

HOẠT TÍNH KHÁNG VI SINH VẬT GÂY BỆNH VÀ GÂY NGỘ ĐỘC THỰC PHẨM CỦA MỘT SỐ CHỦNG VI KHUẨN LACTIC

TS. HOA THỊ MINH Tú, TS. NGUYỄN KIM THOA
TS. PHAN THỊ TUYẾT MINH, TS. TRẦN THANH THÙY
ThS. LÊ THỊ THANH XUÂN, TS. NGUYỄN THẾ TRANG
PGS.TS. NGUYỄN PHƯƠNG NHUỆ
Viện Hàn lâm Khoa học và công nghệ Việt Nam
TS. CHU THANH BÌNH - Viện Y học dự phòng Quân đội
Phản biện khoa học: (1) PGS.TS. NGUYỄN THÁI SƠN
(2) TS. HÀ THẾ TẤN

TÓM TẮT: Trong bài báo này, 120 chủng vi khuẩn lactic được phân lập từ thực phẩm lên men truyền thống của Việt Nam. Bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch sử dụng 4 chủng kiểm định bao gồm *Enterococcus faecium* JCM5804, *Listeria monocytogenes* ATCC35152, *Staphylococcus aureus* ATCC13709 và *Bacillus cereus* ATCC11778, đã xác định được 33 chủng có khả năng kháng từ 1 đến 4 chủng kiểm định thử nghiệm. Trong số đó đã xác định được 3 chủng C3, C5 và M7 có phổ kháng khuẩn rộng, kháng được 4 chủng kiểm định với đường kính vòng kháng khuẩn dao động từ 6 đến 15 mm. Phân tích trình tự gen 16S ARN đã xác định được 3 chủng C3, C5, M7 thuộc về loài *Lactobacillus plantarum*. Kết quả này góp phần hữu ích nhằm định hướng ứng dụng chủng trong việc tạo thực phẩm bổ sung giúp tăng cường miễn dịch trong phòng và điều trị bệnh do nhiễm vi sinh vật gây bệnh và ngộ độc thực phẩm.

Từ khóa: Vi khuẩn lactic, hoạt tính kháng khuẩn, ngộ độc thực phẩm.

ABSTRACT: In this study, 120 lactic acid bacteria strains were isolated from traditional Vietnamese fermented foods. Based on the agar disk diffusion method, 33 strains were identified the antibacterial activities with one of four indicator strains: *Enterococcus faecium* JCM5804, *Listeria monocytogenes* ATCC35152, *Staphylococcus aureus* ATCC13709 and *Bacillus cereus* ATCC11778. Among these, 3 strains C3, C5 and M7 had high antibacterial activities against 4 tested strains with diameter of inhibition zone ranging from 6 to 15 mm (D-d). Based on their 16S RNA gene sequence analysis, three strains C3, C5 and M7 belong to *Lactobacillus plantarum*. The obtained results contribute to the orientation of the application of these strains in terms of making dietary supplements that enhancing immunity in the prevention and treatment of infection with pathogenic microorganisms and food poisoning in humans.

Keywords: Antimicrobial activity, foodborne pathogens, lactic acid bacteria.

Chịu trách nhiệm nội dung: TS. Hoa Thị Minh Tú, Email: hoathiminhtu@gmail.com

Ngày nhận bài: 11/6/2021; mời phản biện khoa học: 6/2021; chấp nhận đăng: 24/7/2021.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ.

Theo thống kê, mỗi năm Việt Nam có khoảng 250-500 vụ ngộ độc thực phẩm với 7.000-10.000 nạn nhân và 100-200 ca tử vong. Riêng 6 tháng đầu năm 2020, toàn quốc đã ghi nhận 48 vụ ngộ độc thực phẩm, với 870 người mắc, 824 ca nhập viện điều trị và 22 ca tử vong [1].

Có nhiều nguyên nhân dẫn tới ngộ độc thực phẩm, trong đó, nguyên nhân do nhiễm vi sinh vật và các độc tố của chúng chiếm hơn 80%. Các loài *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Bacillus cereus*, *Toxoplasma gondii* và *Escherichia coli* O157:H7 là nguyên nhân phổ biến gây ra các bệnh ngộ độc thực phẩm [2]. Các chủng này nhiễm và

sinh trưởng ngay cả ở nhiệt độ thấp (4-6°C), trong thịt ướp lạnh, thịt nguội, phô mai chưa tiệt trùng. Người ăn phải thực phẩm nhiễm vi sinh vật này gây ra những rối loạn tiêu hóa, mất cân bằng điện giải, kiệt sức, trường hợp nặng có thể dẫn đến tử vong nếu không chữa trị đúng cách và kịp thời [3].

Vi khuẩn lactic là nhóm vi khuẩn Gram dương, tế bào có dạng hình que hay hình cầu, không sinh bào tử và không di động, catalase âm tính. Vi khuẩn lactic có khả năng sống sót trong điều kiện sinh trưởng ở dải nhiệt độ rộng từ 15-45°C, pH từ 3 đến 11, bao gồm các chi chính *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* và *Weissella* [4].

Những loài như *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. casei rhamnosus*, *L. delbrueckii bulgaricus*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *Lactococcus lactis lactis*, *L. lactis cremoris*, là những loài phổ biến, là nguồn tìm kiếm các bacteriocin mới; đồng thời cũng là những loài được ứng dụng nhiều trong lên men và bảo quản thực phẩm [4, 5]. Ngoài khả năng sinh acid hữu cơ, một số chủng vi khuẩn lactic còn có khả năng sinh ra các chất ức chế vi sinh vật gây bệnh, như diacetyl, hydroperoxyt, acetaldehyde, bacteriocin... Trong đó, bacteriocin được tổng hợp từ vi khuẩn lactic có khả năng ức chế sự sinh trưởng của một số vi sinh vật gây bệnh và gây ngộ độc thực phẩm. Hơn nữa bacteriocin này dễ bị bất hoạt và phân hủy dưới tác động của các protease trong hệ tiêu hóa của người nên rất an toàn đối với người sử dụng. Do vậy, vấn đề này đang được nhiều nhà khoa học trong và ngoài nước quan tâm, nghiên cứu ứng dụng trong bảo quản thực phẩm [3].

Ẩm thực Việt Nam rất phong phú và đa dạng về phương thức chế biến, với nhiều sản phẩm lên men truyền thống. Đặc biệt những sản phẩm này chứa nhiều vi sinh vật bản địa, là nguồn tìm kiếm sàng lọc các chủng vi khuẩn lactic sinh bacteriocin mới, chất kháng khuẩn mới. Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm tuyển chọn chủng vi khuẩn lactic có khả năng tổng hợp bacteriocin cao và kháng khuẩn phổ rộng, ức chế được một số chủng vi sinh vật gây bệnh và gây ngộ độc thực phẩm từ thực phẩm lên men truyền thống của Việt Nam.

2. ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.

2.1. Đối tượng, vật liệu nghiên cứu:

- Các chủng vi khuẩn lactic được phân lập từ các nguồn thực phẩm lên men truyền thống ở Việt Nam: nem chua (từ Thanh Hóa), chượp mắm cá (từ Phú Quốc), thịt muối chua (từ Phú Thọ), dưa cải muối (từ Hà Nội), cà muối (từ Nghệ An), măng muối (từ Hà Nội), tôm chua (từ Huế).

- Các chủng kiểm định: *Enterococcus faecium* JCM5804, *Listeria monocytogenes* ATCC35152, *Staphylococcus aureus* ATCC13709 và *Bacillus cereus* ATCC11778 nhận được từ bộ sưu tập thuộc phòng công nghệ vật liệu sinh học (Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và công nghệ Việt Nam).

- Môi trường LB (g/l) nuôi vi khuẩn kiểm định: pepton 5g, cao men 5g, NaCl 3g, agar 2%, nước cất 1L, pH 6,5-7.

- Môi trường MRS nuôi cấy và phân lập vi khuẩn lactic: pepton 10g, cao thịt 10g, cao men 5g, amonium citrate 2g, K_2HPO_4 2g, $MgSO_4 \cdot 4H_2O$ 0,04g, glucose 20g, CH_3COONa 5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2g, Tween80 1 ml, agar 2%, pH 6,5-6,8.

2.2. Phương pháp nghiên cứu:

Phân lập vi khuẩn lactic được thực hiện theo phương pháp của Hoa Thị Minh Tú và cộng sự có cải tiến theo Abbasilasi năm 2012 [6, 7]. Môi trường MRS agar dùng để phân lập vi khuẩn lactic được bổ sung thêm 0,5% $CaCO_3$ (w/v) nhằm phân biệt vi khuẩn lactic với các nhóm vi khuẩn khác và đồng thời sử dụng 0,01% (w/v) sodium azide ức chế vi khuẩn Gram âm. Sau khi mẫu được đồng nhất, pha loãng 10 lần liên tiếp cho đến 10^{-7} . Mỗi một nồng độ pha loãng từ 10^{-4} đến 10^{-7} sẽ được cấy gọt trên môi trường thạch MRS. Mỗi mẫu phân lập được lặp lại 3 lần và được nuôi cấy trong điều kiện 37°C trong vòng 24 đến 48 giờ. Vi khuẩn lactic được xác định bởi vòng tan $CaCO_3$ xung quanh khuẩn lạc nhờ sự xuất hiện của acid lactic. Những khuẩn lạc vi khuẩn lactic tuyển chọn được làm sạch và giữ giống chuẩn bị cho các thí nghiệm tiếp theo.

2.3. Phương pháp xác định hoạt tính kháng khuẩn của vi khuẩn lactic:

- Xác định khả năng kháng khuẩn sơ bộ bằng phương pháp cấy chấm điểm (theo Schillinger và Lücke [8]): nuôi chủng vi khuẩn lactic trong môi trường MRS lỏng qua đêm. Dùng đầu tăm vô trùng cấy chấm điểm từ dịch huyền phù lên trên bề mặt môi trường MRS đặc, nuôi cấy ở 37°C, thời gian 24 đến 48 giờ. Dịch nuôi cấy của chủng kiểm định *Listeria monocytogenes* ATCC35152 sau 20 giờ trong môi trường LB lỏng ở 37°C được đo quang phổ ở bước sóng 600 nm. Pha loãng dịch nuôi cấy của chủng kiểm định về OD600 = 1; bổ sung 3,6 ml dịch nuôi cấy vào 100 ml môi trường MRS chứa 10 g/l agar. Sau đó, môi trường này được phủ lên bề mặt đĩa đã được nuôi chủng vi khuẩn lactic ở bước 1, giữ ở 4°C trong khoảng 4 giờ. Sau đó, đĩa này được nuôi ở 37°C trong khoảng từ 24 đến 48 giờ. Chủng có khả năng kháng khuẩn tạo thành vòng vô khuẩn to, rõ ràng, ức chế chủng kiểm định sẽ được tuyển chọn.

- Xác định khả năng kháng khuẩn bằng phương pháp khuếch tán trong môi trường thạch:

+ Chủng nghiên cứu được nuôi ở 37°C trong 14 đến 16 giờ. Tiến hành li tâm loại tế bào và thu dịch nuôi cấy (bước 1).

+ Chuẩn bị môi trường thạch đĩa có chứa chủng kiểm định. Chủng kiểm định sử dụng trong nghiên cứu được nuôi cấy trên môi trường LB lỏng, ở nhiệt độ 37°C, trong 24 giờ. Dịch nuôi cấy được đo quang phổ ở bước sóng 600 nm. Điều chỉnh OD600 = 1; bổ sung 3,6 ml dịch nuôi cấy vào 100 ml môi trường MRS chứa 10 g/l agar, đảo đều môi trường với chủng kiểm định. Sau đó, đổ ra đĩa petri và đục lỗ thạch. Dịch li tâm ở bước 1 được chỉnh pH về 6,5 đồng thời loại H_2O_2 sau đó nhỏ dịch này

vào các lỗ thạch. Đĩa thử hoạt tính được giữ ở 4°C trong 4 giờ sau đó nuôi ở 37°C trong 24 giờ. Dựa vào việc xuất hiện vòng vô khuẩn để xác định chủng có hoạt tính kháng khuẩn.

2.4. Phân loại một số chủng vi khuẩn lactic có khả năng kháng khuẩn:

- Phân loại chủng vi khuẩn dựa vào phân tích trình tự gen 16S rRNA: Từ một khuẩn lạc vi khuẩn lactic đơn nuôi trong 5 ml môi trường MRS lỏng trong khoảng 16 giờ, li tâm thu sinh khối. ADN của vi khuẩn được tách bằng kit ThermoFisher theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Phản ứng PCR được thực hiện với master mix của hãng ThermoFisher, DNA của vi khuẩn và cặp mồi 27F/1492R với trình tự:

27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1492R: 5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3'. Trình tự gen 16S rRNA được phân tích tự động bằng máy đọc trình tự gen tự động PRISM@3700 Genetic Analyzer (ThermoFisherScientific, Hoa Kỳ).

- Trình tự gen 16S rRNA được phân tích bằng phần mềm BioEdit và so sánh với dữ liệu trên NCBI bằng chương trình BLAST.

- Dựng cây phát sinh chủng loại được xây dựng bằng phần mềm MEGA 7.

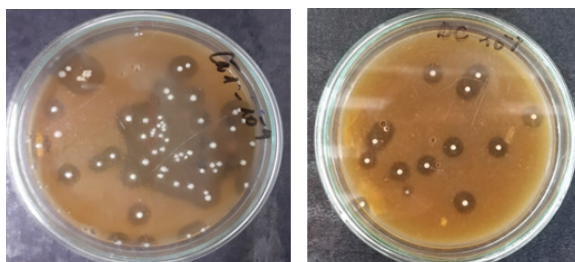
3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.

3.1. Phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn lactic có khả năng kháng khuẩn:

Bảng 1. Số lượng vi khuẩn lactic trong các mẫu phân lập.

Nguồn phân lập	Địa điểm lấy mẫu	Mật độ vi khuẩn lactic (CFU/g)	Số chủng vi khuẩn lactic được tuyển chọn	Số chủng có khả năng kháng khuẩn
Cà muối	Nghệ An	5 x 10 ⁷	20	9
Dưa cải muối	Hà Nội	1,8 x 10 ⁸	30	10
Măng chua	Lạng Sơn	3,2 x 10 ²	10	4
Nem chua	Thanh Hóa	6 x 10 ⁹	30	7
Thịt muối chua	Phú Thọ	3 x 10 ⁵	15	3
Tôm chua	Huế	10 ³	12	0
Chượp mắm cá	Phú Quốc	3 x 10 ²	3	0
Tổng số chủng tuyển chọn			120	33

Vi sinh vật trong các sản phẩm lên men thường đa dạng bao gồm cả vi khuẩn Gram âm và Gram dương. Để thu được kết quả tốt nhất, chúng tôi đã tiến hành phân lập định hướng các chủng vi khuẩn lactic từ các mẫu sản phẩm lên men truyền thống của Việt Nam như mô tả trong phần phương pháp. Sau 36 giờ nuôi ở nhiệt độ 37°C, xuất hiện nhiều khuẩn lạc với kích thước và hình dạng tương đối đồng nhất, chủ yếu là khuẩn lạc màu trắng sữa tròn nhẵn và có vòng màu trong suốt xung quanh khuẩn lạc do CaCO₃ bị phân giải bởi axit lactic (hình 1). Bảng nghiên cứu sơ bộ (số liệu không được chỉ ra ở đây), chúng tôi đã phân lập được 120 chủng vi khuẩn lactic. Các chủng này có một số đặc điểm, như vi khuẩn Gram dương, tế bào hình que hay hình cầu, không sinh bào tử, không có khả năng di động, không sinh catalase, lên men đường glucose và phân giải CaCO₃ [8]. Số lượng vi khuẩn lactic trong các mẫu này dao động trong khoảng 3 x 10² đến 6 x 10⁹ CFU/g mẫu. Trong đó, số lượng vi khuẩn lactic xuất hiện nhiều nhất trong nem chua với 6 x 10⁹ CFU/g, sau đó lần lượt đến dưa cải muối 1,8 x 10⁸, cà muối 5 x 10⁷, thịt muối 3 x 10⁵, tôm chua 10³, măng chua 3,2 x 10² và số lượng vi khuẩn lactic thấp nhất trong chượp mắm cá với 3 x 10² CFU/g. Kết quả chỉ ra, trong tổng số 120 chủng vi khuẩn lactic phân lập được từ 7 nguồn thực phẩm lên men truyền thống, có 20 chủng được phân lập từ cà muối, 30 chủng từ dưa muối, 10 chủng từ măng chua, 12 chủng từ tôm chua, 30 chủng từ nem chua, 3 chủng từ chượp mắm cá và số còn lại từ thịt muối chua (Bảng 1).



Hình 1. Hình ảnh vi khuẩn lactic trên môi trường MRS bổ sung CaCO₃.

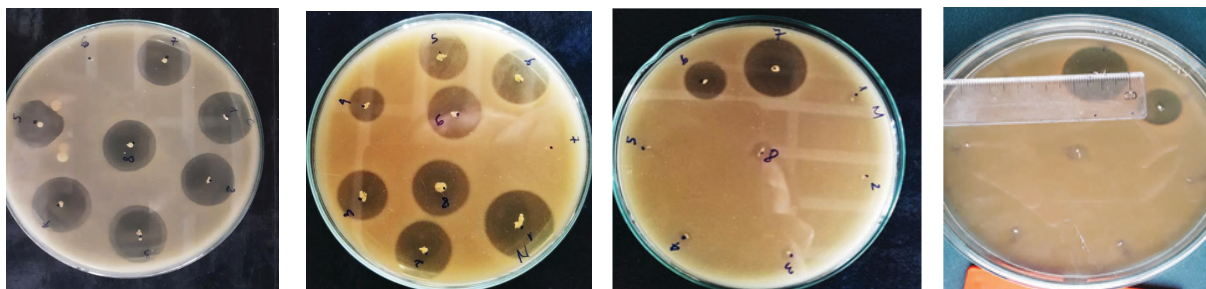
Bảng 2. Đặc điểm hình dạng tế bào và khả năng kháng khuẩn của chủng phân lập

TT	Chủng	Nguồn phân lập	Hình dạng tế bào	Đường kính vòng vô khuẩn ức chế <i>L. monocytogenes</i>	TT	Chủng	Nguồn phân lập	Hình dạng tế bào	Đường kính vòng vô khuẩn ức chế <i>L. monocytogenes</i>
1	TM1	Thịt muối chua	Que	26,0 mm	18	D6	Dưa muối	Que	29,9 mm
2	TM2		Que	26,2 mm	19	D7		Que	25,2 mm
3	TM5		Cầu	27,0 mm	20	D8		Que	24,0 mm
4	C3	Cà muối	Que	26,9 mm	21	D9		Que	17,3 mm
5	C5		Que	21,4 mm	22	D10		Que	27,7 mm
6	C7		Cầu	24,2 mm	23	N1	Que	20,9 mm	
7	C8		Que	25,9 mm	24	N2	Que	14,0 mm	
8	C11		Que	27,2 mm	25	N3	Que	17,8 mm	
9	C12		Que	23,6 mm	26	N4	Que	11,8 mm	
10	C13		Que	2,8 mm	27	N5	Que	16,0 mm	
11	C14		Que	24,1 mm	28	N7	Que	18,2 mm	
12	C15		Que	34,9 mm	29	N9	Que	18,6 mm	
13	D1		Dưa muối	Que	22,4 mm	30	M6	Măng chua	Que
14	D2	Que		13,3 mm	31	M7	Que		25,8 mm
15	D3	Que		16,2 mm	32	M9	Que		25,0 mm
16	D4	Que		24,7 mm	33	M10	Que		28,1 mm
17	D5	Cầu		19,0 mm					

Khả năng tiêu diệt và loại trừ vi khuẩn gây bệnh là một trong những tiêu chí quan trọng để tuyển chọn chủng vi khuẩn lactic nghiên cứu.

Chủng *Listeria monocytogenes* là chủng nhạy cảm với nhiều bacteriocine, có khả năng sống và phát triển trong môi trường có nhiệt độ lạnh (4 đến 6°C), thường nhiễm trong các sản phẩm hàng ngày. Do vậy, chủng *L. monocytogenes* ATCC35152 được sử dụng làm chủng kiểm định trong nghiên cứu. Bằng phương pháp cấy chấm điểm đã xác định được nhanh khả năng kháng khuẩn sơ bộ của chủng vi khuẩn lactic.

Kết quả chỉ ra, đã sàng lọc được 33/120 chủng vi khuẩn lactic có khả năng kháng chủng *L. monocytogenes* ATCC35152 (bảng 2, hình 2) số chủng có khả năng kháng khuẩn trong các mẫu gồm cà muối có 9, dưa cải muối 10, măng chua 4, nem chua 7, thịt muối chua 3 chủng. Điều đáng chú ý ở hai mẫu tôm chua và chượp mắm cá không tìm thấy chủng vi khuẩn lactic nào có khả năng ức chế chủng kiểm định (bảng 1 và 2).



Hình 2. Khả năng ức chế chủng *L. monocytogenes* ATCC35152 của vi khuẩn lactic mới tuyển chọn.

3.2. Phổ kháng khuẩn của các chủng vi khuẩn lactic được tuyển chọn:

Vi khuẩn lactic sinh tổng hợp một số chất có khả năng kháng khuẩn như hydrogen peroxide axit hữu cơ và acetaldehyde. Bằng phương pháp xác định hoạt tính sơ bộ, chúng tôi xác định được 33/120 chủng vi khuẩn lactic có khả năng kháng *L. monocytogenes* ATCC35152. Tuy nhiên, phương pháp này không thể xác định được nguyên nhân gây ra khả năng kháng khuẩn.

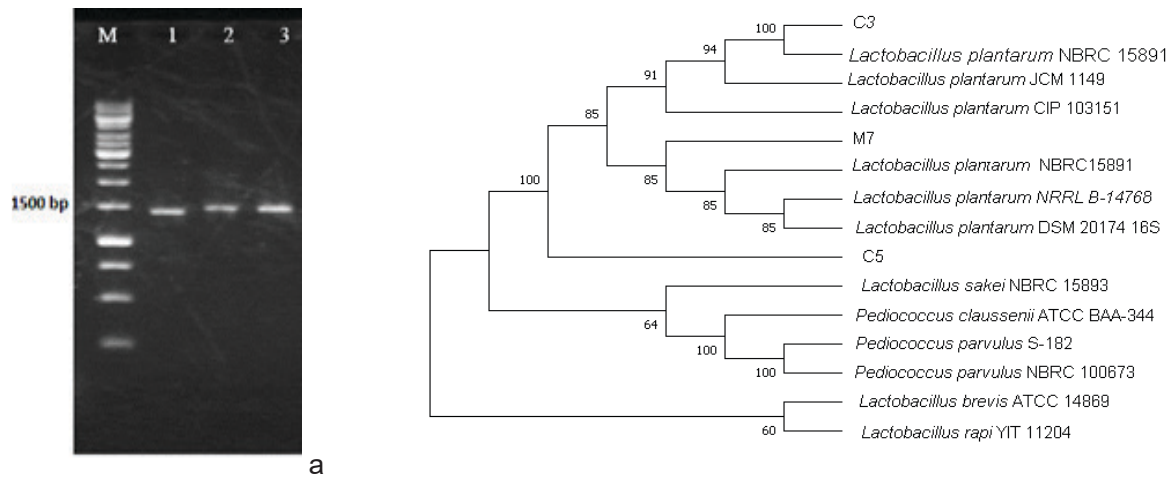
Bảng 3. Phổ kháng khuẩn của các chủng vi khuẩn lactic (kí hiệu - là không có hoạt tính).

TT	Chủng	Nguồn phân lập	Phổ kháng khuẩn - đường kính vòng vô khuẩn (mm)			
			<i>S. aureus</i> ATCC13709	<i>L. monocytogenes</i> ATCC35152	<i>E. faecium</i> JCM5804	<i>B.cereus</i> ATCC11778
1	MT1	Thịt muối chua	7	8	-	-
2	MT2		8	9	-	-
3	MT3		6	7		
4	C3	Cà muối	11	12	10	12
5	C5		7	6	7	8
6	C7		9	10	-	7
7	C8		9	11	-	6
8	C9		6	5	-	-
9	C11		9	6	-	-
10	C12		-	-	8	-
11	C13		-	-	8	-
12	C14		8	7	-	-
13	C15		7	8	-	-
14	D1	Dưa muối	4	10	-	-
15	D2		-	-	-	-
16	D4		8	13	-	-
17	D5		5	13	-	-
18	D6		4	10	3	-
19	D7		-	5	-	-
20	D8		-	6	7	-
21	D9		-	-	-	-
22	D10		8	6	-	-
23	N1		Nem chua	-	9	-
24	N2	6		6	-	-
25	N3	6		7	-	-
26	N5	8		7	-	6
27	N6	5		7	-	-
28	N7	4		6	-	-
29	N9	4		5	-	-
30	M6	Măng chua	10	6	-	-
31	M7		12	10	6	15
32	M9		-	-	0,4	-
33	M10		9	6	2	-

Bacteriocin từ vi khuẩn lactic đóng vai trò quan trọng trong bảo quản thực phẩm, bởi hiệu quả và tính an toàn của chúng. Để tuyển chọn được chủng vi khuẩn lactic sinh tổng hợp bacteriocin, chúng tôi phải loại bỏ các yếu tố có thể gây ra khả năng kháng khuẩn bằng cách: chỉnh pH của dịch nuôi cấy về 6,5, loại H_2O_2 khỏi môi trường nuôi cấy. Sử dụng phương pháp khuếch tán giếng thạch để đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của chủng vi khuẩn lactic sinh tổng hợp ra bacteriocin.

Phổ kháng khuẩn là một trong những tiêu chí quan trọng để tuyển chọn chủng vi khuẩn lactic sinh tổng hợp bacteriocin. Các loài như *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* là nguyên nhân phổ biến gây ngộ độc thực phẩm. Do vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi kiểm định *L. monocytogenes* ATCC35152, *S. aureus* ATCC13709, *B. cereus* ATCC11778, *E. faecium* JCM5804 được sử dụng để đánh giá khả năng kháng khuẩn của chủng tuyển chọn. Trong 33 chủng nghiên cứu, đã tuyển chọn được 3 chủng C3, C5 và M7 có hoạt tính kháng khuẩn mạnh đường kính vòng kháng khuẩn dao động trong khoảng từ 6 đến 15 mm. Cả 3 chủng này đều có phổ kháng khuẩn rộng và luôn ổn định sau nhiều lần nuôi cấy, đặc biệt là ức chế được cả 4 chủng kiểm định gây bệnh và gây ngộ độc thực phẩm (bảng 3). Vì vậy, 3 chủng C3, C5, và M7 được lựa chọn cho các nghiên cứu về định danh đến loài.

3.4. Định danh chủng vi khuẩn có phổ kháng khuẩn rộng:



Hình 3. a: Sản phẩm PCR của 3 chủng C3, C5, M7; M: Maker; 1 - chủng C3; 2 - chủng C5; 3 - chủng M7. b: Cây phát sinh chủng loại của loài *Lactobacillus*.

Ba chủng C3, C5 và M7 được tách chiết ADN tổng số như đã mô tả trong phần phương pháp. Bằng cặp mồi 27F/1142R, đã khuếch đại được đoạn gen 16S ARN đặc hiệu có kích thước khoảng 1500 bp (hình 3a). Trình tự gen của 3 chủng sau khi giải trình tự được so sánh đối chiếu với dữ liệu nguồn gen và phân tích bằng BLAST trên Genbank. Kết quả cả 3 chủng C3, C5 và M7 đều có độ tương đồng cao lần lượt là 99,93%, 99,93% và 100%, với mã số (accession numbers) trên Genbank lần lượt là NR.115605.1, NR 104573.1, NR_042394.1. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng bằng phần mềm MEGA7 so sánh và phân tích về trình tự nucleotide chủng C3, C5 và M7 với các loài tương đồng trên Genbank (hình 3b). Kết quả chỉ ra, cả 3 chủng C3, C5 và M7 đều thuộc về loài *Lactobacillus plantarum* và kí hiệu *Lactobacillus plantarium* C3, *Lactobacillus plantarium* C5 và *Lactobacillus plantarium* M7.

4. BÀN LUẬN.

Vi khuẩn lactic là nhóm vi khuẩn an toàn (GRAS). Một số chủng vi khuẩn lactic còn được sử dụng như lợi khuẩn probiotic ngăn ngừa hiệu quả sự rối loạn hệ vi khuẩn đường ruột và thường được sử dụng trong hỗ trợ điều trị tiêu chảy. Vi khuẩn lactic ngoài sinh bacteriocin, chúng còn sinh acid hữu cơ, H₂O₂ và diacety có khả năng kháng khuẩn [4]. Bacteriocin từ vi khuẩn lactic đóng vai trò quan trọng trong bảo quản thực phẩm, bởi chúng có khả năng kháng lại một số chủng vi sinh vật gây thối hỏng và gây ngộ độc thực phẩm. Một số bacteriocin của vi khuẩn lactic đã được Tổ chức Y tế thế giới (WHO) và Tổ chức Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) cho phép sử dụng như một chất phụ gia trong bảo quản thực phẩm [8]. Do vậy, việc nghiên cứu tuyển chọn chủng vi khuẩn lactic có khả năng kháng khuẩn rộng, lên men thu nhận

bacteriocin của chủng luôn được các nhà nghiên cứu trong và ngoài nước quan tâm. Những nghiên cứu trước đây đã chỉ ra một số nghiên cứu sàng lọc chủng vi khuẩn lactic và tìm kiếm chủng sinh bacteriocin cũng từ sản phẩm lên men vùng nhiệt đới [10]. Phân loại bacteriocin được tổng hợp từ chủng *Lactococcus* [11]. Tuy nhiên, việc tìm kiếm các chủng mới và bacteriocin mới luôn được quan tâm đặc biệt. Ở Việt Nam, với nguồn ẩm thực phong phú cùng nhiều món ăn lên men đa dạng cũng là nguồn tìm kiếm chủng vi khuẩn lactic sinh bacteriocin mới.

Trong nghiên cứu này, bằng phương pháp xác định hoạt tính sơ bộ đã xác định được 33/120 chủng vi khuẩn lactic có khả năng kháng chủng *L. monocytogenes* TCC35152. Trong đó, chủng có khả năng kháng *L. monocytogenes* TCC35152 lần lượt là mẫu cà muối có 9/20 chủng, dưa cải muối có 10/30 chủng, măng chua có 4/10 chủng, nem chua có 7/30 chủng, thịt muối chua có 3/15 chủng. Điều đáng chú ý ở hai mẫu tôm chua và chượp mắm cá không tìm thấy chủng vi khuẩn lactic nào có khả năng ức chế chủng kiểm định *L. monocytogenes* ATCC35152 (bảng 1 và 2). Để tuyển chọn được chủng vi khuẩn lactic sinh tổng hợp chất kháng khuẩn có tiềm năng ứng dụng cao trong bảo quản thực phẩm như bacteriocin, chúng tôi phải loại bỏ các yếu tố cũng có thể gây ra khả năng kháng khuẩn, bằng cách chỉnh pH của dịch nuôi cấy về 6,5, loại H₂O₂ khỏi môi trường nuôi cấy. Bằng phương pháp khuếch tán trong môi trường thạch, đã tuyển chọn được 3 chủng C3, C5, và M7 có hoạt tính kháng khuẩn mạnh, ức chế được 4 chủng kiểm định gây thối hỏng và gây ngộ độc thực phẩm. Trong đó, khả năng ức chế chủng kiểm định *L. monocytogenes* TCC35152 lớn nhất (28/33 chủng), chủng kiểm định *S. aureus*

ATCC13709 là 25/33 chủng, chủng kiểm định *E. faecium* JCM5804 là 9/33 chủng và chủng kiểm định *B.cereus* ATCC11778 là 6/33 chủng. Cả 3 chủng C3, C5 và M7 luôn ổn định sau nhiều lần nuôi cấy; đồng thời, có phổ kháng khuẩn rộng, đặc biệt là ức chế được cả 4 chủng kiểm định gây bệnh và gây ngộ độc thực phẩm (bảng 3). Vì vậy, cả 3 chủng C3, C5 và M7 được chúng tôi lựa chọn cho các nghiên cứu về định loại đến loài.

Bằng cặp mồi 27F/1142R, đã khuếch đại được đoạn gen 16S ARN đặc hiệu, kích thước khoảng 1500 bp của 3 chủng C3, C5 và M7 (hình 3a). Các trình tự gen của 3 chủng này được so sánh với dữ liệu nguồn gen và phân tích bằng BLAST trên Genbank. Kết quả cả 3 chủng C3, C5 và M7 đều có độ tương đồng cao (lần lượt là 99,93%, 99,93% và 100%) với mã số (accession numbers) trên Genbank lần lượt là NR.115605.1, NR 104573.1, NR_042394.1. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng bằng phần mềm MEGA7 so sánh và phân tích về trình tự nucleotide chủng C3, C5 và M7 với các loài tương đồng trên Genbank (hình 3b). Kết quả chỉ ra, cả 3 chủng C3, C5 và M7 đều thuộc về loài *Lactobacillus plantarum*, được kí hiệu *Lactobacillus plantarium* C3, *Lactobacillus plantarium* C5 và *Lactobacillus plantarium* M7. Đáng chú ý, 3 chủng *Lactobacillus plantarium* C3, C5, M7 được phân lập từ thực phẩm lên men truyền thống ở các địa phương của Việt Nam, có khả năng kháng khuẩn mạnh và ổn định; đồng thời kháng lại 4 chủng vi sinh vật kiểm định gây thối hỏng và ngộ độc thực phẩm. Do vậy, cả 3 chủng C3, C5 và M7 có tiềm năng ứng dụng như một chủng khởi động cho quá trình lên men trong bảo quản thực phẩm với tiêu chí tiêu diệt và loại trừ vi sinh vật gây bệnh trong thực phẩm, vừa có thể sử dụng như sản phẩm probiotic cho người. Đồng thời, kết quả này góp phần hữu ích nhằm định hướng ứng dụng chủng trong việc tạo thực phẩm bổ sung, giúp tăng cường miễn dịch trong dự phòng, điều trị bệnh do nhiễm vi sinh vật gây bệnh và ngộ độc thực phẩm ở người. Tuy nhiên, cần phải có các nghiên cứu thêm trước khi được ứng dụng vào thực tiễn.

5. KẾT LUẬN.

Nghiên cứu đã phân lập được 120 chủng vi khuẩn lactic từ 7 nguồn thực phẩm lên men truyền thống ở các địa phương của Việt Nam, trong đó có 33 chủng có khả năng kháng từ 1 đến 4 chủng vi sinh vật kiểm định gồm *E. faecium* JCM5804, *L. monocytogenes* ATCC35152, *S. aureus* ATCC13709 và *B. cereus* ATCC11778. Trong số đó, đã xác định được 3 chủng C3, C5, M7 có phổ kháng khuẩn rộng, kháng được cả 4 chủng vi khuẩn kiểm định, đường kính vòng kháng khuẩn

giao động trong khoảng từ 6 đến 15 mm. Cả 3 chủng C3, C5, M7 được định danh đều thuộc về loài *Lactobacillus plantarum*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. <https://giadinh.net.vn/y-te/moi-nam-viet-nam-co-khoang-250-500-vu-ngo-doc-thuc-pham-20161219123846395.htm>
2. Brandy N Roberts, Damayanti Chakravarty, J.C Gardner III, Steven C, Ricke, Janet R Donaldson (2020), "Listeria monocytogenes Response to Anaerobic Environments", *Pathogens* 2020, 9, 210; doi:10.3390/pathogens9030210.
3. Thomas Bintsis (2017), *Foodborne pathogens: Review*, AIMS Microbiology, Volume 3, Issue 3, 529-563.
4. Axelsson L (2004). Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. Marcel Dekker, Inc.
5. Chen W, Narbad A (2018), "LAB in Foodborne Hazards Reduction: Physiology to Practice", (*Springer*).
6. Hoa Thị Minh Tú, Nguyễn La Anh, Lê Thanh Bình (2012), Phân loại chủng vi khuẩn Lactococcus PD14 tổng hợp bacteriocin, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 50 (5), tr. 633-641.
7. Abbasiliasi S, Tan J.S, Ibrahim T.A.T, Ramanan R.N, Vakhshiteh F, Mustafa S, Ling T.C, AbdulRahim R, Ariff A (2012), "Isolation of Pediococcus acidilactici Kp10 with ability to secrete bacteriocin-like inhibitory substance from milk products for applications in food industry", *BMC Microbiology*, 12, 260-271.
8. Schillinger U, Lucke F.K (1989), *Antibacterial Activity of Lactobacillus sake Isolated from Meat*, *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 1901 - 1906.
9. Cintas L.M, Herranz C, Hernández P.E, Casaus M.P and Nes L.F (2001), "Bacteriocins of lactic acid bacteria", *Food Sci. Tech*, Int. 7: 281-305.
10. Cao-Hoang Lan, Chu-Ky Son, Ho Phu Ha, Husson Florence, Le Thanh Binh, Le-Thanh Mai, Nguyen Thi Hoai Tram, Tran Thi Minh Khanh, Tu Viet Phu, Valentin Dominique, Wache' Yves (2013), "Tropical traditional fermented food, a field full of promise. Examples from the Tropical Bioresources and Biotechnology programme and other related French-Vietnamese programmes on fermented food", *International Journal of Food Science and Technology*, 1-12.
11. Hoa Thị Minh Tú, Nguyễn La Anh, Lê Thanh Bình (2013), Identification of the bacteriocin producing by Lactococcus lactis subsp. lactis PD14, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 51 (4), 417-425. □