờ đó, chúng được xem là những ứng viên tiềm năng cho bảo quản sinh học nhằm kiểm soát vi sinh vật gây hư hỏng và mầm bệnh trong thực phẩm, đồng thời là nguồn probiotic triển vọng trong nuôi trồng thủy sản (Muñoz-Atienza & cs., 2011).

Enterococcus là một chi thuộc nhóm vi khuẩn lactic (LAB), bao gồm nhiều loài, trong đó *Enterococcus faecalis* và *Enterococcus faecium* là hai loài phân bố rộng nhất trong nhiều nguồn khác nhau và được xem là vi sinh vật thường trú trong đường tiêu hóa người và động vật. Enterococci cũng hiện diện trong

nhiều loại thực phẩm, đặc biệt là các sản phẩm lên men như phô mai, xúc xích và rau củ muối. Nhờ sở hữu nhiều đặc tính công nghệ sinh học, enterococci có thể được sử dụng như chủng khởi động hoặc chủng bổ trợ (Leroy & cs., 2003). Bên cạnh đó, chúng có lợi thế cạnh tranh trong môi trường nhờ khả năng sản sinh các peptide kháng khuẩn gọi là enterocin. Enterocin là các peptide nhỏ, kỵ nước, bền nhiệt và được phân thành bốn nhóm chính: lantibiotic (nhóm I), không thuộc lantibiotic (nhóm II), enterocin vòng (nhóm III) và các protein lớn (nhóm IV) (Franz & cs., 2007). Enterocin được quan tâm nhiều do có phổ kháng khuẩn rộng, có khả năng ức chế các vi khuẩn Gram dương và một số vi khuẩn Gram âm như *Pseudomonas aeruginosa*. Một số enterocin khác còn có hoạt tính chống lại vi khuẩn và nấm gây hư hỏng thực phẩm. Ngoài ra, một số enterocin như enterocin A và L50A/B thể hiện hoạt tính kháng khuẩn mạnh và được xem là ứng viên thay thế kháng sinh để kiểm soát bệnh truyền nhiễm (Kang & cs., 2009).

Một vài chủng *Enterococcus* như *E. faecalis, E. faecium* và *E. mundtii* đã được công nhận là probiotic (Todorov & cs., 2009). Cho đến nay, nhiều nghiên cứu đã tập trung phân lập enterococci từ các sản phẩm lên men, nhưng các nghiên cứu trên động vật, đặc biệt là động vật thủy sản vẫn còn hạn chế. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân lập và xác định các đặc điểm đặc trưng của chủng *Enterococcus* sinh tổng hợp bacteriocin từ cá, hướng đến tiềm năng ứng dụng trong nuôi trồng thủy sản.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thu thập mẫu và phân lập vi khuẩn lactic (LAB)

Mẫu cá tươi được thu thập từ các chợ địa phương và vận chuyển đến phòng thí nghiệm trong điều kiện lạnh (4°C), việc xử lý mẫu được tiến hành trong vòng 12 giờ sau khi thu thập. Cá được rửa bằng nước cất vô trùng và khử trùng bề mặt bằng ethanol 70%, sau đó được mổ trong điều kiện vô trùng để tách lấy ruột. Ruột được cắt nhỏ, nghiền mịn và huyền phù trong nước muối sinh lý vô trùng (0,9% NaCl), sau đó pha loãng liên tiếp để phân lập vi khuẩn. Dịch huyền phù được cấy trải trên đĩa thạch MRS (g/l: Glucose 20,0; Meat extract 10,0; yeast extract 5,0; peptone 10,0; tween 80 1ml; triamonium citrate 2,0; $K_2HPO_4.3H_2O$ 2,0; CH_3COONa 5,0; $MgSO_4.7H_2O$ 0,58; $MnSO_4.4H_2O$ 0,28; $CaCO_3$ 5,0; agar 15,0; pH = 6,5 ± 0,2), các đĩa được ủ ở 30°C trong 24 giờ trong điều kiện hiếu khí. Các khuẩn lạc riêng lẻ có đặc điểm điển hình (màu trắng, đường kính 2-3mm và có mép nguyên vẹn) được chọn ngẫu nhiên theo mô tả của Nair & Surendran (2005). Các chủng này được làm thuần bằng cách cấy ria trên môi trường thạch MRS, sau đó được bảo quản trong glycerol 30% vô trùng và được lưu giữ ở -20°C.

2.2. Thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn

Những chủng vi khuẩn Gram dương, âm tính với catalase và âm tính với oxidase được chọn để sàng lọc hoạt tính kháng khuẩn. Các chủng được nuôi cấy qua đêm ở 30°C trong môi trường MRS lỏng, sau đó được ly tâm ở 10.000 vòng/phút trong 10 phút ở 10°C để thu được dịch nổi không chứa tế bào (cell-free supernatants). Dịch nổi này được trung hòa pH = 6,5 bằng NaOH 1M để loại bỏ ảnh hưởng ức chế từ axit hữu cơ và được tiệt trùng bằng màng lọc (0,22µm, Millipore, Bedford, MA). Hoạt tính kháng khuẩn được xác định bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch. Một trăm microlit (100µl) dịch nổi sau khi tiệt trùng bằng màng lọc được nhỏ vào mỗi giếng (5mm) tạo trên thạch mềm (0,8% w/v) đã cấy chủng vi khuẩn kiểm định *Aeromonas hydrophila* (phân lập từ mẫu cá chép bị bệnh thu thập tại Ninh Bình, lưu trữ tại phòng thí nghiệm Bộ môn Công nghệ vi sinh, Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam). Các đĩa được ủ ở 30°C trong 12 giờ, sau đó đo đường kính vùng ức chế xung quanh giếng. Sự xuất hiện của vùng ức chế có đường kính ít nhất 2mm được xem là kết quả dương tính.

2.3. Xác định bản chất của chất kháng khuẩn dựa trên độ bền nhiệt và độ nhạy với enzyme phân giải protein

Dịch nổi nuôi cấy không chứa tế bào (cell-free culture supernatants) được xử lý nhiệt ở các

mức: 60°C trong 30 phút, 80°C trong 30 phút, 100°C trong 30 phút, 121°C trong 15 phút và 121°C trong 30 phút. Hoạt tính còn lại được kiểm tra bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch.

Độ nhạy của hợp chất kháng khuẩn từ chủng tuyển chọn với enzyme phân giải protein được đánh giá bằng cách thêm proteinase K và trypsin vào dịch nuôi cấy ở nồng độ cuối cùng là 1 mg/ml (Cui & cs., 2020). Các mẫu được ủ ở 37°C trong 1 giờ, và hoạt tính còn lại được kiểm tra bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch. Dịch nổi không chứa tế bào chưa qua xử lý được sử dụng làm mẫu đối chứng.

2.4. Phát hiện gen enterocin

Sự hiện diện của các gen mã hóa enterocin đã được phát hiện theo phương pháp của Gaaloul & cs. (2014), bằng kỹ thuật khuếch đại PCR sử dụng các cặp mồi đặc hiệu mã hóa các enterocin phổ biến nhất. Các cặp mồi tương tác, nhiệt độ gắn mồi và kích thước sản phẩm khuếch đại được nêu chi tiết trong bảng 1. Phản ứng PCR cho các gen enterocin được thực hiện với chương trình nhiệt bao gồm: biến tính ban đầu ở 94°C trong 5 phút; tiếp theo là 35 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm biến tính ở 94°C trong 1 phút, gắn mồi ở nhiệt độ thích hợp (Bảng 1) trong 1 phút và kéo dài ở 72°C trong 40 giây; cuối cùng là bước kéo dài toàn bộ chuỗi ở 72°C trong 10 phút. Năm microlit (5µl) sản phẩm PCR của mỗi phản ứng được phân tích bằng điện di trên gel agarose (1,5%,w/v), nhuộm redsafe, sử dụng đệm 1X TAE với điện áp không đổi 100V trong 60 phút và được quan sát dưới ánh sáng tử ngoại (UV trans-illumination) (Gaaloul & cs., 2014).

2.5. Định danh chủng vi khuẩn dựa trên đặc điểm sinh học và phân tích trình tự gen 16S rRNA

Chủng vi khuẩn được định danh dựa trên sự kết hợp giữa các đặc điểm sinh học và phân tích trình tự gen 16S rRNA. Các đặc điểm hình thái và sinh hóa, bao gồm nhuộm Gram, khả năng di động cùng với các phản ứng sinh hóa như methyl red (MR), Voges-Proskauer (VP) và phản ứng catalase được sử dụng để nhận dạng sơ bộ chủng vi khuẩn.

DNA tổng số được tách chiết từ dịch nuôi cấy qua đêm trong môi trường MRS lỏng theo quy trình mô tả bởi Masoomi & cs. (2016) đã sửa đổi. Vùng gen 16S rRNA được khuếch đại bằng phản ứng chuỗi polymerase (PCR) sử dụng cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') và 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'). Phản ứng được thực hiện theo chu trình nhiệt: 95°C - 5 phút, 29 chu kỳ (95°C - 30 giây, 54°C - 30 giây, 72°C - 1 phút), 72°C trong 10 phút, giữ mẫu ở 4°C. Sản phẩm PCR được quan sát bằng điện di trên gel agarose 1,5% nhuộm redsafe. Giải trình tự DNA được thực hiện bởi công ty 1st BASE (Singapore) bằng phương pháp Sanger cải tiến. So sánh trình tự thu được với các trình tự có sẵn trong cơ sở dữ liệu công cộng GenBank bằng công cụ BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) trên trang web của Trung tâm Thông tin Công nghệ Sinh học Quốc gia Hoa Kỳ (NCBI). Phân tích cây phát sinh loài dựa trên trình tự gen 16S rRNA được thực hiện bằng phần mềm MEGA X theo phương pháp maximum likelihood.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đánh giá hoạt tính kháng vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* của một số chủng vi khuẩn có tiềm năng sinh tổng hợp bacteriocin phân lập được từ ruột cá chép

3.1.1. Phân lập và sàng lọc chủng vi khuẩn Enterococcus có khả năng kháng vi khuẩn Aeromonas hydrophila từ ruột cá

Trên môi trường thạch MRS, thu được 36 chủng vi khuẩn có khả năng phân giải $CaCO_3$ từ 10 mẫu cá thu thập được từ các địa bàn trong khu vực Hà Nội, Hưng Yên, Thái Nguyên, Ninh Bình và Hải Phòng. Các chủng vi khuẩn phân lập đều có khuẩn lạc màu trắng đục, hình tròn, kích thước nhỏ. Tế bào có đặc điểm đặc trưng của chi vi khuẩn *Enterococcus* là hình cầu, bắt màu Gram dương theo khóa phân loại của Bergey (Vos & cs., 2011). Các chủng vi khuẩn *Enterococcus* phân lập sau đó được kiểm tra khả năng ức chế chủng vi sinh vật kiểm định *Aeromonas hydrophila* bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Trong đó, chủng E22 được phân lập từ ruột cá chép cho thấy khả năng kháng mạnh nhất đối với

Aeromonas hydrophila, đường kính vòng kháng khuẩn là 12,69 ± 0,19mm (Hình 1). Bốn chủng vi khuẩn còn lại có khả năng kháng khuẩn với hoạt tính thấp hơn so với chủng E22, với đường kính vòng kháng khuẩn trong khoảng từ 2,16 ± 0,23 đến 6,3 ± 0,41mm.

Kết quả nghiên cứu này phù hợp với nhiều công bố trước đây về khả năng đối kháng của các loài *Enterococcus* đối với vi khuẩn gây bệnh thuộc chi *Aeromonas*. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng các chủng *Enterococcus* có khả năng sinh tổng hợp các chất kháng khuẩn góp phần ức chế các vi khuẩn Gram âm gây bệnh như Puvanasundram & cs. (2022) cho thấy khả năng kháng khuẩn của *E. hirae* LAB3 đối với chủng vi khuẩn gây bệnh *Aeromonas hydrophila* đạt 10,3 ± 0,3mm. Một nghiên cứu khác của Hakkinen & cs. (2025) trên các chủng *Enterococcus* phân lập từ cá cũng ghi nhận khả năng ức chế *A. hydrophila*, với đường kính vòng kháng khuẩn dao động từ 1,70 đến 5,08mm.

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng *Enterococcus* có khả năng sinh tổng hợp bacteriocin (enterocin) với phổ kháng khuẩn rộng, ức chế hiệu quả cả vi khuẩn Gram dương và Gram âm.Ben Braïek & cs. (2017) báo cáo rằng *Enterococcus lactis* phân lập từ tôm *Penaeus vannamei* có khả năng ức chế các vi khuẩn gây bệnh như *Listeria monocytogenes* và *Staphylococcus aureus* với sự hình thành vòng kháng khuẩn rõ rệt. Ngoài ra, Cui & cs. (2020) cũng chứng minh rằng *E. faecalis* CG-9 sinh ra các hợp chất kháng khuẩn có khả năng ức chế nhiều vi khuẩn gây bệnh và gây hư hỏng thực phẩm như *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* và *Staphylococcus aureus*. Những kết quả này cho thấy tiềm năng của các chủng *Enterococcus* như một nguồn bacteriocin tự nhiên trong kiểm soát vi khuẩn gây bệnh theo hướng sinh học.

3.1.2. Đặc tính của chất kháng khuẩn do chủng E22 sinh tổng hợp

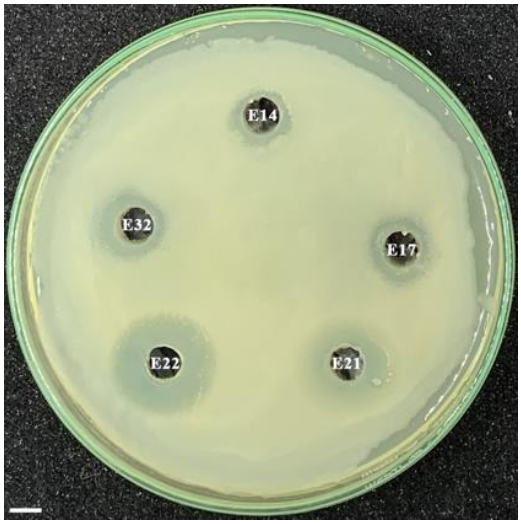
Ảnh hưởng của xử lý nhiệt đến hoạt tính kháng khuẩn

Bacteriocin là peptide/protein có hoạt tính phụ thuộc vào cấu trúc bậc ba, được ổn định bởi liên kết disulfua và hydro. Nhiệt độ cao phá vỡ liên kết hydro, làm biến đổi cấu trúc không gian và gây mất hoạt tính (biến tính) (Dương Văn Hoàn & cs., 2023). Bản chất của chất kháng khuẩn sinh tổng hợp từ chủng *Enterococcus* đối kháng với *Aeromonas hydrophila* được xác định bằng phương pháp xử lý nhiệt.

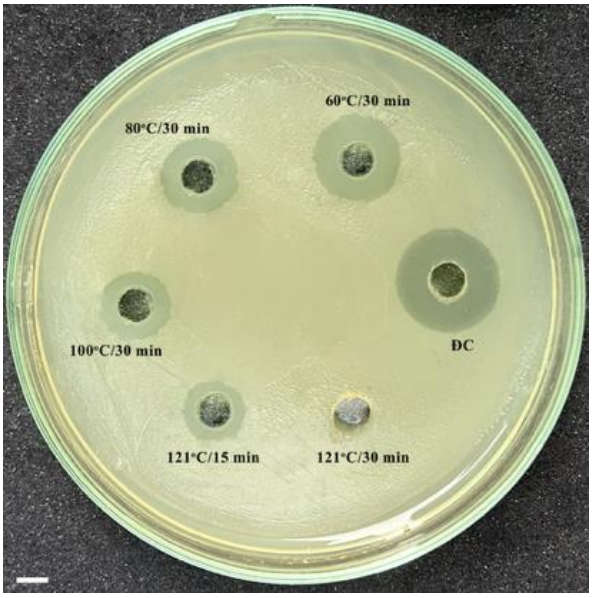
Kết quả cho thấy chất kháng khuẩn sinh bởi chủng E22 có khả năng duy trì hoạt tính sau xử lý nhiệt, nhưng giảm dần khi nhiệt độ và thời gian xử lý tăng. Hoạt tính còn lại đạt 78,66%, 63,39% và 53,86% lần lượt sau xử lý ở 60, 80 và 100°C trong 30 phút so với đối chứng. Đáng chú ý, chất kháng khuẩn vẫn duy trì 41,42% hoạt tính sau xử lý ở 121°C trong 15 phút, mất hoàn toàn hoạt tính sau xử lý ở 121°C trong 30 phút. Kết quả cho thấy chất kháng khuẩn E22 có khả năng chịu nhiệt tương đối tốt, đặc biệt ở 100°C trong 30 phút và 121°C trong 15 phút.

Bảng 1. Mồi được sử dụng trong nghiên cứu

Gen	Kích thước sản phẩm (bp)	Đoạn mồi	Trình tự (5'-3')	Nhiệt độ gắn mồi (°C)	Tài liệu tham khảo
EntA	130	A F	GGTACCACTCATAGTGGAAA	58	De Vuyst & cs. (2003)
		A R	CCCTGGAATTGCTCCACCTAA		
EntB	180	B F	CAAAATGTAAAAGAATTAAGTACG	56	De Vuyst & cs. (2003)
		B R	AGAGTATACATTTGCTAACCC		
EntP	132	P F	GCTACGCGTTCATATGGTAAT	60	De Vuyst & cs. (2003)
		P R	TCCTGCAATATTCTCTTTAGC		
LB50A	135	LB50A-F	ATGGGAGCAATCGCAAAATTA	50	Batdorj & cs. (2006)
		LB50A-R	TTTGTTAATTGCCCATCCTTC		
LB50B	252	LB50B-F	ATGGGAGCAATCGCAAAATTA	49	Cintas & cs. (1998)
		LB50B-R	CCTACTCCTAAGCCTATGGTA		



Hình 1. Khả năng đối kháng với *Aeromonas hydrophila* của các chủng vi khuẩn *Enterococcus* phân lập từ ruột cá chép (Bar 5mm)



Hình 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính kháng khuẩn của chất kháng khuẩn do chủng E22 sinh tổng hợp (Bar 5mm)

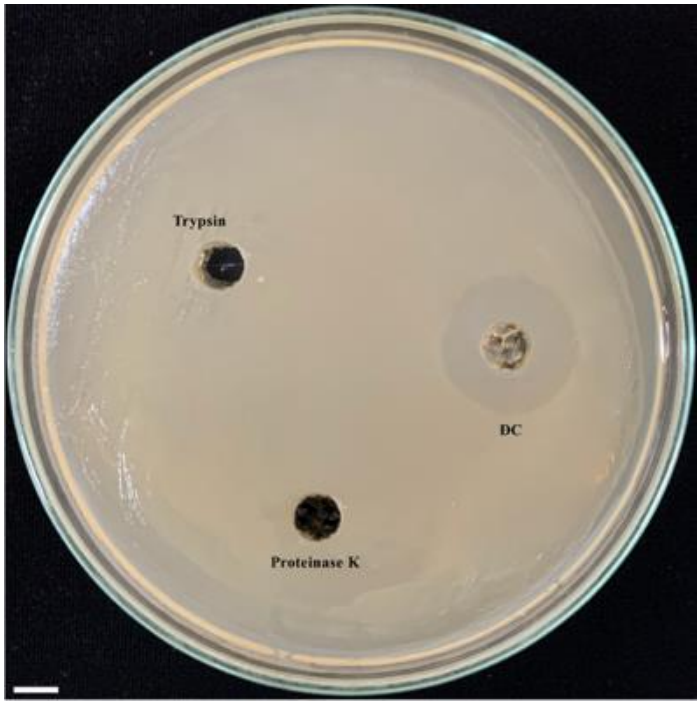
Kết quả này tương đồng với một số báo cáo về tính chịu nhiệt của chất kháng khuẩn từ các chủng *Enterococcus* như nghiên cứu của Garmasheva & Oleschenko (2023) ghi nhận chất kháng khuẩn từ *E. faecalis* 58, *Enterococcus* sp. 226 và *Enterococcus* sp. 423 vẫn duy trì hoạt tính sau xử lý ở 100°C trong 20 phút và 121°C trong 15 phút. Tương tự, Hernandez-Mendoza & cs. (2024) ghi nhận các chất kháng khuẩn dạng BLIS (bacteriocin-like inhibitory substances) từ *E. lactis* vẫn duy trì hoạt tính sau xử lý ở 121°C trong 15 phút. Các kết quả trên cho thấy khả năng chịu nhiệt của chất kháng khuẩn sinh tổng hợp bởi chủng E22 phù hợp với đặc tính đã được ghi nhận ở một số chất kháng khuẩn của chi *Enterococcus*.

Ảnh hưởng của enzyme phân giải protein đến hoạt tính kháng khuẩn

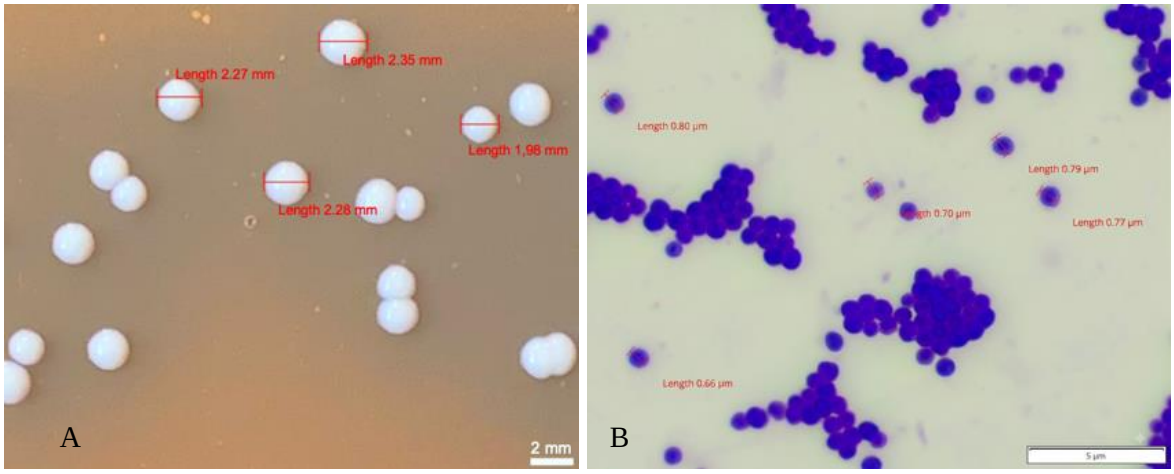
Chất kháng khuẩn sinh ra bởi chủng vi khuẩn E22 tiếp tục được khẳng định là

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 chủng vi sinh vật kiểm định *Aeromonas hydrophila* (Hình 3). Qua đó, chất kháng khuẩn sinh ra bởi chủng E22 có bản chất là protein, bị thủy phân khi xử lý với enzyme proteinase K và trypsin.

Những đặc điểm quan sát được trong nghiên cứu này tương đồng với các kết quả đã được công bố về bacteriocin do các loài *Enterococcus* sinh ra. Cụ thể, Ben Braïek & cs. (2017) khi nghiên cứu chủng *Enterococcus lactis* phân lập từ tôm *Penaeus vannamei* đã chứng minh rằng *enterocin P* có bản chất peptide/protein và bị bất hoạt hoàn toàn khi xử lý bằng các enzyme thủy phân protein, khẳng định đặc trưng điển hình của bacteriocin (Ben Braïek & cs., 2017). Tương tự, Cui & cs. (2020) khi nghiên cứu chủng *Enterococcus faecalis* CG-9 phân lập từ nước bọt người đã báo cáo về một bacteriocin mới, hợp chất này bị mất hoạt tính khi xử lý với các enzyme phân giải protein. Nghiên cứu của Phạm Hồng Hiển & cs. (2022) cũng đã xác định được chủng vi khuẩn *Enterococcus faecium* HN1 có khả năng sinh tổng hợp bacteriocin, hoạt tính kháng khuẩn của bacteriocin sinh tổng hợp bởi chủng vi khuẩn này bị mất hoàn toàn khi xử lý bằng enzyme proteinase K. Nghiên cứu trước đó của Dương Văn Hoàn & cs. (2023) đã báo cáo rằng hoạt chất kháng khuẩn sinh tổng hợp bởi chủng vi khuẩn *Enterococcus faecalis* ET04 bị mất hoàn toàn sau khi xử lý bằng enzyme trypsin và proteinase K, ủ ở 37°C trong 2 tiếng. Các kết quả này phù hợp với thí nghiệm trong nghiên cứu hiện tại, khi hoạt tính kháng khuẩn của chủng *Enterococcus* bị ảnh hưởng rõ rệt bởi các enzyme thủy phân protein. Việc đối chiếu các kết quả thu được với các công bố trước đó cho thấy tính nhất quán về bản chất protein của bacteriocin trong nhóm vi khuẩn *Enterococcus*. Từ đó có thể khẳng định rằng chất kháng khuẩn do chủng E22 trong nghiên cứu này sinh ra là bacteriocin. Đáng chú ý, bacteriocin của chủng này vẫn duy trì hoạt tính sau khi xử lý ở nhiệt độ cao, do đó được tuyển chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 3. Ảnh hưởng của enzyme phân giải protein đến hoạt tính kháng khuẩn sinh tổng hợp bởi chủng vi khuẩn E22 (Bar 5mm)



Hình 4. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc (A) **và đặc điểm hình thái tế bào ở độ phóng đại 1.000 lần** (B) **của chủng vi khuẩn *Enterococcus* sp. E22**

3.2. Nghiên cứu đặc điểm sinh học và phân loại của chủng E22

3.2.1. Đặc điểm hình thái

Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào là chỉ tiêu quan trọng trong phân loại vi sinh vật, góp phần xác định và định danh vi sinh vật. Kết quả quan sát hình thái khuẩn lạc cho thấy chủng E22 khi nuôi cấy trên môi trường thạch MRS tạo khuẩn lạc có dạng tròn, kích thước nhỏ (1,98-2,35mm), màu trắng đục, bề mặt nhẵn và hơi lồi. Quan sát dưới kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 1.000 lần, sử dụng phương pháp nhuộm Gram, cho thấy tế bào của chủng E22 có dạng cầu khuẩn (0,66-0,80µm), bắt màu Gram dương (Hình 4). Các đặc điểm này phù hợp với các mô tả trước đây của các vi khuẩn thuộc chi *Enterococcus*, vốn có khuẩn lạc nhỏ, màu trắng đến xám nhạt và tế bào có dạng cầu khuẩn Gram dương, thường sắp xếp thành cặp hoặc chuỗi ngắn (Moreno & cs., 2006).

3.2.2. Xác định các đặc điểm sinh lý, sinh hóa

Kết quả khảo sát các đặc điểm sinh lý - sinh hóa cho thấy chủng E22 không có khả năng di động, không sinh catalase, âm tính với oxidase, indole, nitrate và citrate, dương tính với phản ứng methyl red (MR) và âm tính với phản ứng Voges-Proskauer (VP) (Bảng 2).

Các đặc điểm này nhìn chung phù hợp với đặc điểm điển hình của các vi khuẩn thuộc chi *Enterococcus* đã được công bố trước đây, bao gồm đặc tính không di động, không sinh catalase và oxidase, cũng như phản ứng MR dương tính. Tuy nhiên, phản ứng Voges-Proskauer (VP) của chủng *Enterococcus* sp. E22 cho kết quả âm tính, trong khi một số nghiên cứu đã ghi nhận phản ứng này có thể dương tính hoặc biến thiên tùy theo từng chủng. Sự biến thiên trong kết quả phản ứng VP này đã được ghi nhận trong nhiều nghiên cứu trước đây, trong đó phản ứng VP ở *Enterococcus* spp. không ổn định giữa các chủng (Klibi & cs., 2013). Điều này có thể liên quan đến sự khác biệt trong con đường chuyển hóa carbon giữa các chủng, đặc biệt là khả năng tạo acetoin - sản phẩm trung gian được phát hiện trong phản ứng VP. Ngoài ra, các yếu tố như điều kiện nuôi cấy, thành phần môi trường và thời gian ủ cũng có thể ảnh hưởng đến kết quả phản ứng.

3.2.3. Phân loại bằng phân tích trình tự 16S rRNA

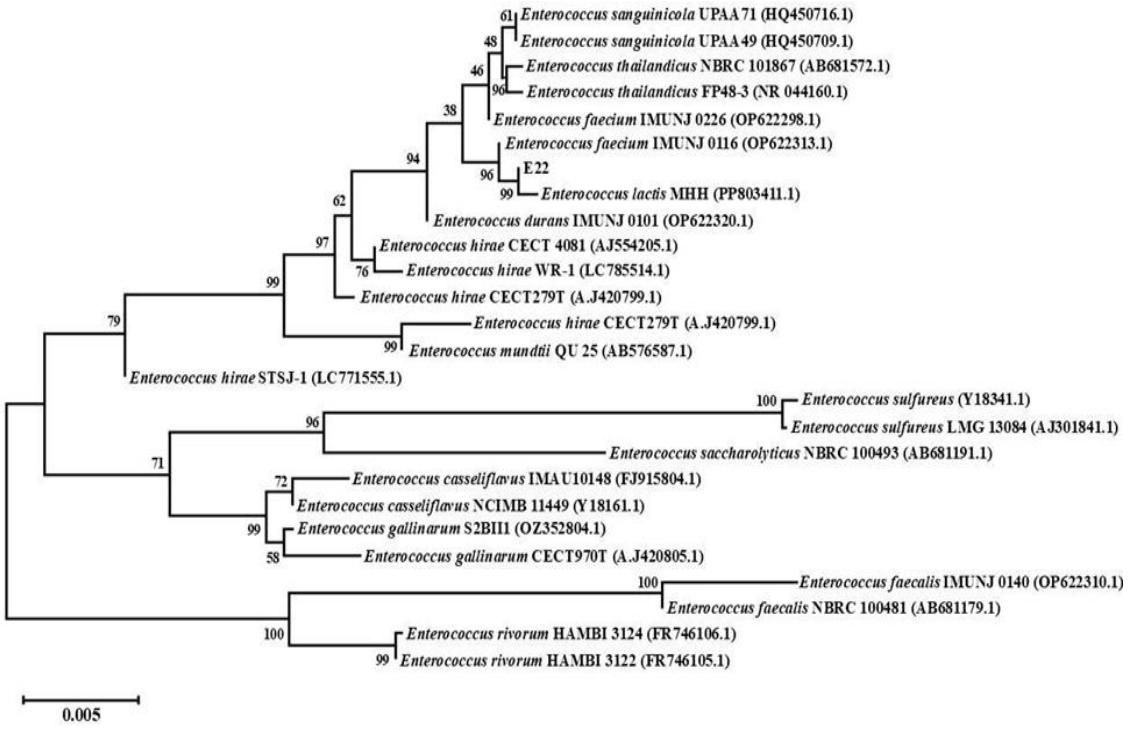
Để định danh chính xác chủng vi khuẩn *Enterococcus* sp. E22, phương pháp sinh học phân tử được sử dụng dựa trên mức độ tương đồng của đoạn gen mã hóa 16S rRNA của chủng vi khuẩn này với các chủng vi khuẩn đã được công bố trên Genbank. Kết quả so sánh trình tự và cây phát sinh loài cho thấy chủng vi

khuẩn E22 có mức độ tương đồng với chủng vi khuẩn *E. lactis* MHH là 99,76%, nằm cùng nhánh với chủng vi khuẩn *E. lactis* MHH với giá trị bootstrap 99% (Hình 5). Kết quả này khẳng định chủng E22 có quan hệ di truyền rất gần gũi và thuộc cùng loài với *E. lactis*. Kết hợp các đặc điểm sinh học và sinh học phân tử đã phân tích, chủng vi khuẩn này được định danh là *Enterococcus lactis* E22. Trình tự gen 16S rRNA của chủng *E. lactis* E22 đã được đăng ký trên cơ sở dữ liệu GenBank với mã truy cập PZ812239.

Bảng 2. Đặc điểm sinh hóa của chủng vi khuẩn *Enterococcus* sp. E22

Đặc điểm sinh hóa	*Enterococcus* sp. E22	Các chủng *Enterococcus* đã được công bố trước đó	Tài liệu tham khảo
Hình thái khuẩn lạc	Khuẩn lạc tròn, nhỏ, trắng đục, bề mặt lồi	Khuẩn lạc tròn, nhỏ, trắng/xám, bề mặt nhẵn, hơi lồi	Moreno & cs. (2006)
Đặc điểm tế bào	Cầu khuẩn, Gram +	Cầu khuẩn Gram dương, xếp đôi/chuỗi	Franz & cs. (2011)
Di động	-	-	Franz & cs. (2011)
Sinh bào tử	-	-	Moreno & cs. (2006)
Catalase	-	-	Franz & cs. (2011)
Oxidase	-	-	Franz & cs. (2011)
Indole	-	-	Klibi & cs. (2013)
Khả năng khử nitrate	-	±	Klibi & cs. (2013)
Khả năng khử Citrate	-	-	Klibi & cs. (2013)
MR (Methyl Red)	+	+	Klibi & cs. (2013)
VP (Voges-Proskauer)	-	±	Klibi & cs. (2013)

Ghi chú: (+) phản ứng dương tính; (-) phản ứng âm tính; (±) kết quả biến thiên tùy theo chủng vi khuẩn.

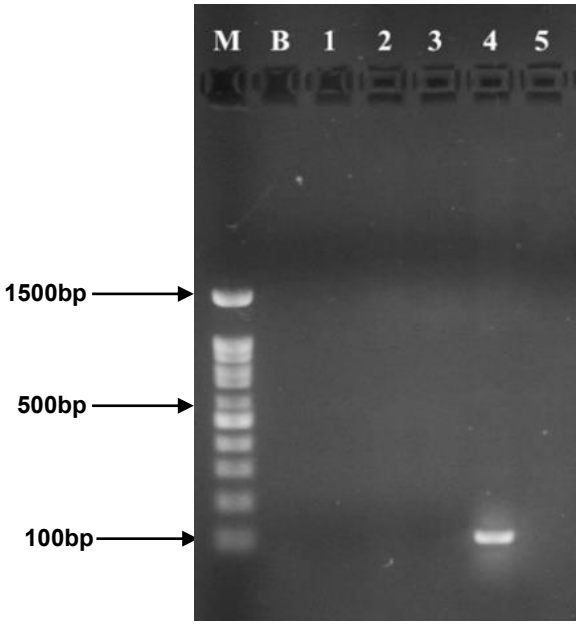


Hình 5. Cây phân loại được xây dựng dựa trên trình tự vùng gen 16S rRNA của chủng vi khuẩn *E. lactis* E22

3.3. Phát hiện gen sinh tổng hợp *Enterocin*

Phản ứng PCR với cặp mồi *enterocin A* từ DNA của chủng *E. lactis* E22 cho một băng vạch có kích thước ~130bp, trong khi các gen bacteriocin khác (*enterocin P, B*, LB50A, LB50B) không được khuếch đại (Hình 6). Kết quả này tương tự như nghiên cứu đã công bố trước đó của De Vuyst & cs. (2003), rằng gen *entA* là một trong những gen bacteriocin phổ biến nhất ở các chủng *Enterococcus*, đặc biệt ở những chủng phân lập từ thực phẩm lên men và đường ruột động vật. Tương tự, Franz & cs. (2007) cũng ghi nhận rằng sự hiện diện của *enterocin A* thường cao hơn đáng kể so với *enterocin P* hay *enterocin B* trong nhiều nguồn mẫu khác nhau, phản ánh sự phân bố không đồng nhất của các gen bacteriocin trong chi *Enterococcus* (Franz & cs., 2007). Nghiên cứu của Fujii & cs. (2025) phân tích gen bacteriocin trên 38 chủng *E. faecium* lâm sàng cho thấy tỷ lệ xuất hiện của gen *enterocin A* rất cao (97,4%), trong khi *enterocin B* chỉ hiếm gặp (2,6%), và các gen bacteriocin khác (*enterocin NKR-5-3B*, T8, BacAS9) cũng có tần suất biến thiên đáng kể giữa mỗi chủng, điều này cho thấy sự đa dạng và không đồng nhất của các gen này trong cùng loài (*E. faecium*) (Fujii & cs., 2025). Một nghiên cứu khác cũng cho thấy số lượng và loại gen bacteriocin khác nhau thay đổi giữa các chủng *Enterococcus*, chịu tác động bởi điều kiện sinh thái và đặc điểm di truyền riêng của từng chủng (Suárez & cs., 2015). Bên cạnh đó, các nghiên cứu cho thấy các gen *enterocin* như *enterocin A, B, P, SEK4* và *L50* có phổ kháng khuẩn khác nhau và thường được khảo sát kết hợp trong các mô hình thử nghiệm để đánh giá hiệu lực đối với các vi khuẩn gây bệnh, điển hình là *Clostridium perfringens* (García-Vela & cs., 2024).

Kết quả PCR với cặp mồi *entA* cho thấy một băng khuếch đại đặc hiệu ở *E. lactis* E22, xác nhận sự hiện diện của gen *enterocin A*. Kết quả này phù hợp với các công bố trước đây, trong đó entA được ghi nhận là một trong những gen mã hóa bacteriocin phổ biến ở các chủng *Enterococcus*. Theo Landete & cs. (2024), enterocin đóng vai trò quan trọng trong hoạt tính kháng khuẩn, qua đó góp phần vào khả năng tương tác và cạnh tranh của *Enterococcus* với các vi sinh vật khác. Sự hiện diện của gen *enterocin A* ở chủng *E. lactis* E22 có thể liên quan đến hoạt tính đối kháng của chủng này đối với *Aeromonas hydrophila* được ghi nhận trong nghiên cứu.



Ghi chú: M: Marker; B: Blank; lane 1: LB50A, lane 2: LB50B, lane 3: Ent P, lane 4: Ent A, lane 5: Ent B

Hình 6. Sản phẩm PCR khuếch đại gen sinh tổng hợp *Enterocin* từ DNA của chủng vi khuẩn *E. lactis* E22

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã phân lập và định danh thành công chủng *Enterococcus lactis* E22 từ mẫu cá chép. Chủng vi khuẩn này có khả năng sinh tổng hợp bacteriocin với hoạt tính ức chế mạnh đối với *Aeromonas hydrophila*. Chất kháng khuẩn do *E. lactis* E22 sinh tổng hợp duy trì hoạt tính sau khi xử lý nhiệt trong các điều kiện khảo sát và bị bất hoạt bởi enzyme phân giải protein, cho thấy chất kháng khuẩn có bản chất protein/peptide, phù hợp với đặc tính của enterocin. Chủng *E. lactis* E22 mang gen *enterocin A* và thể hiện các đặc điểm sinh học điển hình của chi *Enterococcus*. Kết quả này cho thấy *E. lactis* E22 là nguồn sinh tổng hợp bacteriocin tiềm năng, mở ra triển vọng ứng dụng nhằm kiểm soát mầm bệnh trong nuôi trồng thủy sản theo hướng sinh học bền vững.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện dưới sự hỗ trợ kinh phí của dự án Việt Bỉ từ đề tài: Tuyển chọn các chủng vi khuẩn *Enterococcus* sp. có khả năng sinh tổng hợp bacteriocin ứng dụng trong nuôi trồng thuỷ sản (mã số T2025-VB-12-18).

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 of Food Science of Animal Resources. 38(5): 1064-1079.

Batdorj B., Dalgalarrondo M., Choiset Y., Pedroche J., Métro F., Prévost H., Chobert J. M. & Haertlé T. (2006). Purification and characterization of two bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Mongolian airag. Journal of Applied Microbiology. 101(4): 837-848.

Ben Braïek O., Ghomrassi H., Cremonesi P., Morandi S., Fleury Y., Le Chevalier P., Hani K., Bel Hadj O. & Ghrairi T. (2017). Isolation and characterisation of an enterocin P-producing *Enterococcus lactis* strain from a fresh shrimp (*Penaeus vannamei*). Antonie Van Leeuwenhoek. 110(6): 771-786.

Cintas L. M., Casaus P., Holo H., Hernandez P. E., Nes I.F. & Håvarstein L.S. (1998). Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to *Staphylococcal hemolysins*. Journal of Bacteriology. 180(8): 1988-1994.

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.

De Vuyst L., Moreno M.F. & Revets H. (2003). Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. International Journal of Food Microbiology. 84(3): 299-318.

Dương Văn Hoàn, Đặng Thị Thanh Tâm, Đinh Trường Sơn, Nguyễn Xuân Trường, Phạm Thị Dung & Nguyễn Xuân Cảnh (2023). Phân lập, tuyển chọn và nghiên cứu đặc điểm của chủng vi khuẩn *Enterococcus faecalis* ET04 có khả năng sinh bacteriocin. Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam 2023. 21(7): 868-877.

Franz C.M., Huch M., Abriouel H., Holzapfel W. & Gálvez A. (2011). Enterococci as probiotics and their implications in food safety. International Journal of Food Microbiology. 151(2): 125-140.

Franz C.M., Van Belkum M.J., Holzapfel W.H., Abriouel H. & Gálvez A. (2007). Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. FEMS Microbiology Reviews. 31(3): 293-310.

Fujii A., Kawada-Matsuo M., Le M. N.-T., Suzuki Y., Nishihama S., Shiba H., Aikawa T. & Komatsuzawa H. (2025). Comprehensive analysis of bacteriocins produced by clinical enterococcal isolates and their antibacterial activity against Enterococci, including VRE. Scientific Reports. 15(1): 4846: 1-13.

Gaaloul N., Ben Braiek O., Berjeaud J. M., Arthur T., Cavera V. L., Chikindas M. L., Hani K. & Ghrairi T. (2014). Evaluation of Antimicrobial Activity and Safety Aspect of *Enterococcus italicus* GGN 10 Strain Isolated from Tunisian Bovine Raw Milk. Journal of Food Safety. 34(4): 300-311.

García-Vela S., Guay L.-D., Rahman M.R.T., Biron E., Torres C. & Fliss I. (2024). Antimicrobial activity of synthetic enterocins A, B, P, SEK4, and L50, alone and in combinations, against Clostridium perfringens. International Journal of Molecular Sciences. 25(3): 1597: 1-13.

Garmasheva I.L. & Oleschenko L.T. (2023). Screening of bacteriocin-producing dairy *Enterococcus* strains using low-cost culture media. Frontiers in Microbiology. 14: 1168835.

Hakkinen M., Faqih A.R., Prihanto A.A. & Anitasari S. (2025). Isolation of lactic acid bacteria as potential probiotic candidates from the digestive tract of *Gobiopterus* sp. Biodiversitas. 26(2): 1008-1017.

Hernandez-Mendoza E., Peña-Ramos E.A., Juneja V.K., Martínez-Téllez M.Á., González-Ríos H., Paredes-Aguilar M.D L.C., Valenzuela-Melendres M. & Aispuro-Hernández E. (2024). Antagonistic activity of bacteriocin-like inhibitory substances from *Enterococcus lactis* isolated from the surface of jalapeño pepper against foodborne pathogens. Microbiology Research. 15(2): 889-899

Kang B.S., Seo J.-G., Lee G.-S., Kim J.-H., Kim S.Y., Han Y. W., Kang H., Kim H.O., Rhee J.H. & Chung M.-J. (2009). Antimicrobial activity of enterocins from *Enterococcus faecalis* SL-5 against Propionibacterium acnes, the causative agent in acne vulgaris, and its therapeutic effect. The Journal of Microbiology. 47(1): 101-109.

Klibi N., Said L.B., Jouini A., Slama K.B., López M., Sallem R.B., Boudabous A. & Torres C. (2013). Species distribution, antibiotic resistance and virulence traits in enterococci from meat in Tunisia. Meat science. 93(3): 675-680.

Landete J.M., Montiel R., Rodríguez-Mínguez E. & Arqués J.L. (2024). Enterocins produced by enterococci isolated from breast-fed infants: antilisterial potential. Children. 11(2), 261:2-12

Leroy F., Moreno M.F. & De Vuyst L. (2003). *Enterococcus faecium* RZS C5, an interesting bacteriocin producer to be used as a co-culture in food fermentation. International Journal of Food Microbiology. 88(2-3): 235-240.

Moreno M. F., Sarantinopoulos P., Tsakalidou E. & De Vuyst L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. International Journal of Food Microbiology. 106(1): 1-24

Muñoz-Atienza E., Landeta G., De Las Rivas B., Gómez-Sala B., Muñoz R., Hernández P.E., Cintas L.M. & Herranz C. (2011). Phenotypic and genetic evaluations of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from fish and fish products. International Journal of Food Microbiology. 146(2): 212-216.

Nair P.S. & Surendran P.K. (2005). Biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from fish and prawn. Journal of Culture Collections. 4: 48-52

Phạm Hồng Hiển, Dương Văn Hoàn, Trần Thị Đào, Phạm Thị Dung, Nguyễn Thị Thu, Phạm Thị Thu Trang & Nguyễn Xuân Cảnh (2022). Phân lập, tuyển chọn và định danh chủng vi khuẩn *Enterococcus faecium* HN1 có khả năng sinh bacteriocin. Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam. 20(3): 370-380.

Puvanasundram P., Chong C.M., Sabri S., Yusoff M.S.M., Lim K.C. & Karim M. (2022). Efficacy of single and multi-strain probiotics on in vitro strain compatibility, pathogen inhibition, biofilm formation capability, and stress tolerance. Biology. 11(11). 1644.

Suárez N.E., Bonacina J., Hebert E.M. & Saavedra M.L. (2015). Genome mining and transcriptional analysis of bacteriocin genes in *Enterococcus faecium* CRL1879. Journal of Data Mining in Genomics & Proteomics. 6(3): 1-8.

Todorov S.D., Von Mollendorff J.W., Moelich E., Muller N., Witthuhn R.C. & Dicks L.M. (2009). Evaluation of potential probiotic properties of *Enterococcus mundtii*, its survival in boza, and in situ bacteriocin production. Food Technology & Biotechnology. 47(2): 178-191.