

XÁC ĐỊNH MỘT SỐ ĐẶC TÍNH PROBIOTIC CỦA CÁC CHỦNG VI KHUẨN LACTIC PHÂN LẬP TỪ DƯA MUỐI VÀ CÀ MUỐI

Hoàng Minh Đức*, Trần Thị Khánh Hoà, Tống Khánh Linh, Hoàng Minh Sơn

Bộ môn Thú y cộng đồng, Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

*Tác giả liên hệ email: hoangminhduc@vnua.edu.vn

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục đích phân lập, chọn lọc và đánh giá tiềm năng probiotic trong điều kiện *in vitro* của các chủng vi khuẩn lactic (LAB) có nguồn gốc từ rau, quả muối lên men thủ công, bày bán tại Thành phố Hà Nội. Tổng cộng 100 chủng LAB đã được phân lập từ 100 mẫu dưa và cà muối. Trong đó, 5 chủng được lựa chọn để tiến hành nghiên cứu các đặc tính probiotic, các chủng này thuộc các loài *Pediococcus pentosaceus* (2 chủng), *Pediococcus acidilactici* (1 chủng) và *Lactobacillus plantarum* (2 chủng). Cả 5 chủng đều không có khả năng gây dung huyết, nhưng có khả năng tồn tại trong môi trường có pH thấp và muối mật. Ngoài ra, chúng còn có khả năng đối kháng với *S. typhimurium*, *E. coli* K88, *S. aureus* và *C. perfringens*. Nhìn chung, kết quả nghiên cứu này cho thấy 5 chủng LAB phân lập có thể được sử dụng để tạo ra các chế phẩm sinh học.

Từ khóa: Vi khuẩn lactic, mầm bệnh, kháng kháng sinh, lợi khuẩn.

Determination of some probiotic properties of lactic acid bacteria strains isolated from traditional fermented vegetables

Hoang Minh Duc, Tran Thi Khanh Hoa, Tong Khanh Linh, Hoang Minh Son

SUMMARY

This study was conducted to isolate, select, and assess the probiotic potential *in vitro* of lactic acid bacteria (LAB) from traditional fermented vegetables in Ha Noi City. A total of 100 LAB strains were isolated from 100 samples of Vietnamese pickled mustard green and salted egg-plant. Of which, 5 strains were selected for study on probiotic characteristics, these strains belonged to *Pediococcus pentosaceus* (2 strains), *Pediococcus acidilactici* (1 strain), and *Lactobacillus plantarum* (2 strains). All 5 isolates showed non-hemolytic activity but high tolerance with low pH and bile salt. Besides, they also exhibited antagonistic activity against *S. typhimurium*, *E. coli* K88, *S. aureus*, and *C. perfringens*. These results indicate that 5 isolated LAB can be used for producing probiotics.

Keywords: Lactic acid bacteria, pathogens, antibiotic resistance, probiotics.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong những thập kỷ qua, lạm dụng kháng sinh trong chăn nuôi đang là một mối đe dọa lớn đến sức khỏe cộng đồng do sự gia tăng đáng kể vấn đề kháng kháng sinh và sự hiện diện của dư lượng kháng sinh trong các sản phẩm động vật (Mehdi và cs., 2018). Vi khuẩn kháng kháng sinh có thể theo chuỗi thức ăn để xâm nhập vào cơ thể con người và gây nên những bệnh khó chữa do khan hiếm kháng sinh điều trị (CDC, 2013). Thậm chí khi đã tìm được phương pháp điều trị hiệu quả thì nhiều

trường hợp bệnh nhân vẫn có thời gian nằm viện cũng như thời gian phục hồi lâu hơn đáng kể, dẫn đến chi phí thăm khám và tỷ lệ di chứng cao hơn, làm tăng thêm gánh nặng cho hệ thống chăm sóc sức khỏe vốn đã quá tải ở nhiều quốc gia (CDC, 2013). Ngoài ra, dư lượng kháng sinh trên các sản phẩm có nguồn gốc động vật như thịt, trứng, sữa gây nên nhiều tác động tiêu cực đến con người như truyền vi khuẩn kháng kháng sinh, phá vỡ hệ vi sinh vật đường ruột, gây dị ứng, đột biến, nhiễm độc gan thận, rối loạn sinh sản, nhiễm độc tủy xương và thậm chí gây ung thư (Bacanli và Başaran, 2019).

Tuy nhiên, việc cấm hay hạn chế sử dụng kháng sinh bổ sung vào thức ăn chăn nuôi có thể làm gia tăng tỷ lệ mắc bệnh và giảm sinh trưởng ở động vật (Chattopadhyay, 2014). Điều này gây ảnh hưởng lớn đến năng suất chăn nuôi và hiệu quả kinh tế. Do đó, nhu cầu cấp thiết hiện nay là tìm kiếm các giải pháp thay thế kháng sinh hiệu quả để kiểm soát các bệnh truyền nhiễm và hạn chế sự lây lan của vi khuẩn kháng kháng sinh, quan trọng hơn là để bảo tồn kháng sinh cho tương lai.

Theo FAO/WHO (2002), chế phẩm sinh học (probiotics, hay còn gọi là lợi khuẩn) được định nghĩa là “các vi sinh vật sống khi được sử dụng với lượng đủ sẽ mang lại lợi ích cho sức khỏe của vật chủ”. Vai trò tích cực của lợi khuẩn đối với con người và động vật đã được chứng minh và chấp nhận rộng rãi (Li và cs., 2020). Việc bổ sung các lợi khuẩn có thể cải thiện hiệu suất tiêu hóa, tốc độ tăng trưởng, chất lượng và sản lượng sản phẩm cũng như giảm nhiễm trùng đường ruột ở nhiều loài động vật khác nhau (Mohammed và cs., 2021).

Nhóm vi khuẩn sản sinh ra acid lactic (vi khuẩn lactic - LAB) bao gồm rất nhiều loài vi khuẩn khác nhau và được sử dụng rộng rãi trong các chế phẩm sinh học nhờ độ phổ biến, tính an toàn và có nhiều đặc tính probiotic khác (khả năng tồn tại trong môi trường pH thấp, muối mật, đối kháng với các vi sinh vật gây bệnh) (Liu và cs., 2022). Vi khuẩn lactic được đặc trưng bởi khả năng sản sinh ra acid lactic như một sản phẩm chính trong quá trình chuyển hóa, có tác dụng điều chỉnh và cải thiện sự cân bằng của hệ vi sinh đường ruột (Aswathy và cs., 2008).

Tại Việt Nam, dưa muối và cà muối là hai loại thực phẩm lên men phổ biến được sử dụng hàng ngày. Đây là một nguồn mẫu lý tưởng bởi việc tiêu thụ dưa, cà muối thường xuyên và lâu đời cho thấy mức độ an toàn, không chứa những vi khuẩn có hại. Ngoài ra, thực phẩm lên men đã được chứng minh là nguồn cung cấp các chủng vi khuẩn lactic có đặc tính probiotic tiềm năng (Liu và cs., 2022), do đó có thể được khai thác như một nguồn hứa hẹn cho những chế phẩm sinh học mới.

Xuất phát từ những vấn đề nêu trên, nghiên cứu này được thiết kế và tiến hành nhằm mục đích tuyển chọn các chủng vi khuẩn lactic mang các đặc tính probiotic.

II. NỘI DUNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung nghiên cứu

- Phân lập và tuyển chọn các chủng LAB từ mẫu dưa muối và cà muối
- Đánh giá khả năng gây dung huyết, kháng với acid và muối mật, kháng kháng sinh và đối kháng với vi khuẩn gây bệnh của các chủng LAB đã lựa chọn.

2.2. Nguyên liệu

- Mẫu nghiên cứu: Mẫu dưa muối (50) và cà muối (50) bày bán trên địa bàn huyện Gia Lâm, thành phố Hà Nội.
- Môi trường, hóa chất: De Man-Rogosa-Sharpe (MRS) agar, MRS broth, Blood agar, Mueller hinton broth (MHB), thuốc nhuộm gram, muối mật, NaOH, HCl, brain heart infusion (BHI) broth, tryptose sulfite cycloserine (TSC) agar, bột agar.
- Kháng sinh bột: ampicillin, kanamycin, gentamicin, clindamycin, erythromycin, tetracycline và chloramphenicol.

Các chủng vi khuẩn gây bệnh cho vật nuôi: Bốn vi khuẩn gây bệnh cho vật nuôi (vi khuẩn chỉ định) dùng trong nghiên cứu này bao gồm: *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* K88, *Staphylococcus aureus* và *Clostridium perfringens*. Các chủng này được phân lập và giữ giống tại phòng thí nghiệm Bộ môn Thú y cộng đồng, Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

- Thời gian: từ tháng 1 năm 2023 đến tháng 12 năm 2023.
- Địa điểm: Mẫu được phân tích tại phòng thí nghiệm Bộ môn Thú y cộng đồng, Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Phân lập vi khuẩn lactic từ dưa muối và cà muối

Mẫu dưa muối (50 mẫu) và cà muối (50 mẫu) được thu thập ngẫu nhiên tại các chợ trên địa bàn

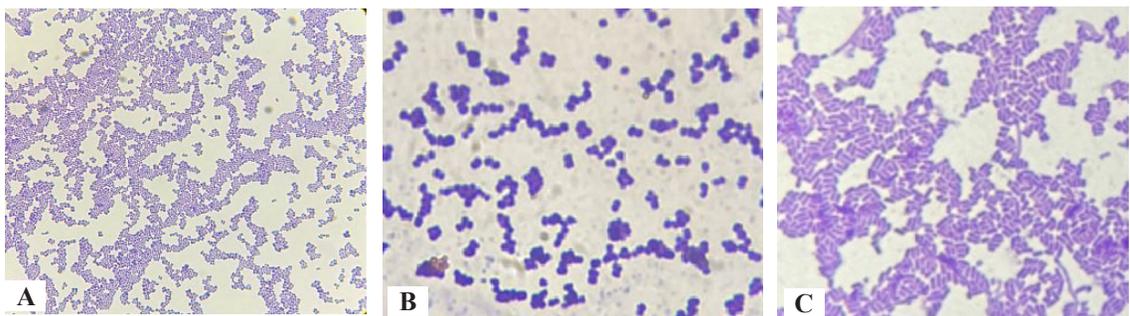
huyện Gia Lâm, thành phố Hà Nội. Mẫu được cho vào túi zip vô trùng ghi đầy đủ thông tin mẫu, bảo quản trong thùng lạnh và tiến hành phân tích trong vòng 24 giờ.

Mẫu (25g) được cắt nhỏ bằng pank và kéo vô trùng, đồng nhất với canh thang MRS (225 mL) và ria cấy lên đĩa thạch MRS, nuôi cấy ở 37°C trong 24 - 48 h. Vi khuẩn lactic trên thạch MRS

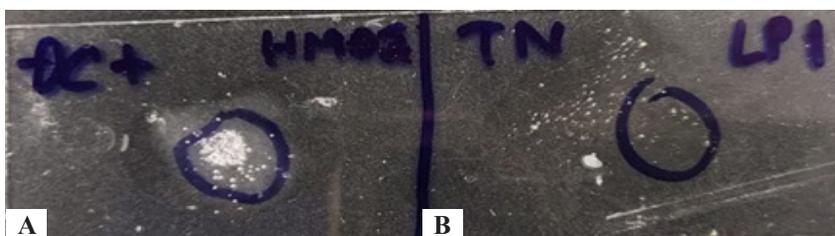
hình thành khuẩn lạc nhỏ, màu trắng sữa hoặc trắng xám, tròn lồi (hình 1). Các khuẩn lạc điển hình được chọn lọc (1 khuẩn lạc/1 mẫu) để nhuộm gram (hình 2), thử phản ứng catalase (hình 3) và định danh bằng phương pháp khối phổ MALDI TOF. Những chủng đã được xác định đến mức độ loài, độ chính xác cao và thuộc loài thường được sử dụng trong các chế phẩm sinh học được lựa chọn để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 1. Hình thái khuẩn lạc của vi khuẩn *P. pentosaceus* (A), *P. acidilactici* (B), *L. plantarum* (C) trên thạch MRS



Hình 2. Hình thái của vi khuẩn *P. pentosaceus* (A), *P. acidilactici* (B), *L. plantarum* (C) dưới kính hiển vi (1000x) sau khi nhuộm gram



Hình 3. Kết quả kiểm tra phản ứng sinh hóa catalase của các chủng LAB phân lập
Đối chứng dương (A) có hiện tượng sủi bọt, chủng kiểm tra (B) không có hiện tượng sủi bọt

2.4.2. Đánh giá khả năng gây dung huyết

Các chủng LAB được đánh giá khả năng gây dung huyết theo phương pháp đã được mô tả bởi Halder và cs. (2017). Cụ thể, canh khuẩn LAB

được ria cấy lên môi trường thạch máu và ủ trong 72 h ở 37°C. Khả năng dung huyết của các chủng LAB được xác định thông qua quầng xung quanh khuẩn lạc: quầng trong suốt (β -hemolysis), quầng

xanh (α -hemolysis) hoặc không xuất hiện quầng (γ -hemolysis) (hình 4).

2.4.3. Đánh giá sức đề kháng với acid và muối mật

Sức đề kháng với acid và muối mật của các chủng LAB phân lập được xác định bằng phương pháp đã được mô tả bởi Huligere và cs. (2023) với một số thay đổi. Cụ thể, canh khuẩn LAB được cấy chuyển vào canh thang MRS ở độ pH 3,0 hoặc có nồng độ muối mật 0,3% tương ứng với thử nghiệm đánh giá sức đề kháng với môi trường acid hoặc muối mật, sau đó ủ ở 37°C trong 3 h. Số lượng vi khuẩn ban đầu và sau 3 h được xác định bằng phương pháp lãg trên thạch MRS. Khả năng đề kháng của các chủng LAB với pH và muối mật được đánh giá theo công thức sau:

$$\% \text{ sống sót} = \frac{\text{Số khuẩn lạc sau 3 h}}{\text{Số khuẩn lạc ban đầu}} \times 100$$

2.4.4. Xác định độ miễn cảm với kháng sinh

Tính miễn cảm với kháng sinh của các chủng LAB phân lập trong nghiên cứu này được xác định bằng phương pháp pha loãng kháng sinh theo hướng dẫn của Cơ quan An toàn thực phẩm châu Âu EFSA (2018). Các kháng sinh được dùng trong thí nghiệm gồm ampicillin, kanamycin, gentamicin, clindamycin, erythromycin, tetracycline và chloramphenicol. Giá trị điểm nhạy cảm giới hạn của các kháng sinh đối với các loài vi khuẩn lactic được xác định dựa trên tiêu chuẩn của EFSA (2018).

2.4.5. Đánh giá khả năng đối kháng với các vi khuẩn *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. aureus*, *C. perfringens*

Khả năng đối kháng của các chủng được thực hiện bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch dựa trên mô tả bởi Gupta và cs. (2021). Cụ thể, canh khuẩn LAB được ly tâm và lọc qua màng lọc 0,22 μm để thu dịch nổi không tế bào (cell free supernatant – CFS). Một phần dịch nổi được trung hòa đến pH 6,5 bằng dung dịch NaOH 0,1N được ký hiệu là nCFS. Canh khuẩn của 4 vi khuẩn (*E. coli* K88, *S. typhimurium*, *S. aureus*, *C. perfringens*) (10^7 CFU/mL) được trộn với thạch mềm BHI 0,8%; đổ đều lên bề mặt đĩa thạch MRS và ủ ở 37°C trong 6 h. Riêng đối với vi khuẩn *C. perfringens* thì thạch MRS và BHI được thay bằng thạch TSC. Sau 6 h ủ, các

lỗ giếng đường kính 5mm được đục trên bề mặt đĩa thạch để nhỏ dịch nổi CFS và nCFS (50 μL /giếng) của các chủng LAB. Đĩa được giữ lạnh ở 4°C trong 2-3 h để các hoạt chất khuếch tán vào thạch trước khi được ủ ở 37°C trong 18 h. Khả năng đối kháng với mầm bệnh được đánh giá thông qua sự xuất hiện của các vòng vô khuẩn xung quanh ô giếng. Kết quả được phân loại dựa trên kích thước đường kính vòng vô khuẩn: 6-10mm (+), 11-16mm (++), >16mm (+++) hoặc không có vòng vô khuẩn (-).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và lựa chọn các chủng vi khuẩn lactic

Tổng cộng 100 chủng LAB giả định được phân lập từ 50 mẫu dưa muối và 50 mẫu cà muối (chỉ giữ giống 1 chủng/mẫu để tránh sự trùng lặp). Dựa vào kết quả nhuộm gram, thử sinh hoá, định danh bằng kỹ thuật khối phổ MALDI TOF, 5 chủng LAB thuộc các loài *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici* và *Lactobacillus plantarum* đã được lựa chọn ngẫu nhiên để tiếp tục nghiên cứu (bảng 1).

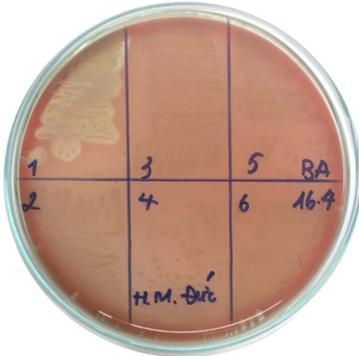
Bảng 1. Các chủng vi khuẩn lactic phân lập

Ký hiệu chủng	LAB phân lập	Nguồn gốc
PP1	<i>P. pentosaceus</i>	Dưa muối
PP2	<i>P. pentosaceus</i>	Cà muối
PA	<i>P. acidilactici</i>	Dưa muối
LP2	<i>L. plantarum</i>	Dưa muối
LP3	<i>L. plantarum</i>	Cà muối

Trong số các chi thuộc vi khuẩn lactic, *Lactobacillus* là chi lớn nhất, có vai trò đa dạng trong nâng cao chất lượng thực phẩm và được ứng dụng nhiều nhất trong các chế phẩm sinh học (Dewi và Kollanoor Johny, 2022). Ngoài ra, *Lactobacillus* đạt tiêu chí GRAS và QPS, an toàn để ứng dụng trên người và động vật (Panel, 2021). *Pediococcus* spp. đã được sử dụng từ nhiều thế kỷ trước để lên men các thực phẩm truyền thống ở nhiều quốc gia (Todorov và cs., 2023). Hiện nay, *Pediococcus* spp. đang được ứng dụng rộng rãi trong ngành công nghiệp thực phẩm, y tế và thú y nhờ khả năng sản xuất các bacteriocin có hiệu quả cao trong việc đối kháng với mầm bệnh (Todorov và cs., 2023).

3.2. Khả năng dung huyết của các chủng LAB phân lập

Kết quả kiểm tra trên thạch máu cho thấy cả 5 chủng LAB được phân lập đều không có khả năng gây dung huyết, vì vậy các chủng này được cho là an toàn cho vật nuôi (FAO/WHO, 2002). Kết quả này tương đồng với các nghiên cứu trước khi công bố nhiều loài LAB không có khả năng gây dung huyết (Casarotti và cs., 2017).

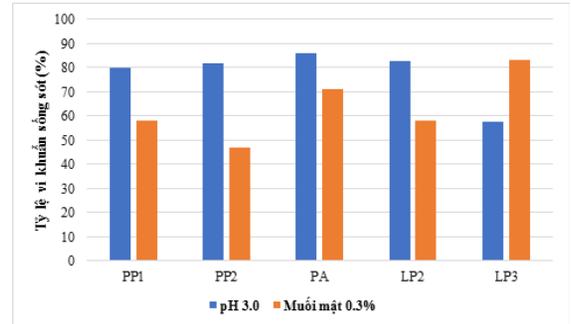


Hình 4. Kết quả kiểm tra khả năng dung huyết của các chủng LAB phân lập trên thạch máu
1: Đối chứng dương gây dung huyết, 2-6: Chủng kiểm tra không gây dung huyết

3.3. Sức đề kháng với acid và muối mật của các chủng LAB phân lập

Khả năng đề kháng với pH thấp và muối mật là điều kiện tiên quyết để các lợi khuẩn có thể sống sót trong đường tiêu hóa của động vật. Trong thí nghiệm này; pH 3,0 và muối mật 0,3% có sự ảnh hưởng khác nhau đến 5 chủng LAB (hình 5). Tỷ lệ sống sót trong môi trường canh thang MRS pH 3,0 có sự dao động lớn; từ 57,58% đến 86,11%. Chủng LP3 có khả năng sống sót thấp nhất sau 3h ủ, trong khi đó 4 chủng còn lại đều cho thấy tỷ lệ sống sót $\geq 80\%$. Ở môi trường có nồng độ muối mật 0,3%; tỷ lệ sống sót được ghi nhận trong khoảng 46,88 – 83,33%. Nhìn chung, cả 5 chủng LAB trong nghiên cứu này đều thể hiện khả năng sống sót tốt hơn ở môi trường pH 3,0. Có thể do chúng có nguồn gốc từ rau củ lên men có tính acid, vì vậy các chủng vi khuẩn này đã tiến hoá để thích nghi cao với điều kiện pH thấp. Chủng LP3 có sức đề kháng với pH thấp nhất nhưng lại cho thấy sức đề kháng với muối mật cao nhất trong 5 chủng LAB được đem đánh giá. Kết quả của nghiên cứu

này tương đồng với một số nghiên cứu khác, cho thấy khả năng đề kháng cao với muối mật ở những chủng LAB không có nguồn gốc từ động vật (Liu và cs., 2022; Somashekaraiah và cs., 2019).



Hình 5. Sức đề kháng với acid (pH 3,0) và muối mật (0,3%) của các chủng LAB phân lập

Trong nghiên cứu của Somashekaraiah và cs. (2019), khả năng sống sót của các chủng LAB là $>50\%$ ở điều kiện pH 2,0 và muối mật 0,3%. Ở cùng điều kiện môi trường, hơn 30% số chủng trong nghiên cứu của Liu và cs. (2022) có tỷ lệ sống sót $>50\%$ sau 4 h ủ. Sức đề kháng với acid và muối mật của các chủng vi khuẩn lactic khác nhau thường khác nhau (Liu *et al.*, 2022). Nhìn chung, 5 chủng LAB phân lập được trong nghiên cứu này đều có tiềm năng thích nghi với điều kiện sống trong đường tiêu hóa của vật nuôi. Bên cạnh sức đề kháng với pH thấp và muối mật, khả năng đề kháng các enzyme tiêu hóa như pepsin, trypsin cũng là yếu tố quan trọng quyết định sự sống sót của lợi khuẩn khi ở trong đường tiêu hóa của vật chủ. Vì vậy, những nghiên cứu sâu hơn cần được tiến hành để đánh giá khả năng sống sót của các chủng LAB phân lập dưới tác động của các enzyme tiêu hoá.

3.4. Tính miễn cảm với kháng sinh

Tính miễn cảm với kháng sinh của 5 chủng LAB trong nghiên cứu này được xác định đối với 7 kháng sinh (ampicillin, kanamycin, gentamicin, clindamycin, erythromycin, tetracycline và chloramphenicol) (bảng 2). Kết quả cho thấy cả 5 chủng đều có khả năng kháng 5/7 kháng sinh kiểm tra. Tất cả (5/5) các chủng LAB phân lập đều kháng kanamycin, gentamicin và tetracycline. Tương tự, 4/5 chủng LAB kháng ampicillin trừ chủng PA. Tuy nhiên, chủng PA là chủng duy

nhất có khả năng kháng clindamycin. Kết quả cũng cho thấy 3/5 chủng gồm PP1, PP2, PA kháng chloramphenicol và 2/5 chủng (LP2, LP3) có khả năng kháng erythromycin. Nhìn chung, kiểu hình kháng có sự tương đồng giữa các chủng thuộc cùng một loài và có sự khác biệt giữa các loài khác nhau (bảng 2). Điều này có thể do sự đáp ứng, thích nghi với áp lực chọn lọc từ kháng sinh để hình thành cơ chế kháng ở mỗi loài là khác nhau.

Bảng 2. Kiểu hình kháng kháng sinh của các chủng LAB phân lập

Ký hiệu chủng	Kiểu hình kháng	Số kháng sinh kháng
PP1	Amp-Kan-Gen-Tet-Chl	5
PP2	Amp-Kan-Gen-Tet-Chl	5
PA	Kan-Gen-Cli-Tet-Chl	5
LP2	Amp-Kan-Gen-Ery-Tet	5
LP3	Amp-Kan-Gen-Ery-Tet	5

Ghi chú: Amp: ampicillin, Kan: Kanamycin, Gen: gentamicin, Cli: clindamycin, Ery: erythromycin, Tet: tetracycline, Chl: chloramphenicol

Tỷ lệ kháng ampicillin (4/5, 80%) cao trong nghiên cứu này có sự tương đồng với kết quả nghiên cứu của Somashekaraiah và cs. (2019), tuy nhiên lại trái ngược với kết quả của một vài nghiên cứu khác (Liu và cs., 2022; Stefańska và cs., 2021). Đối với kanamycin và gentamicin, phần lớn các loài *Lactobacillus* và *Pediococcus* được ghi nhận có khả năng kháng nội tại cao với cơ chế kháng liên quan đến tính thấm của màng tế bào đối với kháng sinh (Stefańska và cs., 2021). Ở vi khuẩn, tính kháng tetracycline thường được mã hóa bởi gen *tet* nằm trên yếu tố di động. Mặc dù vậy, không phải tất cả LAB kháng tetracycline đều mang gen này (Stefańska và cs., 2021). Vì vậy, tính kháng tetracycline của các chủng LAB cũng được coi là kháng nội tại, tuy nhiên, cơ chế liên quan đến khả năng kháng tetracycline nội tại ở các loài vi khuẩn gram dương bao gồm LAB vẫn chưa được làm rõ (Stefańska và cs., 2021). Khả năng kháng chloramphenicol, erythromycin và clindamycin của LAB trong nghiên cứu này dao động tùy thuộc từng chủng. Nhiều nghiên cứu trước đây cho thấy vi khuẩn lactic có tính miễn cảm

cao với các kháng sinh này (Liu và cs., 2022; Somashekaraiah và cs., 2019). Khả năng kháng kháng sinh nói chung là đặc trưng cho từng loài và vị trí địa lý là một trong những yếu tố quyết định kiểu hình kháng kháng sinh của LAB (Reuben và cs., 2020). Khả năng kháng kháng sinh của lợi khuẩn đem lại lợi ích trong cả phòng bệnh và điều trị khi được sử dụng cùng với kháng sinh vì quá trình khôi phục hệ vi sinh vật đường ruột trở nên dễ dàng hơn (Reuben và cs., 2020). Tuy nhiên, các gen kháng kháng sinh nằm trên yếu tố di động có thể lan truyền từ lợi khuẩn đến các vi khuẩn gây bệnh (Liu và cs., 2022). Vì vậy, kiểu gen và khả năng truyền gen của các chủng lợi khuẩn đến các loài vi khuẩn khác cần được nghiên cứu sâu hơn.

3.5. Khả năng đối kháng với vi khuẩn *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. aureus*, *C. perfringens*

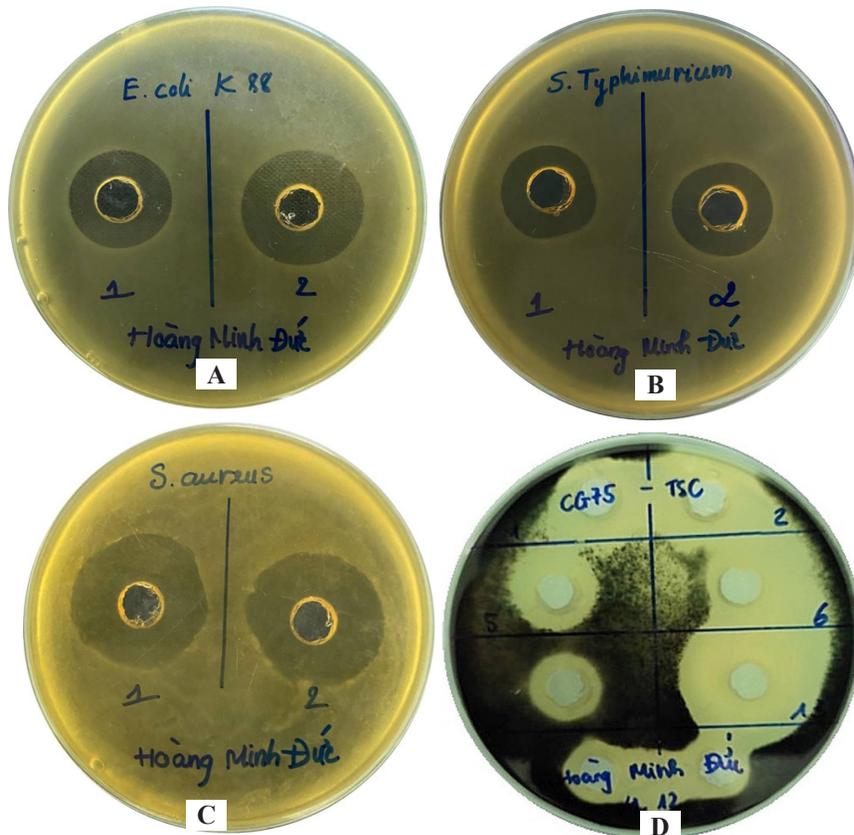
Kết quả kiểm tra tính đối kháng của 5 chủng LAB phân lập với 4 vi khuẩn gây bệnh được thể hiện trong bảng 3 và hình 6.

Sau 18h ủ, dịch nổi CFS của cả 5 chủng LAB đều cho thấy khả năng đối kháng với 4 vi khuẩn chỉ định và hoạt tính kháng khuẩn của CFS mạnh hơn đáng kể so với của nCFS. Tính đối kháng của các chủng LAB với các mầm bệnh không có sự khác biệt lớn, ngoại trừ vòng vô khuẩn tạo ra bởi mẫu CFS của các chủng PP1, PP2 và PA với *E. coli* K88 có đường kính lớn hơn so với của của các chủng LP2 và LP3. Đáng chú ý, nCFS của tất cả 5 chủng LAB đều không tạo vòng vô khuẩn với vi khuẩn *E. coli* K88 và *S. typhimurium* mặc dù vậy chúng vẫn biểu hiện hoạt tính kháng khuẩn yếu với vi khuẩn *S. aureus* và *C. perfringens*. Nhìn chung, các chủng LAB phân lập có tính đối kháng với các chủng vi khuẩn *S. aureus* và *C. perfringens* mạnh hơn so với các chủng vi khuẩn *E. coli* K88 và *S. typhimurium*, kết quả này phù hợp với mô tả của Monteiro và cs. (2019). Nguyên nhân có thể do các hợp chất có trong CFS và nCFS (acid hữu cơ, bacteriocin...) có thể dễ dàng tác tiếp cận các receptor có mặt ở thành tế bào vi khuẩn gram dương hơn vi khuẩn gram âm bởi vi khuẩn gram âm còn có thêm lớp màng ngoài bao phủ.

Bảng 3. Hoạt tính kháng khuẩn của các chủng LAB phân lập

Chủng		<i>S. typhimurium</i>	<i>E. coli</i> K88	<i>S. aureus</i>	<i>C. perfringens</i>
PP1	CFS	++	++	+++	+++
	nCFS	-	-	+	+
PP2	CFS	++	++	+++	+++
	nCFS	-	-	+	+
PA	CFS	++	++	+++	+++
	nCFS	-	-	-	-
LP2	CFS	++	+	+++	+++
	nCFS	-	-	+	+
LP3	CFS	++	+	+++	+++
	nCFS	-	-	+	+

Ghi chú: -: không có vòng vô khuẩn, +: đường kính vòng vô khuẩn 6-10 mm, ++: 11-16 mm, +++: >16mm



Hình 6. Kết quả thử tính đối kháng của các chủng LAB phân lập với vi khuẩn *E. coli* (A), *Salmonella* (B), *S. aureus* (C), *C. perfringens* (D)

Vi khuẩn LAB đối kháng với vi khuẩn gây bệnh theo nhiều cơ chế khác nhau, bao gồm cạnh tranh chất dinh dưỡng và vị trí cư trú, sản sinh các

hợp chất kháng khuẩn và tăng cường hệ miễn dịch của vật chủ (Milner và cs., 2021). Trong nghiên cứu này, dịch nổi không chứa tế bào vi khuẩn được

sử dụng để đánh giá tính đối kháng của các chủng vi khuẩn lactic thông qua hoạt tính của các hợp chất được sản xuất trong quá trình phát triển. Vì vậy, cơ chế cạnh tranh chất dinh dưỡng với mầm bệnh đã được loại trừ. Dịch nổi CFS và CFS đã được trung hòa (nCFS) được sử dụng làm mẫu kiểm tra nhằm mục đích đánh giá hoạt tính của các acid hữu cơ và các hợp chất khác không phải acid (bacteriocin). Sau khi trung hòa, dịch nổi của các chủng LAB đều bị giảm đáng kể hoạt tính, chứng minh vai trò quan trọng của các acid hữu cơ trong việc đối kháng với mầm bệnh.

Các chủng vi khuẩn gây bệnh sử dụng trong nghiên cứu này (*E. coli* K88, *S. typhimurium*, *S. aureus* và *C. perfringens*) đều là mầm bệnh phổ biến và quan trọng trên vật nuôi và có khả năng truyền lây sang người. Hiện nay, kháng sinh đang là phương pháp chính để điều trị bệnh gây ra bởi các mầm bệnh này. Tuy nhiên, khả năng đa kháng ở những vi khuẩn này đang làm thu hẹp lựa chọn phác đồ điều trị bệnh trên người và động vật. Vì vậy, khả năng đối kháng của lợi khuẩn với vi khuẩn gây bệnh có khả năng kháng kháng sinh là rất quan trọng. Bên cạnh khả năng đối kháng với vi khuẩn gây bệnh, nhiều nghiên cứu đã chỉ ra tác dụng đối kháng của LAB với những mầm bệnh khác. Cụ thể, các chủng LAB đã được chứng minh là có khả năng ức chế nấm mốc trong quá trình bảo quản thực phẩm (Somashekaraiah và cs., 2019). Ngoài ra, LAB còn có tác động lên virus thông qua các cơ chế tương tự như cơ chế đối kháng vi khuẩn gây bệnh (Al Kassaa và cs., 2014). Như vậy, khi so sánh với kháng sinh, lợi khuẩn có hoạt phổ kháng mầm bệnh rộng hơn trong một số trường hợp cụ thể.

IV. KẾT LUẬN

Tổng cộng 100 chủng LAB đã được phân lập và giữ giống từ các mẫu dưa muối và cà muối. Năm chủng thuộc các loài *Pediococcus pentosaceus* (2 chủng), *Pediococcus acidilactici* (1 chủng) và *Lactobacillus plantarum* (2 chủng) được lựa chọn để tiến hành xác định một số đặc tính probiotic đều không có khả năng gây dung huyết. Bên cạnh đó, 5 chủng LAB này cũng có khả năng đề kháng cao với acid và muối mật. Kết quả kiểm tra tính miễn cảm với kháng sinh và đối kháng với vi khuẩn gây bệnh cho thấy chúng có

khả năng kháng 5/7 kháng sinh thử nghiệm và đối kháng mạnh với vi khuẩn *S. typhimurium*, *E. coli* K88, *S. aureus* và *C. perfringens*. Tuy nhiên cần nghiên cứu đánh giá thêm trên vật nuôi để có thể ứng dụng trong sản xuất chế phẩm sinh học thay thế kháng sinh trong tương lai.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Al Kassaa, I., Hober, D., Hamze, M., Chihib, N. E., & Drider, D., 2014. Antiviral potential of lactic acid bacteria and their bacteriocins. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 6, 177–185.
2. Aswathy, R. G., Ismail, B., John, R. P., & Nampoothiri, K. M., 2008. Evaluation of the probiotic characteristics of newly isolated lactic acid bacteria. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 151, 244–255.
3. Bacanlı, M., & Başaran, N., 2019. Importance of antibiotic residues in animal food. *Food and Chemical Toxicology*, 125, 462–466.
4. Casarotti, S. N., Carneiro, B. M., Todorov, S. D., Nero, L. A., Rahal, P., & Penna, A. L. B., 2017. In vitro assessment of safety and probiotic potential characteristics of *Lactobacillus* strains isolated from water buffalo mozzarella cheese. *Annals of Microbiology*, 67(4). <https://doi.org/10.1007/s13213-017-1258-2>
5. CDC, 2013. Antibiotic resistance threats in the United States. In *Atlanta, GA*.
6. Chattopadhyay, M. K., 2014. Use of antibiotics as feed additives: a burning question. In *Frontiers in microbiology* (Vol. 5, p. 334). Frontiers Media SA.
7. Dewi, G., & Kollanoor Johny, A., 2022. *Lactobacillus* in food animal production—A forerunner for clean label prospects in animal-derived products. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 6, 831195.
8. EFSA FEEDAP Panel, Rychen, G., Aquilina, G., Azimonti, G., Bampidis, V., Bastos, M. de L., Bories, G., Chesson, A., Cocconcelli, P. S., Flachowsky, G., Gropp, J., Kolar, B., Kouba, M., López-Alonso, M., López Puente, S., Mantovani, A., Mayo, B., Ramos, F., Saarela, M., ... Galobart, J., 2018. Guidance on the characterisation of

- microorganisms used as feed additives or as production organisms. *EFSA Journal*, 16(3). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5206>
9. FAO/WHO, 2002. Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization. Joint FAO/WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. *FAO FOOD and Nutrition Paper*.
 10. Gupta, S., Mohanty, U., & Majumdar, R. K., 2021. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from traditional fermented fish product Shidal of India with reference to their probiotic potential. *Lwt*, 146, 111641.
 11. Halder, D., Mandal, M., Chatterjee, S. S., Pal, N. K., & Mandal, S., 2017. Indigenous probiotic *Lactobacillus* isolates presenting antibiotic like activity against human pathogenic bacteria. *Biomedicines*, 5(2), 31.
 12. Huligere, S. S., Chandana Kumari, V. B., Alqadi, T., Kumar, S., Cull, C. A., Amachawadi, R. G., & Ramu, R., 2023. Isolation and characterization of lactic acid bacteria with potential probiotic activity and further investigation of their activity by α -amylase and α -glucosidase inhibitions of fermented batters. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1042263.
 13. Liu, C., Xue, W. J., Ding, H., An, C., Ma, S. J., & Liu, Y., 2022. Probiotic Potential of *Lactobacillus* Strains Isolated From Fermented Vegetables in Shaanxi, China. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.774903>
 14. Mehdi, Y., Létourneau-Montminy, M.-P., Gaucher, M.-L., Chorfi, Y., Suresh, G., Rouissi, T., Brar, S. K., Côté, C., Ramirez, A. A., & Godbout, S., 2018. Use of antibiotics in broiler production: Global impacts and alternatives. *Animal Nutrition*, 4(2), 170–178.
 15. Milner, E., Stevens, B., An, M., Lam, V., Ainsworth, M., Dihle, P., Stearns, J., Dombrowski, A., Rego, D., & Segars, K., 2021. Utilizing probiotics for the prevention and treatment of gastrointestinal diseases. *Frontiers in Microbiology*, 12, 689958.
 16. Mohammed, A. A., Zaki, R. S., Negm, E. A., Mahmoud, M. A., & Cheng, H. W., 2021. Effects of dietary supplementation of a probiotic (*Bacillus subtilis*) on bone mass and meat quality of broiler chickens. *Poultry Science*, 100(3), 100906.
 17. Monteiro, C. R. A. V, do Carmo, M. S., Melo, B. O., Alves, M. S., Dos Santos, C. I., Monteiro, S. G., Bomfim, M. R. Q., Fernandes, E. S., & Monteiro-Neto, V., 2019. In vitro antimicrobial activity and probiotic potential of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* against species of *Clostridium*. *Nutrients*, 11(2), 448.
 18. Panel, E. B., 2021. Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 13: suitability of taxonomic units notified to EFSA until september 2020. *EFSA Journal*, 19(1), e06377.
 19. Reuben, R. C., Roy, P. C., Sarkar, S. L., Alam, A. S. M. R. U., & Jahid, I. K., 2020. Characterization and evaluation of lactic acid bacteria from indigenous raw milk for potential probiotic properties. *Journal of Dairy Science*, 103(2), 1223–1237.
 20. Somashekaraiah, R., Shruthi, B., Deepthi, B. V., & Sreenivasa, M. Y., 2019. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from neera: a naturally fermenting coconut palm nectar. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1382.
 21. Stefańska, I., Kwiecień, E., Józwiak-Piasecka, K., Garbowska, M., Binek, M., & Rzewuska, M., 2021. Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria strains of potential use as feed additives—the basic safety and usefulness criterion. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 687071.
 22. Todorov, S. D., Dioso, C. M., Liong, M.-T., Nero, L. A., Khosravi-Darani, K., & Ivanova, I. V., 2023. Beneficial features of pediococcus: from starter cultures and inhibitory activities to probiotic benefits. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(1), 4.

Ngày nhận 8-1-2024

Ngày phản biện: 11-1-2024

Ngày đăng: 1-7-2024