



DOI:10.22144/ctu.jvn.2019.017

**PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN DÒNG VI KHUẨN *Lactobacillus* CÓ TIỀM NĂNG PROBIOTIC TỪ CÂY MÔN NGỌT (*Colocasia esculenta* (L.) SCHOTT)**

Huỳnh Ngọc Thanh Tâm\*, Nguyễn Lê Hồng Diệp và Phan Thị Thu Sương

Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

\*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Huỳnh Ngọc Thanh Tâm (email: hnttam@ctu.edu.vn)

**Thông tin chung:**

Ngày nhận bài: 14/06/2018

Ngày nhận bài sửa: 22/08/2018

Ngày duyệt đăng: 28/02/2019

**Title:**

Isolation and selection of *Lactobacillus* having probiotic potential from *Colocasia esculenta* (L.) Schott

**Từ khóa:**

Chịu kháng sinh, chịu pH thấp, kháng khuẩn, *Lactobacillus*, môn ngọt (*Colocasia esculenta* (L.) Schott, probiotic

**Keywords:**

Antibacteria, antibiotic resistance, *Colocasia esculenta* (L.) Schott, *Lactobacillus*, low pH resistance, probiotic

**ABSTRACT**

This study was conducted to find out the *Lactobacillus* having enough probiotic potential for producing healthy products. The findings indicated that, among 18 strains of bacteria isolated from *Colocasia esculenta* (L.) Schott on MRS agar, there were 7 strains able to survive in pH = 2.5 and resist three kinds of antibiotic: ampicilline, tetracycline and ofloxacin. Three strains of NKCI, OML1 and OML2 had higher antibacterial activity against *E. coli* than the others. In the study of the extracellular enzyme production, it was found that 7 strains had the ability to produce two kinds of extracellular and the OML2 strain produced the highest amount of amylase through biosynthesis process. It meant that OML2 strain possessed the best probiotic potential amongst the 18 isolated strains. Combined with morphology and biochemical tests, OML2 strain was indentificated as *Lactobacillus plantarum* by means of the identification by sequencing of 16S rRNA gene (99% identity when searching on Genbank of NCBI).

**TÓM TẮT**

Nghiên cứu được thực hiện nhằm tìm ra dòng *Lactobacillus* có những đặc tính tốt để sản xuất probiotic. Trong 18 dòng vi khuẩn được phân lập từ các mẫu môn ngọt (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) trên môi trường MRS, có 7 dòng vi khuẩn có khả năng sống trong điều kiện pH = 2,5 và kháng được 3 loại kháng sinh: ampicilline, tetracycline và ofloxacin. Ba dòng NKCI, OML1 và OML2 có khả năng kháng vi khuẩn *E. coli* cao hơn so với 4 dòng còn lại. Khảo sát khả năng sinh enzyme ngoại bào, 7 dòng vi khuẩn trên có khả năng sinh 2 loại enzyme ngoại bào, trong đó, dòng OML2 sinh tổng hợp enzyme amylase cao nhất. Dòng OML2 có tiềm năng probiotic tốt nhất trong 18 dòng đã phân lập, do đó, dòng OML2 được định danh đến tên loài là *Lactobacillus plantarum* (99%), bằng phương pháp giải trình tự 16S rRNA, kết hợp với đặc điểm hình thái và sinh hóa.

Trích dẫn: Huỳnh Ngọc Thanh Tâm, Nguyễn Lê Hồng Diệp và Phan Thị Thu Sương, 2019. Phân lập và tuyển chọn dòng vi khuẩn *Lactobacillus* có tiềm năng probiotic từ cây môn ngọt (*Colocasia esculenta* (L.) Schott). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 55(1B): 15-23.

**1 GIỚI THIỆU**

Vi sinh vật (VSV) probiotic là các sinh vật sống có lợi, giúp cơ thể vật chủ cân bằng hệ VSV trong đường tiêu hóa (Haghshenas *et al.*, 2017). VSV

probiotic ảnh hưởng đáng kể đến khả năng dung nạp các chất dinh dưỡng trong cơ thể con người bằng cách tạo điều kiện hấp thu magnesium và calcium từ protein sữa, tiêu hóa lactose, sản xuất folate và vitamin B (Haghshenas *et al.*, 2015).

*Lactobacillus* là nhóm vi khuẩn acid lactic (LAB) được sử dụng nhiều nhất trong lĩnh vực probiotic. LAB là vi khuẩn an toàn và được sử dụng rộng rãi trong các sản phẩm men vi sinh (Haghshenas *et al.*, 2015). LAB có tác dụng hỗ trợ ngăn ngừa các bệnh đường ruột do kháng sinh, chống nhiễm trùng đường tiết niệu (Allen *et al.*, 2011), giảm cholesterol trong máu (Fuller, 1997), ngăn chặn việc sinh trưởng của hệ VSV có hại hay điều chỉnh trạng thái miễn dịch ở mô niêm mạc khoang miệng (Meurman, 2005). LAB còn có tác dụng chống dị ứng và kháng ung thư (Shokryazdan *et al.*, 2014). LAB đã được phân lập từ nhiều nguồn khác nhau, chủ yếu là từ các chế phẩm sinh học (Hawaz, 2014). Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng VSV probiotic tồn tại ở các loài thực vật khác nhau. Nghiên cứu của Ruiz *et al.* (2011) đã phân lập được các dòng VSV có tiềm năng probiotic từ hạt lúa trồng ở Argentina. Tiếp đó, Prawan and Bhima (2017) đã phân lập được các dòng vi khuẩn thuộc chi *Lactobacillus* từ khoai tây, cà chua và cải bắp.

Môn ngọt (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) là loài cây hoang dại có nguồn gốc ở các vùng nhiệt đới, đặc biệt là vùng Châu Á Thái Bình Dương. Môn ngọt phát triển mạnh ở các điều kiện nóng, ẩm ướt và được phát hiện ở môi trường ven sông, ven suối, đầm lầy, kênh rạch hoặc được trồng gần các trang trại. Đặc biệt, loài cây này có khả năng sống ở nhiều điều kiện khác nhau như đất phèn, đất chua, vùng nước phèn, nước lợ (Nguyễn Thị Ngọc Huệ và Đinh Thế Lộc, 2005). Một nghiên cứu gần đây của Brown and Valiere (2004) đã khẳng định vi khuẩn chiếm ưu thế trong họ khoai môn là *Lactococcus lactis* (95%) và *Lactobacilli* (5%). Do đó, việc nghiên cứu và phân lập những dòng vi khuẩn *Lactobacillus* từ cây môn ngọt (một loài cây thuộc họ khoai môn) có thể làm đa dạng nguồn nguyên liệu sản xuất probiotic và tuyển chọn được những dòng vi khuẩn có tiềm năng probiotic tốt do cây môn ngọt có khả năng sống được ở nhiều vùng môi trường khác nhau.

## 2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Vật liệu và hóa chất

Môi trường MRS lỏng (De Man, Rogosa và Sharpe, sản xuất năm 2016, Thermo Fisher Scientific) cải tiến nuôi cấy vi khuẩn *Lactobacillus* spp.. Môi trường MRS agar được pha bằng cách bổ sung thêm vào môi trường MRS lỏng 20 gram agar trên 1 lít môi trường. Môi trường LB (Luria-Bertani, SBC Scientific) nuôi vi khuẩn *E. coli* (ATCC® 25922™).

Hóa chất nhuộm Gram: Crystal violet, dung dịch iod, dung dịch khử màu (ethanol và acetol theo tỉ lệ 1:1), fushin. Hóa chất nhuộm bào tử: dung dịch lục malachite và dung dịch Safranin.

Thuốc thử catalase: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, thuốc thử indole (sản phẩm của công ty Nam Khoa Biotek).

### 2.2 Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1 Phân lập và nhận diện các dòng vi khuẩn thuộc *Lactobacillus* spp. từ cây môn ngọt thu tại thành phố Cần Thơ

##### Thu mẫu

Mẫu là những cây môn ngọt với đặc điểm: phiến lá dạng tim bầu, màu xanh lục với một đốm đỏ ở giữa ngay gốc lõm của lá, bẹ lá nhỏ có màu xanh nhạt. Mẫu được thu ở những nơi đất ẩm tại 3 quận: Ninh Kiều, Ô Môn và Cái Răng thuộc thành phố Cần Thơ. Ở mỗi địa điểm thu 3- 5 bụi môn ngọt, sau đó đem về phòng thí nghiệm để tiến hành xử lý mẫu và thực hiện thí nghiệm.

##### Phân lập những dòng vi khuẩn từ cây môn ngọt

Xử lý mẫu: môn ngọt được rửa sạch bằng nước cất và khử trùng bên ngoài bằng ethanol 70°. Sau đó, ép môn ngọt lấy dịch rồi cho vào bình tam giác đã khử trùng. Hút lấy 1 mL dung dịch môn ngọt cho vào bình tam giác chứa 100 mL môi trường MRS lỏng, ủ ở 37°C trong 48 giờ.

Tiến hành phân lập: pha loãng dịch nuôi 100 lần trong nước muối sinh lý 0,85%; sau đó, hút 0,1 mL dung dịch mẫu trải trên đĩa petri chứa môi trường MRS agar và ủ ở 37°C; sau 48 giờ, quan sát và chọn những khuẩn lạc tiêu biểu để tiến hành cấy chuyển vi khuẩn cũng trên môi trường MRS agar. Quá trình cấy chuyển được lặp lại nhiều lần cho đến khi độ thuần vi khuẩn được xác định.

##### Kiểm tra hình thái khuẩn lạc đặc trưng cho các vi khuẩn *Lactobacillus* spp.

Đặc điểm nhận dạng khuẩn lạc: những dòng vi khuẩn được chấp nhận khi có hình dạng khuẩn lạc trắng đục, độ nổi lồi hoặc mô, bìa nguyên hoặc chia thùy. Khuẩn lạc được phân lập nằm trên đường cấy chuyển và không lẫn với những khuẩn lạc có hình thái và màu sắc lạ. Sau khi được tách riêng, những dòng phân lập sẽ được kiểm tra hình thái và quan sát độ thuần dưới kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 40X và 100X.

##### Kiểm tra các đặc điểm sinh hóa tiêu biểu cho các vi khuẩn *Lactobacillus* spp.

Sau khi chọn những dòng vi khuẩn tiêu biểu từ cây môn ngọt, vi khuẩn *Lactobacillus* spp. được xác định bằng các thí nghiệm sinh hóa được tiến hành như mô tả của Kandler and Wiss (1986): nhuộm Gram, thử nghiệm catalase, phân giải CaCO<sub>3</sub> và sự hình thành indole (Bảng 1).

**Bảng 1: Đặc điểm sinh hóa tiêu biểu của các vi khuẩn *Lactobacillus* spp.**

Các thí nghiệm sinh hóa	Dương tính (+)	Âm tính (-)
Nhuộm Gram	Xanh tím (Gram dương)	Đỏ hồng (Gram âm)
Catalase	Có bọt khí	Không có bọt khí
Phân giải CaCO <sub>3</sub>	Vùng sáng xuất hiện	Không xuất hiện vùng sáng
Sự hình thành Indole	Vòng pellicle vàng chuyển sang đỏ hoặc cam	Vòng pellicle vàng không đổi màu

2.2.2 *Đánh giá và tuyển chọn các dòng vi khuẩn *Lactobacillus* spp. có tiềm năng probiotic*

*Đánh giá khả năng chống chịu với môi trường pH thấp*

Các dòng vi khuẩn đã phân lập được nuôi tăng sinh trong môi trường MRS lỏng ở 37°C trong 48 giờ; thu lấy sinh khối vi khuẩn bằng cách ly tâm 5.000 vòng/phút ở 4°C trong 10 phút; sau đó, rửa sinh khối thu được với 1,5 mL nước cất vô trùng và chuyển dịch huyền phù vi khuẩn vào ống nghiệm chứa môi trường MRS đã chỉnh pH = 2,5, pH = 2,0 và pH = 1,5, ủ ở 37°C; sau 48 giờ, tiến hành đếm mật số vi khuẩn bằng phương pháp đếm sống (Hoben and Somasegaran, 1982). Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

*Đánh giá khả năng kháng các loại kháng sinh*

Tính nhạy cảm với kháng sinh của vi khuẩn được xác định bằng phương pháp khuếch tán đĩa (Sharma *et al.*, 2016) có hiệu chỉnh. Dịch vi khuẩn *Lactobacillus* sau khi tăng sinh 48 giờ có mật số tương đương 10<sup>8</sup> tế bào/mL (TB/mL); sau đó, hút 50 µL dịch vi khuẩn trải đều trên bề mặt môi trường MRS agar. Đĩa kháng sinh (Oxoid, England), đường kính đĩa 5 mm, được đặt lên mặt thạch và ủ ở 37°C trong 24 giờ. Sau thời gian ủ, đường kính vòng vô khuẩn (ĐKVVK) được đo và so sánh với các giá trị tiêu chuẩn về mức độ nhạy cảm với kháng sinh. Các loại kháng sinh thử nghiệm là: tetracycline (30 µg/mL), ampicilline (10 µg/mL), ofloxacin (10 µg/mL). Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Tính nhạy cảm với kháng sinh được đánh giá dựa theo nghiên cứu của Sharma *et al.* (2017). Đường kính vòng vô khuẩn (mm) tương ứng sẽ được xác định là: kháng: R (Resistant) ≤ 14 mm, nhạy cảm vừa: 14 < S+ (Susceptible) ≤ 19 mm, nhạy cảm mạnh: S++ ≥ 20 mm.

*Đánh giá khả năng sinh enzyme ngoại bào*

Đánh giá khả năng sinh enzyme ngoại bào của các dòng vi khuẩn bằng phương pháp đục lỗ thạch (Taheri *et al.*, 2010). Vi khuẩn *Lactobacillus* được nuôi đến 10<sup>8</sup> TB/mL. Sau đó, dịch nuôi được ly tâm 6.000 vòng/phút ở 4°C trong 15 phút để thu phần dịch lỏng bên trên tế bào; tiến hành nhỏ 10 µL dịch chứa enzyme ngoại bào vào giếng thạch trên môi trường MRS được bổ sung 1% tinh bột cho phản ứng khảo sát khả năng sinh enzyme amylase và 1%

gelatin cho phản ứng khảo sát khả năng sinh enzyme protease; quan sát khả năng tạo vòng phân giải cơ chất sau 24 giờ; đọc kết quả bằng cách sử dụng thuốc thử Lugol đối với amylase (vòng phân giải cơ chất có màu xanh tím nhạt) và trichloroacetic acid 25% (TCA) đối với protease (vòng phân giải cơ chất có màu trắng trong).

*Đánh giá khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh *Escherichia coli**

Thí nghiệm được điều chỉnh dựa trên mô tả của Noohi *et al.* (2016). Tăng sinh các dòng vi khuẩn *Lactobacillus*, sau đó xác định khả năng ức chế *E. coli* bằng cách: hút 50 µL dịch khuẩn *E. coli* (được nuôi trong 24 giờ, đạt mật số 10<sup>7</sup> TB/mL) trải đều trên đĩa petri chứa môi trường MRS agar và để khô; tạo 5 giếng thạch/đĩa, mỗi giếng có đường kính 5 mm; tiếp tục bơm 50 µL nước cất vô trùng (đối chứng âm); bơm 50 µL dịch nuôi của vi khuẩn *Lactobacillus* spp./giếng; tiếp tục bơm 50 µL dung dịch ampicilline (500 mg, Mekophar) 0,1 mg/mL (đối chứng dương); cuối cùng ủ mẫu ở 37°C. Sau 48 giờ, ĐKVVK được đo. Hoạt tính kháng khuẩn được tính theo Moore *et al.* (2013). Thí nghiệm được lặp lại ba lần. ĐKVVK được tính bằng công thức: D – d, trong đó: D là đường kính tổng (mm), d là đường kính ban đầu của giếng (5 mm). Đường kính vòng vô khuẩn (mm) tương ứng sẽ được xác định là: không có tính kháng khuẩn: ĐKVVK < 1 mm, tính kháng khuẩn trung bình: 1 mm ≤ ĐKVVK ≤ 5 mm, tính kháng khuẩn mạnh: 6 mm ≤ ĐKVVK ≤ 20 mm.

2.2.3 *Định danh dòng vi khuẩn thuộc chi *Lactobacillus* được phân lập có tiềm năng probiotic tốt nhất*

Xác định loài của dòng vi khuẩn đã phân lập có tiềm năng probiotic tốt nhất bằng kỹ thuật sinh học phân tử kết hợp với đặc điểm hình thái và thí nghiệm sinh hóa. Định danh bằng phương pháp giải trình tự đoạn gene 16S rRNA với mỗi xuôi 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC-3') và mỗi ngược 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACT-3'). Sau đó, đoạn gene này được giải trình tự tại công ty Sinh hóa Phù Sa (Cần Thơ, Việt Nam).

2.3 *Xử lý số liệu*

Phần mềm Microsoft Excel 2010 được sử dụng để xử lý số liệu thô, tính các giá trị trung bình và vẽ biểu đồ. Phần mềm Minitab 16 dùng để phân tích

phương sai, độ lệch chuẩn (SD) và kiểm định trung bình các nghiệm thức bằng kiểm định Tukey.

### 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1 Phân lập và nhận diện các dòng vi khuẩn acid lactic thuộc loài *Lactobacillus* spp. từ cây môn ngọt ở Thành phố Cần Thơ

Trên môi trường MRS đã phân lập được 18 dòng vi khuẩn từ cây môn ngọt tại 3 quận thuộc thành phố Cần Thơ. Trong đó, có 6 dòng thuộc quận Ninh Kiều, 5 dòng thuộc quận Cái Răng và 7 dòng thuộc quận Ô Môn.

Đặc điểm khuẩn lạc của 18 dòng vi khuẩn được quan sát trên môi trường MRS agar (có bổ sung 0,5% CaCO<sub>3</sub>) sau 48 giờ ủ ở 37°C cho thấy tất cả

khẩn lạc đều có màu trắng đục, dạng tròn, bia nguyên, trong đó có 16 dòng có độ nổi mô và 2 dòng có độ nổi lồi, kích thước khuẩn lạc dao động từ 0,5 đến 3 mm (Bảng 2). Khi kiểm tra hình dạng tế bào dưới kính hiển vi quang học, tế bào của 18 dòng vi khuẩn đã phân lập được sau 48 giờ nuôi cấy trên môi trường MRS agar đều có hình que ngắn (12 dòng, chiếm 66,67%) hoặc que dài (6 dòng, chiếm 33,33%). Ngoài ra, 18 dòng vi khuẩn trên đều không có khả năng di động và không sinh bào tử (Bảng 2).

Đặc điểm sinh hóa của 18 dòng vi khuẩn được phân lập: tất cả 18 dòng vi khuẩn đều có 4 đặc điểm là: Gram dương (+), không sinh indole (-), catalase âm tính (-) và có khả năng phân giải CaCO<sub>3</sub>

**Bảng 2: Đặc điểm hình thái của 18 dòng vi khuẩn phân lập được từ cây môn ngọt tại thành phố Cần Thơ**

Dòng	Hình dạng khuẩn lạc	Hình dạng tế bào	Màu sắc	Dạng bia	Độ nổi	Kích thước (mm)
NKL1	Tròn	Que dài	Trắng đục	Nguyên	Mô	1 – 3
NKL2	Tròn	Que dài	Trắng đục	Nguyên	Mô	1 – 2
NKL3	Tròn	Que dài	Trắng đục	Nguyên	Mô	2 – 3
NKL4	Tròn	Que ngắn	Trắng đục	Nguyên	Mô	0,5
NKC1	Tròn	Que dài	Trắng đục	Nguyên	Mô	1 – 2
NKC2	Tròn	Que ngắn	Trắng đục	Nguyên	Mô	1
CRL1	Tròn	Que ngắn	Trắng đục	Nguyên	Lồi	0,5
CRL2	Tròn	Que ngắn	Trắng đục	Nguyên	Lồi	1,5
CRC1	Tròn	Que ngắn	Trắng đục	Nguyên	Mô	1 – 2
CRC2	Tròn	Que ngắn	Trắng đục	Nguyên	Mô	1
CRC3	Tròn	Que ngắn	Trắng đục	Nguyên	Mô	0,5
OML1	Tròn	Que dài	Trắng đục	Nguyên	Mô	0,5
OML2	Tròn	Que dài	Trắng đục	Nguyên	Mô	1 – 2
OML3	Tròn	Que ngắn	Trắng đục	Nguyên	Mô	0,5
OMC1	Tròn	Que ngắn	Trắng đục	Nguyên	Mô	1 – 2
OMC2	Tròn	Que ngắn	Trắng đục	Nguyên	Mô	1 – 2
OMC3	Tròn	Que ngắn	Trắng đục	Nguyên	Mô	0,5
OMC4	Tròn	Que ngắn	Trắng đục	Nguyên	Mô	1

Ghi chú: Ký hiệu các dòng vi khuẩn được phân lập đặt tên dựa theo quận thu mẫu: NK là mẫu thu tại Ninh Kiều, CR là mẫu thu tại Cái Răng, OM là mẫu thu tại Ô Môn. Các chữ cái C và L là dòng vi khuẩn được phân lập trên mẫu củ và lá

Kết hợp giữa đặc điểm hình thái và đặc điểm sinh hóa, có thể kết luận 18 dòng vi khuẩn phân lập từ cây môn ngọt *Colocasia esculenta* (L.) Schott ở Cần Thơ thuộc *Lactobacillus* spp. Kết quả phân lập và nhận diện vi khuẩn *Lactobacillus* spp. này phù hợp với kết quả đã được công bố của Arimah *et al.* (2014) và kết quả của Đỗ Thị Tuyết Nhung và *ctv.* (2014).

#### 3.2 Kết quả đánh giá tiềm năng probiotic của các dòng vi khuẩn

##### 3.2.1 Khả năng chịu pH thấp

Kết quả nghiên cứu thu được 7/18 dòng *Lactobacillus* sống được ở môi trường pH = 2,5 trong 24 giờ. Dòng NKL1 có khả năng sống sót thấp

nhất với mật số 5,423 log (cfu/mL), các dòng NKL3, NKL2, NK1 và OML1 có mật số ở mức trung bình và khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5% (Bảng 3). Đáng chú ý là hai dòng CRC1 và OML2 với mật số lần lượt là 6,64 và 6,63 log (cfu/mL), hai dòng này có khả năng sống sót cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% so với các dòng còn lại (theo kiểm định Tukey) (Bảng 3). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Parisa *et al.* (2014) khi phân lập được 9 dòng vi khuẩn thuộc chi *Lactobacillus* từ sữa mẹ, phân trẻ sơ sinh và thực phẩm lên men, tất cả đều có khả năng chịu pH = 3 trong 3 giờ. Bên cạnh đó, 6/7 dòng vi khuẩn *Lactobacillus* được phân lập từ sữa dê và chế phẩm sinh học cũng có khả năng chống chịu với môi

trường pH = 3 trong 3 giờ (Nguyễn Phước Hiền và ctv., 2014). Trong nghiên cứu này, 7/18 dòng vi khuẩn *Lactobacillus* được phân lập từ cây môn ngọt có khả năng sống sót trong môi trường pH = 2,5 trong 24 giờ, đồng nghĩa với việc chúng có khả năng chịu được pH = 3 trong 3 giờ, thỏa một trong những điều kiện quan trọng trong việc lựa chọn các dòng vi sinh vật probiotic ứng dụng cho người (Matijasic and Rogelj, 2000; Baick and Kim, 2015).

**Bảng 3: Khả năng chịu pH thấp của dòng vi khuẩn *Lactobacillus***

STT	Dòng	Mật số <i>Lactobacillus</i> (log cfu/mL)
1	NKL1	5,42 <sup>c</sup> ± 0,13
2	NKL2	5,65 <sup>b</sup> ± 0,05
3	NKL3	5,73 <sup>b</sup> ± 0,05
4	NKC1	5,58 <sup>bc</sup> ± 0,08
5	OML1	5,56 <sup>bc</sup> ± 0,03
6	OML2	6,63 <sup>a</sup> ± 0,03
7	CRC1	6,64 <sup>a</sup> ± 0,03

Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê của các nghiệm thức khảo sát theo kiểm định Tukey ở mức độ tin cậy 95%.

3.2.2 Khả năng kháng kháng sinh

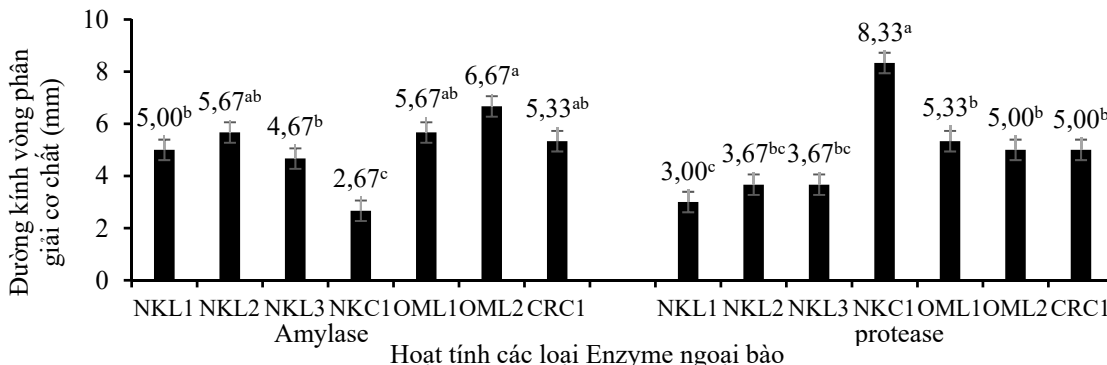
Kết quả nghiên cứu cho thấy, cả 7 dòng *Lactobacillus* đã khảo sát đều không có vòng vô khuẩn đối với kháng sinh ức chế quá trình tổng hợp vách tế bào của vi khuẩn (ampiciline), kháng sinh ức chế sự tổng hợp protein của tế bào vi khuẩn (tetracycline) và kháng sinh nhóm ức chế quá trình tổng hợp acid nucleic của vi khuẩn (ofloxacin). Dựa vào 3 mức độ đánh giá khả năng kháng kháng sinh của CLSI (2012) và nghiên cứu của Sharma et al. (2016) cho thấy, cả 7 dòng *Lactobacillus* được khảo sát đều có khả năng kháng với 3 loại kháng sinh: ampiciline, tetracycline, và ofloxacin. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Nguyễn Phước Hiền và ctv. (2014) khi khảo sát khả năng kháng

kháng sinh của 7 dòng LAB được phân lập từ sữa dê và chế phẩm sinh học đều cho kết quả kháng với các loại kháng sinh. Tương tự, nghiên cứu của Hoàng Quốc Khánh và Phạm Thị Lan Anh (2011) trong thí nghiệm khảo sát khả năng kháng kháng sinh của các chủng *Lactobacillus* cho kết quả: 12/12 dòng vi khuẩn đều có khả năng kháng với kháng sinh ức chế tổng hợp protein, 10/12 dòng kháng với kháng sinh ức chế tổng hợp vách tế bào và 5/12 dòng kháng với kháng sinh ức chế tổng hợp acid nucleic.

Từ kết quả nghiên cứu cho thấy, các dòng vi khuẩn phân lập từ cây môn ngọt có khả năng kháng kháng sinh, nếu sử dụng chúng như một probiotic cho bệnh nhân điều trị bệnh liên quan đến đường tiêu hóa bằng kháng sinh sẽ đạt hiệu quả tốt hơn do probiotic có khả năng thiết lập hệ vi sinh vật có ích trong đường ruột một cách nhanh chóng (EI-Naggar, 2004). Vì thế, có thể sử dụng các dòng vi khuẩn phân lập từ cây môn ngọt cho hai mục đích phòng ngừa và điều trị các bệnh liên quan đến hệ tiêu hóa.

3.2.3 Khả năng sinh enzyme ngoại bào

Kết quả từ Hình 1 cho thấy, cả 7 dòng *Lactobacillus* phân lập từ cây môn ngọt đều thể hiện khả năng sinh enzyme amylase và enzyme protease. Trong đó, dòng OML2 sinh enzyme amylase cao nhất (6,67 mm), dòng NKC1 có khả năng sinh enzyme protease cao nhất (8,33 mm). Tương tự, nghiên cứu khả năng sinh enzyme ngoại bào của vi khuẩn phân lập từ mấm chua cá sặc của Đỗ Thị Tuyết Nhung và ctv. (2014) cũng chỉ ra rằng: 3 dòng *Lactobacillus* L1, L2, L3 sinh enzyme protease và 4 dòng *Lactobacillus* L1, L2, L3, L4 đều sinh enzyme amylase. Bên cạnh đó, nghiên cứu của Nguyễn Thị Minh Hằng và Nguyễn Minh Thư (2013) về khảo sát khả năng sinh tổng hợp enzyme amylase của một số chủng vi khuẩn *Lactobacillus* được phân lập từ sản phẩm lên men, thu được 7 dòng *Lactobacillus* có khả năng sinh tổng hợp enzyme amylase với đường kính vòng phân giải tinh bột dao động từ 8 - 20 mm.



**Hình 1: Khả năng sinh enzyme ngoại bào của những dòng *Lactobacillus***

Ghi chú: Số liệu là trung bình của 3 lần lặp lại. Giữa các mẫu, các giá trị trung bình có cùng chữ cái thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95% theo kiểm định Tukey

3.2.4 Khả năng kháng vi khuẩn *Escherichia coli*

Hiệu quả của một sản phẩm probiotic là khi đưa vào đường tiêu hóa sẽ giúp gia tăng sự chuyển hóa thức ăn, tăng khả năng miễn dịch, ngoài ra còn có tác dụng ức chế sự phát triển của vi sinh vật gây bệnh, giúp cân bằng hệ vi sinh đường ruột và hạn chế các bệnh đường tiêu hóa (Lê Thị Hải Yến và Nguyễn Đức Hiền, 2016).

**Bảng 4: Khả năng ức chế vi khuẩn *E. coli* của các dòng *Lactobacillus* đã phân lập**

STT	Dòng	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)
1	NKL1	2,33 <sup>c</sup> ± 0,58
2	NKL2	2,67 <sup>c</sup> ± 0,58
3	NKL3	4,00 <sup>bc</sup> ± 1,00
4	NKC1	5,67 <sup>ab</sup> ± 1,58
5	OML1	8,00 <sup>a</sup> ± 0,00
6	OML2	7,00 <sup>a</sup> ± 1,00
7	CRC1	6,67 <sup>a</sup> ± 0,57
8	Đối chứng (+)	20
9	Đối chứng (-)	0

Ghi chú: Số liệu ĐKVVK là giá trị trung bình của ba lần lặp lại. Trong cùng một hàng các số có ít nhất 1 chữ cái theo sau giống nhau thì thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5% qua kiểm định Tukey. Đối chứng dương là ampicillin (1 mg/mL) cho ĐKVVK là 20 mm; đối chứng âm là nước cất đã khử trùng

Khi cho 7 dòng vi khuẩn thuộc *Lactobacillus* spp. được phân lập từ cây môn ngọt ở thành phố Cần Thơ tương tác với vi khuẩn *E. coli* thì 100% số dòng thuộc *Lactobacillus* spp. đã phân lập tạo vòng vô khuẩn với vi khuẩn *E. coli*. Trong đó, ĐKVVK dao động từ 2,33 đến 8,00 mm (Bảng 4). Dòng OML1, OML2 và CRC1 là 3 dòng vi khuẩn có khả năng kháng *E. coli* tốt nhất trong 7 dòng khảo sát với ĐKVVK tương ứng là 8,00 mm, 7,00 mm và 6,67 mm (khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% qua kiểm định Tukey so với các dòng thuộc *Lactobacillus* spp. còn lại). Ngược lại, dòng NKL1 có khả năng ức chế *E. coli* thấp nhất (2,33 mm) trong 7 dòng vi khuẩn có khả năng ức chế *E. coli*. Theo quy ước của Galindo (2004) về khả năng ức chế vi khuẩn, thì cả 7 dòng vi khuẩn trong khảo sát đều có khả năng kháng *E.coli* (ĐKVVK < 1 mm), 4 dòng (NKL1, NKL2, NKL3 và NKC1) kháng *E. coli* yếu

(1 mm ≤ ĐKVVK ≤ 5 mm) và 3 dòng kháng *E. coli* với mức độ trung bình (6 mm ≤ ĐKVVK ≤ 20 mm).

Nhiều nghiên cứu đã báo cáo rằng, có nhiều loài trong giống *Lactobacillus* có khả năng tạo ra các loại protein có khả năng diệt khuẩn tốt (Verschuere *et al.*, 2000; Farzanfar, 2005). Trong số 20 dòng thuộc *Lactobacillus* spp. được phân lập từ tôm sú (*Penaeus monodon*) ở tỉnh Bạc Liêu và Cà Mau trong nghiên cứu của Huỳnh Ngọc Thanh Tâm và *ctv.* (2018), có 19 dòng thuộc *Lactobacillus* spp. có khả năng tạo bacteriocin ức chế vi khuẩn *E. coli* với ĐKVVK dao động từ 11,7 đến 16,3 mm. Hay trong nghiên cứu của Nguyễn Văn Thành và Nguyễn Ngọc Trai (2011) chỉ duy nhất 1/45 dòng thuộc *Lactobacillus* spp. được phân lập từ hệ tiêu hóa cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) có khả năng tạo bacteriocin ức chế 2 vi khuẩn là *Aeromonas hydrophila* và *Edwardsiella ictaluri*.

**3.3 Định danh dòng *Lactobacillus* bằng phương pháp giải trình tự đoạn gene 16S rRNA**

Dòng vi khuẩn OML2 là dòng vi khuẩn thuộc chi *Lactobacillus* spp. và cũng là dòng vi khuẩn tối ưu nhất trong 18 dòng vi khuẩn được phân lập từ cây môn ngọt về khả năng chịu pH thấp, khả năng kháng kháng sinh, cũng như khả năng sinh enzyme ngoại bào và khả năng kháng khuẩn. Vì vậy, dòng OML2 được chọn để giải trình tự đoạn gene 16S rRNA.

Sau khi sử dụng chương trình Nucleotide Blast để so sánh mức độ tương đồng của trình tự được giải với trình tự của các dòng vi khuẩn trong ngân hàng gen trên NCBI, kết quả cho thấy trình tự đoạn gen của dòng OML2 tương đồng với trình tự đoạn gen 16S rRNA của vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* strain JCM 1149 với độ tương đồng là 99% (1451/1461) và độ bao phủ 99% (Hình 2). Bên cạnh đó, dựa vào đặc điểm hình thái (Bảng 2) và sinh hóa của dòng OML2 phù hợp với miêu tả của Lương Đức Phẩm (2002), dòng *Lactobacillus* sp. có dạng hình que, không di động, khuẩn lạc có màu trắng sữa, Gram dương, catalase và oxidase âm tính. Kết hợp giữa kết quả nhận diện vi khuẩn bằng kỹ thuật sinh học phân tử (giải trình tự bằng đoạn mỗi chung 16S rRNA) cùng kết quả quan sát hình thái và thí nghiệm sinh hóa cho thấy dòng OML2 có trình tự 16S rRNA và các đặc tính sinh hóa tương đồng với loài *Lactobacillus plantarum*.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<a href="#">Lactobacillus plantarum strain JCM 1149 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2636	2636	99%	0.0	99%	<a href="#">NR_117813.1</a>
<a href="#">Lactobacillus plantarum strain CIP 103151 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2634	2634	100%	0.0	99%	<a href="#">NR_104573.1</a>
<a href="#">Lactobacillus plantarum strain NRRL B-14768 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2634	2634	100%	0.0	99%	<a href="#">NR_042394.1</a>

**Hình 2: Kết quả so sánh mức độ tương đồng với các dòng vi khuẩn trên ngân hàng gen NCBI**

Dòng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* là một trong những dòng vi khuẩn thuộc chi *Lactobacillus* có khả năng tồn tại trong nhiều môi trường khác nhau như: sữa, rượu vang, thịt bò, sản phẩm lên men, đường tiêu hóa của người và động vật (Bringel *et al.*, 2005). Ngoài các nguồn kể trên, nghiên cứu này đã góp phần tìm ra dòng *L. plantarum* từ cây môn ngọt. *Lactobacillus plantarum* được ứng dụng rộng rãi trong các sản phẩm probiotic ở các nước thuộc Châu Mỹ (Seddik *et al.*, 2017). Nghiên cứu của Dallal *et al.* (2017) đã cho thấy *Lactobacillus plantarum* có khả năng ngăn chặn sự phát triển của 2 dòng vi khuẩn gây bệnh đường ruột là *Acinetobacter baumannii* và *Pseudomonas aeruginosa*. Bên cạnh việc phòng ngừa các bệnh về đường tiêu hóa, nó còn có khả năng phòng ngừa bệnh đái tháo đường, hạ cholesterol máu, kháng oxy hóa và kháng ung thư (Arasu *et al.*, 2016; Seddik *et al.*, 2017).

**4 KẾT LUẬN**

Mười tám dòng vi khuẩn thuộc *Lactobacillus* spp. đã được phân lập từ cây môn ngọt tại thành phố Cần Thơ. Các thử nghiệm kiểm tra tiềm năng probiotic cho kết quả: 7/18 dòng vi khuẩn đều có khả năng kháng với 3 loại kháng sinh và chịu được môi trường pH = 2,5. Trong đó, 2 dòng OML2 và CRC1 có khả năng chịu pH thấp tốt nhất với mật số lần lượt là 6,64 và 6,63 log (cfu/mL). Ngoài ra, 7 dòng vi khuẩn trên cũng có khả năng kháng khuẩn *E. coli* với khả năng kháng khuẩn tốt nhất là 3 dòng OML1, OML2 và CRC1, ĐKVVK của 3 dòng lần lượt là 8,00 mm, 7,00 mm, và 6,67 mm. Bên cạnh đó, 7 dòng này còn có khả năng sinh tổng hợp enzyme amylase và protease, nổi bật là dòng OML2 có khả năng sinh enzyme amylase cao nhất (6,67 mm) so với 6 dòng còn lại. Sau khi tiến hành các thử nghiệm kiểm tra tiềm năng probiotic, dòng OML2 là dòng có tiềm năng probiotic tốt nhất trong các dòng đã phân lập. Vì thế, dòng OML2 đã được định danh đến mức độ loài với tên là *L. plantarum*.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

Allen, S.J., Martinez, E.G., Gregorio, G.V., Dans and L.F., 2011. Probiotics for treating acute

infectious diarrhoea. Sao Paulo Medical Journal 129(3):185-185.

Arasu, M.V., Al-Dhabi, N.A., Ilavenil, S., Choi, K.C. and Srigopalram, S., 2016. In vitro importance of probiotic *Lactobacillus plantarum* related to medical field. Saudi Journal of Biological Sciences. 23(1): 6-10.

Arimah, B.D., Ogunlowo, O.P., Adebayo, M.A. and Jesumirhewe, C., 2014. Identification of lactic acid bisolated from selected Nigerian food and comparison of their bacteriocins activities. International Journal of ChemTech Research. 6: 929-937.

Baick, S.C. and Kim, C.H., 2015. Assessment of characteristics and functional properties of *Lactobacillus* species isolated from kim chi for dairy use. Korean Journal for Food Science of Animal resources. 35: 339-349.

Bringel, F., Castioni, A., Olukoya, D.K., Felis, G.E., Torriani, S. and Dellaglio, F., 2005. *Lactobacillus plantarum* subsp. *argentoratensis* subsp. nov, isolated from vegetable matrices. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 55: 1629-1634.

Brown, A.C. and Valiere, A., 2004. The Medicinal Uses of Poi. Nutrition in Clinical Care. 7(2): 69-74.

Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI, 2012. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard. 32 (2): M7- A9.

Dallal, S.M.M., Davoodabadi, A., Abdi, M., et al., 2017. Inhibitory effect of *Lactobacillus plantarum* and *Lb. fermentum* isolated from the faeces of healthy infants against nonfermentative bacteria causing nosocomial infections. New Microbes and New Infections. 15: 9-13.

Đỗ Thị Tuyết Nhung, Nguyễn Văn Thành và Nguyễn Hữu Hiệp, 2014. Định danh và xác định một số đặc tính sinh hóa của các dòng vi khuẩn lactic trong sản phẩm mắm chua cá sặc. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 33: 53-66.

Đỗ Thị Tuyết Nhung, Nguyễn Văn Thành và Nguyễn Hữu Hiệp, 2014. Nghiên cứu bổ sung giống vi khuẩn lactic trong chế biến mắm chua cá sặc. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 32: 9-16.

EI-Naggar, M.Y.M., 2004. Comparative study of probiotic cultures to control the growth of *E. coli*

- O157:H7 and Salmonella typhimurium. *Biotechnology*. 3: 173-180.
- Farzanfar, A., 2006. The use of probiotics in shrimp aquaculture. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 48(2): 149-158.
- Fuller, R., 1997. *Probiotics 2: applications and practical aspects*. London: Chapman and Hall, 212 pages.
- Galindo, A. B. 2004. *Lactobacillus plantarum 44A as a live feed supplement for freshwater fish*. Ph.D Thesis, 131 pages.
- Haghshenas, B., Nami, Y., Almasi, A., et al., 2017. Isolation and characterization of probiotics from dairies Iranian. *Journal of Microbiology*. 9(4): 234–243.
- Haghshenas, B., Nami, Y., Haghshenas, M., et al., 2015. Bioactivity characterization of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *Microbiologypopen*. 4(5): 803–813.
- Hawaz, E., 2014. Isolation and identification of probiotic lactic acid bacteria from curd and in vitro evaluation of its growth inhibition activities against pathogenic bacteria. *African Journal of Microbiology Research*. 8(13) : 1419–1425.
- Hoàng Quốc Khánh và Phạm Thị Lan Thanh, 2011. Phân lập, định danh và xác định các chủng *Lactobacillus* có tiềm năng Probiotic từ phân trẻ sơ sinh. *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ*. 14(6): 10 trang.
- Hoben, H. and Somasegaran, P., 1982. Comparison of the pour, spread and drop plate methods for enumeration of *Rhizobium* spp. in inoculants made from presterilized peat. *Applied and Environmental Microbiology*. 44(5): 1246-1247.
- Huỳnh Ngọc Thanh Tâm, Lưu Huỳnh Mộng Trinh, Nguyễn Quang Lộc và Nguyễn Đức Độ, 2018. Phân lập và tuyển chọn dòng vi khuẩn thuộc loài *Lactobacillus* sp. có khả năng kháng khuẩn từ tôm sú (*Penaeus monodon*) ở tỉnh Bạc Liêu và Cà Mau. *Tạp chí khoa học & công nghệ nông nghiệp*. 2(1): 535-546.
- Kandler, O. and Weiss., 1986. Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, 212AL. In: *Bergeys Manual of system Bacteriology*. P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharp, and J. G. Holt (Eds), 2, Baltimore: Williams and Wilkins, 1209 – 1234.
- Lê Thị Hải Yến và Nguyễn Đức Hiền, 2016. Khảo sát đặc tính probiotic các chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* phân lập tại các tỉnh Đồng Bằng sông Cửu Long. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. Số chuyên đề: Nông nghiệp* (2): 26-32. DOI:10.22144/ctu.jsi.2016.040.
- Lương Đức Phẩm, 2002. *Vi sinh vật học và an toàn vệ sinh thực phẩm*. NXB Nông Nghiệp. Hà Nội.
- Matijasic, B.B. and Rogelj, I., 2000. *Lactobacillus K7 – a new candidate for a probiotic strain*. *Food Technology and Biotechnology*. 38(2): 113-119.
- Moore, T., Globa, L., Barbaree, J., Vodyanoy, V. and Sorokulova, I., 2013. Antagonistic activity of *Bacillus* bacteria against food-borne pathogens. *Probiotics and Healthy*. 1(3): 6 pages.
- Nguyễn Phước Hiền, Lê Diệp Thúy, Trần Trà My và Nguyễn Hữu Hiệp, 2014. Khảo sát khả năng chống chịu điều kiện pH thấp và kháng thuốc kháng sinh của hệ vi khuẩn acid lactic phân lập từ sữa dê và chế phẩm sinh học. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. 34: 8-17.
- Nguyễn Thị Minh Hằng và Nguyễn Minh Thư, 2013. Phân lập và tuyển chọn một số chủng vi khuẩn lactic có khả năng sinh tổng hợp amylase và bacteriocin. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp*. 3: 1-8.
- Nguyễn Thị Ngọc Huệ và Đinh Thế Lộc, 2005. Cây có củ và kỹ thuật thâm canh, quyển 3, khoai Môn – Sọ. NXB Lao động xã hội, 84 trang. Nguyễn Văn Thành và Nguyễn Ngọc Trai, 2012. Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn *Lactobacillus* sp. có khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh gan thận mù và đốm đỏ trên cá tra. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. 23a: 224-234.
- Noohi, N., Ebrahimipour, G., Rohani, M., Talebi, M. and Pourshafie, M.R., 2016. Evaluation of potential probiotic characteristics and antibacterial effects of strains of *Pediococcus* species isolated from broiler chickens. *British poultry science*. 5: 1-7.
- Parisa, S., Siew, C.C., Kalavathy, R., Liang, J.B., Alitheen, N.B. and Ho, M.F.J.Y.W., 2014. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains with antimicrobial activity against some human pathogenic strains. *BioMed Research International*. 16 pages.
- Prawan, K., Bhima, B., 2017. Isolation and characterization of lactic acid bacteria for probiotic application from plant sources. *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*. 5(4): 869-876.
- Ruiz, D., Agaras, B., de Werra, P., Wall, L.G. and Valverde, C., 2011. Characterization and screening of plant probiotic traits of bacteria isolated from rice seeds cultivated in Argentina. *Journal of Microbiology*. 49(6): 902-912.
- Sharma, C., Gulati, S., Thakur, N., Singh, B.P., Gupta, S., Kaur, S., Mishra, S.K., Puniya, A.K., Gill, J.P.S. and Panwar, H. 2017. Antibiotic sensitivity pattern of indigenous *Lactobacilli* isolated from curd and human milk samples. 3: *Biotech*, 7(1). doi: 10.1007/s13205-017-0682-0.
- Seddik, H.A., Bendali, F., Gancel, F., Fliss, I., Spano, G. and Drider, D., 2017. *Lactobacillus plantarum* and its probiotic and food potentialities. *Probiotics antimicrob proteins*. 9(2): 111-122.
- Sharma, K., Sharma, N. and Sharma, R., 2016. Identification and evaluation of in vitro probiotic attributes of novel and potential strains of lactic acid bacteria isolated from traditional dairy products of North-West Himalayas. *Journal of*



- Clinical Microbiology and Biochemical Technology. 2(1): 18-25.
- Shokryazdan, P., Siew, C. C., Kalavathy, R., Liang, J. B., Alitheen, N. B., Jahromi, M. F., and Yin Wan Ho., 2014. Probiotic potential of Lactobacillus strains with antimicrobial activity against some human pathogenic strains. BioMed Research International. Article ID 927268, 16 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/927268>.
- Taheri, H.R., Moravej, H., Malakzadegan, A., et al., 2010. Efficacy of *Pediococcus acidilactici*-based probiotic on intestinal Coliforms and villus height, serum cholesterol level and performance of broiler chickens. African Journal of Biotechnolog. 9(44): 7564-7567.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P. and Verstraete, W., 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiology and Molecular Biology reviews. 64(4): 655-671.