

Phân lập và định danh vi khuẩn lactic từ mực muối

Phạm Thị Kim Ngọc^{*1}, Nguyễn Thị Minh Nguyệt²,
Thái Mỹ Ngân², Nguyễn Văn Dũng²

¹Khoa Hóa học và Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Bà Rịa - Vũng Tàu

²Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, trường Đại học Công nghiệp TP.HCM

Nhận ngày 10 tháng 10 năm 2014

Chỉnh sửa ngày 30 tháng 10 năm 2014; Chấp nhận đăng ngày 20 tháng 11 năm 2014

Tóm tắt: Mực muối là một dạng sản phẩm lên men truyền thống của người miền Trung Việt Nam. Trong quá trình muối mực, dưới sự tác động của nồng độ muối cao cũng như sự hiện diện của các nhóm vi sinh vật khác nhau đã tạo nên nét đặc trưng của sản phẩm. Một trong những yếu tố quyết định đến chất lượng sản phẩm là hệ vi sinh vật có khả năng lên men lactic. Kết quả bước đầu chúng tôi đã phân lập được 9 chủng vi khuẩn Gram (+) hiện diện trong 9 mẫu mực muối khác nhau. Kết hợp quan sát đặc điểm hình thái với phương pháp hóa sinh, phân tích và so sánh trình tự vùng gen 16S rDNA chúng tôi đã định danh được 9 loài vi khuẩn hiện diện trong mực muối là *Bacillus thuringiensis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. atropheus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*; *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum* và 1 loài *Staphylococcus sp.*

Từ khóa: Mực muối, 16S rDNA, lên men lactic, vi khuẩn Lactic.

1. Đặt vấn đề

Mực muối (hay mắm mực) là một sản phẩm lên men truyền thống được chế biến từ mực ống tươi nhỏ. Mực ướp muối theo tỉ lệ khối lượng 3 mực: 1 muối, đậy kín và để lên men tự nhiên, sau khoảng 2-3 tháng là ăn được. Trong quá trình muối mực, dưới sự tác động của nồng độ muối cao cũng như sự hiện diện của các nhóm vi sinh vật khác nhau đã tạo nên nét đặc trưng về mùi vị và cấu trúc của sản phẩm. Một trong những yếu tố quyết định đến chất lượng sản phẩm là hệ vi sinh vật có khả năng lên men lactic (LAB). Mực muối là một sản phẩm truyền thống nhưng chưa được

nghiên cứu một cách khoa học và đầy đủ, chất lượng sản phẩm này phụ thuộc nhiều vào kinh nghiệm của người chế biến và điều kiện môi trường ủ khi lên men. Vì vậy việc phân lập và định danh các giống LAB có trong sản phẩm này là rất cần thiết phục vụ cho công tác nghiên cứu và giảng dạy. Trên cơ sở đó góp phần kiểm soát quy trình chế biến bằng nguồn giống khởi động để duy trì chất lượng ổn định cho sản phẩm truyền thống này.

2. Nguyên vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Mực tươi mua tại chợ Phước Nguyên, thành phố Bà Rịa, tỉnh Bà Rịa - Vũng Tàu. Mực tươi,

*Tác giả liên hệ. ĐT: 84-4-985929591

Email: kimngoc080283@gmail.com

lớp vỏ ngoài màu trắng, không dập, túi mực còn nguyên, đầu còn liền thân, trung bình 4 - 6 con/100g. Mực được rửa sạch, để ráo và trộn với muối rồi cho vào hũ nhựa sạch, đậy kín, để lên men tự nhiên. Thí nghiệm tiến hành trên 3 loại mực: nguyên con, bỏ nội tạng, bỏ túi mực và 3 tỉ lệ khối lượng mực và muối: 3:0,75, 3:1 và 3:1,25. Sau 3 tháng, sản phẩm mực muối được dùng làm mẫu nghiên cứu.

2.2. Hóa chất

Muối sử dụng là muối hạt của công ty CP Muối và TM Bà Rịa Vũng Tàu. Casein của công ty Himedia, hóa chất dùng cho phản ứng PCR của công ty Fermentas (Mỹ), bộ kit genomic DNA Isolation tách chiết DNA của hãng GeNet Bio, các cặp môi sử dụng trong phản ứng PCR là primer Lac 1 và Lac 2, các hóa chất chạy điện di của công ty Sigma, thang DNA 100 bp plus và 1kb plus của ABM - Canada.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

*** Phương pháp phân lập và tuyển chọn vi khuẩn lên men lactic:** Sử dụng môi trường MRS thạch (g/l): Glucose - 20,0; K_2HPO_4 - 2,0; $CaCO_3$ - 5,0; CH_3COONa - 5,0; cao thịt - 10,0; triamoni xitrat 2,0; Pepton -10,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,58; cao nấm men 5,0; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ - 0,28; Tween 80 - 1 ml; thạch - 15,0; nước cất vừa đủ 1lít; pH= 6,0; khử trùng $121^\circ C/15$ phút [1]. Dịch lên men được pha loãng theo phương pháp pha loãng giới hạn của Nguyễn Lâm Dũng [2] sau đó thu nhận các khuẩn lạc điển hình. Quan sát hình thái tế bào vi khuẩn qua tiêu bản nhuộm Gram, tiến hành phản ứng sinh hóa nhằm định danh sơ bộ các chủng vi sinh vật lên men lactic.

*** Phương pháp định danh dựa trên giải trình tự vùng gene 16S rDNA** [3, 4, 5]: Chủng vi sinh vật phân lập được sẽ được tăng sinh trên môi trường MRS lỏng, thu nhận sinh khối tách chiết DNA bằng bộ kit Genomic DNA Isolation

for bacteria của hãng GeNet Bio. Phản ứng PCR được thực hiện để khuếch đại vùng gene 16S rDNA trên máy PCR Mastercycler Eppendorf với tổng thể tích 25 μ l bao gồm: 0,5 μ l DNA khuôn, 12,5 μ l PCR master mix, 1,25 μ l mỗi môi (10 pmoles/ μ l), 9,5 μ l nước theo chu trình nhiệt: $96^\circ C/3$ phút, 30 chu kỳ ($94^\circ C/1$ phút, $40^\circ C/1$ phút, $72^\circ C/2$ phút), $72^\circ C/10$ phút, giữ $4^\circ C$. Sản phẩm PCR được tinh sạch và xác định trình tự trên máy đọc trình tự tự động tại công ty Nam Khoa Biotec. Kết quả giải trình tự được xem bằng công cụ SnapGene Viewer và so sánh với trình tự vùng gene 16S rDNA của các loài đã công bố từ dữ liệu của DDBJ, EMBL và GenBank.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Phân lập các chủng vi sinh vật lên men lactic

Từ các mẫu mực muối khảo sát, 9 chủng vi khuẩn khác nhau đã được phân lập và tinh sạch trên môi trường MRS, ở $37^\circ C$ trong 48 giờ.

Dựa vào hình thái khuẩn lạc và tiêu bản nhuộm Gram, các chủng vi khuẩn phân lập được chia thành 3 nhóm: nhóm các tế bào hình que, Gram (+), không sinh bào tử (chủng VKM 1 và 6); nhóm tế bào hình cầu, Gram (+) (chủng VKM 2) và nhóm tế bào hình que, Gram (+) sinh bào tử (chủng VKM 3, 4, 5, 7, 8, 9). Đặc điểm hình thái của tế bào và khuẩn lạc được mô tả ở bảng 1.

Nhìn chung, các khuẩn lạc thu được đều có những điểm rất đặc trưng thường được dùng để nhận dạng các dòng vi khuẩn sản sinh acid lactic như: vi khuẩn Gram (+), hình que hoặc hình cầu, trên môi trường MRS khuẩn lạc màu trắng hoặc trắng sữa, kích thước khoảng 1-2 mm [6]. Các kết quả khảo sát ban đầu cho phép dự đoán các khuẩn lạc này thuộc vào 3 chi *Lactobacillus*, *Bacillus* và *Staphylococcus*.

Bảng 1. Đặc điểm của 9 chủng vi khuẩn

Chủng	VKM 1	VKM 2	VKM 3	VKM 4	VKM 5	VKM 6	VKM 7	VKM 8	VKM 9	
Đặc điểm hình thái	- Khuẩn lạc tròn, nhỏ li ti, màu trắng sữa, khô. - Tế bào que ngắn, nhỏ, đứng riêng lẻ hay xếp thành mảng, G+	- Khuẩn lạc tròn, nhỏ li ti, màu trắng sữa, khô. - Tế bào hình cầu, nhỏ, đứng riêng lẻ hay xếp thành mảng, G+	- Khuẩn lạc tròn, nhỏ li ti, màu trắng sữa, khô. - Tế bào que ngắn, nhỏ, đứng riêng lẻ hay xếp thành mảng, G+	- Khuẩn lạc tròn, nhỏ li ti, màu trắng sữa, khô. - Tế bào que ngắn, nhỏ, đứng riêng lẻ hay xếp thành mảng, G+	- Khuẩn lạc tròn, nhỏ li ti, màu trắng sữa, khô. - Tế bào que ngắn, nhỏ, đứng riêng lẻ hay xếp thành mảng, G+	- Khuẩn lạc tròn, nhỏ li ti, màu trắng sữa, khô. - Tế bào que ngắn, nhỏ, đứng riêng lẻ hay xếp thành mảng, G+	- Khuẩn lạc tròn, nhỏ li ti, màu trắng sữa, khô. - Tế bào que ngắn, nhỏ, đứng riêng lẻ hay xếp thành mảng, G+	- Khuẩn lạc tròn, nhỏ li ti, màu trắng sữa, khô. - Tế bào que ngắn, nhỏ, đứng riêng lẻ hay xếp thành mảng, G+	- Khuẩn lạc tròn, nhỏ li ti, màu trắng sữa, khô. - Tế bào que ngắn, nhỏ, đứng riêng lẻ hay xếp thành mảng, G+	- Khuẩn lạc tròn, nhỏ li ti, màu trắng sữa, khô. - Tế bào que ngắn, nhỏ, đứng riêng lẻ hay xếp thành mảng, G+
Tiêu bản nhuộm Gram										

3.2. Các thử nghiệm sinh hóa

Từ kết quả quan sát đặc điểm hình thái tế bào và khuẩn lạc, chúng tôi tiến hành các phản ứng sinh hóa đặc trưng cho 3 nhóm dự đoán. Kết quả thử nghiệm được trình bày ở bảng 2.

Kết hợp kết quả khả năng sinh catalase (-) với hoạt tính làm đông tụ sữa (+), chúng tôi cho rằng khuẩn lạc VKM 1 và 6 thuộc cùng 1 giống *Lactobacillus* do vi khuẩn này khi hiện diện trong sữa sẽ chuyển đường lactose thành acid acetic làm giảm pH. Tại pH = 4,7 tương đương điểm đẳng điện của casein nên đã xảy ra quá trình kết tụ để tạo gel.

Biến dưỡng citrate là thử nghiệm cho khả năng sử dụng nguồn citrate là nguồn carbon duy nhất. Đây là phản ứng điển hình của giống *Bacillus*. Thử nghiệm cho kết quả dương (+) tính ở các khuẩn lạc: VKM 4, 5, 7, 9 và âm (-) tính ở VKM 1, 2, 3 và 8. Điều này có thể kết luận các khuẩn lạc cho thử nghiệm (+) thuộc giống *Bacillus*. Khuẩn lạc VKM 2 và 8 dù kết quả thử nghiệm là (-) tính nhưng tiêu bản cho thấy hình thái tế bào gần giống với *Bacillus* và có sinh bào tử, khác với khuẩn lạc VKM 1, 3 và 6. Do đó VKM 2 và 8 cũng thuộc nhóm *Bacillus* song do là các chủng khác nhau nên khả năng sử dụng citrate sẽ khác nhau.

Bảng 2. Kết quả các thử nghiệm sinh hóa

Thử nghiệm	Chủng vi khuẩn								
	VKM 1	VKM 2	VKM 3	VKM 4	VKM 5	VKM 6	VKM 7	VKM 8	VKM 9
Hoạt tính làm đông tụ sữa	+					+			
Khả năng biến dưỡng citrate				+	+		+		+
Khả năng sinh catalase		+	+	+	+		+	+	+
Khả năng sinh protease	+			+	+	+			+

Thử nghiệm khả năng sinh enzyme catalase nhằm ghi nhận đặc điểm hiếu khí hay kỵ khí của các nhóm vi khuẩn. Kết quả thử nghiệm ở các khuẩn lạc VKM 1 và 6 là (-) tính, còn lại đều (+) tính. Thử nghiệm khả năng sinh protease ngoại bào bằng cách cấy chấm điểm vi khuẩn lên môi trường thạch MRS có bổ sung casein. Kết quả cho thấy các khuẩn lạc VKM 1, 4, 5, 6 và 9 có khả năng sinh protease, còn lại đều (-) tính.

Các kết quả thực nghiệm thu được cho phép chúng tôi dự đoán như sau: các khuẩn lạc VKM 1 và 6 thuộc giống *Lactobacillus*, khuẩn lạc VKM 2 thuộc giống *Staphylococcus*, các khuẩn lạc còn lại thuộc giống *Bacillus*.

Ngoài ra, trong quá trình nghiên cứu chúng tôi còn nhận thấy sự khác biệt về mật độ xuất hiện của các khuẩn lạc ở 9 mẫu mực khảo sát do sự khác biệt về nồng độ muối và dạng mực muối quyết định:

- Đối với khuẩn lạc *Staphylococcus* hầu như hiện diện ở tất cả các mẫu do đây là một loại tụ cầu có mặt trong đường ruột của nguyên liệu và rất dễ mọc trên các loại môi trường nuôi cấy.

- Ở các nghiệm thức có nồng độ muối thấp (3:0,75), chủng *Bacillus* ít hiện diện và chủng *Lactobacillus* chiếm ưu thế.

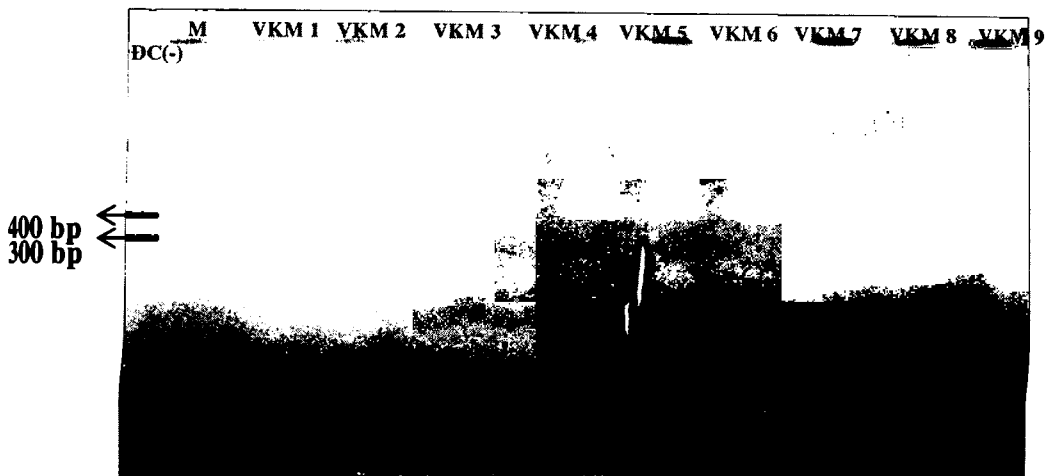
- Ở các nồng độ muối cao (3:1 và 3:1,25) không có sự hiện diện của chủng *Lactobacillus*, phần lớn là sự có mặt của *Bacillus*.

3.3. Kết quả định danh bằng kỹ thuật sinh học phân tử

DNA hệ gen của 9 chủng vi khuẩn được tách chiết. Đoạn gen mã hóa cho 16S rDNA được khuếch đại nhờ phản ứng PCR sử dụng cặp mồi phổ biến Lac 1 và Lac 2, sau đó được tinh sạch và dùng làm khuôn trong phản ứng đọc trình tự với các mồi xuôi và mồi ngược. Kết quả đọc trình tự được xử lý bằng phần mềm SnapGene Viewer và so sánh với dữ liệu của DDBJ, EMBL, GenBank bằng công cụ Blast Search để xác định đến tên loài.

Kết quả khuếch đại vùng gene 16S rDNA (hình 1) thu được các băng DNA có kích thước khoảng 340 bp, là phù hợp với chiều dài đoạn gen mà hai mồi Lac 1, Lac 2 khuếch đại được. Ở cuối băng gel không có dấu hiệu của smear cũng như bất kỳ vạch DNA nào, điều này chứng tỏ sản phẩm PCR khuếch đại chính xác gene mục tiêu 16S rDNA, đạt được độ tin cậy cao. Mặc khác, mẫu đối chứng âm không xuất hiện vạch DNA chứng tỏ các thành phần trong phản ứng PCR đảm bảo chất lượng, không lẫn tạp DNA khác và cặp mồi Lac 1, Lac 2 là đặc hiệu với gene mục tiêu.

Kết quả so sánh trình tự của 9 chủng vi khuẩn này với các trình tự vùng gen 16S rDNA của các loài đã công bố từ dữ liệu của DDBJ, EMBL và GenBank với các mức độ tương đồng được thể hiện ở bảng 3. Như vậy 9 chủng phân lập được thuộc 3 giống *Lactobacillus*, *Bacillus* và *Staphylococcus*.



Hình 1. Kết quả điện di trên gel agarose 1% phân tích sản phẩm PCR khuếch đại vùng trình tự 16S rDNA của 9 chủng vi khuẩn phân lập được từ mực muối.
M: thang chuẩn DNA 100 bp, ĐC(-): đối chứng âm

Bảng 3. Kết quả BlastN trên NCBI

Chủng	Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
VKM 1	NR 075041.1	<i>La:tobacillus plantarum</i> WCFS1 strain WCFS1 16S ribosomal RNA, complete sequence	490	490	92%	0	100%
VKM 2	NR 037046.1	<i>Staphylococcus cohnii</i> subsp. urealyticus strain CK27 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	527	527	100%	0	100%
VKM 3	NR 102506.1	<i>Bacillus thuringiensis</i> Bt407 16S ribosomal RNA, complete sequence	540	540	91%	0	99%
VKM 4	NR 074290.1	<i>Bacillus megaterium</i> QM B1551 strain QM B1551 16S ribosomal RNA, complete sequence	484	484	100%	0	99%
VKM 5	NR 075005.1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. plantarum strain FZB42 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	499	499	100%	0	99%
VKM 6	NR 075049.1	<i>Lactobacillus acidophilus</i> 30SC strain 30SC 16S ribosomal RNA, complete sequence	532	532	100%	0	100%
VKM 7	NR 118996.1	<i>Bacillus licheniformis</i> strain DSM 13 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	538	538	100%	0	99%
VKM 8	NR 075016.1	<i>Bacillus atrophaeus</i> 1942 strain 1942 16S ribosomal RNA, complete sequence	412	537	100%	0	100%
VKM 9	NR 118591.1	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. spizizenii strain 168 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	475	475	98%	0	99%