

# NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM VI KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG TẠO MÀNG BIOFILM TỪ SỮA BÒ TƯƠI CHĂN NUÔI HỘ GIA ĐÌNH Ở THÀNH PHỐ CẦN THƠ

Bùi Thế Vinh<sup>1</sup>, Trần Hữu Thanh Huy<sup>1</sup>, Lương Thị Phương Liên<sup>2</sup>, Nguyễn Vinh Hiến<sup>3</sup>,  
Huỳnh Văn Tiền<sup>4,\*</sup>, Bùi Huỳnh Liên<sup>4</sup>, Ngô Thanh Phong<sup>4</sup>, Hà Thanh Toàn<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Trường Đại học Cửu Long

<sup>2</sup> Trường Cao đẳng Cơ điện và Nông nghiệp Nam bộ

<sup>3</sup> Giáo viên Trường THPT chuyên Vĩ Thanh

<sup>4</sup> Đại học Cần Thơ

\*Email: hv tien@ctu.edu.vn

## TÓM TẮT

Sự hình thành biofilm của vi khuẩn trên bề mặt thiết bị chế biến sữa có thể làm giảm chất lượng và an toàn của sản phẩm. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân lập, tuyển chọn và định danh các chủng vi khuẩn có khả năng hình thành biofilm từ sữa bò tươi được thu thập tại 4 hộ chăn nuôi nhỏ lẻ trên địa bàn phường Cái Răng, thành phố Cần Thơ. Tổng cộng 12 mẫu sữa được phân lập vi khuẩn trên môi trường chọn lọc, đánh giá khả năng hình thành biofilm bằng phương pháp định lượng *in vitro*, định danh chủng tạo biofilm mạnh nhất thông qua giải trình tự gen 16S rRNA. Kết quả thu được 10 dòng vi khuẩn có khả năng hình thành biofilm, trong đó dòng CT412 tạo biofilm mạnh nhất và được xác định là *Serratia nematodiphila*. Chủng này có khả năng sinh enzyme protease và lipase ngoại bào, tiềm ẩn nguy cơ gây viêm vú ở bò và làm hư hỏng sữa. Kết quả nghiên cứu cung cấp thông tin cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo về kiểm soát vi khuẩn sinh biofilm trong sản xuất và chế biến sữa.

**Từ khóa:** Biofilm, đặc điểm sinh học, *Serratia*, sữa bò tươi, vi khuẩn.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sữa bò là thực phẩm giàu dinh dưỡng, bao gồm 4 thành phần chính về mặt dinh dưỡng là: Nước, chất béo, protein và đường lactose, cùng với các thành phần phụ như khoáng chất, enzyme, vitamin và khí hòa tan [1]. Hàm lượng vi sinh vật trong sữa là đặc tính quyết định chất lượng sữa cũng như đặc tính cảm quan và chất lượng sản phẩm. Vi khuẩn ưa lạnh phát triển trong sữa ở nhiệt độ thấp sinh ra enzyme protease và lipase ngoại bào làm ảnh hưởng đến chất lượng sữa [2]. Hệ vi sinh vật trong sữa có liên quan chặt chẽ đến sự an toàn và chất lượng của các sản phẩm sữa, do đó việc xác định đặc điểm của sự thay đổi thành phần vi sinh vật trong sữa tươi nguyên liệu là rất quan trọng [3].

Sữa bò tươi nguyên liệu có thể bị nhiễm vi khuẩn từ nhiều nguồn khác nhau trong môi trường. Hệ vi sinh vật trong sữa rất đa dạng, bao gồm cả các loài ưa lạnh phát triển ở nhiệt độ thấp như các loài thuộc chi *Pseudomonas* và họ *Enterobacteriaceae*, có khả năng sinh ra các enzyme bền nhiệt. Hiện tượng này được ghi nhận ở các loài hình thành bào tử kháng nhiệt sống sót qua quá trình xử lý nhiệt, tạo biofilm trên thiết bị chế biến sữa ảnh hưởng đến chất lượng sữa [4]. Biofilm vi khuẩn được hình thành bởi các cộng đồng vi sinh vật trong môi trường tạo thành các ma trận polyme bám dính trên bề mặt sinh học và phi sinh học [5]. Sự hiện diện của biofilm được coi là mối nguy hiểm đối với sức khỏe động vật vì chúng cũng có thể chứa vi sinh vật gây bệnh và việc kiểm soát sức khỏe và bệnh tật động vật phụ

thuộc rất nhiều vào khả năng kiểm soát sự hình thành biofilm của vi khuẩn [6].

Trong ngành công nghiệp sữa, sự hình thành biofilm vi sinh vật trên bề mặt thiết bị chế biến và tại các trang trại chăn nuôi bò sữa có thể gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến chất lượng và độ an toàn của sữa nguyên liệu cũng như sản phẩm cuối cùng. Các vi sinh vật hình thành biofilm có thể sản sinh protease và lipase chịu nhiệt ngoại bào được tiết ra bên ngoài môi trường ảnh hưởng đến chất lượng sữa [7], có thể kể đến như: *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Acinetobacter* [8].

Để đảm bảo chất lượng sữa bò tươi nguyên liệu và đề xuất các giải pháp phòng ngừa hư hỏng sữa từ vi khuẩn tạo biofilm, nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân lập và xác định các loài vi khuẩn tạo biofilm, từ đó có thể đề xuất biện pháp bảo quản tốt nhất.

## **2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.1. Phân lập vi khuẩn**

#### *2.1.1. Thu mẫu và phân lập vi khuẩn*

Mẫu sữa bò tươi nguyên liệu được thu từ bốn hộ chăn nuôi bò sữa tại phường Cái Răng, thành phố Cần Thơ, vào buổi sáng (6 - 7 giờ) trong quá trình vắt sữa đầu ngày. Mỗi hộ có quy mô 8 - 15 con, nuôi theo phương thức bán chăn thả, sử dụng giống bò lai *Holstein Friesian* (HF) với độ tuổi 3 - 6 năm và đang ở lứa đẻ thứ 2 - 4. Tại mỗi hộ, sữa được lấy từ 3 cá thể bò khỏe mạnh (không có dấu hiệu viêm vú), vắt trực tiếp vào ống falcon vô trùng 50 mL, mỗi cá thể lấy một mẫu riêng biệt. Sau khi thu, các mẫu được bảo quản trong thùng đá lạnh (4 - 8°C) và vận chuyển đến phòng thí nghiệm trong vòng 2 giờ để tiến hành phân tích. Sau đó ghi nhãn, bảo quản lạnh và vận chuyển về phòng thí nghiệm trong vòng 6 giờ. Các mẫu sữa bò tươi nguyên liệu sau khi thu được bảo quản ở nhiệt độ 4 - 8°C trong tối đa 12 giờ trước khi xử lý. Mục tiêu phân lập tập trung vào nhóm vi khuẩn Gram âm có khả năng hình thành biofilm, đặc biệt là các loài ưa lạnh và có ý nghĩa trong hư hỏng sữa (*Pseudomonas* spp., họ *Enterobacteriaceae*). Mẫu được cấy trải trên môi trường chọn lọc Cetrimide agar (CA) trong đĩa petri và ủ ở 30°C trong 24 - 48 giờ để thu nhận khuẩn lạc điển hình. Các khuẩn

lạc nghi ngờ sinh biofilm được kiểm tra khả năng tạo biofilm bằng phương pháp đĩa 96 giếng nhuộm tím tinh thể. Chúng sinh biofilm mạnh nhất sau đó được định danh bằng giải trình tự gen 16S rRNA.

Quá trình phân lập các dòng vi khuẩn từ các mẫu sữa bò tươi nguyên liệu được tiến hành theo các bước như sau: Pha loãng, trải mẫu trên môi trường CA gồm: 45,3 g/L cetrimide agar; 10 mL/L glycerol và 3,4 g/L agar [9]. Sau đó, tiến hành làm thuần, quan sát, mô tả đặc điểm khuẩn lạc của vi khuẩn phân lập được và trữ mẫu ròng.

#### *2.1.2. Xác định khả năng hình thành biofilm*

Phương pháp xác định khả năng hình thành biofilm trên đĩa 96 giếng được thực hiện theo mô tả của Stepanović và cs (2007) [10], Fallah và cs (2017) [11] với các bước tiến hành như sau:

Bước 1. Nuôi tăng sinh: Nuôi cấy vi khuẩn trong 4 mL môi trường TSB + Y (30 g/L Tryptone Soy Broth; 5 g/L Yeast) vô trùng và lắc 200 vòng/phút trong 12 giờ.

Bước 2. Chuẩn bị huyền dịch vi khuẩn: Chuyển 1 mL dịch vi khuẩn nuôi tăng sinh ở bước 1 vào ống nghiệm chứa 9 mL môi trường TSB + Y vô trùng. Trộn đều bằng máy vortex. Lắc 200 vòng/phút trong 12 giờ.

Bước 3. Nuôi cấy tĩnh: Chuyển 100  $\mu$ L huyền dịch vi khuẩn vào mỗi giếng có sẵn 100  $\mu$ L môi trường TSB + Y của đĩa nhựa vô trùng 96 giếng. Mỗi mẫu được lặp lại 3 lần. Nuôi cấy tĩnh ở 37°C trong vòng 48 giờ.

Bước 4. Rửa trôi vi khuẩn không bám vào thành/đáy đĩa: Rửa trôi vi khuẩn không bám vào đáy/thành đĩa bằng 200  $\mu$ L dung dịch Phosphate Buffer Saline (PBS 1X: 8 g/L NaCl; 0,2 g/L KCl; 1,44 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 0,24 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ); lặp lại 3 lần sau đó thấm khô giếng.

Bước 5. Cố định biofilm: Cố định vi khuẩn bám vào thành/đáy đĩa bằng 200  $\mu$ L methanol. Giữ đĩa ở nhiệt độ phòng trong 20 phút. Loại bỏ hoàn toàn methanol trong giếng bằng cách vẩy và thấm khô.

Bước 6. Nhuộm biofilm: Dùng pipet hút 200  $\mu$ L dung dịch tím kết tinh (crystal violet) 1% vào mỗi giếng và giữ trong 15 phút ở nhiệt độ phòng.

Loại bỏ hoàn toàn dung dịch tím kết tinh bằng cách vẩy và thấm khô. Loại bỏ hoàn toàn thuốc nhuộm thừa (không thấm vào lớp biofilm) bằng cách rửa mỗi giếng bằng 200  $\mu$ L PBS 1x; lặp lại ít nhất 3 lần cho đến khi không còn màu của thuốc nhuộm sau khi thấm khô giếng.

Bước 7. Đo mật độ quang (OD – Optical Density) của dịch vi khuẩn tại bước sóng 570 nm để xác định khả năng tạo biofilm. Giá trị OD ngưỡng được tính dựa trên trung bình cộng của các giá trị OD đối chứng âm cộng với 3 lần độ lệch chuẩn.

Đánh giá mức sinh tổng hợp biofilm của vi khuẩn được thực hiện giá trị OD ngưỡng (OD<sub>c</sub>) được tính theo công thức:

$$OD_c = \overline{OD} + 3SD.$$

Trong đó: OD<sub>c</sub> là giá trị ngưỡng OD dương tính;  $\overline{OD}$  là giá trị OD trung bình của các mẫu đối chứng âm; SD là độ lệch chuẩn của giá trị OD của các mẫu đối chứng âm.

Đánh giá vi khuẩn tạo biofilm: Mẫu dương tính (sinh tổng hợp biofilm) là những mẫu có giá trị OD<sub>mẫu</sub> > OD<sub>c</sub>. Mức tạo biofilm được đánh giá như sau: Không tạo màng biofilm (OD<sub>mẫu</sub> ≤ OD<sub>c</sub>), tạo màng biofilm yếu (OD<sub>c</sub> < OD<sub>mẫu</sub> ≤ 2OD<sub>c</sub>), tạo màng biofilm trung bình (2OD<sub>c</sub> < OD<sub>mẫu</sub> ≤ 4OD<sub>c</sub>) và tạo màng biofilm mạnh (4OD<sub>c</sub> < OD<sub>mẫu</sub>).

### 2.1.3. Giải trình tự gen 16S-rRNA xác định loài vi khuẩn sinh tổng hợp biofilm

Tuyển chọn dòng vi khuẩn có mức sinh tổng hợp biofilm cao nhất để giải trình tự gen 16S-rRNA với cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3') và 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3') [12] được sử dụng để khuếch đại đoạn gen 16S-rRNA. Thành phần của một phản ứng PCR 25  $\mu$ L gồm 12,5  $\mu$ L master mix; 0,25  $\mu$ L mỗi loại mồi (0,25

$\mu$ M); 5  $\mu$ L ADN; 7  $\mu$ L nước khử khoáng vô trùng. Chu kỳ nhiệt của phản ứng PCR gồm 95°C (6 phút); 40 chu kỳ nhân số lượng ADN với nhiệt độ và thời gian tương ứng là 5°C (30 giây), 55°C (30 giây), 72°C (30 giây); 72°C (5 phút). Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng kỹ thuật điện di trên gel agarose 1,5% (Merck) và được giải trình tự tại Công ty Macrogen (Hàn Quốc) bằng phương pháp Sanger [13].

## 2.2. Xử lý số liệu

Thí nghiệm được bố trí theo thiết kế hoàn toàn ngẫu nhiên, trong đó mỗi chủng vi khuẩn được xem là một nghiệm thức. Các nghiệm thức được lặp lại 3 lần, mỗi lần lặp sử dụng một mẫu riêng biệt. Vị trí các đĩa 96 giếng trong quá trình ủ và xử lý được sắp xếp ngẫu nhiên bằng cách sử dụng bảng số ngẫu nhiên để loại bỏ ảnh hưởng của sai số hệ thống và các yếu tố ngoại lai. Các thông số tối ưu được xác định từ kết quả của thí nghiệm trước và được sử dụng cho thí nghiệm tiếp theo. Phần mềm Microsoft Excel 2010 được sử dụng để nhập và xử lý số liệu thô, tính các trung bình và vẽ biểu đồ.

Trình tự nucleotide được phân tích bằng phần mềm Geneious và được so sánh với gen tương ứng trong ngân hàng dữ liệu của NCBI sử dụng công cụ BLASTn. Dựa vào kết quả phân tích trình tự ADN và khóa phân loại vi khuẩn của Bergey để định danh các dòng vi khuẩn có khả năng tổng hợp biofilm.

## 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Đặc điểm và khả năng hình thành biofilm của các chủng vi khuẩn

Từ 6 mẫu sữa bò tươi nguyên liệu phân lập được 10 dòng vi khuẩn trên môi trường cetrimide agar (CA). Kết quả xác định các đặc điểm khuẩn lạc và tế bào của 10 dòng vi khuẩn trên (Bảng 1).

**Bảng 1. Đặc điểm hình thái và khuẩn lạc của 10 dòng vi khuẩn có khả năng tạo biofilm**

| STT | Dòng vi khuẩn | Đặc điểm tế bào | Đặc điểm khuẩn lạc |           |               |        |                 |
|-----|---------------|-----------------|--------------------|-----------|---------------|--------|-----------------|
|     |               |                 | Hình dạng          | Màu sắc   | Bìa khuẩn lạc | Độ nổi | Kích thước (mm) |
| 1   | CT130         | Cầu             | Tròn               | Hồng      | Nguyên        | Mô     | 1,8 - 2,0       |
| 2   | CT412         | Que ngắn        | Tròn               | Hồng      | Nguyên        | Mô     | 0,7 - 2,1       |
| 3   | CT210         | Que ngắn        | Tròn               | Đỏ        | Nguyên        | Mô     | 2,2 - 3,1       |
| 4   | CT220         | Que ngắn        | Tròn               | Trắng đục | Nguyên        | Lài    | 1,8 - 2,9       |
| 5   | CT314         | Que ngắn        | Tròn               | Đỏ        | Nguyên        | Mô     | 1,0 - 3,1       |

|    |       |          |      |             |          |     |           |
|----|-------|----------|------|-------------|----------|-----|-----------|
| 6  | CT490 | Que ngắn | Tròn | Trắng đục   | Nguyên   | Mô  | 1,0 -1,3  |
| 7  | CT280 | Que ngắn | Tròn | Trắng trong | Nguyên   | Mô  | 1,5 - 2,0 |
| 8  | CT211 | Que ngắn | Tròn | Trắng trong | Nguyên   | Lài | 1,3 - 3,8 |
| 9  | CT320 | Que ngắn | Tròn | Trắng đục   | Răng cưa | Mô  | 1,0 - 1,3 |
| 10 | CT470 | Que ngắn | Tròn | Trắng đục   | Nguyên   | Mô  | 1,3 - 2,1 |

Hình dạng tế bào quan sát kính hiển vi chủ yếu có hình dạng que ngắn (9/10) và hình cầu (1/10). Về đặc điểm khuẩn lạc của hầu hết có dạng hình tròn, có màu trắng đục (4/10), trắng

trong (2/10), hồng (2/10) và đỏ (2/10); khuẩn lạc thuộc dạng bìa nguyên (9/10) và bìa răng cưa (1/10); độ nổi dạng mô (8/10) và dạng lồi (2/10); kích thước tế bào dao động từ 0,7 - 3,8 mm.

**Bảng 2. Khả năng tạo biofilm và mức sinh tổng hợp của các dòng vi khuẩn**

| STT | Mẫu   | Giá trị OD trung bình $\pm$ SD | Khả năng tạo biofilm | Mức sinh tổng hợp biofilm |            |      |
|-----|-------|--------------------------------|----------------------|---------------------------|------------|------|
|     |       |                                |                      | Yếu                       | Trung bình | Mạnh |
| 1   | Đ/C   | 0,0781 $\pm$ 0,0161            | -                    |                           |            |      |
| 2   | CT130 | 0,3966 $\pm$ 0,0673            | +                    |                           | +          |      |
| 3   | CT412 | 0,5995 $\pm$ 0,0352            | +                    |                           |            | +    |
| 4   | CT210 | 0,3157 $\pm$ 0,0057            | +                    |                           | +          |      |
| 5   | CT220 | 0,1346 $\pm$ 0,0138            | +                    | +                         |            |      |
| 6   | CT314 | 0,1345 $\pm$ 0,0102            | +                    | +                         |            |      |
| 7   | CT490 | 0,1935 $\pm$ 0,0203            | +                    | +                         |            |      |
| 8   | CT280 | 0,1779 $\pm$ 0,0314            | +                    | +                         |            |      |
| 9   | CT211 | 0,1467 $\pm$ 0,0548            | +                    | +                         |            |      |
| 10  | CT320 | 0,3092 $\pm$ 0,0364            | +                    |                           | +          |      |
| 11  | CT470 | 0,2638 $\pm$ 0,0047            | +                    |                           | +          |      |

*Ghi chú: ĐC: Đối chứng; OD: độ đục tế bào; SD: độ lệch chuẩn.*

Kết quả xác định giá trị mật độ quang (OD) trung bình và đánh giá mức độ hình thành biofilm của các dòng vi khuẩn được trình bày ở bảng 2. Trong tổng số 10 dòng vi khuẩn khảo sát, có 1 dòng (CT412) có khả năng sinh tổng hợp biofilm mạnh, gấp khoảng 7,67 lần so với đối chứng; 4 dòng (CT130, CT210, CT320, CT470) có khả năng ở mức trung bình (gấp hơn 2 lần so với đối chứng); 5 dòng (CT220, CT314, CT490, CT280, CT211) có khả năng ở mức yếu. Dựa trên kết quả này, dòng CT412 có khả năng sản sinh biofilm mạnh nhất -

được lựa chọn để phân tích đặc tính di truyền gen 16S rRNA.

### 3.2. Định danh dòng vi khuẩn có khả năng hình thành biofilm mạnh nhất

Trình tự gen 16S rRNA của dòng CT412 được khuếch đại đoạn gen 16S rRNA bằng cặp mồi 27F/1492R; sản phẩm ~1,4 kb được giải trình tự Sanger 2 chiều, lắp ráp và cắt tỉa tạo trình tự consensus dài 1.362 bp (Hình 1; mã hiệu CT412\_1362bp). Trình tự thu được được so sánh với cơ sở dữ liệu 16S rRNA trên NCBI bằng BLASTn.

ATGGCAGGGGCGCGGCTACACATGCAGTCGAGCGGTAGCACAGGGGAGCTTGCTCCCTGGGTGAC  
GAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACG  
GTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATG  
TGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTC  
TGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGG  
GGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGG  
TTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAGGTGGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAG  
CAGAAGAAGCACCAGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGGTGCAAGCGTTAATC  
GGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAG  
ACCTGGGAACTGCATTTGAACTGGCAAGCTAGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTA  
GCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTG  
ACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAAC  
GATGTCGATTTGGAGGGTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGC  
CTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAG  
CATGTGGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAATTTTACA  
AGATGGATTGGTGCCTTCGGGACTCTGAGACAGTGTGTCATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGTGA  
AATGTTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCACCTTATCCTTTGTTGCCGCGTTTCGGCCGGGAAC  
TCAAAGAGAATGCCGTGATAACTGAGGAGAGGGGGGGGAGGACGTCCAGTCCCTCATGGCCCTTCC  
AATAAGGGTACCCCCGGCTCCATGGGTAAACAAAAGAAAGAACCTCCTCAACCAGCGGACCCCCAA  
AAAACCCCAACCCGAGTGGGAGGGCGCCTCCCCCCCCAAACCGGAACCTTTTATTTAAATAAAAAA  
AATTAGGAA AAAAAATCCCCCCTTTTACCCCCCCCCCCCCACCCCGGAAGGG

**Hình 1. Trình tự gen 16S rDNA của dòng vi khuẩn CT412 >CT412\_1362pb**

Kết quả nghiên cứu cho thấy, dòng CT412 có (NR\_036886.1; 97,03%), *S. marcescens* subsp. *marcescens* ATCC 13880 (NR\_113236.1; 96,95%), *S. surfactantfaciens* (NR\_169468.1; 96,86%) và *S. nematodiphila* (NR\_044385.1; 96,86%) (Bảng 3).  
mức tương đồng 96,86 - 97,03% với các loài thuộc chi *Serratia*, với độ bao phủ 87%. Năm kết quả khớp hàng đầu gồm: *Serratia marcescens* (NR\_114043.1; 97,03%), *S. marcescens* subsp. *sakuensis*

**Bảng 3. Các dòng vi khuẩn có trình tự tương đồng với dòng vi khuẩn CT412**

| Các dòng vi khuẩn tương đồng                                             | Độ bao phủ (%) | Độ tương đồng (%) | Mã truy cập |
|--------------------------------------------------------------------------|----------------|-------------------|-------------|
| <i>Serratia marcescens strain NBRC 102204</i>                            | 87             | 97,03             | NR_114043.1 |
| <i>Serratia marcescens subsp. sakuensis strain KRED</i>                  | 87             | 97,03             | NR_036886.1 |
| <i>Serratia marcescens subsp. marcescens ATCC 13880 strain JCM 1239</i>  | 87             | 96,95             | NR_113236.1 |
| <i>Serratia surfactantfaciens strain YD25</i>                            | 87             | 96,86             | NR_169468.1 |
| <i>Serratia nematodiphila DZ0503SBS1</i>                                 | 87             | 96,86             | NR_044385.1 |
| <i>Serratia marcescens subsp. marcescens ATCC 13880 strain DSM 30121</i> | 87             | 96,86             | NR_041980.1 |

Với mức tương đồng < ~98,65% (ngưỡng thường dùng để phân biệt tới loài bằng 16S rRNA), kết quả khẳng định CT412 thuộc chi *Serratia* nhưng chưa đủ chắc chắn để gán tên loài. Do đó, nghiên cứu này sẽ dừng lại ở cấp chi, đồng thời gán mã định danh riêng (CT412) cho dòng phân lập này là *Serratia* sp. CT412. Để xác định tới loài, cần bổ sung các chỉ thị phân tử có độ phân giải cao hơn (ví dụ *gyrB*, *rpoB*) hoặc phân tích cây phát sinh (Neighbor-Joining/Maximum Likelihood) với bootstrap phù hợp.

Giải trình tự gen là bước đầu để định danh một dòng vi khuẩn, góp phần rút ngắn thời gian định danh nhưng bên cạnh đó, cần kết hợp với khảo sát kiểm tra các đặc điểm hình thái và sinh hóa để có thể đi đến kết quả định danh chính xác [14]. Vi khuẩn *Serratia* là vi khuẩn Gram âm kỵ khí tùy tiện có mặt khắp nơi trong môi trường, được tìm thấy trong đất, nước, phân bò và được coi là mầm bệnh cơ hội có thể gây viêm vú bò. *Serratia* khi xâm nhập vào bò sẽ lây lan từ con bò này sang con bò khác trong quá trình vắt sữa, lau khô núm vú. *Serratia* có khả năng kháng sinh nên để điều trị bệnh viêm vú bò có thể dùng thuốc xịt chứa iodine và cần điều tra thời gian vắt sữa để xác định bất kỳ những khu vực có thể làm giảm nguy cơ lây lan trong đàn bò nuôi [15, 16].

Cho đến nay, vi khuẩn *Serratia* spp. được mô tả phân lập từ đất, nước và cũng được phân lập từ sữa. Chúng có thể hình thành biofilm trên các bề mặt trơ và tạo ra các enzyme ngoại bào chịu nhiệt, do đó chúng có khả năng gây hư hỏng ở các thời điểm khác nhau trong quá trình chế biến sữa [17]. Các loài *Serratia* là các vi sinh vật gây bệnh cơ hội được biết đến có thể gây ra các vấn đề về chất lượng thực phẩm. Các loài *Serratia* sau đây có thể là nguyên nhân gây ra sự đổi màu đỏ của sữa: *Serratia marcescens*, *Serratia rubidaea*, *Serratia plymuthica* và *Serratia nematodiphila*. Sắc tố đặc trưng của chúng là prodigiosin màu đỏ, một chất chuyển hóa thứ cấp không tan trong nước được sản xuất trong các điều kiện môi trường cụ thể [18]. Vi khuẩn *Serratia* spp. với tiềm năng gây hư hỏng cao đã được phân lập từ sữa tươi nguyên liệu ở Brazil có khả năng sinh ra enzyme protease và lipase ngoại bào nhấn mạnh rằng *Pseudomonas* spp. và *Serratia liquefaciens* được xác định là những vi khuẩn gây hư hỏng chiếm ưu thế tìm thấy trong sữa lạnh ở Brazil [19]. Cả 2 chi *Serratia* và *Pseudomonas* được tìm thấy ở bề mặt bên trong của thiết bị chế biến sữa và tồn trữ sữa [20, 21]. Trong đó, *Serratia* là những nhà sản xuất biofilm mạnh và sản xuất enzyme protease và lipase ngoại bào chịu nhiệt gây hư hỏng sữa. Vì vậy, sau khi định danh bằng phương pháp giải trình tự gen của dòng vi khuẩn CT412 sinh biofilm mạnh nhất cho thấy vi khuẩn CT412 là *Serratia* sp. CT412.

#### 4. KẾT LUẬN

12 mẫu sữa bò tươi nguyên liệu thu nhận từ các trại nuôi bò sữa đã phân lập được 10 dòng vi khuẩn có khả năng tạo biofilm, trong đó chủng vi khuẩn *Serratia nematodiphila* CT412 tạo biofilm mạnh nhất là vi khuẩn Gram âm; có tế bào hình que; khuẩn lạc hình tròn và có màu hồng, kích thước khuẩn lạc 0,7 - 2,1 mm; sản sinh ra enzyme protease và lipase ngoại bào sau 72 giờ nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C. Vì vậy, cần phải kiểm soát sự tái nhiễm loài *Serratia* vào sữa bò tươi nguyên liệu dẫn đến giảm chất lượng sữa thông qua việc kiểm soát môi trường chăn nuôi, sức khỏe đàn bò, vệ sinh và sát trùng quá trình vắt sữa.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Guetouache, M., Guessas, B., Medjekal, S. (2014). Composition and nutritional value of raw milk. *J Issues Biol Sci Pharm Res*, 2350, 1588.
2. Arcuri, E. F., Silva, P. D. L. D., Brito, M. A. V. P., Brito, J. R. F., Lange, C. C., Magalhães, M. M. D. A. (2008). Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. *Ciência Rural*, 38, 2250 - 2255.
3. Yuan, H., Han, S., Zhang, S., Xue, Y., Zhang, Y., Lu, H., Wang, S. (2022). Microbial properties of raw milk throughout the year and their relationships to quality parameters. *Foods*, 11(19): 3077.
4. Martin N. H., Evanowski R. L., Wiedmann, M. (2023). Invited review: Redefining raw milk quality - Evaluation of raw milk microbiological parameters to ensure high-quality processed dairy products. *Journal of Dairy Science*, 106(3), 1502 - 1517.
5. Šuláková, M., Pazlarová, J., Meyer, R. L., Demnerová, K. (2019). Distribution of extracellular DNA in *Listeria monocytogenes* biofilm. *Czech Journal of Food Sciences*, 37(6), 409 - 416.
6. Tasneem, U., Yasin, N., Nisa, I., Shah, F., Rasheed, U., Momin, F., ... Qasim, M. (2018). Biofilm producing bacteria: A serious threat to

public health in developing countries. *J Food Sci Nutr*, 1(2): 25 - 31.

7. Weber, M., Liedtke, J., Plattes, S., Lipski, A. (2019). Bacterial community composition of biofilms in milking machines of two dairy farms assessed by a combination of culture-dependent and-independent methods. *PLoS One*, 14(9), e0222238.

8. Schlegelová, J., Babak, V., Holasova, M., Konstantinova, L., Necidova, L., Šišák, F., Jaglic, Z. (2010). Microbial contamination after sanitation of food contact surfaces in dairy and meat processing plants. *Czech Journal of Food Sciences*, 28(5), 450 - 461.

9. Flint, S., Hartley, N. (1996). A modified selective medium for the detection of *Pseudomonas* species that cause spoilage of milk and dairy products. *International Dairy Journal*, 6(2), 223 - 230.

10. Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Bonaventura, G. D., Djukić, S., Ćirković, I., Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis*, 115(8), 891 - 899.

11. Fallah, F., Yousefi, M., Pourmand, M. R., Hashemi, A., Alam, A. N., Afshar, D. (2017). Phenotypic and genotypic study of biofilm formation in Enterococci isolated from urinary tract infections. *Microbial pathogenesis*, 108, 85 - 90.

12. Frank, S. (2008). *Migration and Literature: Günter Grass, Milan Kundera, Salman Rushdie, and Jan Kjærstad*. Springer.

13. Blazej, R. G., Kumaresan, P., Mathies, R. A. (2006). Microfabricated bioprocessor for integrated nanoliter-scale Sanger DNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(19), 7240 - 7245.

14. Trần Thị Bích Thảo, Nguyễn Đắc Khoa, Hồ Nhã Tuấn (2017). Xác định mầm bệnh

gây thối đồng tiền trên khoai lang tím Nhật tại huyện Bình Tân, Vĩnh Long. *Tạp chí Khoa học, Đại học Cần Thơ*, 52, 56 - 63.

15. Cranefield S., Cameron T., Dean R. (2023). Mastitis in New Zealand dairy cows caused by *Serratia* species. *Conference Proceedings of the Dairy Cattle Veterinarians Branch of the NZVA*, 25 - 30.

16. Zhang, C. X., Yang, S. Y., Xu, M. X., Sun, J., Liu, H., Liu, J. R.,... Zhang, K. Y. (2009). *Serratia nematodiphila* sp. nov., liên kết cộng sinh với tuyến trùng gây bệnh *Heterorhabditoides chongmingensis* (Rhabditida: Rhabditidae). *Tạp chí Quốc tế về vi sinh vật học hệ thống và tiến hóa*, 59(7), 1603 - 1608.

17. Friman M. J, Eklund M. H., Anna Helena Pitkälä A. H., Rajala-Schultz P. J., Rantala M. H. J. (2019). Description of two *Serratia marcescens* associated mastitis outbreaks in Finnish dairy farms and a review of literature. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 61, 1 - 11.

18. Korcz E., Varga L., Kerény Z. (2021). Characterization of *Serratia* species and qualitative detection of *Serratia marcescens* in raw and pasteurized milk by an analytical method based on polymerase chain reaction. *Journal of Food Investigation*, 67(2), 3453 - 3464.

19. Machado, S. G., da Silva, F. L., Bazzolli, D. M., Heyndrickx, M., Costa, P. M. D. A., Vanetti, M. C. D. (2015). *Pseudomonas* spp. and *Serratia liquefaciens* as predominant spoilers in cold raw milk. *Journal of Food science*, 80(8), M1842 - M1849.

20. Cleto S., Matos S., Kluskens L., Vieira M. J. (2012). Characterization of contaminants from a sanitized milk processing plant. *PLoS one*, 7(6), e40189.

21. Le Nguyen, D. D., Te Do, H., Luong, T. P. L. (2020). Proteolytic and lipolytic activities of *Pseudomonas* spp. Isolated from Raw Milk in Mekong Delta-Vietnam. *CET Journal-Chemical Engineering Transactions*, 78. 517 - 522. DOI: 10.3303/CET2078087

**BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF A STRONG BIOFILM-FORMING BACTERIAL STRAIN  
ISOLATED FROM COW'S MILK RAW OF LIVESTOCK FARMERS**

**Bui The Vinh<sup>1</sup>, Tran Huu Thanh Huy<sup>1</sup>, Luong Thi Phuong Lien<sup>2</sup>, Nguyen Vinh Hien<sup>3</sup>,  
Huynh Van Tien<sup>4</sup>, Bui Huynh Lien<sup>4</sup>, Ngo Thanh Phong<sup>1</sup>, Ha Thanh Toan<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> *Cuu Long University*

<sup>2</sup> *Southern College for Engineering and Agriculture*

<sup>3</sup> *Teacher, Vĩ Thanh High School for the Gifted*

<sup>4</sup> *Can Tho University*

**Abstract**

Bacterial biofilm formation on dairy processing equipment surfaces can adversely affect product quality and safety. This study aimed to isolate, screen and identify biofilm-forming bacterial strains from raw cow's milk collected from four smallholder dairy farms in Cai Rang ward, Can Tho city, Vietnam. A total of 12 milk samples were cultured on selective media, biofilm-forming ability was quantitatively assessed under laboratory conditions, the strongest biofilm-producing strain was identified through 16S rRNA gene sequencing. Ten biofilm-forming bacterial strains were obtained, among which strain CT412 exhibited the highest biofilm production and was identified as *Serratia nematodiphila*. This strain demonstrated extracellular protease and lipase activities, indicating potential risks of causing bovine mastitis and milk spoilage. The findings provide a scientific basis for further studies on controlling biofilm-forming bacteria in dairy production and processing.

**Keywords:** *Biofilms, biological characteristics, serratia, fresh cow's milk, bacteria.*

**Ngày nhận bài:** 15/4/2025

**Ngày chuyển phản biện:** 7/7/2025

**Ngày thông qua phản biện:** 18/7/2025

**Ngày duyệt đăng:** 23/7/2025