

# PHÂN LẬP, ĐỊNH DANH VÀ KHẢO SÁT MỘT SỐ TÍNH CHẤT CÓ LỢI CỦA CÁC CHỦNG VI KHUẨN LACTIC TỪ SỮA MẸ VÀ RAU, QUẢ LÊN MEN

Nguyễn Thị Phương Trang<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Hồng Chuyên<sup>2</sup>, Lê Thị Thùy Nhi<sup>2</sup>, Phan Mỹ Hạnh<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Khoa Sinh học - Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

<sup>2</sup>Phòng Công nghệ Vi sinh, Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh

## TÓM TẮT

Vi khuẩn lactic (Lactic acid bacteria - LAB) là nhóm vi khuẩn Gram dương, thường là lợi khuẩn, phổ biến trong đường tiêu hóa ở người và động vật. Chúng có khả năng chuyển hóa các hợp chất carbohydrate thành axit lactic giúp ức chế vi khuẩn gây hại, tăng cường hệ miễn dịch và cân bằng hệ vi sinh đường ruột. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm tuyển chọn các chủng vi khuẩn lactic từ sữa mẹ và sản phẩm lên men từ rau quả có tiềm năng ức chế 5 chủng vi khuẩn gây bệnh chi thị phổ biến, gây ra các bệnh nhiễm trùng ở đường tiêu hóa, hô hấp, da và máu (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* và *Streptococcus spp.*), đáp ứng nhu cầu cấp thiết trong việc kiểm soát các bệnh truyền nhiễm và vấn đề kháng với kháng sinh ngày càng nghiêm trọng, với 4 loại kháng sinh phổ biến (Cefotaxime (Ct), Cefoxitin (Cn), Ciprofloxacin (Ci) và Penicillin (Pn)). Nghiên cứu cũng đánh giá khả năng chịu muối mật của các chủng tuyển chọn ở các nồng độ 0.3%, 0.5%, 0.7%, 1%. Kết quả phân lập được 21 chủng vi khuẩn từ 3 mẫu sữa mẹ và 2 mẫu rau quả lên men, trong đó 7 chủng vi khuẩn có đặc điểm hình thái và khả năng sinh hóa của nhóm vi khuẩn LAB. Thực hiện định danh sinh học phân tử, giải trình tự 16S rRNA, 7 chủng vi khuẩn axit lactic được xác định là MM1.2.1 (*Lactobacillus paracasei*), MM2.2 (*Limosilactobacillus fermentum*), MM2.3 (*Lactobacillus salivarius*), MM3.2 (*Enterococcus faecalis*), BC2 (*Limosilactobacillus fermentum*), DL2 (*Lactobacillus citreum*) và DL4 (*Weissella cibaria*). Nghiên cứu ghi nhận cả 7 chủng LAB đều có khả năng ức chế 5 chủng vi khuẩn chi thị, hiệu quả ức chế được theo dõi liên tục trong 5 ngày. Trong đó chủng vi khuẩn *Limosilactobacillus fermentum* MM2.2 có đường kính vùng ức chế lớn nhất, có ý nghĩa khác biệt thống kê với các chủng khác và duy trì hiệu quả ổn định theo thời gian. Kết quả đánh giá mức độ nhạy cảm của 7 chủng LAB đối với 4 loại kháng sinh cho thấy mức độ nhạy cảm chủ yếu ở kháng sinh Cefotaxime (Ct) và Penicillin (Pn). Cả 7 chủng đều có khả năng sinh enzyme bile salt hydrolysis (BSH) ở nồng độ muối mật 1%.

**Từ khóa:** Kháng khuẩn, kháng kháng sinh, lên men rau củ, muối mật, sữa mẹ, vi khuẩn sinh axit lactic.

## MỞ ĐẦU

Vi khuẩn lactic (Lactic acid bacteria – LAB) không sinh bào tử, có hình cầu hoặc hình que, gram dương, catalase âm tính, oxydase âm tính và có khả năng chuyển hóa axit lactic. Nhóm vi khuẩn này thường có trong sữa mẹ và trong đường tiêu hóa ở người và động vật. Ngoài ra, chúng cũng có thể được tìm thấy trong các sản phẩm lên men tự nhiên từ rau quả. Mật độ vi khuẩn sống có trong sữa mẹ theo các nghiên cứu khoa học từ khoảng  $10^2$ – $10^5$  CFU/ml, chiếm ưu thế bởi các loài *Lactobacillus* và *Bifidobacterium*. Trong đó, các chủng *Limosilactobacillus fermentum* và *Lactobacillus salivarius* được đánh giá là có khả năng kháng khuẩn và tiềm năng probiotic (Perez-Cano *et al.*, 2010). Trong quá trình sinh trưởng, vi khuẩn LAB sử dụng đường glucose, lactose, sản sinh axit lactic, làm pH giảm dưới pH 4.0, làm ức chế sự phát triển của nhiều vi khuẩn khác, từ đó ngăn ngừa sự phát triển của chúng. Bên cạnh đó, LAB còn sản sinh ra các hợp chất hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), diacetyl, acetaldehyde, các đồng phân D của amino acid, reuterin và bacteriocin có khả năng ức chế vi sinh vật gây hại theo các cơ chế khác nhau giúp đẩy lùi sự phát triển của các tác nhân gây bệnh (Smita *et al.*, 2014).

Hiện tượng kháng với kháng sinh (Antimicrobial resistance - AMR) đang trở thành một trong những mối đe dọa lớn nhất đối với sức khỏe toàn cầu. Nghiên cứu của Murray và đồng tác giả (2022) cho thấy trong năm 2019, AMR đã gây ra 4,95 triệu ca tử vong, trong đó 1,27 triệu ca tử vong trực tiếp do kháng kháng sinh của vi khuẩn. Các vi khuẩn như *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, và *Pseudomonas aeruginosa* đã được phát hiện có khả năng kháng lại nhiều loại kháng sinh quan trọng, làm giảm hiệu quả điều trị và tăng nguy cơ tử vong (Murray *et al.*, 2022). Điều này đòi hỏi sự phát triển của các phương pháp điều trị mới và hiệu quả hơn để khắc phục hiện tượng này. Việc nghiên cứu và ứng dụng các dòng vi khuẩn lactic có thể mở ra hướng đi mới trong việc kiểm soát các bệnh nhiễm khuẩn, đồng thời giảm sự phụ thuộc vào các loại thuốc kháng sinh. Điều này không chỉ có ý nghĩa trong y học mà còn góp phần bảo vệ sức khỏe cộng đồng trước nguy cơ lan rộng của hiện tượng kháng kháng sinh.

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Nguyên liệu

Mẫu sữa mẹ được thu thập tại ngân hàng sữa mẹ, bệnh viện Từ Dũ, thành phố Hồ Chí Minh từ 5 người mẹ tình nguyện độ tuổi từ 25 đến 35 tuổi, có tình trạng sức khỏe tốt, theo khảo sát sức khỏe không sử dụng kháng sinh trong vòng 3 tháng và không có bất kỳ bệnh lý nào được chẩn đoán.

Mẫu dịch lên men rau, quả gồm bắp cải và dưa leo được mua từ chợ đầu mối nông sản Hóc Môn, Tp. Hồ Chí Minh.

Các chủng vi khuẩn chỉ thị được dùng trong thử nghiệm: *Escherichia coli*, (ATCC 25922) *Staphylococcus aureus*, (ATCC 25923) *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10231), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028TM) và *Streptococcus sp.*, được lưu trữ trong bộ sưu tập giống vi sinh vật HBCM (HCMbiotech collection microorganisms) từ Phòng Công nghệ Vi sinh và Phòng Công nghệ sinh học Y Dược thuộc Trung tâm Công nghệ Sinh học, TP. Hồ Chí Minh.

### Hóa chất và thiết bị

Các môi trường vi sinh tổng hợp như MRS (De Man, Rogosa và Sharpe), TSB (Tryptone Soya Broth), TSA (Tryptone Soya Agar) từ các hãng Bio Basic và Himedia. Đĩa giấy tẩm kháng sinh từ Công ty Nam Khoa Việt Nam. Hóa chất sử dụng trong kiểm tra sinh hóa: KOH 3%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%, bộ kit nhuộm gram (Gram Stain-Kit, Himedia, India), Bile Salt từ hãng Bio Basic. Hóa chất sử dụng trong định danh sinh học phân tử: hoá chất tách chiết, điện di, tinh sạch DNA và giải trình tự từ hãng Thermo scientific, Bio Basic, Merck.

Các thiết bị và dụng cụ sử dụng trong nghiên cứu được cung cấp từ các hãng Himedia, Merck, Carl Zeiss, Mettler toledo, Memmert, Thermo scientific.

### Phương pháp

#### Phân lập các chủng vi khuẩn nghi ngờ là LAB

Quá trình thu nhận sữa mẹ được thực hiện trực tiếp, cẩn thận để hạn chế nguy cơ nhiễm bẩn theo tiêu chuẩn của bệnh viện Từ Dũ. Mẫu sữa được chứa trong các ống falcon đã được vô trùng và vận chuyển đến Phòng công nghệ Vi sinh trong vòng 24 giờ ở nhiệt độ 4°C. Các mẫu sữa mẹ được ủ trong điều kiện yếm khí trong môi trường MRS lỏng, ở 37°C trong 48 giờ (Yavuzdurmaz, 2007).

Rau củ gồm bắp cải, dưa leo được rửa sạch, cắt nhỏ cho vào các lọ thủy tinh sạch bổ sung 3% NaCl, ủ 37°C, duy trì yếm khí trong 48 giờ.

Quá trình phân lập các chủng vi khuẩn nghi ngờ LAB được tiến hành bằng cách pha loãng thập phân dịch tăng sinh bằng nước muối sinh lý vô trùng 0,85%, hút 0,1ml ở mỗi nồng độ pha loãng trải lên đĩa thạch MRS có bổ sung 0,5% CaCO<sub>3</sub>, ủ ở 37°C và sàng lọc các khuẩn lạc đơn mục tiêu sau 48 giờ. Các đặc điểm hình thái đặc trưng của nhóm vi khuẩn sinh axit lactic như khuẩn lạc màu trắng đục, có tâm hay không có tâm, kích thước (từ 2-5 mm), dạng lồi, có mùi chua hoặc mùi sữa chua đặc trưng được quan sát bằng kính hiển vi soi nổi (Carl Zeiss – Đức) với độ phóng đại 8X.

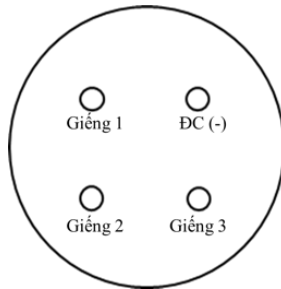
Thực hiện định danh sơ bộ nhóm vi khuẩn LAB mục tiêu bằng các thử nghiệm sinh hóa nhằm loại các chủng nấm men, vi khuẩn axit acetic như: khảo sát khả năng tạo vòng tan trên môi trường thạch MRS có bổ sung 0,5% CaCO<sub>3</sub>, nhuộm Gram, thử nghiệm enzyme catalase sử dụng thuốc thử hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30%, thử nghiệm oxydase để kiểm tra sự hiện diện của cytochrom oxydase sử dụng thuốc thử tetra-metyl-p-phenylenediamine dihydrochlorid (TMPD), khả năng di động được kiểm tra bằng cách quan sát vi khuẩn trong môi trường MRS lỏng dưới kính hiển vi quang học. Tiến hành ghi nhận các chủng nghi ngờ là LAB khi có kết quả là gram dương, tạo vòng tan, không có khả năng tổng hợp enzym catalase, không có sự hiện diện của cytochrom oxydase và không có khả năng di động để tiếp tục định danh bằng phương pháp giải trình tự DNA.

#### Định danh bằng phương pháp giải trình tự DNA

DNA vi khuẩn được tách chiết bằng quy trình của Phòng công nghệ Vi sinh. Phản ứng khuếch đại PCR sử dụng hai đoạn mồi 20F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1500R (5'-GTTACCTGTTACGACTT-3') để khuếch đại đoạn trình tự 16s rRNA. Phản ứng PCR bao gồm gia nhiệt ban đầu ở 94°C trong 10 phút, tiếp theo là 40 chu kỳ gồm biến tính ở 94°C, ủ ở 56°C và kéo dài ở 72°C, mỗi bước kéo dài trong 60 giây. Bước cuối cùng là gia nhiệt ở 72°C trong 10 phút để hoàn tất quá trình PCR. Sản phẩm PCR sau đó được giữ ở 4°C để ổn định và bảo quản (Dubernet *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2016). Điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1%, sử dụng thang Generuler DNA ladder mix (ThermoScientific). DNA được tinh sạch và giải trình tự bằng máy giải trình tự gene 3500 Genetic. Trình tự DNA được xử lý, BLAST trên cơ sở dữ liệu NCBI để xác định loài. Cây phát sinh loài được vẽ thể hiện mối quan hệ loài của 7 chủng tuyển chọn theo phương pháp Neighbor-Joining, bootstrap 1000, sử dụng phần mềm MEGA11 (Tamura *et al.*, 2021).

**Khả năng kháng khuẩn theo thời gian**

Khả năng kháng khuẩn của các chủng LAB tuyển chọn được đánh giá theo thời gian dựa trên phương pháp khuếch tán giếng thạch. Dịch nuôi cấy các chủng LAB ở 35°C trong 48 giờ được cho vào 3 giếng thạch đã tạo trên môi trường MRS chứa lần lượt các chủng gây bệnh chỉ thị *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* và *Streptococcus spp* ở mật độ 10<sup>8</sup> CFU/mL theo phương pháp so màu Mc-farland. Đối chứng âm là giếng thạch có môi trường MRS không chứa vi khuẩn (Hình 1), ủ ở 35°C trong 48 giờ. Thí nghiệm được lặp lại 5 lần ở 1 chủng LAB tương ứng với 1 chủng chỉ thị. Mức độ kháng hoặc ức chế khuẩn được xác định bằng vòng vô khuẩn xuất hiện xung quanh giếng thạch (Đoàn Thị Tuyết Lê, Đỗ Minh Anh, 2019). Đường kính vòng ức chế xung quanh miệng giếng thạch được tính theo công thức:  $\Delta D = D - d$ . Trong đó,  $\Delta D$  là đường kính vùng vô khuẩn (mm); D là đường kính vòng ức chế (mm) và d là đường kính miệng giếng (d = 8 mm).



Hình 1. Bố trí thí nghiệm kháng khuẩn trên đĩa petri

**Định tính khả năng chịu muối mật**

Muối mật là các muối của axit mật, chủ yếu bao gồm các muối natri và kali của axit cholic và axit chenodeoxycholic, có vai trò quan trọng trong quá trình tiêu hóa và hấp thụ chất béo. Các chủng LAB có tiềm năng ứng dụng trong probiotic có khả năng chịu muối mật trong đường tiêu hóa của vật chủ nhờ hoạt động của enzyme bile salt hydrolysis (BSH) (EC3.5.1.24). Nồng độ muối mật trung bình trong ruột non là 0,3% w/v. Khả năng chịu được nồng độ muối mật cao giúp các chủng LAB tồn tại lâu trong đường ruột (Foley, et al., 2019). Các chủng LAB tuyển chọn được tăng sinh trong môi trường MRS sau 48 giờ ở 30°C, ly tâm thu sinh khối, huyền phù trong PBS (Phosphate buffered saline) sau đó nhỏ dịch lên môi trường MRS thạch chứa muối mật ở các nồng độ 0.3%, 0.5%, 0.7% và 1%. Kết quả dương tính khi xuất hiện vòng kết tủa axit mật (vòng sáng mờ đục) xung quanh sinh khối khuẩn lạc LAB.

**Mức độ nhạy cảm kháng sinh**

Thí nghiệm thực hiện dựa trên phương pháp khuếch tán đĩa do NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) đề xuất, nhằm đánh giá tác động 4 loại kháng sinh khác nhau, bao gồm Cefotaxime (30ug), Cefoxitin (30ug), Ciprofloxacin (5ug) và Penicillin (10UI) lên các chủng LAB tuyển chọn. Dịch tăng sinh các chủng LAB trong môi trường MRS lỏng sau 48 giờ ở 30°C được trải 0,1 ml lên đĩa thạch MRS. Đặt các đĩa giấy đã được tẩm kháng sinh lên đĩa thạch có chủng LAB trong điều kiện vô trùng, ủ 30°C trong 48 giờ. Sau thời gian ủ, đường kính vùng ức chế sinh trưởng được đo và so sánh với các giá trị tiêu chuẩn để ghi nhận mức độ nhạy cảm kháng sinh của vi khuẩn LAB.

**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**Phân lập các chủng nghi ngờ là LAB**

Từ 3 mẫu sữa mẹ và 2 mẫu lên men rau củ, sàng lọc thu được 21 chủng vi sinh vật có khả năng tạo vòng tan trên môi trường thạch MRS có bổ sung 0,5% CaCO<sub>3</sub>. Đặc điểm hình thái của các chủng thuần được đánh giá bằng kính hiển vi soi nổi và so sánh với các đặc điểm hình thái phổ biến của nhóm vi khuẩn sinh lactic. Kết quả ghi nhận 12 chủng có mô tả hình thái khuẩn lạc đặc trưng trên môi trường MRS của nhóm vi khuẩn LAB.

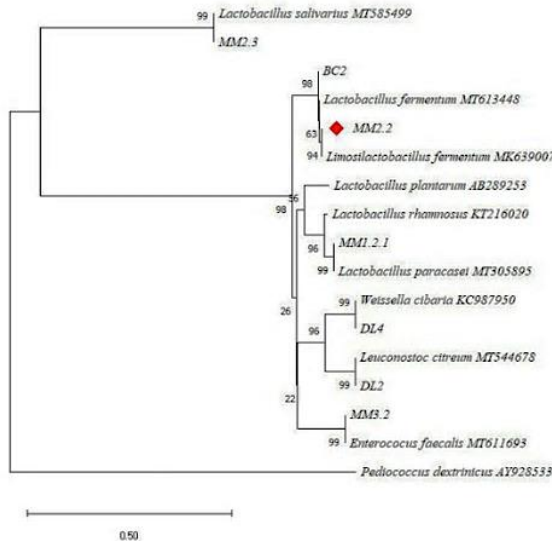
Kết hợp kết quả khảo sát định danh sinh hóa về gram, thử nghiệm phản ứng catalase, oxydase, khả năng di động được thể hiện ở (Bảng 1), có 7 chủng gồm: MM1.2.1, MM2.2, MM2.3, MM3.2, BC2, DL2 và DL4 đáp ứng các đặc trưng sinh hóa của nhóm vi khuẩn LAB như vi khuẩn gram dương, phản ứng catalase âm tính, oxydase âm tính và không có khả năng di động.

Bảng 1. Kết quả sinh hóa 12 chủng sàng lọc

Chủng	Gram	Catalase	Oxydase	Khả năng di động
MM1.1	-	-	-	-
MM1.2.1	+	-	-	-
MM1.3	+	+	-	-
MM1.4	-	-	-	-
MM2.2	+	-	-	-
MM2.3	+	-	-	-
MM3.1	-	-	-	-
MM3.2	+	-	-	-
BC1	+	+	+	-
BC2	+	-	-	-
DL2	+	-	-	-
DL4	+	-	-	-

**Định danh bằng phương pháp giải trình tự DNA**

Kết quả BLAST trên cơ sở dữ liệu NCBI trình tự đoạn gene 16S rDNA của 7 chủng cho kết quả các chủng với ký hiệu và tên khoa học lần lượt là MM1.2.1 (*Lactobacillus paracasei*), MM2.2 (*Limosilactobacillus fermentum*), MM2.3 (*Lactobacillus salivarius*), MM3.2 (*Enterococcus faecalis*), BC2 (*Limosilactobacillus fermentum*), DL2 (*Lactobacillus citreum*) và DL4 (*Weissella cibaria*). Cây phát sinh loài thể hiện mối quan hệ giữa 7 chủng LAB tuyển chọn được thể hiện ở hình 2.



Hình 2. Cây phát sinh loài của 7 chủng LAB

**Khả năng kháng khuẩn**

**Bảng 2. Kết quả đường kính vùng ức chế của 7 chủng LAB đối với E. coli**

Các chủng LAB	Loại kháng sinh				
	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4	Ngày 5
MM1.2.1 - <i>L. paracasei</i>	+++	+++	+++	+++	+++
MM2.2 - <i>L. fermentum</i>	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
MM2.3 - <i>L. salivarius</i>	+++	+++	+++	+++	+++
MM3.2 - <i>E. faecalis</i>	++++	+++	+++	+++	+++
BC2 - <i>L. fermentum</i>	+++++	++++	++++	++++	++++
DL2 - <i>L. citreum</i>	++	++	++	++	++
DL4 - <i>W. cibaria</i>	+++	+++	++	++	++

Ghi chú: “-”: 0, “+”: 1-5 mm, “++”: 5-10mm, “+++”: 10-15mm, “++++”: 15-20mm, “+++++”: 20-25mm, “++++++”: 25-30 mm.

Cả 7 chủng LAB tuyển chọn đều có khả năng ức chế 5 chủng gây bệnh chỉ thị hoặc làm giảm sự phát triển của chúng khi vùng vô khuẩn bắt đầu xuất hiện khuẩn lạc của chủng chỉ thị sau các mốc thời gian ghi nhận. Trong đó chủng lactic MM2.2 có hiệu quả kháng khuẩn cao nhất đối với 5 chủng chỉ thị sau 1 – 2 ngày, sau đó duy trì ổn định sau 5 ngày khảo sát. Cụ thể, đối với *E.coli* (Bảng 2), chủng MM2.2 có hiệu quả kháng khuẩn tốt nhất, duy trì sau 5 ngày (từ 21,9 – 22,1 mm), 5 chủng LAB còn lại cho kết quả kháng khuẩn trung bình lần lượt từ 8,2 – 18,4 mm. sau 1 – 2 ngày, sau đó giảm dần ở mỗi chủng trong 3 ngày tiếp theo (từ 7,3 – 13,3 mm).

**Bảng 3. Kết quả đường kính vùng ức chế của 7 chủng LAB đối với P. aeruginosa**

Các chủng LAB	Loại kháng sinh				
	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4	Ngày 5
MM1.2.1 - <i>L. paracasei</i>	+	+	+	+	+
MM2.2 - <i>L. fermentum</i>	++	++	++	++	++
MM2.3 - <i>L. salivarius</i>	+	+	+	+	+

HỘI NGHỊ KHOA HỌC TOÀN QUỐC VỀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC 2024

MM3.2 - <i>E. faecalis</i>	+	+	+	+	+
BC2 - <i>L. fermentum</i>	++	+	+	+	+
DL2 - <i>L. citreum</i>	+	+	+	+	+
DL4 - <i>W. cibaria</i>	+	+	+	+	+

Ghi chú: “-”: 0, “+”: 1-5 mm, “++”: 5-10mm, “+++”: 10-15mm, “++++”: 15-20mm, “+++++”: 20-25mm, “++++++”: 25-30 mm.

Tương tự, 5 chủng MM2.2, BC2, DL4, DL2, MM2.3 cho khả năng kháng *P. aeruginosa* sau 24 giờ, sau đó giảm trong 4 ngày còn lại, cao nhất là chủng MM2.2 lần lượt 7,4 mm và 6,2 mm ở ngày thứ 1 và ngày thứ 5; 2 chủng MM1.2.1 và MM3.2 có khả năng ức chế chủng chỉ thị kéo dài 48 giờ, sau đó giảm dần (Bảng 3).

**Bảng 4. Kết quả đường kính vùng ức chế của 7 chủng LAB đối với *S.typhimurium***

Các chủng LAB	Loại kháng sinh				
	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4	Ngày 5
MM1.2.1 - <i>L. paracasei</i>	-	+++	++++	+++	+++
MM2.2 - <i>L. fermentum</i>	-	++++	+++++	+++++	+++++
MM2.3 - <i>L. salivarius</i>	-	++++	++++	+++	+++
MM3.2 - <i>E. faecalis</i>	-	++++	++++	++++	++++
BC2 - <i>L. fermentum</i>	-	++++	++++	++++	++++
DL2 - <i>L. citreum</i>	-	+++	+++	+++	++
DL4 - <i>W. cibaria</i>	-	++	++	++	++

Ghi chú: “-”: 0, “+”: 1-5 mm, “++”: 5-10 mm, “+++”: 10-15mm, “++++”: 15-20 mm, “+++++”: 20-25 mm, “++++++”: 25-30 mm.

Kết quả đo đường kính vùng ức chế giữa 7 chủng LAB đối với vi khuẩn *S.typhimurium* có thể ghi nhận sau 2 ngày và có sự khác biệt (Bảng 4), trong đó, chủng MM2.2 có hiệu quả ức chế cao nhất, tăng dần từ ngày thứ 2 (23,5 mm) đến ngày thứ 4 (27,1 mm) nhất, sau đó giảm ở ngày thứ 5 (20,9 mm); 6 chủng LAB còn lại xuất hiện vùng ức chế sau 2 ngày, sau đó giảm nhẹ, trừ chủng MM1.2.1, có khả năng ức chế tăng dần trong 3 ngày đầu (13,4 – 17 mm).

**Bảng 5. Kết quả đường kính vùng ức chế của 7 chủng LAB đối với *S. aureus***

Các chủng LAB	Loại kháng sinh				
	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4	Ngày 5
MM1.2.1 - <i>L. paracasei</i>	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
MM2.2 - <i>L. fermentum</i>	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
MM2.3 - <i>L. salivarius</i>	++++	+++++	+++++	++++	++++
MM3.2 - <i>E. faecalis</i>	++++	++++	+++	+++	++
BC2 - <i>L. fermentum</i>	+++++	+++++	+++++	+++++	++++
DL2 - <i>L. citreum</i>	+++	+++	+++	+++	++++
DL4 - <i>W. cibaria</i>	+++++	+++++	+++++	+++++	++++

Ghi chú: “-”: 0, “+”: 1-5 mm, “++”: 5-10 mm, “+++”: 10-15 mm, “++++”: 15-20 mm, “+++++”: 20-25 mm, “++++++”: 25-30 mm.

Đối với hiệu quả kháng vi khuẩn *S. aureus*, cả 7 chủng LAB tuyển chọn đều duy trì hiệu quả kháng khuẩn trong 2 – 3 ngày đầu, cao nhất là chủng MM2.2 (27,12 mm), sau đó có dấu hiệu giảm dần ở 2 ngày còn lại (Bảng 5).

**Bảng 6. Kết quả đường kính vùng ức chế của 7 chủng LAB đối với *Streptococcus sp***

Các chủng LAB	Loại kháng sinh				
	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4	Ngày 5
MM1.2.1 - <i>L. paracasei</i>	+	+	+	+	+
MM2.2 - <i>L. fermentum</i>	++	++++	++++	++++	++++
MM2.3 - <i>L. salivarius</i>	+	+	+	+	+
MM3.2 - <i>E. faecalis</i>	++	++	++	++	+

CÔNG NGHỆ VI SINH, THỰC PHẨM VÀ MÔI TRƯỜNG

BC2 - <i>L. fermentum</i>	+++	+++	+++	+++	+++
DL2 - <i>L. citreum</i>	++	++	++	++	++
DL4 - <i>W. cibaria</i>	+++	-	-	-	-

Ghi chú: “-”: 0, “+”: 1-5 mm, “++”: 5-10mm, “+++”: 10-15mm, “++++”: 15-20mm, “+++++”: 20-25mm, “++++++”: 25-30 mm.

Ngược lại, 7 chủng LAB tuyển chọn thể hiện khả năng ức chế vi khuẩn *Streptococcus sp.* khác nhau, 2 chủng MM1.2.1 và MM2.3 không có khả năng ức chế, thể hiện ở vùng vô khuẩn rất nhỏ và mờ trong thời gian khảo sát; chủng DL4 chỉ có thể ức chế vi khuẩn chỉ thị sau 24 giờ (13,3 mm), hiệu quả ức chế sau đó không còn khi xuất hiện nhiều khuẩn lạc xung quanh giếng thạch; 2 chủng MM3.2 và BC2 có khả năng kháng khuẩn sau 24 giờ đầu tiên, lần lượt 9,3 và 14,6 mm, sau đó giảm dần và ổn định đến ngày thứ 5; 2 chủng MM2.2 và DL2 có khả năng kháng khuẩn duy trì trong 5 ngày, cao nhất là MM2.2 (19,1 mm) (Bảng 6).

Các kết quả này tương đồng với nghiên cứu của (Abubakr, 2018) khi khảo sát khả năng kháng khuẩn của 6 chủng LAB từ sữa mẹ đối với các vi khuẩn gây bệnh cũng cho thấy vùng ức chế rõ rệt trên môi trường MRS agar chứa *E. coli*, với một số chủng có khả năng ức chế mạnh mẽ và duy trì ổn định trong thời gian dài, điển hình là chủng LAB-HM6. Nghiên cứu của Abubakr cũng ghi nhận rằng các chủng LAB này có khả năng kháng khuẩn đa dạng, nhiều hợp chất chịu trách nhiệm cho hoạt động kháng khuẩn và không thể quy cho một hoặc các hợp chất chính có trong sữa mẹ và mức độ và thời gian duy trì hiệu quả kháng khuẩn có sự khác biệt giữa các chủng.

Kết quả nghiên cứu này cho thấy chủng *L. fermentum* MM2.2 có khả năng kháng khuẩn đa dạng và có tiềm năng ứng dụng cao cũng tương tự với nghiên cứu của Thụy và đồng tác giả (2024) khi khảo sát khả năng kháng khuẩn của các chủng LAB từ thực phẩm lên men.

**Định tính khả năng chịu muối mật**

Chủng vi khuẩn LAB có enzyme BSH làm thủy phân axit mật liên hợp thể hiện vòng đục trên đĩa MRS có bổ sung bile salt ở các nồng độ khác nhau. Kết quả cho thấy cả 7 chủng LAB đều có khả năng chống chịu muối mật ở các nồng độ 0.3%, 0.5%, 0.7% và 1%. Theo nghiên cứu của Jiang và đồng tác giả (2010), các chủng LAB *L. helveticus*, *L. fermentum*, *L. acidophilus* cho hiệu quả khử muối mật cao 50 mmol/L và các loài có khả năng tạo probiotic như *Lactobacillus*, *Bifidobacteria* có khả năng thủy phân nhiều loại muối mật liên hợp khác nhau, hiệu quả khác nhau đối với đặc hiệu mỗi cơ chất (Morinaga et al., 2022).



Hình 3. Định tính enzyme BSH của 7 chủng LAB

**Mức độ nhạy cảm kháng sinh**

Mức độ nhạy cảm kháng sinh của các chủng LAB dựa quan sát đường kính vùng vô khuẩn xung quanh 4 loại đĩa giấy kháng sinh khảo sát, phân loại thành ba nhóm: không nhạy cảm – K (không có vùng vô khuẩn), nhạy cảm trung bình – TB (mm), và nhạy cảm cao – N (mm). Đánh giá dựa vào tham chiếu mức độ nhạy cảm của chủng chỉ thị tương ứng đối với mỗi loại kháng sinh.

Đối với kháng sinh Cefotaxime (Ct), cả 7 chủng được phân loại ở mức nhạy cảm trung bình (TB). Đối với kháng sinh Cefoxitin (Cn), ghi nhận cả 7 chủng LAB không nhạy cảm tương tự với một số chủng LAB trong. Đối với Ciprofloxacin (Ci), ghi nhận 5 chủng không nhạy cảm (MM1.2.1, MM2.2, MM2.3, MM3.2, BC2); 2 chủng có kết quả là nhạy cảm trung bình (DL2 và DL4). Có 3 chủng LAB (MM2.2, MM2.3, MM3.2) không nhạy cảm; 4 chủng (MM1.2.1, BC2, DL2, DL4) nhạy cảm cao đối với kháng sinh Penicillin (Pn). Kết quả nghiên cứu thể hiện sự đa dạng trong mức độ nhạy cảm, tương tự một số chủng LAB trong phát hiện của Zommara và đồng tác giả, 2023. Theo nhiều nghiên cứu, không phải tất cả các chủng có khả năng kháng với kháng sinh (không nhạy cảm) đều mang gene kháng với kháng sinh đó.

Bảng 7. Kết quả khảo sát mức độ nhạy cảm kháng sinh của 7 chủng LAB

Các chủng LAB	Loại kháng sinh			
	Cefotaxime (Ct)	Cefoxitin (Cn)	Ciprofloxacin (Ci)	Penicillin (Pn)
MM1.2.1 - <i>L. paracasei</i>	TB	K	K	N
MM2.2 - <i>L. fermentum</i>	TB	K	K	TB
MM2.3 - <i>L. salivarius</i>	TB	K	K	TB

MM3.2 - <i>E. faecalis</i>	TB	K	K	TB
BC2 - <i>L. fermentum</i>	TB	K	K	N
DL2 - <i>L. citreum</i>	TB	K	TB	N
DL4 - <i>W. cibaria</i>	TB	K	TB	N

Ghi chú: K: Không nhạy cảm; TB: Nhạy cảm trung bình; N: Nhạy cảm cao.

## KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Kết quả phân lập và tuyển chọn 7 chủng vi sinh vật có đặc điểm mô tả hình thái và sinh hóa của vi khuẩn lactic, định danh sinh học phân tử và thể hiện mối liên hệ thông qua cây phát sinh loài, được xác định là: *L. paracasei* (MM1.2.1), *L. fermentum* (MM2.2), *L. salivarius* (MM2.3), *E. faecalis* (MM3.2), *L. fermentum* (BC2), *L. citreum* (DL2), và *W. cibaria* (DL4).

Nghiên cứu khả năng kháng khuẩn của các dòng vi khuẩn lactic là một trong những thúc đẩy quan trọng trong lĩnh vực vi sinh và y học, giúp chống lại vi khuẩn gây bệnh ngày càng phức tạp. Nghiên cứu này đã thành công trong việc tuyển chọn 7 dòng vi khuẩn lactic có tiềm năng kháng khuẩn từ sữa mẹ. Cả 7 chủng LAB tuyển chọn đều có khả năng ức chế sự phát triển của 5 chủng vi khuẩn gây bệnh ở mức độ khác nhau, có khả năng chịu được muối mật ở nồng độ 1% và khả năng nhạy cảm khác nhau với 4 loại kháng sinh phổ biến khác nhau. Trong đó *L. fermentum* MM2.2 có khả năng kháng khuẩn và duy trì hiệu quả tương đối ổn định trong việc ức chế nhiều loại vi khuẩn gây bệnh phổ biến như *E.coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *S. aureus* và *Streptococcus sp* góp phần phát triển các phương pháp điều trị và phòng ngừa bệnh hiệu quả hơn, bảo vệ sức khỏe cộng đồng một cách toàn diện và bền vững.

Cần có nghiên cứu thêm về tác động *in vivo* của các chủng tuyển chọn lên khả năng kháng khuẩn trên mô hình chuột, kiểm tra các gene kháng kháng sinh của 7 chủng tuyển chọn, để hạn chế hiện tượng chuyển gene kháng với kháng sinh truyền ngang giữa các vi sinh vật.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abubakr MA (2018). Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from human breast milk against human pathogenic strains. *Int J Clin Dev Anat*, 4(1): 27–31.
- Dubernet S, Desmases N, Guéguen M (2002). A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiol Lett*, 214(2): 271–275.
- Đoàn Thị Tuyết Lê, Đỗ Minh Anh. "Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn lactic có hoạt tính kháng *Vibrio parahaemolyticus* từ nội tạng tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*)."  
*Tạp chí Khoa học-Công nghệ Thủy sản, Trường Đại học Nha Trang* 04 (2019): 181-188.
- Foley MH, O'Flaherty S, Barrangou R, Theriot CM (2019). Bile salt hydrolases: Gatekeepers of bile acid metabolism and host-microbiome crosstalk in the gastrointestinal tract. *PLoS Pathog*, 15: e1007581.
- Jiang, J., Hang, X., Zhang, M., Liu, X., Li, D., & Yang, H. (2010). Diversity of bile salt hydrolase activities in different lactobacilli toward human bile salts. *Annals of Microbiology*, 60, 81-88.
- Lin SP, Huang YH, Hsu KD, Lai YJ, Chen YK, Cheng KC (2016). Isolation and identification of cellulose-producing strain *Komagataeibacter intermedius* from fermented fruit juice. *Carbohydr Polym*, 151: 827–833.
- Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Aguilar GR, Gray A, Han C, Bisignano C, Rao P, Wool E (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis. *Lancet*, 399(10325): 629–655.
- Morinaga K, Kusada H, Tamaki H (2022). Bile salt hydrolases with extended substrate specificity confer a high level of resistance to bile toxicity on atopobiaceae bacteria. *Int J Mol Sci*, 23(18): 10980.
- Perez-Cano FJ, Dong H, Yaqoob P (2010). In vitro immunomodulatory activity of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 and *Lactobacillus salivarius* CECT5713: Two probiotic strains isolated from human breast milk. *Immunobiology*, 215(12): 996–1004.
- Smita N, Bodhankar MG, Vaijayanti S (2014). Screening of intestinal Lactic Acid Bacteria of breastfed neonates for antimicrobial activity against *Bacillus subtilis*, *Staph. aureus* and *E. coli*. *Res J Chem Environ*, 18(3): 37–41.
- Tamura K, Stecher G, Kumar S (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol Biol Evol*, 38(7): 3022–3027.
- Thuy TTD, Lu HF, Bregente CJB, Huang FCA, Tu PC, Kao CY (2024). Characterization of the broad-spectrum antibacterial activity of bacteriocin-like inhibitory substance-producing probiotics isolated from fermented foods. *BMC Microbiol*, 24(1): 85.
- Yavuzdurmaz H (2007). Isolation, characterization, determination of probiotic properties of lactic acid bacteria from human milk. *PhD Thesis. Izmir Institute of Technology, Turkey*.
- Zommara M, El-Ghaish S, Haertle T, Chobert JM, Ghanimah M (2023). Probiotic and technological characterization of selected *Lactobacillus* strains isolated from different Egyptian cheeses. *BMC Microbiol*, 23(1): 160.

## ISOLATION, IDENTIFICATION, AND POTENTIAL PROBIOTIC CHARACTERIZATION OF LACTIC ACID BACTERIA FROM BREAST MILK AND FERMENTED VEGETABLES

Nguyen Thi Phuong Trang<sup>1</sup>, Nguyen Thi Hong Chuyen<sup>2</sup>, Le Thi Thuy Nhi<sup>2</sup>, Phan My Hanh<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Biology & Biotechnology – University of Science – Ho Chi Minh City

<sup>2</sup>Department of Microbial Biotechnology, Biotechnology Center of Ho Chi Minh City

### SUMMARY

Lactic acid bacteria (LAB) are typically beneficial Gram-positive bacteria. They were commonly found in the gastrointestinal tract of humans and animals. They can metabolize carbohydrates into lactic acid, in order to inhibit harmful bacteria, enhance the immune system, and balance gut microbiota. This study aims to select LAB strains from human breast milk and fermented vegetable products that have the potential inhibition to five indicator pathogenic bacteria. These are often found in the gut, environment, food, skin, and mucous membranes of humans, causing infections in the gastrointestinal tract, respiratory system, skin, and blood (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* và *Streptococcus sp*). The study was carried out to address the urgent need to control infectious diseases and the increasing phenomenon of resistance to four common antibiotics (Cefotaxime (Ct), Cefoxitin (Cn), Ciprofloxacin (Ci), and Penicillin (Pn)). The study also assesses the bile salt tolerance of the selected strains at concentrations of 0.3%, 0.5%, 0.7%, and 1%. A total of 21 bacterial strains were isolated from three breast milk samples and two fermented vegetable samples, of which seven strains exhibited morphological and biochemical characteristics of lactic acid-producing bacteria. Molecular identification by 16S rRNA sequencing determined that the seven lactic acid bacterial strains were MM1.2.1 (*Lactobacillus paracasei*), MM2.2 (*Limosilactobacillus fermentum*), MM2.3 (*Lactobacillus salivarius*), MM3.2 (*Enterococcus faecalis*), BC2 (*Limosilactobacillus fermentum*), DL2 (*Lactobacillus citreum*) và DL4 (*Weissella cibaria*). Moreover, the study found that all seven LAB strains could inhibit five indicator pathogenic bacteria. The inhibition effect was monitored continuously over five days. Among these, *Limosilactobacillus fermentum* MM2.2 illustrated the largest zone inhibition diameter, showing a statistically significant difference from the other strains and maintaining stable effectiveness over five days. The assessment of the seven LAB strains' sensitivity to the four antibiotics revealed that they were mainly sensitive to Cefotaxime (Ct) and Penicillin (Pn). Additionally, all seven strains were capable of producing bile salt hydrolase (BSH) enzyme at a bile salt concentration of 1%.

**Keywords:** Antibacterial, antibiotic resistant, bile salts, breast milk, fermented vegetables, lactic acid bacteria.

---

\* Author for correspondence: Tel 0984888320; Email: hanhues@gmail.com