



DOI:10.22144/ctujos.2023.224

TUYỂN CHỌN VÀ ĐỊNH DANH CHỦNG VI KHUẨN ACID LACTIC CÓ TIỀM NĂNG PROBIOTIC TỪ TRÁI SƠ RI (*Malpighia glabra* L.)

Huỳnh Ngọc Thanh Tâm*, Huỳnh Yến Nhi, Lâm Cảnh Tân và Nguyễn Thành Bi

Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ

*Tác giả liên hệ (Corresponding author): hnttam@ctu.edu.vn

Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received): 11/07/2023

Sửa bài (Revised): 04/08/2023

Duyệt đăng (Accepted): 07/08/2023

Title: Identification of lactic acid bacteria in acerola fruit (*Malpighia glabra* L.) and potential probiotic properties of selected *Lactobacillus* strains

Author(s): Huỳnh Ngọc Thanh Tâm*, Huỳnh Yến Nhi, Lâm Cảnh Tân and Nguyễn Thành Bi

Affiliation(s): Can Tho University

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm tuyển chọn được các chủng vi khuẩn có tiềm năng probiotic từ trái sơ ri (*Malpighia glabra* L.). Kết quả tuyển chọn được 9 chủng vi khuẩn có khả năng chịu được pH 2,5 trong đó chủng vi khuẩn HCl có khả năng sống sót tốt nhất với mật số là 4,73 logCFU/mL. Nghiên cứu đã tuyển chọn được ba chủng vi khuẩn HCl, KA2, TB5 có khả năng chịu muối mật cao nhất. Các chủng vi khuẩn HCl, KA2, KA3, KA4, TB4 và TB5 có khả năng kháng ba loại kháng sinh là tetracyclin (30 µg/mL), ampicillin (10 µg/mL) và ofloxacin (30 µg/mL). Chủng vi khuẩn HCl và KA4 có khả năng tự kết dính cao nhất với tỷ lệ kết dính lần lượt là 49,35% và 48,69%. Hơn thế nữa, ba chủng vi khuẩn HCl có khả năng kháng vi khuẩn *Escherichia coli* với đường kính vòng vô khuẩn (ĐKVKK) lần lượt là 7,27 mm. Qua các thử nghiệm kiểm tra tiềm năng probiotic, HCl là chủng vi khuẩn tiềm năng được chọn để giải trình tự gene 16S RNA, kết quả cho thấy chủng vi khuẩn này là chủng *Lactiplantibacillus plantarum* với độ tương đồng đạt 97,20%.

Từ khoá: Acid lactic, *Escherichia coli*, *Lactiplantibacillus plantarum* probiotic, vi khuẩn

ABSTRACT

This study was conducted to select bacterial strains with probiotic potential from acerola fruit (*Malpighia glabra* L.). Nine bacterial strains that can tolerate pH 2.5, in which HCl had the best survival ability with a cell count of 4.73 logCFU/mL. Three strains of bacteria HCl, KA2, TB5 with the highest tolerance to bile salts had the ΔOD values of 0.298, 0.269, and 0.266. HCl, KA2, KA3, KA4, TB4 and TB5 were resistant to three antibiotics including tetracycline (30 µg/mL), ampicillin (10 µg/mL), and ofloxacin (30 g/mL). HCl and KA4 bacterial strains had the highest self-adhesion with adhesion rates of 49.35% and 48.69%. Furthermore, HCl bacterial strains were resistant to *Escherichia coli* with a resistance of 7.27 mm. Through probiotic potential test, HCl is a potential bacterial strain selected for 16S RNA gene sequencing, the results showed that this bacterium is *Lactiplantibacillus plantarum* strain with a similarity of 97.20 %.

Keywords: Bacteria, *Escherichia coli*, lactic acid, *Lactiplantibacillus plantarum*, probiotic

1. GIỚI THIỆU

Probiotic là các vi sinh vật sống, khi được đưa một lượng vừa đủ và cần thiết vào cơ thể vật chủ sẽ mang lại lợi ích tốt cho sức khỏe vật chủ (Hill et al., 2014). Ngày càng có nhiều nghiên cứu cho rằng probiotic có chức năng hỗ trợ sức khỏe của con người và động vật như: tăng cường đáp ứng miễn dịch, giảm cholesterol huyết thanh, hỗ trợ ngăn ngừa các bệnh về đường ruột, ngăn chặn sự sinh trưởng và phát triển của hệ vi sinh vật gây hại đường ruột và phòng ngừa ung thư (Kechagia et al., 2013; Shokryazdan et al., 2014). Những chủng vi khuẩn thường được nghiên cứu để phát triển các sản phẩm probiotic chủ yếu là các vi khuẩn acid lactic (LAB), các chủng vi khuẩn LAB được xác định có khả năng sống và phát triển tốt trong điều kiện bất lợi của hệ tiêu hóa như muối mật, pH thấp, kháng sinh, có khả năng cạnh tranh với hệ vi sinh vật gây bệnh đường ruột. Mặc khác, LAB còn có khả năng sản sinh ra nhiều hoạt chất kháng khuẩn như acid lactic, bacteriocin, diacetyl, một số các enzyme có chức năng thúc đẩy quá trình tiêu hóa (Vuyst & Leroy, 2007).

Hiện nay, trên thế giới cũng như ở Việt Nam đã có nhiều nghiên cứu về tuyển chọn các chủng vi khuẩn LAB có tiềm năng probiotic. Chúng được phân lập và tuyển chọn từ nhiều nguồn khác nhau ở cả thực vật lẫn động vật và được ứng dụng rộng rãi trong chăn nuôi hoặc chăm sóc sức khỏe con người. Trái cây, rau và hoa là một nguồn nguyên liệu tiềm năng chứa nhiều vi khuẩn LAB với các đặc tính lợi khuẩn, thúc đẩy quá trình lên men cũng như hỗ trợ sức khỏe con người. Tùy vào tính chất hóa lý của từng loại trái cây, hoa quả mà có một hệ vi sinh vật riêng biệt, trong số đó đại diện bởi LAB (Ajibola et al., 2023). Nhóm vi khuẩn acid lactic ưa fructose (FLAB) là nhóm vi khuẩn LAB tiềm năng đã được chứng minh có nhiều tính chất sinh học độc đáo (Maeno et al., 2021). Những chủng vi khuẩn thuộc FLAB chủ yếu được phân lập từ các nguồn giàu fructose như hoa, trái cây, các sản phẩm lên men từ hoa và trái cây, thực phẩm chứa nhiều fructose và từ ruột của ong mật. Theo Như và ctv. (2022) và Tâm và ctv. (2023) đã phân lập được nguồn vi khuẩn LAB dồi dào từ trái sơ ri và ứng dụng thành công trong sản phẩm lên men sữa chua có bổ sung dịch trái sơ ri. Vì thế, việc tuyển chọn được các chủng vi khuẩn acid lactic có tiềm năng probiotic được phân lập từ trái sơ ri nhằm đa dạng hóa nguồn LAB có tiềm năng probiotic từ những nguồn nguyên liệu dồi dào có sẵn, nghiên cứu này sẽ tạo tiền đề cho việc

phát triển các chế phẩm men vi sinh thúc đẩy quá trình tiêu hóa của người và động vật.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Mười bảy chủng vi khuẩn acid lactic (được ký hiệu HC, KA và TB từ các mẫu được thu nhận lần lượt tại Cần Thơ, Tiền Giang và An Giang) được phân lập từ trái sơ ri được lưu trữ với glycerol ở 4°C trong 3 tháng tại phòng thí nghiệm Công nghệ Sinh học Thực phẩm, Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Tuyển chọn các chủng vi khuẩn acid lactic có khả năng chịu pH thấp

Mười bảy chủng vi khuẩn acid lactic được nuôi tăng sinh trong môi trường MRS lỏng trên máy lắc với tốc độ 120 vòng/phút ở 37°C trong 48 giờ. Sau đó, mật số vi khuẩn được điều chỉnh về 10^8 tế bào/mL bằng phương pháp đo quang phổ ở bước sóng 600 nm ($OD_{600} = 0,5$) (phương pháp Mcfarland) (Nhưng và ctv., 2019). Huyền phù vi khuẩn (1,5 mL) được tiến hành ly tâm với tốc độ 2000 vòng/phút trong 15 phút để thu nhận sinh khối tế bào vi khuẩn, sau đó sinh khối tế bào vi khuẩn được rửa bằng nước cất vô trùng. Cuối cùng, chủng vi khuẩn vào môi trường MRS lỏng đã điều chỉnh pH 1,5, 2,0 và 2,5, huyền phù vi khuẩn được ủ ở 37°C trong 24 giờ.

Mật số vi khuẩn được xác định bằng phương pháp đếm sống nhỏ giọt (Hoben & Somasegagan, 1982), mật số vi khuẩn được xác định bởi công thức sau:

$$CFU/mL = A \times B \times 100$$

Trong đó,

A: số khuẩn lạc trung bình đếm được trên 3 giọt huyền phù vi khuẩn (số khuẩn lạc/10 μ L)

B: hệ số pha loãng

100: hệ số chuyển đổi từ 10 μ L sang 1 mL

Chủng vi khuẩn có khả năng chịu được pH tối nhất sẽ được chọn để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

2.2.2. Tuyển chọn các chủng vi khuẩn acid lactic có khả năng chịu muối mật

Các chủng vi khuẩn được tuyển chọn ở mục 2.2.1 được tiến hành khảo sát khả năng chịu muối mật ở nồng độ 0,3%. Các chủng vi khuẩn tuyển chọn được tiến hành nuôi tăng sinh trong môi trường

MRS lỏng trên máy lắc với tốc độ 120 vòng/phút ở 37°C trong 48 giờ. Mật số vi khuẩn được điều chỉnh về 10^8 tế bào/mL bằng phương pháp đo quang phổ ở bước sóng 600 nm ($OD_{600nm} = 0,5$) (phương pháp Mcfarland) (Nhưng và ctv., 2019). Sau đó, 1 mL huyền phù vi khuẩn được chuyển vào vào 5 mL môi trường MRS lỏng có bổ sung 0,3% muối mật, các ống nghiệm được lắc ở với tốc độ 120 vòng/phút trong 4 giờ ở 37°C.

Mức độ chịu được muối mật được xác định bằng sự gia tăng giá trị hấp thụ quang phổ của tế bào vi khuẩn ở bước sóng 600 nm (Gilliland et al., 1984):

$$\Delta OD = OD_{\text{sau 4 giờ}} - OD_{\text{ban đầu}}$$

2.2.3. Tuyển chọn các chủng vi khuẩn acid lactic có khả năng kháng một số loại kháng sinh

Các chủng vi khuẩn được tuyển chọn ở mục 2.2.1 được tiến hành khảo sát khả năng kháng 3 loại kháng sinh tetracyclin (30 $\mu\text{g/mL}$), ampicillin (10 $\mu\text{g/mL}$) và ofloxacin (30 $\mu\text{g/mL}$) bằng phương pháp khoan giấy kháng sinh khuếch tán (Hà, 1991). Các chủng vi khuẩn tuyển chọn được nuôi ủ lắc với tốc độ 120 vòng/phút trong 48 giờ ở 37°C. Huyền phù vi khuẩn (50 μL) được hút và trải đều trên môi trường thạch MRS, mẫu giấy lọc có tẩm từng loại kháng sinh (trong 10-15 phút) được đặt lên đĩa môi trường đã trải sẵn vi khuẩn, mẫu đối chứng âm được thực hiện tương tự nhưng thay thế kháng sinh bằng nước cất.

Tính nhạy cảm của kháng sinh được đánh giá dựa vào đường kính vòng kháng khuẩn (ĐKVKK), mức độ nhạy cảm với kháng sinh được xác định theo Sharma et al. (2017): Kháng (ký hiệu R): ĐKVKK ≤ 14 mm; Nhạy cảm vừa (ký hiệu S+): $14 \text{ mm} \leq \text{ĐKVKK} \leq 19$ mm; Nhạy cảm mạnh (ký hiệu S++): ĐKVKK ≥ 20 mm

2.2.4. Tuyển chọn các chủng vi khuẩn acid lactic có khả năng bám dính

Các chủng vi khuẩn được tuyển chọn ở mục 2.2.1 được tiến hành khảo sát khả năng bám dính thông qua 2 chỉ tiêu: (1) Tự kết dính và (2) Kết dính với dung môi.

(1) Khảo sát khả năng tự kết dính: Sinh khối tế bào vi khuẩn sau khi nuôi lắc với tốc độ 120 vòng/phút trong 48 giờ ở 37°C sẽ được rửa 2 lần bằng đệm PBS (8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na_2PO_4 , 0,24 g KH_2PO_4 , điều chỉnh pH 7,2). Sau đó, vi khuẩn được tái huyền phù trong đệm PBS ($OD_{600nm} = 1$) (OD ban đầu). Huyền phù được để yên ở 37°C trong 5 giờ để tạo điều kiện cho vi khuẩn tự kết dính và lắng xuống.

(2) Khảo sát khả năng kết dính với dung môi: Sinh khối tế bào vi khuẩn sau khi nuôi lắc với tốc độ 120 vòng/phút trong 48 giờ ở 37°C sẽ được rửa bằng dung dịch KNO_3 0,1 M tại pH 6,2 và tái huyền phù vi khuẩn trong dung dịch này ($OD_{600nm} = 1$) (OD ban đầu). Dung môi ethyl acetate (1 mL) được chuyển vào ống nghiệm chứa 3 mL huyền phù tế bào, vortex hỗn hợp trên trong 2 phút. Hỗn hợp được để yên trên trong 20 phút tạo điều kiện cho vi khuẩn kết dính với dung môi.

Khả năng tự kết dính là phần trăm độ giảm của hệ số OD đo được ở bước sóng 600 nm trong dịch bề mặt của mẫu so với ban đầu (Thủy & Hương, 2018)

2.2.5. Tuyển chọn các chủng vi khuẩn acid lactic có khả năng kháng vi khuẩn *Escherichia coli*

Các chủng vi khuẩn có khả năng chịu pH thấp, chịu muối mật, kháng kháng sinh và có khả năng bám dính sẽ được tiến hành khảo sát khả năng kháng vi khuẩn *Escherichia coli* bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch. Các chủng vi khuẩn sau khi nuôi lắc với tốc độ 120 vòng/phút trong 48 giờ ở nhiệt độ phòng sẽ được ly tâm 13000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C (dịch ly tâm sẽ được chuẩn về pH 6,5 bằng NaOH 1 N để đưa pH về trung tính vì môi trường nuôi cấy vi khuẩn LAB mang tính acid). Vi khuẩn *E. coli* (50 μL) sau khi nuôi ở 37°C trong 24 giờ, mật số 10^6 tế bào/mL (Tâm và ctv., 2016) sẽ được trải trên môi trường NA. Các giếng trên môi trường được tạo ra bằng phương pháp đục lỗ, với đường kính mỗi giếng là 4 mm. Sau đó, 50 μL dịch ly tâm của chủng vi khuẩn đối kháng được chuyển lần lượt vào ba giếng, song song đó 50 μL nước cất (đối chứng âm) và 50 μL kháng sinh ampicillin (0,1 mg/mL) (đối chứng dương) chuyển lần lượt vào hai giếng còn lại. Hoạt tính kháng khuẩn được xác định thông qua ĐKVKK tạo thành theo Moore et al. (2013):

$$\text{ĐKVKK} = D - D_0$$

Trong đó,

D: Đường kính tổng (mm)

D_0 : Đường kính giếng (4 mm)

Mức độ kháng khuẩn của các chủng LAB được xác định theo quy ước của Leska et al. (2022): Không có tính kháng khuẩn: Kháng khuẩn yếu: $1 \text{ mm} < \text{ĐKVKK} < 6 \text{ mm}$; Kháng khuẩn trung bình: $6 \text{ mm} \leq \text{ĐKVKK} < 11 \text{ mm}$; Kháng khuẩn mạnh: $11 \text{ mm} \leq \text{ĐKVKK} \leq 16 \text{ mm}$; Kháng khuẩn rất mạnh: $\text{ĐKVKK} \geq 16$.

2.2.6. Định danh chủng vi khuẩn có tiềm năng probiotic cao

Dựa vào hình dạng, sinh hóa của chủng vi khuẩn có tiềm năng probiotic cao được chọn để giải trình tự đoạn gene 16S rRNA bằng phản ứng PCR với cặp mồi được thiết kế theo Sambrook and Russell (2001) để khuếch đại đoạn gen mục tiêu có trình tự:

1492R (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACT-3') và 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC-3').

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tuyển chọn các chủng vi khuẩn acid lactic có khả năng chịu pH thấp

Một trong những điều kiện để vi sinh vật được ứng dụng trong các sản phẩm probiotic là khả năng chịu được pH thấp của dạ dày, pH dạ dày của người dao động từ 1,5 đến 2,0 (Fujimori, 2020). Để có thể vượt qua dạ dày, các vi khuẩn LAB phải có khả năng thích ứng được với môi trường acid trong dạ dày.

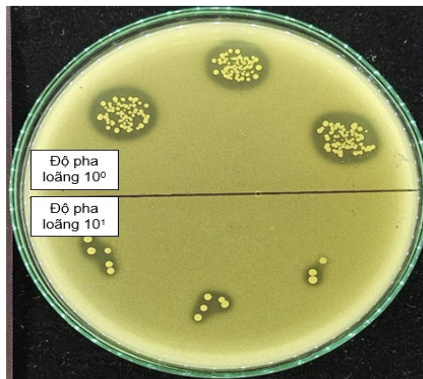
Bảng 1. Mật số vi khuẩn acid lactic tại pH 2,5

STT	Chủng vi khuẩn	Mật số vi khuẩn acid lactic (logCFU/mL)	Tỷ lệ vi khuẩn sống sót (%)
1	HC1	4,73 ± 0,02a	59,13
2	HC3	4,27 ± 0,02a	53,38
3	KA2	4,51 ± 0,03b	56,38
4	KA3	3,95 ± 0,09d	49,38
5	KA4	4,37 ± 0,02c	54,63
6	TB2	3,92 ± 0,06d	49
7	TB3	3,92 ± 0,07d	49
8	TB4	4,59 ± 0,05b	57,38
9	TB5	4,62 ± 0,02ab	57,75

Ghi chú: Mật số ban đầu của vi khuẩn là 8 logCFU/mL; Các giá trị trung bình theo sau có các mẫu tự giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức ý nghĩa 5% theo kiểm định Tukey.

Mật số của các chủng vi khuẩn chịu được pH 2,5 trong 24 giờ có sự khác nhau, mật số dao động từ 3,92 đến 4,73 logCFU/mL tương ứng tỷ lệ vi khuẩn sống sót dao động từ 49% đến 59,13%. Trong đó, chủng vi khuẩn HC1 cho khả năng chịu pH 2,5 tốt nhất với mật số đạt là 4,73 logCFU/mL (với tỷ lệ vi khuẩn sống sót là 59%) (Hình 1) và thấp nhất là chủng vi khuẩn KA3, TB2 và TB3 với mật số lần lượt là 3,95 logCFU/mL, 3,92 logCFU/mL và 3,92 logCFU/mL khác biệt không ý nghĩa thống kê; nhưng giá trị này có khác biệt thống kê với mức ý nghĩa 5% so với các chủng vi khuẩn còn lại. Theo nghiên cứu của Liu et al. (2021) cho thấy một số chủng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* có khả năng chịu được môi trường dịch vị tại pH 2 trong 1 giờ với mật số vi khuẩn dao động từ 6,87 đến 8,37 logCFU/mL. Theo một nghiên cứu khác của Sadeghi et al. (2022) đã tuyển chọn được 144 chủng vi khuẩn được phân lập từ các loại sữa có khả năng

Kết quả đánh giá cho thấy có 9/17 chủng vi khuẩn có khả năng chịu được pH 2,5 và 0/17 chủng vi khuẩn có khả năng chịu pH ở mức 1,5 và 2,0. Mức độ chịu được pH 2,5 giữa các chủng vi khuẩn được trình bày ở Bảng 1 và Hình 1.



Hình 1. Khả năng chịu pH 2,5 của chủng vi khuẩn acid lactic HC1

kháng lại môi trường acid trong đó có 35 chủng vi khuẩn có khả năng sống tốt tại pH 2,5 trong 3 giờ với tỷ lệ sống sót trên 80%. Kết quả nghiên cứu này cho thấy các chủng vi khuẩn phân lập không những có khả năng kháng lại môi trường acid mà còn có thể phát triển trong điều kiện acid.

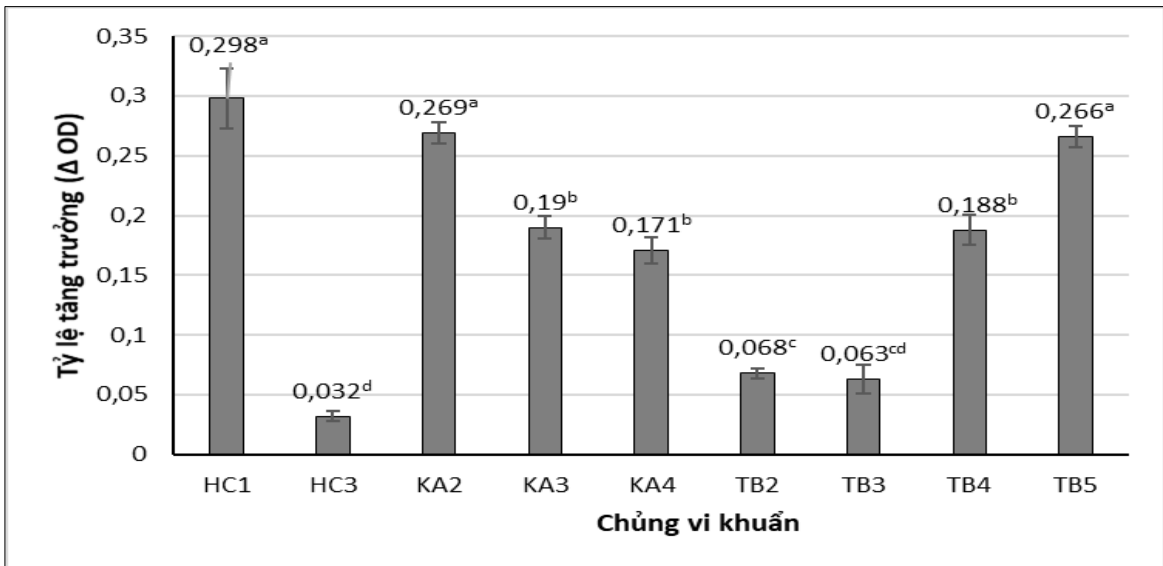
3.2. Tuyển chọn các chủng vi khuẩn acid lactic có khả năng chịu muối mật

Theo Tian et al. (2020), muối mật được sản xuất trong gan từ quá trình oxy hóa cholesterol và được chuyển hóa trong ruột bởi hệ vi sinh vật đường ruột. Hàm lượng muối mật trong cơ thể người dao động từ 0,1 đến 0,3% (Dunne et al., 2001). Muối mật ức chế sự phát triển của nhiều loại vi khuẩn như: *Bacteroides*, *Clostridia*, *Escherichia coli*. Do vậy, khảo sát khả năng chịu muối mật 0,3% của các chủng vi khuẩn LAB phân lập từ sơ ri là một trong những yếu tố quyết định tiềm năng probiotic.

Kết quả thí nghiệm cho thấy, 9/9 chủng vi khuẩn khảo sát đều có khả năng sống sót và sinh trưởng trong điều kiện bổ sung 0,3% muối mật sau 4 giờ ủ. Độ tăng mật số thông qua giá trị ΔOD có sự dao động từ 0,032 đến 0,298 sau 4 giờ ủ (Hình 2). Trong đó, chủng vi khuẩn HC1, KA2, TB5 có khả năng chịu muối mật cao nhất với giá trị ΔOD lần lượt là 0,298, 0,269 và 0,266, bên cạnh đó chủng vi khuẩn HC3 và TB2 có khả năng chịu muối mật kém nhất với giá trị ΔOD lần lượt là 0,032 và 0,063.

Theo nghiên cứu của Divya et al. (2012), chủng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* B6 có khả năng

chịu được muối mật ở nồng độ 0,3% và khi tăng nồng độ muối mật lên 0,5% và 0,8% thì có sự suy giảm mật số. Bên cạnh đó, nghiên cứu của Sakandar et al. (2019) đã phân lập được hai chủng vi khuẩn FLAB (Fructophilic Lactic Acid Bacteria) là chủng *Fructobacillus pseudoficulneu* (phân lập từ chuối) và *F. durionis* (phân lập từ kiwi) có khả năng sống sót trong điều kiện bổ sung muối mật 0,4% với tỷ lệ sống sót đạt lần lượt là 71,9% và 52,5% sau 24 giờ ủ ở 30°C. Kết quả nghiên cứu này cao hơn của Liong and Shah (2005) với tốc độ tăng OD ở bước sóng 600 nm trong khoảng 0,068 (*L. casei* ASCC 290) đến 0,127 (*L. casei* ASCC).



Hình 2. Khả năng kháng muối mật của các chủng vi khuẩn acid lactic

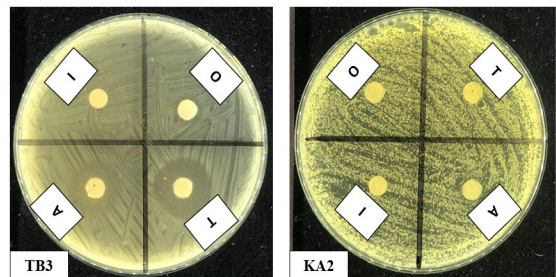
Ghi chú: Các giá theo sau có các mẫu tự giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức ý nghĩa 5% theo kiểm định Tukey.

3.3. Tuyển chọn các chủng vi khuẩn acid lactic có khả năng kháng các loại kháng sinh

Khả năng kháng kháng sinh là một yêu cầu cần thiết đối với các chủng vi khuẩn có tiềm năng probiotic trong thực trạng sử dụng thuốc kháng sinh ngày càng phổ biến hiện nay. Việc ứng dụng kháng sinh trong việc tiêu diệt các vi khuẩn gây bệnh tiêu chảy có thể vô tình tiêu diệt hệ vi khuẩn có lợi trong đường ruột, dẫn đến mất cân bằng hệ sinh thái đường ruột, gây suy giảm hệ tiêu hóa.

Bảng 2 và Hình 3 cho thấy có 6/9 chủng vi khuẩn LAB có khả năng kháng ba loại kháng sinh khảo sát đó là HC1, KA2, KA3, KA4, TB4 và TB5. Bên cạnh đó, chủng vi khuẩn HC3 có khả năng chỉ kháng ampicillin ở nồng độ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Mặt khác, hai chủng vi khuẩn TB2 và TB3 chỉ kháng hai loại kháng sinh

ampicillin ở nồng độ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ và ofloxacin ở nồng độ 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$.



Hình 3. Khả năng kháng kháng sinh của một số chủng vi khuẩn acid lactic

Ghi chú: A: Ampicillin, I: Đối chứng âm, O: Ofloxacin, T: Tetracyclin

Bảng 2. Khả năng kháng ampicillin, tetracylin và ofloxacin của các chủng vi khuẩn acid lactic

STT	Chủng vi khuẩn	Ampicillin(10 µg/mL)	Tetracylin(30 µg/mL)	Ofloxacin(30 µg/mL)
1	HC1	R	R	R
2	HC3	R	S++	S++
3	KA2	R	R	R
4	KA3	R	R	R
5	KA4	R	R	R
6	TB2	R	S++	R
7	TB3	R	S+	R
8	TB4	R	R	R
9	TB5	R	R	R

Ghi chú: R: Kháng, S+: Nhạy cảm, S++: Rất nhạy cảm

Theo nghiên cứu của Divya et al. (2012), ba chủng vi khuẩn *L. plantarum* G1, G4 và P8 có khả năng kháng lại kháng sinh tetracylin ở nồng độ 30 µg/mL với ĐKVKK lần lượt là 19 mm, 18 mm và 34 mm đồng thời ba chủng vi khuẩn này còn có khả năng kháng lại ampicillin nồng độ 10 µg/mL với ĐKVKK lần lượt là 18 mm, 22 mm và 3 mm. Theo Thủy (2022) các chủng vi khuẩn LAB có khả năng kháng kháng sinh có liên quan đến một số gen trên nhiễm sắc thể transposome hoặc plasmid. Một giả thuyết đặt ra liệu các chủng LAB này thể chuyển các gen kháng thuốc sang các chủng vi khuẩn gây bệnh trong đường ruột hay không. Tuy nhiên, hiện nay chưa có thông tin về các vấn đề lâm sàng gây ra do hiện tượng này. Nếu bỏ qua vấn đề trên thì khả năng kháng kháng sinh được coi là có lợi đối với chế phẩm probiotic. Nhờ đó, LAB có thể phát triển tốt khi bệnh nhân sử dụng các thuốc kháng sinh đường

uống, duy trì được trạng thái tiêu hóa tốt và ổn định ở đường ruột khi người bệnh dùng kháng sinh. Do vậy, WHO và FAO khuyến cáo cần có thêm những nghiên cứu về vấn đề này ở các chủng probiotic.

3.4. Tuyển chọn các chủng vi khuẩn acid lactic có khả năng bám dính

Để thực hiện khả năng probiotic ngoài khả năng sống sót đi qua hệ tiêu hóa của dạ dày thì khả năng bám dính vào chất nhầy, tế bào biểu mô hay thành ruột cũng là một yếu tố rất quan trọng để thể hiện tác dụng lợi khuẩn của LAB (Han et al., 2021). Khả năng bám dính vào dung môi ethyl acetate là phương pháp gián tiếp để chọn lọc các chủng vi khuẩn có khả năng bám dính vào đường ruột (Thủy & Hương, 2018). Kết quả khảo sát khả năng tự kết dính và khả năng kết dính với dung môi ethyl acetate được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3. Khả năng bám dính của một số chủng vi khuẩn LAB

STT	Chủng vi khuẩn	Tự bám dính (%)	Bám dính với dung môi (%)
1	HC1	49,35 ^a ± 0,82	40,84 ^a ± 0,29
2	HC3	11,23 ^c ± 1,14	19,87 ^c ± 0,98
3	KA2	43,46 ^b ± 0,43	30,99 ^b ± 0,85
4	KA3	35,93 ^c ± 1,82	13,67 ^c ± 0,29
5	KA4	48,69 ^a ± 1,22	13,11 ^c ± 0,81
6	TB2	13,03 ^c ± 0,63	21,08 ^c ± 0,75
7	TB3	10,28 ^d ± 1,00	42,60 ^a ± 0,45
8	TB4	32,82 ^d ± 0,65	31,42 ^b ± 0,43
9	TB5	30,91 ^d ± 0,95	17,24 ^d ± 0,17

Ghi chú: Các giá trị trong bảng của cùng một cột, theo sau có các mẫu tự giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức ý nghĩa 5% theo kiểm định Tukey.

Kết quả thí nghiệm trên cho thấy tất cả các chủng vi khuẩn khảo sát đều có khả năng tự kết dính và bám dính với dung môi. Chủng vi khuẩn HC1 có khả năng tự kết dính cao nhất với tỷ lệ 49,35% không có khác biệt ý nghĩa thống kê với chủng vi khuẩn KA4 (48,69%) và có khác biệt ý nghĩa ở mức ý nghĩa 5% so với các chủng vi khuẩn còn lại. Về khả năng bám

dính với dung môi thì có 2 chủng vi khuẩn HC1 và TB3 có khả năng kết dính cao nhất với tỷ lệ kết dính lần lượt là 40,84% và 42,6%, hai giá trị này khác biệt không có ý nghĩa thống kê nhưng có khác biệt có ý nghĩa ở mức ý nghĩa 5% so với các chủng vi khuẩn còn lại. Kết quả nghiên cứu này thấp hơn kết quả nghiên cứu của Thủy và Hương (2018) về khả

năng tự kết dính và kết dính với dung môi ethyl acetate của chủng vi khuẩn *L. farcimimis* NM6 với tỷ lệ kết dính lần lượt là 75,02% và 67,45%. Tương tự với kết quả của Thủy và Hương (2018) về khả năng tự kết dính và kết dính với dung môi ethyl acetate của chủng vi khuẩn *L. farcimimis* NM6 với tỷ lệ kết dính lần lượt là 75,02% và 67,45%.

3.5. Tuyển chọn chủng vi khuẩn có khả năng kháng vi khuẩn *Escherichia coli*

Dựa vào khả năng chịu pH, chịu muối mật, kháng kháng sinh và khả năng bám dính từ các thí nghiệm trên, ba chủng vi khuẩn HC1, KA2 và TB5 được chọn để khảo sát khả năng kháng lại vi khuẩn *E.coli* (Bảng 4 và Hình 4). Một số chủng vi khuẩn LAB như *L. plantarum* và *L. acidophilus* có tác dụng kháng khuẩn đối với các vi khuẩn Gram âm và Gram dương (Khalid et al., 2011). Một trong những chất chuyển hóa của LAB là bacteriocin, một peptide kháng khuẩn. Các peptide kháng khuẩn do vi khuẩn Gram dương tạo ra thường có phổ kháng khuẩn rộng và có thể ức chế sự phát triển của cả vi khuẩn Gram dương và Gram âm (Yang et al., 2014).

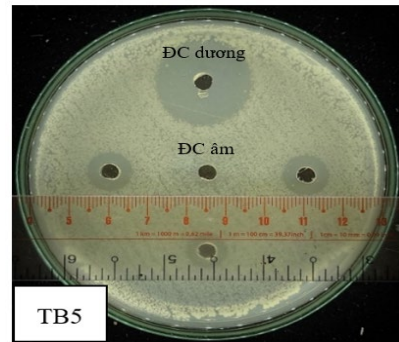
Bảng 4. Khả năng kháng vi khuẩn *Escherichia coli* của các chủng vi khuẩn tuyển chọn

STT	Chủng vi khuẩn	ĐKVKK (mm)
1	HC1	7,27 ^b ± 0,06
2	KA2	6,37 ^c ± 0,06
3	TB5	9,34 ^a ± 0,06

Ghi chú: Các giá trị trong bảng của cùng một cột, theo sau có các mẫu tự giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức ý nghĩa 5% theo kiểm định Tukey.

Qua kết quả khảo sát trên, cả ba chủng vi khuẩn tuyển chọn đều có khả năng kháng lại vi khuẩn *E.*

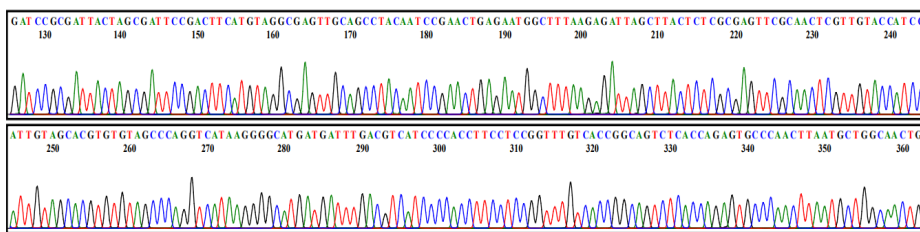
coli nhưng chỉ ở mức trung bình, trong đó chủng vi khuẩn TB5 là chủng vi khuẩn có khả năng kháng *E. coli* cao nhất và có khác biệt ý nghĩa thống kê với các chủng vi khuẩn còn lại ở mức ý nghĩa 5%. Kết quả này tương tự với kết quả nghiên cứu của Nhung và ctv. (2019) về khả năng kháng *E. coli* của 10 chủng vi khuẩn LAB được phân lập từ các mẫu thực phẩm lên men, với ĐKVKK dao động từ 10 đến 22 mm. Các chủng vi khuẩn *Lactobacillus* có khả năng kháng vi khuẩn *E.coli* ở mức trung bình đến mạnh với ĐKVKK dao động từ 2,33 đến 8 mm (Tâm và ctv., 2019).



Hình 4. Khả năng kháng kháng sinh của một số chủng vi khuẩn acid lactic

3.6. Định danh chủng vi khuẩn có tiềm năng probiotic cao

Kết quả trên cho thấy, chủng vi khuẩn HC1 là chủng vi khuẩn tiềm năng cao về khả năng probiotic. Do đó, chủng vi khuẩn HC1 được chọn để giải trình tự gen 16S rRNA và so sánh độ tương đồng trên ngân hàng gene NCBI. Kết quả định danh chủng vi khuẩn HC1 là chủng *Lactiplantibacillus plantarum* (tên trước đây là *Lactobacillus plantarum*) với độ tương đồng đạt 97,2%.



Hình 6. Kết quả giải trình tự đoạn gene 16S RNA của chủng vi khuẩn HC1

Sự mô tả	Tên khoa học	Điểm tối đa	Tổng điểm	Bia truy vấn	giá trị E	Mỗi nhân dạng	tài khoản len	gia nhập
<input checked="" type="checkbox"/> Chủng <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> C23 16S gen RNA ribosome_một phần trình tự	<i>Lactiplantibacillus plant...</i>	1744	1744	95%	0,0	97,20%	1127	OM063101.1
<input checked="" type="checkbox"/> Chủng <i>Lactobacillus plantarum</i> M6 16S gen RNA ribosome_một phần trình tự	<i>Lactiplantibacillus plant...</i>	1740	1740	97%	0,0	96,43%	1222	MT026915.1
<input checked="" type="checkbox"/> Chủng <i>Lactobacillus plantarum</i> IPhp-GM13 16S gen RNA ribosome_một phần trình tự	<i>Lactiplantibacillus plant...</i>	1738	1738	97%	0,0	96,50%	1219	KY658476.1
<input checked="" type="checkbox"/> Chủng <i>Lactobacillus plantarum</i> Một gen RNA ribosome 16S_một phần trình tự	<i>Lactiplantibacillus plant...</i>	1738	1738	95%	0,0	97,20%	1428	JX426121.1

Hình 7. Kết quả so sánh trình tự gene của chủng vi khuẩn HC1 trên NCBI

L. plantarum đã được ứng dụng vào các sản phẩm lên men như sữa chua, phô mai, bánh mì. Nhiều nghiên cứu đã đánh giá rằng *L. plantarum* đóng một vai trò quan trọng trong việc tăng cường an toàn thực phẩm trong quá trình lên men (Zapasnik et al., 2022). Bên cạnh đó, chủng *L. plantarum* có thể ngăn chặn sự phát triển của nấm bằng cách phân hủy cấu trúc tế bào dưới tác động của các chất chuyển hóa thứ cấp như acid lactic, acid béo, peptide, phenol (Li et al., 2023). Chủng vi khuẩn *L. plantarum* TG2 phân lập từ trái sơ ri đã được ứng dụng trong sản phẩm sữa chua lên men có bổ sung dịch trái sơ ri đạt giá trị cảm quan đạt 14,42/15 điểm theo TCVN 7030:2002 (Tâm và ctv., 2023). Bên cạnh đó, chủng vi khuẩn *L. plantarum* OML2 đã được nghiên cứu và chứng minh tiềm năng probiotic về khả năng kháng lại vi khuẩn *E. coli* với ĐKVKK đạt 7,00 mm và khả năng sống trong điều kiện pH 2,5 với mật số đạt 6,64 logCFU/mL (Tâm và ctv., 2019).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ajibola, O. O., Thomas, R., & Bakare, B. F. (2023). Selected fermented indigenous vegetables and fruits from Malaysia as potential sources of natural probiotics for improving gut health. *Food Science and Human Wellness*, 12(5), 1493-1509. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2023.02.011>.
- Divya, J. B., Varsha, K. K., & Nampoothir, K. M. (2012). Newly Isolated Lactic Acid Bacteria with Probiotic Features for Potential Application in Food Industry. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 167, 1314-1324. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9561-7>.
- Dunne, C. L., Mahony, M., Thornton, G., Morrissey, D., Hallorans, S., Feeney, M., Flynn, S., Kiely, B., Daly, C., & Collins, K. (2001). In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 386S-392S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.386s>.
- Fujimori, S. (2020). Gastric acid level of humans must decrease in the future. *World Journal of Gastroenterology*, 6706-6709. <https://doi.org/10.3748/wjg.v26.i43.6706>
- Gilliland, S. E., Staley, T. E., & Bush, L. J. (1984). Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *Int. J. Dairy Sci.*, 67(12), 3045-51. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81670-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81670-7).
- Hà, N. T. (1991). Phương pháp kỹ thuật khoanh giấy kháng sinh khuếch tán. *Kỹ thuật xét nghiệm vi sinh vật Y học* (trang 329-338). Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
- Han, S., Lu, Y., Xie, J., Fei, Y., Zheng, G., Wang Z., Liu, J., Longxian L., Ling, Z., Berglund, B., Yao, M., & Li, L. (2021). Probiotic Gastrointestinal Transit and Colonization After Oral Administration: A Long Journey. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 609-722. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.60972>.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., & Pot, B. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 11(6), 506-514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>.
- Hoben, H., & Somasegaran, P. (1982). Comparison of the Pour, Dpread and Drop plate methods for enumeration of *Rhizobium* spp. in inoculants made from presterilized peat. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(5), 1246-1247. <https://doi.org/10.1128/aem.44.5.1246-1247.1982>.
- Kechagia, M., Baoulis, D., Konstantopoulou, S., Dimitriadi, D., Gyftopoulou, K., Skarmoutsou, N., & Fakiri, E. M. (2013). Health benefits of probiotics: a review. *ISRN Nutrition*, 1-7. <https://doi.org/10.5402/2013/481651>.
- Khalid, K. (2011). An overview of lactic acid bacteria. *Int J Biosci*, 3, 1-13. <https://inns.pub.net/an-overview-of-lactic-acid-bacteria/>
- Leska, A., Nowal, A., Szulc, J., Motyl, I., & Chrebelska, K. H. C. (2022). Antagonistic Activity of Potentially Probiotic Lactic Acid Bacteria against Honeybee (*Apis mellifera* L.)

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã tuyển chọn được 9/17 chủng vi khuẩn LAB có khả năng chịu được pH 2,5 với mật số vi khuẩn dao động từ 3,91 đến 4,73 logCFU/mL, trong đó chủng vi khuẩn HC1 có khả năng chịu pH 2,5 tốt nhất với mật số là 4,73 logCFU/mL. Ba chủng vi khuẩn HC1, KA2, TB5 có khả năng chịu muối mật cao nhất với giá trị ΔOD lần lượt là 0,298, 0,269 và 0,266. Các chủng vi khuẩn HC1, KA2, KA3, KA4, TB4 và TB5 có khả năng kháng ba loại kháng sinh ampicillin, tetracyclin, ofloxacin khảo sát. Chủng vi khuẩn HC1 và KA4 có khả năng tự kết dính cao nhất với tỷ lệ kết dính lần lượt là 49,35% và 48,69%. ba chủng vi khuẩn HC1, KA2 và TB5 đều có khả năng kháng vi khuẩn *E. coli* với ĐKVKK lần lượt là 7,27 mm, 6,37 mm và 9,34 mm. Chủng vi khuẩn HC1 là chủng vi khuẩn tiềm năng được chọn để giải trình tự gene 16S rRNA, kết quả cho thấy chủng vi khuẩn này là chủng *Lactiplantibacillus plantarum* với độ tương đồng đạt 97,20%.

- Pathogens. *Pathogens*, 11, 1367.
<https://doi.org/10.3390/pathogens11111367>
- Li, Q., Zeng, X., Fu, H., Wang, X., Guo, X., & Wang, M. (2023). *Lactiplantibacillus plantarum*: A comprehensive review of its antifungal and anti-mycotoxic effects. *Trends in Food Science and Technology*, 136, 224-238.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.04.019>.
- Liong, M. T., & Shah, N. P. (2005). Acid and Bile Tolerance and Cholesterol Removal Ability of Lactobacilli Strains. *Journal of Dairy Science*, 88, 55–66. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(05)72662-X.
- Liu, C., Xue, W., Ding, H., An, C., Ma, S., & Liu, Y. (2021). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from fermented vegetables in Shaanxi, China. *Front. Microbiol*, 12, 774903.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.774903>.
- Maeno, S., Nishimura, H., Tanizawa Y., Dicks, L., Arita, M., & Endo, A. (2021). Unique niche-specific adaptation of fructophilic lactic acid bacteria and proposal of three Apilactobacillus species as novel members of the group. *BMC Microbiology*, 21-41.
<https://doi.org/10.1186/s12866-021-02101-9>,
- Moore, G. L., Barbaree, J., Vodyanoy, V., & Sorokulov, I. (2013). Antagonistic activity of *Bacillus* bacteria against food-borne pathogens. *Journal of Probiotics & Health*, 1(3).
<https://doi.org/10.4172/2329-8901.1000110>.
- Như, L. H. (2022). *Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn acid lactic có khả năng kháng khuẩn và sinh enzyme ngoại bào từ trái sơ ri (Malpighia glabra L.)* (luận văn tốt nghiệp đại học). Trường Đại học Cần Thơ.
- Nhung, N. T. H., Thương, L. T., Hằng, N. T. T., & Huyền, N. T. (2019). Tuyển chọn chủng vi khuẩn lactic có tiềm năng ứng dụng tạo chế phẩm sinh học (probiotic) bổ sung vào thức ăn chăn nuôi. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp*, 2, 18-27.
- Sadeghi, M., Panahi, B., Mazlumi, A., Hejazi, M. A., Komi, D. E. A., & Nami, Y. (2022). Screening of potential probiotic lactic acid bacteria with antimicrobial properties and selection of superior bacteria for application as biocontrol using machine learning models. *Food Science and Technology*, 162, 113471.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113471>.
- Sakandar, H. A., Faizan, S. K., & Sadiqa, A. (2019). Isolation and *in-vitro* probiotic characterization of fructophilic lactic acid bacteria from Chinese fruits and flowers. *Food Science and Technology*, 104, 70-75.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.01.038>.
- Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1: 2344.
- Sharma, C., Gulati S., Thakur, N., Singh, B. P., Gupta, S., Kaur, S., Mishra, S. K., Puniya, A. K., Gill, J. P. S., & Panwar, H. (2017). Antibiotic sensitivity pattern of indigenous *Lactobacilli* isolated from curd and human milk samples. *Biotech*, 7(1), 53.
<https://doi.org/10.1007/s13205-017-0682-0>
- Shokryazdan, P., Sieso, C. C., Kalavathy, R., Liang J. B., Alitheen, N. B., Jahromi, M. F., & Ho, Y. W. (2014). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains with antimicrobial activity against some human pathogenic strains. *BioMed Research International*, 2014, 1-16.
<https://doi.org/10.1155/2014/927268>.
- Tâm, H. N., Trúc, T. T., Mươi, N. V., & Toàn, H. T. (2016). Phân lập và tuyển chọn dòng vi khuẩn acid lactic có khả năng kháng khuẩn từ dưa lê non (*Cucumis melo* (L.)) muối chua. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 1, 18-24.
<https://doi.org/10.22144/ctu.jsi.2016.017>
- Tâm, H. N. T., Diệp, N. L. H., & Sương, P. T. T. (2019). Phân lập và tuyển chọn dòng vi khuẩn *Lactobacillus* có tiềm năng probiotic từ cây môn ngọt (*Colocasia esculenta* (L.) SCHOTT). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 55 (1B), 15-23.
<https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2019.017>.
- Tâm, H. N. T., Như, L. H., Thành, Đ. T., & Nhi, H. Y. (2023). Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn lactic từ trái sơ ri định hướng ứng dụng trong lên men sữa chua sơ ri (*Malpighia glabra* L.). *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 2, 259-272.
- Tian, Y., Gui, W., Koo, I., Smith, P. B., Allman, E. L., Nichols, R. G., Rimal, B., Cai, J., Liu, Q., & Patterson, A. D. (2020). The microbiome modulating activity of bile acids. *Gut Microbes*, 11(4), 979-996.
<https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1732268>.
- Thùy, Đ. T. B., & Hương, N. T. D. (2018). Định danh và khảo sát một số tính chất của chủng *Lactobacillus farciminis* NM6 phân lập từ nước mắt. *Tạp chí khoa học Đại học Huế*, 127(1C), 119-129.
- Thùy, Đ. T. B. (2022). Một số tính chất có lợi của vi khuẩn lactic. Nhà xuất bản Đại học Huế.
- Vuyst, D., & Leroy, F. (2007). Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13, 194-199.
<https://doi.org/10.1159/000104752>.
- Yang, S. C., Lin, C. H., Sung, C. T., & Fang, J. Y. (2014). Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5, 241.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00241>
- Zapasnik, A., Sokolowska, B., & Bryła, M. (2022). Role of Lactic Acid Bacteria in Food Preservation and Safety. *Food MDPI*, 11, 1283.
<https://doi.org/10.1186/s12866-021-02101-9>.