

# ĐÁNH GIÁ ĐẶC TÍNH PROBIOTICS VÀ KHÁNG KHUẨN CỦA CÁC CHỦNG *LACTOBACILLUS PLANTARUM* D3 VÀ *LACTOBACILLUS PLANTARUM* D5

Dương Diệu Linh<sup>1</sup>, Nguyễn Thùy My<sup>1</sup>, Lê Thị Hải Yên<sup>1</sup>, Lê Sỹ Phan Anh<sup>2</sup>, Nguyễn Thanh Hòa<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Trường Hóa và Khoa học sự sống, Đại học Bách khoa Hà Nội

<sup>2</sup>Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

## TÓM TẮT

Vi khuẩn axit lactic (LAB) là một loại lợi khuẩn đã được chứng minh là an toàn (GRAS) và có nhiều ứng dụng trong cuộc sống. *Lactobacillus* là chi lớn nhất trong nhóm vi khuẩn lactic, chúng cũng được chứng minh có nhiều đặc tính có lợi như: lên men thực phẩm, kháng khuẩn, tạo nhiều enzyme ứng dụng trong công nghiệp,... Nhóm nghiên cứu đã phân lập được 6 chủng vi khuẩn *Lactobacillus* và sàng lọc khả năng kháng nấm *Candida albicans* của chúng. Chủng D3 và D5 có hoạt tính kháng nấm *Candida albicans* ATCC10231 tốt nhất đã được thử nghiệm trước đó và được lựa chọn cho nghiên cứu này nhằm mục đích xác định khả năng sống sót của hai chủng này trong môi trường pH thấp và môi trường chứa nồng độ axit muối mật cao của chúng. Kết quả thí nghiệm cho thấy, hai chủng nghiên cứu không có khả năng sống sót ở môi trường có pH = 2 sau 2 giờ nuôi cấy. Môi trường pH = 3 không làm ảnh hưởng đến khả năng sống sót của chủng D3, tuy nhiên có tác động đến khả năng sống sót của chủng D5 (số lượng tế bào giảm 2log so với mẫu kiểm chứng tại thời điểm 3 giờ sau nuôi cấy). Cả hai chủng đều phát triển tốt trong môi trường có nồng độ muối mật 0.3%, số lượng tế bào gần như không có sự thay đổi sau 4 giờ nuôi cấy. Hai chủng cũng cho thấy khả năng kháng *Escherichia coli* và *Staphylococcus aureus* tương đối tốt với đường kính vòng kháng từ 14,17 – 22 mm. Kết quả này cũng cho thấy được tiềm năng ứng dụng của chúng trong phát triển các sản phẩm probiotics có hoạt tính kháng nấm cũng như kháng khuẩn.

**Từ khóa:** Kháng khuẩn, *Lactobacillus*, môi trường pH thấp, muối mật, thực phẩm lên men, vi khuẩn lactic.

## MỞ ĐẦU

Vi khuẩn axit lactic (LAB) là một nhóm vi khuẩn có khả năng lên men cacbohydrate thành axit lactic là sản phẩm chính hoặc sản phẩm duy nhất. LAB là vi khuẩn Gram dương, không sinh bào tử, cầu khuẩn không di động hoặc hình que, có thể hô hấp kỵ khí hoặc hiếu khí tùy tiện, catalase âm tính, có khả năng chịu đựng cao đối với pH thấp. Chúng là vi khuẩn không gây bệnh và được chứng minh là an toàn (GRAS) (Mozzi, 2015). Ngoài axit lactic, nhiều loài vi khuẩn LAB còn có khả năng tạo ra các chất ức chế sinh trưởng như bacteriocin, hydrogen peroxide, diacyls,... ngăn chặn sự phát triển của vi khuẩn gây hư hỏng thực phẩm và mầm bệnh (Mokoena, 2017). *Lactobacillus* là chi lớn nhất trong nhóm vi khuẩn lactic và có 168 loài thuộc chi này đã được phát hiện cho đến nay. *Lactobacillus* là vi khuẩn kỵ khí tùy tiện, vi khuẩn gram dương, catalase âm tính, không hình thành bào tử, hình que, có khả năng lên men đường tạo ra axit lactic (Ibrahim Salam, 2016). Chúng là những sinh vật có nhu cầu dinh dưỡng phức tạp bao gồm cacbohydrate, acid amin, peptit, bazo nucleic, axit béo vitamin và khoáng chất. Đa số các loài *Lactobacillus* đã được phân lập từ đường tiêu hóa của người và động vật. Ngoài ra, *Lactobacillus* còn được tìm thấy từ rau và các sản phẩm lên men của chúng, thực vật (đặc biệt là thực vật đang thối rữa), ngũ cốc, sữa và các sản phẩm lên men từ sữa,... (Mokoena, 2017). Vi khuẩn *Lactobacillus* là vi sinh vật an toàn và có nhiều ứng dụng to lớn trong công nghiệp thực phẩm, công nghệ sinh học, y học; chúng còn là lợi khuẩn không thể thiếu trong hệ tiêu hóa của người và động vật. *Lactobacillus* thường được chọn làm men vi sinh vì thể hiện nhiều đặc tính quan trọng như: khả năng chịu acid và muối mật cao, khả năng bám vào bề mặt ruột, ức chế các loài có khả năng gây bệnh (hoạt tính kháng khuẩn), kháng kháng sinh, sản xuất exopolysacarides và loại bỏ cholesterol...

Chúng tôi đã phân lập được các chủng vi khuẩn lactic từ nước dưa chua mua tại chợ Hoàng Mai, quận Hoàng Mai, Hà Nội và đánh giá hoạt tính kháng nấm của chúng, đặc biệt là khả năng kháng nấm *Candida albicans* ATCC10231. Kết quả đánh giá cho thấy rằng chủng D3 và D5 có khả năng kháng nấm *C. albicans* mạnh nhất với đường kính vòng kháng lên tới 15mm (số liệu không thể hiện). Trong nghiên cứu này, chúng tôi xác định khả năng sống sót của hai chủng này trong môi trường pH thấp và môi trường chứa nồng độ axit muối mật cao, đây là môi trường mô phỏng hệ tiêu hóa của con người. Đồng thời, khả năng kháng vi khuẩn *Escherichia coli* và *Staphylococcus aureus* của hai chủng lactic này cũng được nghiên cứu sơ bộ thông qua phương pháp đổ thạch hai lớp.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Vật liệu

Hai chủng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* (D3 và D5) được phân lập từ nước dưa chua mua tại chợ Hoàng Mai, quận Hoàng Mai, Hà Nội. Các chủng vi khuẩn chỉ thị bao gồm: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 từ Bệnh viện bệnh Nhiệt đới Trung ương cơ sở 2.

### Phương pháp nghiên cứu

#### Phương pháp xác định khả năng chịu pH thấp của chủng

Các chủng đã phân lập được nuôi cấy riêng rẽ trong 5mL môi trường MRS lỏng ở 37°C trong 24 giờ. Hút 100 microlit canh trường vào 5mL môi trường MRS đã điều chỉnh pH về giá trị 2 và 3 bằng HCl 1N. Ủ ở 37°C trong 3 giờ, sau đó hút 100 microlit canh trường sau mỗi giờ khảo sát đem trang đều trên đĩa thạch chứa môi trường MRS. Nuôi ở 37°C trong 24 giờ. Làm tương tự với mẫu kiểm chứng dương (các chủng thí nghiệm được nuôi cấy trong 5mL môi trường MRS có pH=7).

#### Phương pháp xác định khả năng sống trong môi trường chứa muối mật

Khả năng sống trong môi trường có muối mật của các chủng vi sinh vật được kiểm tra bằng cách ủ tế bào trong môi trường MRS lỏng chứa 0,3% muối mật. Khả năng này được đánh giá dựa trên số lượng khuẩn lạc đếm được trên các đĩa petri sau khi ủ tế bào ở 37°C trong các khoảng thời gian 0, 1, 2, 3 và 4 giờ, tương ứng với thời gian lưu thức ăn trong ruột non.

#### Phương pháp xác định khả năng kháng khuẩn

##### Phương pháp kẻ một đường thẳng

Thử nghiệm này sử dụng phương pháp đồ thạch hai lớp đã biến đổi (overlay method) được tham khảo từ nghiên cứu của Muhammad Saleem Kalhoro (2023) và Hong – Jae Lee (2023) (Kalhoro *et al.*, 2023; Lee *et al.*, 2023). Đầu tiên, nuôi cấy sinh *E. coli* và *S.aureus* trong 5 mL môi trường LB lỏng ở 37°C, 150 rpm, trong 24 giờ. Lấy một lượng khuẩn lạc vi khuẩn Lactic kẻ thành một đường thẳng trên đĩa MRS agar, nuôi ở 37°C trong 24 giờ. Sau đó, phủ lên bề mặt thạch bằng một lớp 10 mL môi trường LB bán rắn (0,7% agar) đã trộn với 1% (v/v) canh trường vi khuẩn chỉ thị (đã điều chỉnh về OD<sub>600nm</sub> = 1). Môi trường LB bán rắn được để trong bể ổn nhiệt ở 55°C trước khi trộn với vi khuẩn chỉ thị. Đĩa thạch được ủ trong 24 giờ ở 37°C và quan sát vòng ức chế xuất hiện quanh đường khuẩn lạc.

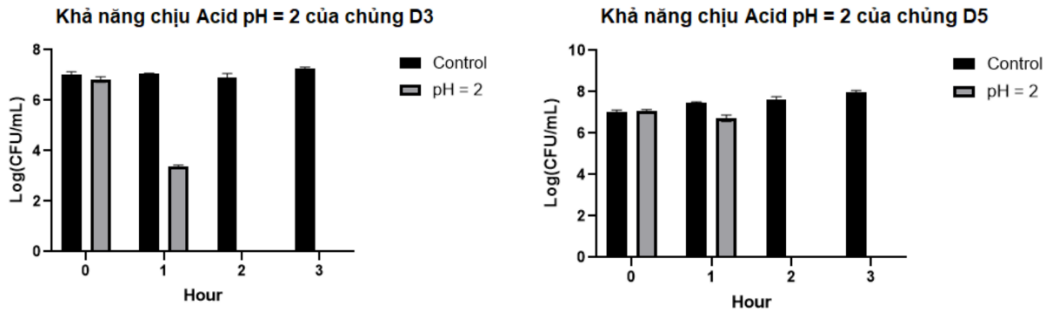
##### Phương pháp nhỏ giọt

Thử nghiệm này sử dụng phương pháp đồ thạch hai lớp (overlay method) được tham khảo từ nghiên cứu của Zhixiang Qian (2020), Muhammad Saleem Kalhoro (2023) và Hong – Jae Lee (2023) (Kalhoro *et al.*, 2023; Lee *et al.*, 2023; Qian *et al.*, 2020). Đầu tiên, nuôi cấy sinh vi khuẩn LAB đã phân lập trong 5 mL môi trường MRS lỏng ở 37°C, 150 rpm, trong 24 giờ. Nhỏ 3 µL canh trường vi khuẩn lactic (đã điều chỉnh về OD<sub>600nm</sub> = 1) lên đĩa môi trường MRS agar, để khô rồi đem ủ ở 37°C, 24 giờ. Tiếp theo, nuôi cấy sinh vi khuẩn *E.coli* và *S.aureus* trong 5 mL môi trường LB lỏng ở 37°C, 150rpm, trong 24 giờ. Sau đó, phủ lên bề mặt thạch bằng một lớp 10 mL môi trường LB bán rắn (0,7% agar) đã trộn với 1% (v/v) canh trường vi khuẩn chỉ thị (đã điều chỉnh về OD<sub>600nm</sub> = 1). Môi trường LB bán rắn được để trong bể ổn nhiệt ở 55°C trước khi trộn với khuẩn chỉ thị. Đĩa thạch được ủ trong 24 giờ ở 37°C và quan sát vòng ức chế xuất hiện quanh khuẩn lạc. Vi khuẩn được xem là có khả năng ức chế nếu đường kính vòng ức chế rộng hơn 2 mm.

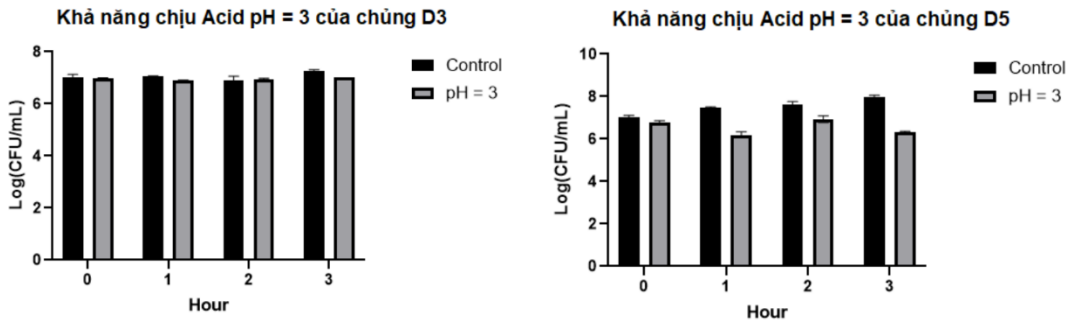
## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Kết quả khả năng chịu pH thấp của chủng

Kết quả nghiên cứu khả năng tồn tại của *Lactobacillus* trong môi trường acid thấp được điều chỉnh bằng acid HCl để giả lập như môi trường acid của dạ dày. Tại giá trị pH = 2, cả 2 chủng D3 và D5 đều không có tế bào vi khuẩn nào sống sót sau 2 giờ đầu tiên, chứng tỏ vi khuẩn này không thể tồn tại trong môi trường acid khắc nghiệt (Hình 1). Khả năng phát triển và tồn tại của chủng D5 đã có sự giảm đáng kể tại giá trị pH = 3, trong khi chủng D3 vẫn duy trì số lượng tế bào như ban đầu (Hình 2). Chan HK và đồng tác giả báo cáo rằng các acid như acid clohydric (HCl) cũng được tìm thấy trong dạ dày của con người và phá vỡ các phân tử sinh học của tế bào như acid béo, protein và DNA. Môi trường pH thấp có thể ức chế quá trình trao đổi chất và làm giảm sự phát triển cũng như khả năng tồn tại của *Lactobacillus* (Sahadeva *et al.*, 2011). Các nghiên cứu khác cũng cho rằng việc tiếp xúc với acid dạ dày có pH ≤ 2 sau 3 giờ ủ làm giảm đáng kể số lượng vi khuẩn sống sót. Theo Prasad và Chan, điểm ngưỡng để xác định trạng thái kháng acid được đặt ở pH = 2 và pH = 3 trong thời gian ủ 3 giờ vì nó mô phỏng sự cư trú của vi khuẩn trong dạ dày (Prasad *et al.*, 1998).



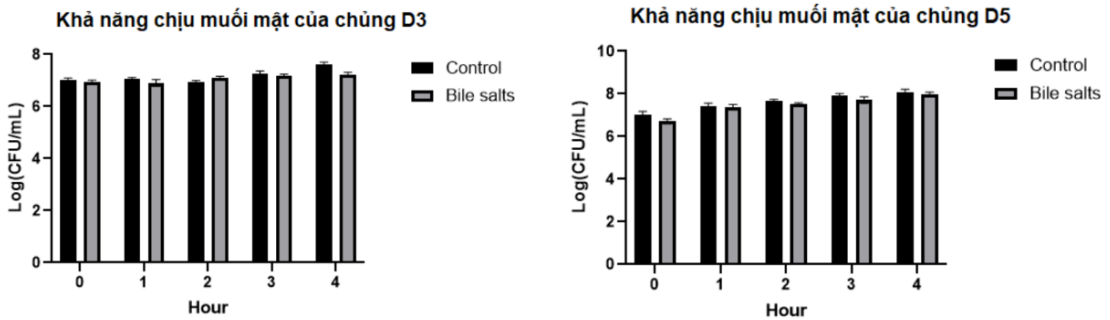
Hình 1. Khả năng chịu Acid pH = 2 của hai chủng D3 và D5



Hình 2. Khả năng chịu Acid pH = 3 của hai chủng D3 và D5

**Kết quả khả năng sống trong môi trường chứa muối mật**

Khả năng chịu nồng độ muối mật 0.3% được khảo sát sau 4 giờ ủ và có lấy mẫu sau mỗi giờ (Hình 3). Cả hai chủng D3 và D5 đều tồn tại và phát triển trong môi trường muối mật. So sánh số lượng khuẩn lạc khi nuôi ở môi trường có và không có muối mật tốc độ phát triển của chủng không thay đổi nhiều, chỉ có chủng D3 thể hiện sự kém thích nghi hơn so với mẫu kiểm chứng sau 4 giờ nuôi cấy. Tóm lại, hai chủng này cho kết quả kháng muối mật tốt sau 4 giờ ủ. Theo S. Mandal sau khi vi khuẩn tiếp xúc với muối mật, sự phá vỡ cân bằng nội môi tế bào xảy ra dẫn đến sự phân ly và phá vỡ tính nguyên vẹn của lớp màng kép lipid và protein làm giảm số lượng vi khuẩn và cuối cùng tế bào chết (Mandal *et al.*, 2006).



Hình 3. Khả năng chịu muối mật nồng độ 0.3% của hai chủng D3 và D5

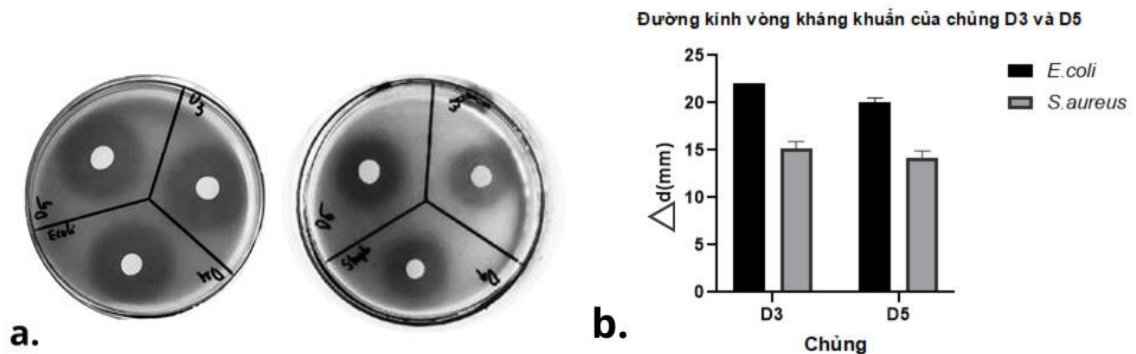
**Kết quả khả năng kháng khuẩn của chủng**

Kết quả thử nghiệm đã cho thấy xung quanh đường nuôi cấy *Lactobacillus* xuất hiện vùng kháng khuẩn tương đối rõ rệt, tại đó hai loại vi khuẩn chỉ thị không phát triển (vùng có màu trong hơn xung quanh). Ngoài vùng kháng khuẩn, vi khuẩn vẫn phát triển bình thường (Hình 4). Qua thử nghiệm này có thể bước đầu khẳng định cả 2 chủng *Lactobacillus* nghiên cứu đều có khả năng kháng lại *E.coli* và *S.aureus*.



Hình 4. Khả năng kháng *E.coli* và *S.aureus* của chủng D3 và D5

Sau thử nghiệm định tính khả năng kháng hai vi khuẩn chỉ thị của các chủng D3 và D5, thử nghiệm sử dụng phương pháp nhỏ giọt đã được thực hiện như một cách định lượng khả năng kháng khuẩn của các chủng nghiên cứu. Phương pháp này là một phương pháp khá phổ biến để xác định và so sánh chính xác tính kháng khuẩn, kháng nấm của các chủng lợi khuẩn. Kết quả thu được ở Hình 5 cho thấy, cả hai chủng D3 và D5 đều kháng lại *E.coli* mạnh hơn *S.aureus*. Đường kính vòng kháng *E.coli* và *S.aureus* của D3 lần lượt là 22 mm và 15,17 mm. Đối với chủng D5 thì các con số tương ứng là 20 mm và 14,17 mm. Theo kết quả này có thể thấy rằng chủng D3 có khả năng kháng lại hai loại vi khuẩn chỉ thị mạnh hơn chủng D5. Kết quả này tương đồng với một số nghiên cứu trước đây như của Muhammad Saleem Kalhoro và đồng tác giả (2022) đối với chủng *Lactobacillus* phân lập từ sữa trâu thô nhằm kháng vi khuẩn *E. coli* ATCC 25922 (đường kính vòng kháng 16,6 – 19,3 mm) và vi khuẩn *S.aureus* với đường kính vòng kháng 17,3 – 20,3 mm (Kalhoro *et al.*, 2023). Ở Việt Nam, Nguyễn Tăng Phú và Nguyễn Thị Liên đã thực hiện với chủng vi khuẩn lactic phân lập từ sữa mẹ với đường kính vòng kháng từ 5,33 – 23,00 mm đối với *E.coli* và 2,67 – 12,67 mm đối với *S.aureus* (Phú & Liên, 2019).



Hình 5. a. Hình ảnh vòng kháng *E.coli* và *S.aureus* của chủng D3 và D5; b. Kết quả thử nghiệm định lượng khả năng kháng *E.coli* và *S.aureus* của chủng D3 và D5

## KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã chứng minh rằng hai chủng vi khuẩn *Lactobacillus* D3 và D5 có thể sống sót và phát triển tốt ở môi trường có pH = 3 và nồng độ muối mật là 0.3%. Các chủng vi khuẩn này có khả năng tồn tại trong điều kiện pH thấp cho thấy tiềm năng trong việc sống sót trong môi trường dạ dày có độ acid cao và nồng độ muối mật ở ruột non. Khả năng kháng *E.coli* và *S.aureus* của chủng D3 và D5 đã được thử nghiệm và có kết quả tương đối cao so với các công bố trước đó với đường kính vòng kháng lớn nhất là 22 mm. Các nghiên cứu về cơ chế kháng nấm kháng khuẩn của hai chủng sẽ tiếp tục được thực hiện. Ngoài ra, các nghiên cứu tiếp theo sẽ tập trung vào việc đánh giá tiềm năng sử dụng hai chủng vi khuẩn này trong các sản phẩm thực phẩm chức năng và probiotic, nhằm ứng dụng vào việc phòng ngừa và điều trị các bệnh nhiễm khuẩn đường ruột.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ibrahim Salam. A (2016). Lactic Acid Bacteria: *Lactobacillus* spp.: Other Species. *Reference Module in Food Science*, 125-131.
- Kalhoro MS, Anal AK, Kalhoro DH, Hussain T, Murtaza G, & Mangi MH (2023). Antimicrobial Activities and Biopreservation Potential of Lactic Acid Bacteria (LAB) from Raw Buffalo (*Bubalus bubalis*) Milk. *Oxid Med Cell Longev*, 2023: 8475995.
- Lee HJ, Lee JB, Park SY, Choi IS, & Lee SW (2023). Antimicrobial Activity of *Ligilactobacillus animalis* SWLA-1 and Its Cell-Free Supernatant against Multidrug-Resistant Bacteria and Its Potential Use as an Alternative to Antimicrobial Agents. *Microorganisms*, 11(1): 182.
- Mandal S, Puniya AK, & Singh K (2006). Effect of Alginate Concentrations on Survival of Microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. *Int Dairy J*, 16(10): 1190–1195.

- Mokoena MP (2017). Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A mini-review. *Molecules*, 22(8): MDPI AG.
- Maldonado-Barragán A, Caballero-Guerrero B, Lucena-Padrós H, Ruiz-Barba JL (2013). "Induction of Bacteriocin Production by Coculture Is Widespread among Plantaricin-Producing *Lactobacillus Plantarum* Strains with Different Regulatory Operons." *Food Microbiol* 33 (1): 40–47.
- Mozzi F (2015). Lactic Acid Bacteria. In *Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier Inc. 501-508.
- Phú NT, & Liên NT (2019). *Đánh giá tiềm năng kháng khuẩn của vi khuẩn lactic phân lập từ sữa mẹ và phân trẻ* Title: *Determination of Antimicrobial Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated from Mothers' breast Milk and Children Stools* *TÓM TẮT*. 55(2): 41–48.
- Prasad J, Gill H, Smart J, & Gopal PK (1998). Selection and Characterisation of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* Strains for Use as Probiotics. *Int Dairy J*, 8(12): 993-1002.
- Qian Z, Zhao D, Yin Y, Zhu H, & Chen D (2020). Antibacterial Activity of *Lactobacillus* Strains Isolated from Mongolian Yogurt against *Gardnerella vaginalis*. *BioMed Res Int*, 2020: 3548618.
- Sahadeva RPK, Leong SF, Chua KH, Tan CH, Chan HY, Tong EV, Wong SYW, & Chan, \*. (2011). Survival of Commercial Probiotic Strains to pH and Bile. *International Food Research Journal*, 18(4): 1515-1522.

## EVALUATION OF PROBIOTICS AND ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF *LACTOBACILLUS PLANTARUM* D3 AND *LACTOBACILLUS PLANTARUM* D5

Duong Dieu Linh<sup>1</sup>, Nguyen Thuy My<sup>1</sup>, Le Thi Hai Yen<sup>1</sup>, Le Sy Phan Anh<sup>2</sup>, Nguyen Thanh Hoa<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>School of Chemistry and Life Sciences, Hanoi University of Science and Technology

<sup>2</sup>Faculty of Biology, VNU University of Science

### SUMMARY

Lactic acid bacteria (LAB) is a type of probiotic that has been proven to be safe (GRAS) and has many applications in life. *Lactobacillus* is the largest genus in the lactic acid bacteria group. They have also been shown to have many beneficial properties such as: food fermentation, antibacterial ability, creating many enzymes for industrial applications, ... Six strains of *Lactobacillus* bacteria had been isolated and screened their ability to resist *Candida albicans* fungus. Two strains D3 and D5 with the best antifungal activity were selected for this study with the aim of determining the ability of these two strains to survive in low pH and high concentrations of bile salt acids environments. The results showed that the two researched strains were not able to survive in an environment with pH = 2 after 2 hours of culture. The pH = 3 environment does not affect the survival ability of strain D3, but has an impact on the survival ability of strain D5 (the number of cells decreased by 2log compared to the control sample at 3 hours after incubation). Both strains grew well in an environment with 0.3% bile salt concentration, with almost no change in cell number after 4 hours of culture. The two strains also showed relatively good resistance to *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* with resistance zone diameters ranging from 14.17 to 22 mm. This result also shows the potential application of the strain in developing probiotic products with antifungal and antibacterial activities.

**Keywords:** Antibacterial, *Lactobacillus*, low pH environment, bile salts, fermented foods, lactic bacteria.

\* Author for correspondence: Tel: 0374869808; Email: hoa.nguyenthanh@hust.edu.vn