



KHẢ NĂNG KHÁNG *Vibrio* spp. VÀ ĐẶC TÍNH PROBIOTIC CỦA *Lactobacillus farciminis* HN12

Trịnh Thị Phương Thảo¹, Lê Thị Kim Thoa¹, Bùi Thị Khuyên², Nguyễn Thị Minh Nga²,
Trương Thị Phương Lan³, Vũ Đức Hoàng⁴, Nguyễn Đức Huy^{2*}

¹Đại học Quốc gia Jeonbuk, Jeonju, Hàn Quốc

²Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế, tỉnh lộ 10, Phú Thượng, Phú Vang, Thừa Thiên Huế, Việt Nam

³Trường đại học Y Dược, Đại học Huế, Huế, Việt Nam

⁴Trường đại học Sư phạm, Đại học Đà Nẵng, Đà Nẵng, Việt Nam

Tóm tắt. Trong nghiên cứu này, chủng vi khuẩn lactic có khả năng đối kháng với *Vibrio parahaemolyticus* đã được phân lập từ mussels. So sánh trình tự nucleotide 16S rRNA, chúng tôi nhận thấy chủng phân lập tương đồng cao với *Lactobacillus farciminis* và đặt tên là *L. farciminis* HN12. Chủng phân lập có hoạt tính kháng *V. parahaemolyticus* mạnh với hoạt độ 460 AU/mL và thể hiện hoạt tính kháng với 20 chủng *Vibrio* spp. phân lập từ tôm và cá bị nhiễm bệnh với hoạt tính kháng khuẩn dao động từ 160 đến 400 AU/mL. Chủng phân lập cũng có khả năng sống sót trong điều kiện bất lợi như sự có mặt của muối mật và NaCl ở nồng độ cao. Hoạt tính tự kết dính là 34,88% và hoạt tính đồng kết dính với *E. coli* là 59,05%. Chủng này bị ampicillin và chloramphenicol ức chế. *L. farciminis* HN12 với khả năng kháng khuẩn tốt và các đặc tính của lợi khuẩn có tiềm năng sử dụng để tạo chế phẩm sinh học cung cấp trong ngành chăn nuôi thủy sản.

Từ khóa: hoạt tính kháng khuẩn, *Lactobacillus farciminis*, nuôi trồng thủy sản, probiotic, *Vibrio* spp.

Antimicrobial activity against *Vibrio* spp. and probiotic potential of *Lactobacillus farciminis* HN12

Trịnh Thị Phương Thảo¹, Lê Thị Kim Thoa¹, Bùi Thị Khuyên², Nguyễn Thị Minh Nga²,
Trương Thị Phương Lan, Vũ Đức Hoàng⁴, Nguyễn Đức Huy^{2*}

¹Jeonbuk National University, Jeonju, South Korea

²Institute of Biotechnology, Hue University, Road 10, Phu Thuong, Phu Vang, Thua Thien Hue, Vietnam

³University of Medicine and Pharmacy, Hue University, Hue, Vietnam

⁴University of Science and Education, The University of Danang, Danang, Vietnam

* Liên hệ: ndhuy@hueuni.edu.vn

Abstract. In this study, a lactic acid bacterium that is able to inhibit *V. parahaemolyticus* was isolated from fermented food “mam nem”. The nucleotide sequence of 16S rRNA comparison with the Genbank database indicates that the isolate exhibits high similarity with *Lactobacillus farciminis* and is named *L. farciminis* HN12. The isolate displays strong activity against *V. parahaemolyticus* at 460 AU/mL and inhibits the growth of 20 *Vibrio* spp. strains isolated from infected shrimp and fish with antibacterial activity ranging from 160 to 400 AU/mL. This strain also shows the ability to survive under stress conditions, such as the presence of bile salts and high NaCl concentrations. Its autoaggregation activity is 34.88%, and its coaggregation activity with *E. coli* is 59.05%. The isolate is inhibited by ampicillin and chloramphenicol. *L. farciminis* HN12 exhibits good antibacterial properties and has the properties of beneficial bacteria, which can potentially be used as probiotics for the aquaculture industry.

Keywords: antibacterial activity, aquaculture, *Lactobacillus farciminis*, probiotic, *Vibrio* spp.

1 Mở đầu

Nuôi trồng thủy sản đã trở thành một ngành sản xuất thực phẩm phổ biến và là nguồn cung cấp nguyên liệu cho công nghiệp thực phẩm và mặt hàng xuất khẩu có giá trị cao. Các bệnh do vi khuẩn và vi rút gây ra được coi là một vấn đề quan trọng trong việc nuôi thâm canh nhuyễn thể, cá, tôm hùm và tôm. Trong các đợt bùng phát dịch bệnh, tỷ lệ chết có thể cao tới 100%. Các chủng gây bệnh thuộc các loài *Vibrio harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* và *V. anguillarum* gây ra những tổn thất nghiêm trọng trong quá trình nuôi động vật thân mềm, cá và tôm [1]. Thuốc kháng sinh đã được sử dụng rộng rãi để kiểm soát vấn đề này. Tuy nhiên, việc sử dụng điều trị kháng sinh chống lại sự lây nhiễm vi khuẩn bị hạn chế rất nhiều trong nuôi trồng thủy sản do sự tồn dư của nó và dẫn đến sự phát triển tính kháng kháng sinh của vi khuẩn. Do đó, chế phẩm sinh học được sử dụng rộng rãi để quản lý dịch bệnh trong nuôi trồng thủy sản [2].

Việc sử dụng chế phẩm sinh học phổ biến trong ngành nuôi trồng thủy sản (đặc biệt trong nuôi tôm) như một phương tiện kiểm soát dịch bệnh, cải thiện chất lượng nước bằng cách cân bằng lượng dinh dưỡng sẵn có và thay thế việc sử dụng kháng sinh và chất khử trùng trong một số trường hợp [2]. Probiotics được biết là ngăn chặn mầm bệnh bằng cách phá vỡ sự biểu hiện gen độc lực và sự kết dính tế bào với mầm bệnh [3]. Vi khuẩn probiotic cũng có thể cạnh tranh với các mầm bệnh để giành không gian và chất dinh dưỡng có sẵn trên bề mặt vật chủ [4]. Nhiều chủng probiotic tạo ra chất kháng khuẩn, chẳng hạn như enzym lytic là các enzyme có khả năng thủy phân thành tế bào vi khuẩn. Bên cạnh đó còn có bacteriocin, hydrogen peroxide và acid hữu cơ [5]. Vi khuẩn lactic (LAB) là nhóm vi khuẩn có khả năng tạo ra nhiều chất kháng khuẩn.

Vi khuẩn lactic bao gồm ít nhất mười chi phân loại đại diện cho *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* và

Vasococcus [6]. Chúng được tìm thấy trong nhiều loại thực phẩm lên men và được sử dụng rộng rãi để nuôi cấy khởi đầu cho các quá trình lên men. Nhiều vi khuẩn acid lactic thể hiện các hoạt động đối kháng với các vi khuẩn khác, bao gồm các sinh vật làm hỏng thực phẩm và các mầm bệnh từ thực phẩm.

Một số tác giả trước đây đã công bố về khả năng kháng khuẩn *in vitro* của các chủng LAB chống lại các vi khuẩn *Vibrio* spp. khác nhau [7] như *V. parahaemolyticus* [8] và *V. cholerae* [9]. Với cơ sở này, chúng tôi tiến hành phân lập vi khuẩn lactic từ thực phẩm lên men, nghiên cứu các hoạt động kháng *Vibrio* spp. phân lập từ tôm, cá bị nhiễm bệnh và các đặc tính lợi khuẩn của các dòng phân lập được chọn với ý tưởng tìm ra được các chủng vi khuẩn lactic có khả năng kháng *Vibrio* spp. mạnh có tiềm năng sử dụng để tạo chế phẩm probiotic cung cấp trong ngành chăn nuôi thủy sản.

2 Phương pháp

2.1 Phân lập vi khuẩn lactic

Mẫu mắm nêm được mua tại Chợ Đông Ba, thành phố Huế, tỉnh Thừa Thiên Huế, và mang về phòng thí nghiệm để tiến hành phân lập vi khuẩn. Một gam mẫu được đồng hóa trong 100 mL dung dịch muối sinh lý, sau đó hút 200 μ L dịch này chuyển qua ống nghiệm chứa 5 mL môi trường MRS đã được hấp khử trùng, ủ ở 30 °C trong 24 giờ ở điều kiện kỵ khí.

Sau khi ủ, dịch nuôi cấy được cấy chuyển qua môi trường MRS agar. Khuẩn lạc đơn được chọn lọc và tiếp tục cấy chuyển lên môi trường MRS bốn lần để thuần khiết khuẩn lạc. Những khuẩn lạc trắng đục hoặc trắng trong, không màu, bờ láng, lồi, bìa nguyên, nằm trên đường cấy chuyển và không lẫn với những khuẩn lạc có hình thái và màu sắc lạ, có khả năng phân giải CaCO_3 được bổ sung trong môi trường được chọn lọc cho nghiên cứu tiếp theo [10].

2.2 Khảo sát khả năng kháng khuẩn

Chủng vi khuẩn được sàng lọc khả năng đối kháng với các chủng vi khuẩn chỉ thị bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch với một vài điều chỉnh nhỏ [11]. Chủng vi khuẩn chỉ thị là *V. parahaemolyticus* và các chủng *Vibrio* spp. phân lập từ tôm và cá bị nhiễm bệnh đang lưu giữ tại Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế.

Dịch huyền phù của dòng chỉ thị được nhân sinh khối và điều chỉnh để đạt mật độ 10^8 tế bào/mL. 50 μ L dịch nuôi cấy được cấy trải lên môi trường LB đã hấp khử trùng sẵn. Các giếng với đường kính 6 mm được tạo trên trên mặt môi trường bằng thanh kim loại vô trùng. Vi khuẩn lactic được nhân sinh khối trong 5 mL môi trường MRS, lắc 180 vòng/phút ở 30 °C. Sau 24 giờ

nuôi cấy, mật độ tế bào được điều chỉnh đến giá trị 10^8 tế bào/mL và ly tâm ở 8.000 vòng/phút trong 15 phút ở $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ để loại bỏ tế bào. 50 μL dung dịch sau ly tâm được cho vào từng giếng trên đĩa thạch đã chứa vi khuẩn chỉ thị. Mẫu được ủ ở $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 15 phút đến khi dung dịch trong giếng khuếch tán đều. Sau đó, đĩa được tiếp tục ủ ở $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 24 giờ và kiểm tra đường kính vòng vô khuẩn (zone diameter of inhibition – ZDI) xuất hiện trên bề mặt đĩa. Hoạt tính kháng khuẩn được tính theo công thức: $\text{AU/mL} = (\text{ZDI} \times 1000)/V$. Trong đó: ZDI là đường kính vòng vô khuẩn (mm) và V là thể tích dịch nuôi cấy sau khi ly tâm của vi khuẩn lactic (μL).

2.3 Định danh phân tử

DNA của chủng vi khuẩn được tách chiết theo phương pháp của Sambrook và cs. DNA tổng số được điện di kiểm tra trên gel agarose 1% ở điện thế 80 V trong 55 phút. Gel được quan sát dưới đèn tử ngoại [12]. Sau khi kiểm tra chất lượng bằng điện di trên gel agarose 0,8%, DNA tổng số được sử dụng làm khuôn mẫu cho phản ứng PCR khuếch đại trình tự 16S rRNA bằng cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1492R (5' GGTTACCTTGTTACGACTT-3). Thành phần PCR bao gồm 6 μL master mix, 10 pmol mỗi primer, 50 ng genomic DNA và nước cất vừa đủ 12 μL . Sau khi được biến tính ở $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 5 phút, chu trình nhiệt PCR bao gồm các bước biến tính $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 1 phút, bắt cặp $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 1 phút, kéo dài $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 1 phút 30 giây, lặp lại 30 chu kỳ. Sau đó, phản ứng PCR được thực hiện ở $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 10 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di agarose gel 0,8%.

Sản phẩm PCR gen 16S rRNA được giải trình tự nucleotide tại công ty Firstbase (Malaysia) theo phương pháp Sanger bằng máy giải trình tự gen Applied Biosystems® Genetic Analyzers. Các trình tự nucleotide được phân tích bằng phần mềm Bioedit (Version 7.2.6.1) và trình tự nucleotide hoàn chỉnh được so sánh dữ liệu nucleotide của NCBI (National Center for Biotechnology Information). Cây phát sinh loài được xây dựng sử dụng phần mềm MEGA 11 với hệ số bootstrap 1000 lần lặp lại [13].

2.4 Khả năng chịu mặn

Khuẩn lạc vi khuẩn từ môi trường MRS agar trên đĩa Petri được cấy chuyển vào MRS lỏng và tiến hành nuôi cấy ở $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 24 giờ. Sinh khối sau khi nuôi cấy được thu nhận bằng cách ly tâm ở 5.000 vòng/phút ở $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 5 phút. Sinh khối được tiếp tục tái huyền phù trong nước muối sinh lý và điều chỉnh để $\text{OD}_{600\text{ nm}} = 1$. Sau đó, tiến hành phân phối vào mỗi Eppendorf 100 μL huyền phù và 900 μL môi trường MRS bổ sung thêm NaCl ở các nồng độ 5, 10, 15 và 20% (w/v). Đo $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ tại các thời điểm 0 giờ và 48 giờ ủ ở $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ [14].

2.5 Khả năng chịu acid

Nuôi sinh khối các khuẩn lactic qua đêm. Ly tâm thu sinh khối, rửa bằng muối sinh lý khoảng hai lần, tái huyền trong 1 mL dung dịch muối sinh lý, điều chỉnh $OD_{600\text{ nm}} = 1$. Trộn 1 mL dịch sau khi tái huyền phù với 24,5 mL dung dịch NaCl 0,2% ở pH 3, 4, 5 và 6 (pH được chỉnh bằng HCl 5 M). Mẫu được lấy theo các mốc 0, 3, 6, 9 và 12 giờ và được pha loãng liên tiếp theo tỷ lệ pha loãng 10 lần bằng pepton 0,1% và trải 50 μL lên MRS agar. Mẫu được ủ 48 giờ và đếm khuẩn lactic đơn [15].

2.6 Khả năng chịu muối mật

Khả năng dung nạp mật ở các nồng độ khác nhau của vi khuẩn lactic được đánh giá theo phương pháp của Zheng và cs. với một số thay đổi nhỏ. Vi khuẩn lactic nuôi qua đêm được cấy vào môi trường MRS 10 mL (pH 6,4) bổ sung 0,3, 0,5 và 1% muối mật. Các mẫu cấy được ủ ở 25 °C trong 24 giờ, độ hấp thụ được đo ở bước sóng 600 nm và so sánh với môi trường nuôi cấy đối chứng (không có muối mật). Kết quả được biểu thị bằng phần trăm tăng trưởng khi có muối mật đối với đối chứng [16].

2.7 Khả năng kháng kháng sinh

Khả năng kháng kháng sinh của chủng vi khuẩn được tiến hành bằng cách nuôi khuẩn lactic của chủng trên môi trường 5 mL MRS có bổ sung kháng sinh (sulfapiridine, sulfathiazole, sulfamethoxazole, oxytetracyclin hydrochloride, chlortetracyclin hydrochloride, kanamycin, ampicilin và chloranphenicol) và đối chứng không bổ sung kháng sinh ở 37 °C trong 24 giờ. Nồng độ kháng sinh dao động trong khoảng từ 25 đến 500 $\mu\text{g/mL}$. Mật độ tế bào được xác định bằng cách đo tại $OD_{600\text{ nm}}$.

2.8 Khả năng tự kết dính và đồng kết dính

Khả năng tự kết dính

Thử nghiệm khả năng tự kết dính được thực hiện theo Li và cs. Dịch nuôi cấy (4 mL) vi khuẩn lactic chứa khoảng 4×10^8 tế bào được ly tâm ở 12.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4 °C. Sinh khối tế bào được tái huyền phù trong 4 mL dung dịch PBS 150 mM (pH 7) và ủ ở 37 °C trong năm giờ. 100 μL được rút đều đặn trong khoảng thời gian một giờ từ huyền phù trên và trộn trong 3,9 mL PBS 150 mM (pH 7) và đo $OD_{600\text{ nm}}$ [17]. Phần trăm tự kết dính ($Aa\%$) được tính theo công thức sau:

$$Aa\% = (1 - A_t/A_0) \times 100$$

trong đó A_t là độ hấp thụ tại thời điểm $t = 1, 2, 3, 4$ và 5 giờ và A_0 là độ hấp thụ tại $t = 0$ giờ.

Khả năng đồng kết dính

Thử nghiệm về khả năng đồng kết dính được thực hiện theo Valeriano và cs. Các mẫu cho thử nghiệm đồng kết dính được chuẩn bị giống như tự kết dính. Dịch nuôi cấy (4 mL) vi khuẩn lactic và *E. coli* chứa khoảng 2×10^8 CFU; mỗi mẫu được ly tâm ở 12.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4 °C. Sinh khối tế bào của cả hai được tái huyền phù riêng biệt trong 2 mL dung dịch đệm sodium phosphate 0,1 M (pH 7). Trộn lẫn hai huyền phù tế bào với thể tích bằng nhau (2 mL) và ủ ở 37 °C trong 5 giờ. Các ống chứa 4 mL huyền phù vi khuẩn được lấy làm đối chứng. Các lượng nhỏ 100 µL được rút đều đặn trong khoảng thời gian một giờ từ phần trên của huyền phù và trộn với 3,9 mL dung dịch đệm tương tự và đo độ hấp thụ ở bước sóng 600 nm [18]. Tỷ lệ đồng kết dính (Ca%) được tính theo công thức:

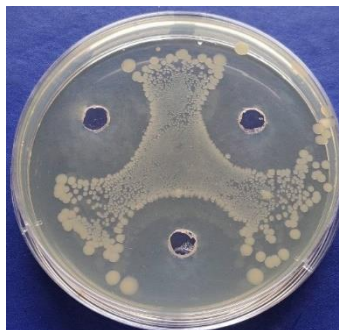
$$Ca\% = \frac{(Ax + Ay)/2 - A(x+y)}{(Ax + Ay)/2} \times 100$$

trong đó Ax là OD_{600 nm} của vi khuẩn lactic; Ay là OD_{600 nm} của *E. coli*; A(x+y) là OD_{600 nm} vi khuẩn lactic và *E. coli*.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Phân lập vi khuẩn lactic

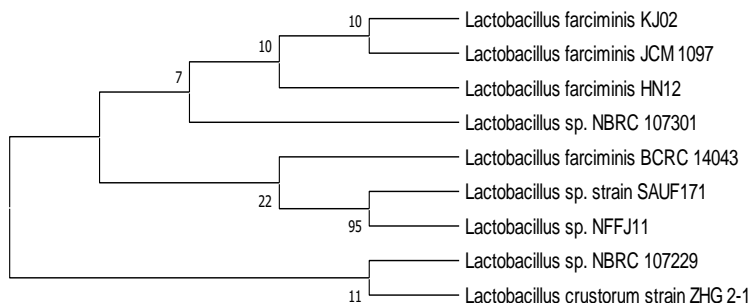
Từ mẫu mứt nêm, chúng tôi phân lập được chủng vi khuẩn có khả năng phân giải CaCO₃ và được bổ sung trong môi trường đặc hiệu MRS agar. Chủng vi khuẩn được sàng lọc sơ bộ khả năng kháng vi khuẩn chỉ thị *V. parahaemolyticus*. Kết quả cho thấy chủng vi khuẩn phân lập có khả năng đối kháng mạnh với *V. parahaemolyticus*. Hoạt tính kháng khuẩn thu được là 460 AU/mL (Hình 1). Chủng phân lập cho hiệu quả đối kháng cao hơn chủng vi khuẩn *L. farciminis* HN11 phân lập từ mứt nêm [19] và các chủng *Wessialla cibaria* và *Lactococcus garvieae* phân lập từ hệ tiêu hóa tôm [20, 21]. Chủng phân lập được ký hiệu là HN12. Do đặc tính đối kháng mạnh, chủng vi khuẩn đã được tiếp tục nghiên cứu.



Hình 1. Vòng đối kháng *V. parahaemolyticus* của chủng HN12

3.2 Định danh phân tử

Chủng HN12 được tiến hành định danh phân tử với cặp mồi 27F và 1492R. Kết quả phân tích trình tự gen 16S rRNA cho thấy chủng HN12 tương đồng 100% với chủng *Lactobacillus farciminis* KJ02 và *L. farciminis* JCM1097. Do đó, chủng này được đặt tên là *L. farciminis* HN12, mã số đăng ký trên Genbank là MT472127. Cây phát sinh di truyền của *L. farciminis* HN12 được trình bày trên Hình 2.



Hình 2. Cây phát sinh loài của *L. farciminis* HN12 và một số chủng *Lactobacillus* khác trên Genbank. Cây phát sinh được xây dựng dựa trên thuật toán Maximum Likelihood method. Cây có mức độ tương đồng likelihood cao nhất được lựa chọn. Các chữ số biểu diễn phần trăm của cây phát sinh có liên quan đến nhóm phân loại tiếp theo.

3.3 Khảo sát khả năng kháng khuẩn

Tiến hành khảo sát khả năng kháng khuẩn của chủng *L. farciminis* HN12 với 20 vi khuẩn *Vibrio* spp. phân lập từ tôm cá bị nhiễm bệnh. Kết quả cho thấy chủng HN12 có khả năng kháng được toàn bộ các chủng *Vibrio* sp. thử nghiệm. Hoạt tính đối kháng dao động từ 160 đến 400 AU/mL. Trong đó, *L. farciminis* HN12 có hoạt tính đối kháng mạnh với chín chủng *Vibrio* sp. với hoạt tính trên 280 AU/mL (Bảng 1).

Bảng 1. Hoạt tính kháng một số chủng *Vibrio* sp. của *L. farciminis* HN12

STT	Ký hiệu chủng <i>Vibrio</i> sp.	Hoạt tính kháng khuẩn (AU/mL)
1	VC 1	240
2	VC 5	240
3	VC 9	220
4	VC 12	220
5	VTX 1a	200
6	VTX 1b	220

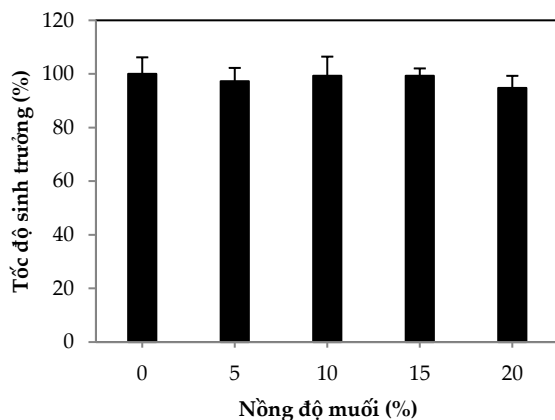
STT	Ký hiệu chủng <i>Vibrio</i> sp.	Hoạt tính kháng khuẩn (AU/mL)
7	VTVX 2a	200
8	VTVX 2b	220
9	VTVX 3a	400
10	VTVX 3b	300
11	VTVX 4a	320
12	VTVX 4b	300
13	VCVX 3	280
14	C I 1	240
15	C II 1	260
16	C III 1	300
17	C IV 1	320
18	VTV V1	320
19	VTV V3	160
20	VTV V4	360

3.4 Khả năng chịu mặn

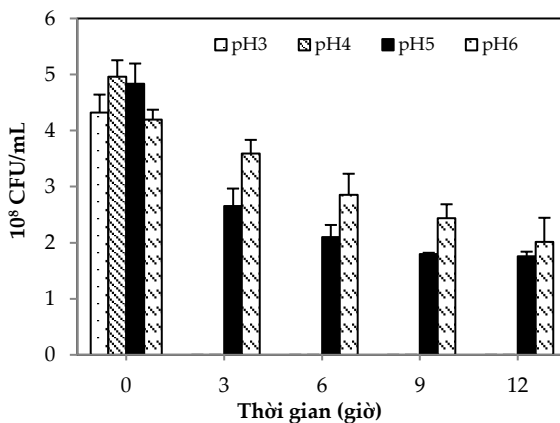
Để đánh giá khả năng chịu mặn, chúng tôi nuôi *L. farciminis* HN12 trong môi trường chứa NaCl từ 0 đến 20%. Kết quả cho thấy nồng độ muối càng cao thì tốc độ sinh trưởng của chủng HN12 giảm dần. Tuy nhiên, ở nồng độ muối 20%, tổng độ sinh trưởng vẫn đạt 94,8%. Như vậy, *L. farciminis* HN12 là chủng có khả năng chịu mặn tốt (Hình 3). Các kết quả nghiên cứu trước đây cũng cho rằng các chủng vi khuẩn lactic phân lập từ các loại thực phẩm lên men có khả năng chịu mặn cao. Các chủng *Tetragenococcus halophilus* phân lập từ mắm cá com có khả năng chịu được nồng độ muối cao từ 10 đến 23% [22]. Chủng *L. farciminis* NM6 phân lập từ nước mắm có khả năng chịu NaCl ở nồng độ từ 10 đến 25% [23].

3.5 Khả năng chịu acid

Chủng *L. farciminis* HN12 được kiểm tra khả năng chịu đựng trong các pH khác nhau. Kết quả ở Hình 4 cho thấy pH ảnh hưởng lớn tới khả năng sống sót của chủng vi khuẩn. Ở pH 3 và 4 sau ba giờ ủ trong dung dịch NaCl 0,2%, chủng vi khuẩn này bị ức chế hoàn. Ở pH 5 và 6, số lượng tế bào sống sót sau 12 giờ là $1,76 \times 10^8$ và $2,01 \times 10^8$ CFU/mL.



Hình 3. Ảnh hưởng của nồng độ muối đến tốc độ sinh trưởng của *L. farciminis* HN12

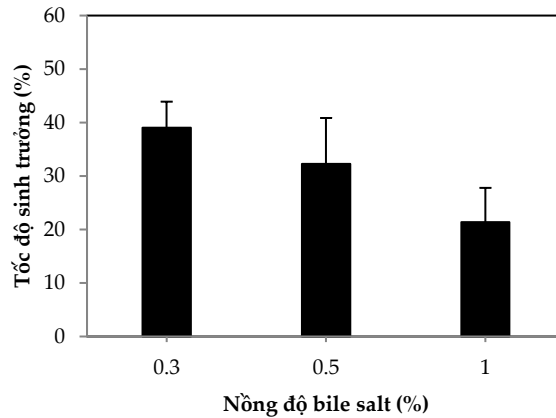


Hình 4. Ảnh hưởng của pH đến khả năng sống của *L. farciminis* HN12

3.6 Khả năng chịu muối mật

Muối mật hoạt động như một chất tẩy rửa sinh học, làm phá hủy màng tế bào vi khuẩn. Muốn tồn tại được, vi khuẩn phải có khả năng chịu muối mật [23, 24]. Vì thế, khả năng chịu muối mật là một đặc tính quan trọng cần có của vi khuẩn lactic.

Khả năng chịu muối mật của *L. farciminis* HN12 được kiểm tra ở nồng độ 0,3, 0,5 và 1%. Kết quả cho thấy tỷ lệ sống sau 24 giờ của chủng HN12 giảm dần khi nồng độ muối mật tăng lên; tỷ lệ sống ở các nồng độ lần lượt là 39,01, 32,25 và 21,39% (Hình 5).



Hình 5. Ảnh hưởng của nồng độ muối mật đến sinh trưởng của *L. farciminis* HN12

Khả năng chịu muối của mật cũng được coi là một tiêu chí lựa chọn quan trọng đối với các chủng probiotic để tồn tại trong trong ruột non. Akalu và cs. cho biết trong số 30 loài LAB được thử nghiệm thì 17 loài *Lactobacillus* phân lập từ Shamita và Kocho lên men theo cách truyền thống của Ethiopia chịu được môi trường chứa 0,3% muối mật với tỷ lệ sống 74–95% sau 24 giờ [25]. Ngược lại, Boke và cs. công bố rằng các chủng *Lactobacillus* B3, G12, A13 và 22 thể hiện mức độ chịu đựng thấp với 0,3% muối mật với tỷ lệ sống sót lần lượt là 36, 33, 3 và 3% [26].

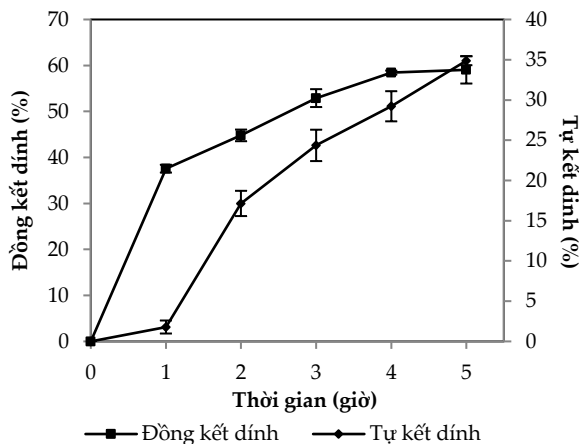
3.7 Khả năng kháng kháng sinh

Khả năng kháng kháng sinh của chủng *L. farciminis* HN12 được đánh giá trên các loại kháng sinh khác nhau ở nồng độ 25–500 µg/mL. Kết quả cho thấy chủng vi khuẩn này có khả năng kháng sulfapiridine, sulfathiazole, sulfamethoxazole, oxytetracyclin hydrochloride, chlortetracyclin hydrochloride và kanamycin ở nồng độ 500 µg/mL. Chủng này bị ampicillin và chloramphenicol ức chế ở nồng độ 25 µg/mL. Halami và cs. công bố rằng chủng *L. farciminis* MD có khả năng kháng ceftazidime và cloxacillin nhưng lại bị ampicillin, kanamycin, tetracyclin, penicillin, gentamicin ức chế [27]. Chủng *L. plantarum* HLX37, theo Guan và cs., có khả năng kháng penicillin, amikacin, tobramycin, kanamycin, streptomycin và vancomycin [28]. Như vậy, tính nhạy cảm và kháng kháng sinh của các chủng *Lactobacillus* là khác nhau.

3.8 Khả năng tự kết dính và đồng kết dính

Hoạt tính kết dính của *L. farciminis* HN12 tăng lên theo thời gian và khác nhau trong các điều kiện khác nhau. Khả năng tự kết dính và đồng kết dính của chủng này tương đối cao, với tỷ lệ tự kết dính 34,88% và tỷ lệ đồng kết dính với *E. coli* là 59,05% sau năm giờ. Tou và cs. cho biết

ràng hoạt tính tự kết dính của 22 chủng *Lactobacillus* dao động từ 24,16 đến 41,39% sau năm giờ ủ ở 37 °C và hoạt tính đồng kết dính với *E. coli* dao động từ 21,36 đến 32,16% [29].



Hình 6. Hoạt tính tự kết dính và đồng kết dính của *L. farciminis* HN12 theo thời gian

Trong hầu hết các trường hợp, khả năng tự kết dính liên quan đến đặc tính kết dính của tế bào và cũng liên quan đến khả năng tồn tại của chúng trong đường tiêu hóa [30]. Đặc tính này có thể mang lại lợi thế cạnh tranh quan trọng đối với việc duy trì vi khuẩn trong đường tiêu hóa của con người [31].

Hoạt tính đồng kết dính đóng vai trò quan trọng trong việc loại bỏ mầm bệnh khỏi đường tiêu hóa [32]. Các chủng *Lactobacillus* có thể tạo thành một hàng rào ngăn cản sự xâm nhập của vi khuẩn gây bệnh thông qua quá trình đông tụ [30]. Sự kết tụ với mầm bệnh tiềm ẩn cho phép chủng probiotic tạo ra các chất kháng khuẩn ở rất gần chúng, có thể ức chế sự phát triển của các chủng gây bệnh trong đường tiêu hóa.

4 Kết luận

Từ các mẫu thực phẩm lên men, chúng tôi phân lập được 13 chủng vi khuẩn lactic có khả năng đối kháng với *V. parahaemolyticus*. Trong đó, chủng *L. farciminis* HN12 phân lập từ mắm nêm có hoạt tính kháng *V. parahaemolyticus* mạnh nhất (460 AU/mL) và kháng với 20 chủng *Vibrio* spp. phân lập từ tôm và cá bị nhiễm bệnh với hoạt tính kháng khuẩn dao động từ 160 đến 400 AU/mL. Tỷ lệ sống sót của chủng này là 21,39% ở nồng độ muối mật 1% và 98,4% ở nồng độ NaCl 25%. Hoạt tính tự kết dính là 34,88% và hoạt tính đồng kết dính với *E. coli* là 59,05%. Chủng này bị ampicillin và chloramphenicol ức chế ở nồng độ 25 µg/mL. *L. farciminis* HN12 có khả năng kháng khuẩn tốt và có các đặc tính của lợi khuẩn và tiềm năng sử dụng để tạo chế phẩm probiotic cung cấp cho ngành chăn nuôi thủy sản.

Thông tin tài trợ

Nghiên cứu này được Bộ Giáo dục và Đào tạo tài trợ trong đề tài khoa học và công nghệ cấp Bộ, mã số B2020-DHH-18. Nhóm tác giả cảm ơn sự hỗ trợ một phần từ chương trình nhóm nghiên cứu mạnh Đại học Huế trong đề tài mã số NCM.DHH.2020.11.

Tài liệu tham khảo

1. Iyapparaj P, Maruthiah T, Ramasubburayan R, Prakash S, Kumar C, Immanuel G, Palavesam A. Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus* sp. MSU3IR against shrimp bacterial pathogens. *Aquatic Biosystems*. 2013;9(12):1-10.
2. Balcazar J, de Blas I, Ruiz-Zarzuola I, Cunningham D, Vendrell D, Muzquiz J. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*. 2006;114:173–86.
3. Medellin-Peña M, Wang H, Johnson R, Anand S, Griffiths M. Probiotics affect virulence-related gene expression in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007;73(13):4259–67.
4. Ravi A, Musthafa K, Jegathammbal G, Kathiresan K, Pandian S. Screening and evaluation of probiotics as a biocontrol agent against pathogenic *Vibrios* in marine aquaculture. *Letters in Applied Microbiology*. 2007;45:219–23.
5. De Vrese D, Schrezenmeir M. A comprehensive review that critically evaluates modes of actions and medicinal applications of prebiotics and synbiotics. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 2008;111:1–66.
6. Bintsis T. Lactic acid bacteria: their applications in foods. *Journal of Bacteriology & Mycology*. 2018;6(2):89–94.
7. Koga T, Mizobe T, Takumi K. Antibacterial activity of *Lactobacillus* species against *Vibrio* species. *Microbiological Research*. 1998;153:271–5.
8. Shokryazdan P, Sieo C, Kalavathy R, Liang J, Alitheen N, Faseleh Jahromi M, et al. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains with antimicrobial activity against some human pathogenic strains. *BioMed Research International*. 2014;2014:927268.
9. Petrova P, Petrov K. Antimicrobial activity of starch-degrading *Lactobacillus* strains isolated from boza. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2011;25:114–6.
10. Vantsawa PA, Maryah UT, Bulus T. Isolation and Identification of lactic acid bacteria with probiotic potential from fermented cow milk (Nono) in Unguwar Rimi Kaduna State Nigeria. *American Journal of Molecular Biology*. 2017;7(2):99-106.
11. Tagg J, McGiven A. Assay system for bacteriocins. *Journal of Applied Microbiology*. 1971;21:943–4.

12. Sambrook J, Maccallum P, Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manua*. 3rd, editor. Cold Spring Harbor Press: NY; 2001.
13. Tamura K, Stecher G, Kumar S (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*; 38(7):3022-7.
14. Kobayashi T, Kajiwara M, Wahyuni M, Hamada-Sato N, Imada C, Watanabe E. Effect of culture conditions on lactic acid production of *Tetragenococcus* species. *Journal of Applied Microbiology*. 2004;96:1215-21.
15. Maragkoudakis PA, Zoumpopoulou G, Miaris C, Kalantzopoulos G, Pot B, Tsakalidou E. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*. 2006;16:189-99.
16. Zheng YC, Lu YL, Wang JF, Yang LF, Pan CY, Huang Y. Probiotic Properties of *Lactobacillus* Strains Isolated from Tibetan Kefir Grains. *PloS One* 2013;8:e69868.
17. Li M, Wang Y, Cui H, Li Y, Sun Y, Qiu HJ. Characterization of lactic acid bacteria isolated from the gastrointestinal tract of a Wild Boar as potential probiotics. *Frontiers in Veterinary Science*. 2020;7:49.
18. Valeriano VD, Parungao-Balolong MM, Kang DK. In vitro evaluation of the mucin-adhesion ability and probiotic potential of *Lactobacillus mucosae* LM1. *Journal of Applied Microbiology*. 2014;117:485-97.
19. Huy ND, Thao TTP, Thoa LTK, Vu NQH, Lich NQ, Tuan LC, et al. Assessment of antioxidant and antibacterial activities of *Lactobacillus farciminis* HN11 as a probiotic candidate. *Applied Food Biotechnology*. 2022; 9(2):103-12.
20. Huy ND, Ngoc LMT, Loc NH, Lan TT, Quang HT, Dung TQ, et al. Isolation of *Weissella cibaria* from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) gastrointestinal tract and evaluation of its pathogenic bacterial inhibition. *Indian Journal of Science and Technology*. 2020;13(10):1200 – 12.
21. Ngoc LMT, Nguyen DQ, Duyen DTH, Lan TT, Tien NQD, Trâm NDQ, et al. Isolation and evaluation anti-pathogenic activities of *Lactococcus garvieae* from shrimp intestinal system. *Hue University Journal of Science: Natural Science*. 2019;128(1E):77-86.
22. Kim JA, Yao Z, Perumal V, Kim H-J, Kim JH. Properties of *Tetragenococcus halophilus* Strains Isolated from Myeolchi (anchovy)-jeotgal. *Microbiology and Biotechnology Letters*. 2018;46(4):313-9.
23. Đỗ Thị Bích Thủy, Nguyễn Thị Diễm Hương. Định danh và khảo sát một số tính chất của chủng *Lactobacillus farciminis* NM6 phân lập từ nước mẩn. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Khoa học tự nhiên*. 2018;127(1C):119-29.
24. Urdaneta V, Casadesús J. Interactions between bacteria and bile salts in the gastrointestinal and hepatobiliary tracts. *Front Med*. 2017;4:163.

25. Akalu N, Assefa F, Dessalegn A. In vitro evaluation of lactic acid bacteria isolated from traditional fermented Shamita and Kocho for their desirable characteristics as probiotics. *African Journal of Biotechnology*. 2017;16(12):594–606.
26. Boke H, Aslim B, Alp G. The role of resistance to bile salts and acid tolerance of exopolysaccharides (EPSS) produced by yogurt starter bacteria. *Archives of Biological Sciences*. 2010;62(2):323–8.
27. Halami PM, Chandrashekar A, Nand K. *Lactobacillus farciminis* MD, a newer strain with potential for bacteriocin and antibiotic assay. *Letters in Applied Microbiology*. 2000;30:197–202.
28. Guan X, Xu Q, Zheng Y, Qian L, Lin B. Screening and characterization of lactic acid bacterial strains that produce fermented milk and reduce cholesterol levels. *Brazilian Journal of Microbiology* 2017;48:730–9.
29. Tuo Y, Yu H, Ai L, Wu Z, Guo B, Chen W. Aggregation and adhesion properties of 22 *Lactobacillus* strains. *Journal of Dairy Science*. 2013;96(7):4252-7.
30. Ferreira CL, Grzeskowiak L, Collado MC, Salminen S. In vitro evaluation of *Lactobacillus gasseri* strains of infant origin on adhesion and aggregation of specific pathogens. *Journal of Food Protection*. 2011;74:1482-7.
31. Schillinger U, Guigas C, Holzapfel WH. In vitro adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. *International Dairy Journal*. 2005;15:1289-97.
32. Todorov SD, Botes M, Guigas C, Schillinger U, Wiid I, achsman MB, et al. Boza, a natural source of probiotic lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 2008;104:465-77.