

H₂O₂ PRODUCTION IN *Lactobacillus* STRAINS ISOLATED FROM THE INTESTINAL MICROBIOME OF HEALTHY PEOPLE

Ha Thi Thu¹, Hoang The Hung², Tran Xuan Thach¹, Nguyen Thi Hoa¹, La Thi Lan Anh³, Vu Thi Hien¹, Nguyen Dinh Duy¹, Dong Van Quyen¹, Nguyen Thi Tuyet Nhung^{1,*}

¹ Molecular Microbiology Department - Institute of Biotechnology (IBT) - Vietnam Academy of Science and Technology (VAST)

² Research Institute of Military Logistics Science - Military Academy of Logistics

³ Graduate University of Science and Technology - VAST

Received 20 October 2019, accepted 6 January 2020

ABSTRACT

Lactobacillus sp. in the digestive tract are capable of producing H₂O₂ to inhibit the growth of harmful bacteria and balance the gut microflora. In this study, we have isolated 115 strains of *Lactobacillus* spp. from stool samples of healthy people in Ha Noi. Of the 50 tested *Lactobacillus* strains, 9 strains were capable of producing H₂O₂, of which the Lac.VFE-14 strain produced highly H₂O₂ with a concentration of 2.183 mM, followed by Lac.VFE-08 strains (2.081 mM) and Lac.VFE-04 (2.067 mM). All three strains grew well in MRS medium supplemented with bile salts or adjusted to low pH value. With 0.3% of bile salt, the survival rates of these 3 strains were 99%, 95% and 97%, respectively. At pH 3.0, after 3 hours of cultivation, the survival rates of the three strains were 98.54%, 94.15% and 95.27%, respectively. In addition, each of the cell-free culture supernatants of these three strains that inhibit the growth of *S. aureus* ATCC-23235. The inhibition zone diameters of the three strains were 19.0±1.0 mm, 14.0±1.0 mm and 11.7±1.3 mm, respectively. The results of 16S rRNA gene analyses showed that Lac.VFE-14, Lac.VFE-08 and Lac.VFE-04 had high similarity scores with *L. plantarum* ZZU 23 (100%), *L. rhamnosus* JCM 1136 (99%) and *L. plantarum* S7 (98.65%), respectively. This study indicates that all three strains have the potential to be used as probiotics in the future.

Keywords: *Lactobacillus*, *Staphylococcus aureus*, H₂O₂, bile salt, antimicrobial activity.

Citation: Ha Thi Thu, Hoang The Hung, Tran Xuan Thach, Nguyen Thi Hoa, La Thi Lan Anh, Vu Thi Hien, Nguyen Dinh Duy, Dong Van Quyen, Nguyen Thi Tuyet Nhung, 2020. H₂O₂ production in *Lactobacillus* strains isolated from the intestinal microbiome of healthy people. *Tap chi Sinh hoc*, 42(1): 83–92. <https://doi.org/10.15625/0866-7160/v42n1.14508>.

*Corresponding author email: ntnhung@ibt.ac.vn

©2020 Vietnam Academy of Science and Technology (VAST)

KHẢ NĂNG SINH H₂O₂ CỦA CÁC CHỦNG VI KHUẨN *Lactobacillus* PHÂN LẬP TỪ HỆ VI KHUẨN ĐƯỜNG RUỘT CỦA NGƯỜI KHỎE MẠNH

Hà Thị Thu¹, Hoàng Thế Hưng², Trần Xuân Thạch¹, Nguyễn Thị Hoa¹, Lã Thị Lan Anh³,
Vũ Thị Hiền¹, Nguyễn Đình Duy¹, Đồng Văn Quyền¹, Nguyễn Thị Tuyết Nhung^{1,*}

¹Phòng Vi sinh vật học phân tử, Viện Công nghệ Sinh học,
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Viện Nghiên cứu Khoa học Hậu cần Quân sự, Học viện Hậu cần

³Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Ngày nhận bài 20-10-2019, ngày chấp nhận 6-1-2020

TÓM TẮT

Vi khuẩn *Lactobacillus* sp. trong đường tiêu hóa, có khả năng sinh H₂O₂ ức chế sự sinh trưởng vi khuẩn gây hại và làm cân bằng hệ vi khuẩn có ích. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phân lập được 115 chủng vi khuẩn *Lactobacillus* từ mẫu phân của người khỏe mạnh tại Hà Nội. Trong số 50 chủng *Lactobacillus* được kiểm tra, có 9 chủng có khả năng sinh H₂O₂, trong đó chủng Lac.VFE-14 sinh H₂O₂ mạnh nhất với nồng độ thu được là 2,183 mM, tiếp theo là các chủng Lac.VFE-08 (2,081 mM) và Lac.VFE-04 (2,067 mM). Ba chủng này đều sinh trưởng tốt trong môi trường MRS có bổ sung muối mật hay môi trường có độ pH thấp. Với 0,3% muối mật, tỷ lệ tế bào sống sót của 3 chủng nêu trên ương ứng là 99%, 95% và 97%. Ở pH 3, sau 3 giờ nuôi cấy, tỷ lệ tế bào sống sót của 3 chủng ương ứng là 98,54%, 94,15% và 95,27%. Bên cạnh đó, dịch nuôi đã loại bỏ tế bào của 3 chủng này có khả năng ức chế sự sinh trưởng của vi khuẩn *Staphylococcus aureus* ATCC-23235. Hoạt tính ức chế thể hiện qua đường kính vòng kháng khuẩn của 3 chủng ương ứng là 19,0±1,0 mm; 14,0±1,0 mm và 11,7±1,3 mm. So sánh trình tự 16S của 3 chủng với các trình tự đã được công bố trên ngân hàng gen cho thấy 3 chủng này có sự tương đồng cao lần lượt với *L. plantarum* ZZU 23; *L. rhamnosus* JCM 1136 và *L. plantarum* S7. Kết quả thu được cho thấy cả 3 chủng này đều có tiềm năng sử dụng làm probiotic trong tương lai.

Từ khóa: *Lactobacillus*, *Staphylococcus aureus*, H₂O₂, muối mật, kháng khuẩn.

*Địa chỉ liên hệ email: nttnhung@ibt.ac.vn

MỞ ĐẦU

Lactobacillus là một trong những vi khuẩn probiotic được sử dụng phổ biến, đem lại nhiều lợi ích cho sức khỏe con người. Sử dụng probiotic *Lactobacillus* làm cân bằng hệ vi sinh vật đường tiêu hóa trong cơ thể vật chủ, điều chỉnh phản ứng miễn dịch và chống lại hoạt động của các vi sinh vật gây bệnh (Markowiak, 2017). Các chủng *Lactobacillus* spp. có khả năng ức chế và tiêu diệt các vi sinh vật gây bệnh do sự cạnh tranh chất dinh

dưỡng, khả năng sản sinh axit làm giảm pH môi trường, tạo biofilm và các chất kháng khuẩn trong đó có H₂O₂ (Bermudez et al., 2012).

H₂O₂ là một chất oxi hóa mạnh, có khả năng dễ dàng chuyển đổi thành gốc hydroxyl, đây là một chất oxi hóa mạnh có tác dụng gây độc cho tế bào, ức chế sự sinh trưởng của nhiều loài vi khuẩn như *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* và *Staphylococcus aureus* (Boateng et al., 2011).

Một số thành viên trong nhóm vi khuẩn *Lactobacillus* có khả năng sản sinh H₂O₂ như: *L. johnsonii*, *L. acidophilus*, *L. fermentum* và *L. gasseri* (Hertzberger et al., 2014). Tùy thuộc vào từng chủng, khả năng sản xuất H₂O₂ của chúng khác nhau với nồng độ dao động trong khoảng từ 0,8 đến 6,4 mM (Belicová et al., 2013). Khả năng tạo H₂O₂ của chủng *L. fermentum* CS 12-1 là 3,5 mM (Kang et al., 2005), chủng *L. johnsonii* NCC533 là 1 mM (Hertzberger et al., 2014) hay các chủng *Lactobacillus* từ 0,059 đến 0,176 mM (Zalán et al., 2005).

Vi khuẩn *Lactobacillus* có khả năng ức chế sinh trưởng và tiết độc tố của vi khuẩn *S. aureus* (Eggers et al., 2018). Nghiên cứu của Misaghi et al. (2017) cho thấy, cả ba loài *L. acidophilus*, *L. paracasei* và *L. fermentum* đều có khả năng ức chế sinh trưởng của *S. aureus*. Ngoài ra, các chủng thuộc chi *Lactobacillus* này cũng ức chế biểu hiện gen Staphylococcal enterotoxin, một yếu tố gây độc chính của *S. aureus*. Bằng thử nghiệm lâm sàng, Eggers et al. (2018) cho thấy, những người sử dụng vi khuẩn probiotic *L. rhamnosus* HN001 có khả năng làm giảm từ 73 đến 83% số lượng vi khuẩn *S. aureus* đường ruột so với những người chỉ dùng giả dược. Hơn nữa, dịch nuôi đã loại bỏ tế bào *Lactobacillus* cũng ức chế sinh trưởng của *S. aureus* nhờ chúng có khả năng tiết ra môi trường những chất kháng khuẩn như ethanol, H₂O₂ và các bacteriocin (Chen et al., 2019).

Từ những lý do nêu trên, trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phân lập, sàng lọc và đánh giá khả năng sinh H₂O₂ của các chủng vi khuẩn *Lactobacillus* và kiểm tra khả năng kháng *S. aureus* của các chủng vi khuẩn này. Kết quả thu được sẽ bổ sung nguồn dữ liệu cho các nghiên cứu về khả năng sinh H₂O₂ cũng như các hợp chất kháng khuẩn của vi khuẩn *Lactobacillus* sp được phân lập ở Việt Nam.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguồn mẫu phân lập

Các mẫu phân từ từ những người khỏe mạnh tình nguyện tham gia nghiên cứu sống ở khu vực Hà Nội tự thu thập và để trong

hộp vô trùng. Mẫu sau đó được giữ lạnh ở 4°C và chuyển ngay đến phòng thí nghiệm để phân tích.

Phân lập vi khuẩn *Lactobacillus*

Quá trình phân lập các chủng *Lactobacillus* từ mẫu phân thường gặp khó khăn vì sự hiện diện của các vi sinh vật cạnh tranh với số lượng lớn như: *Bifidobacterium*, *Streptococcus* và *Enterococcus*. Vì thế, chúng tôi đã lựa chọn môi trường MRS; pH 6,2 cho việc phân lập chủng *Lactobacillus* từ mẫu phân vì môi trường này cho số lượng khuẩn lạc tốt với kích thước và hình thái khuẩn lạc đặc trưng cho *Lactobacilli* (Corry et al., 2003). Một gam mẫu phân sẽ được hòa trong 9 mL nước muối sinh lý vô trùng. Dung dịch sau đó sẽ được pha loãng 10 lần liên tiếp cho đến 10⁻⁷. Mỗi một nồng độ pha loãng từ 10⁻⁵ đến 10⁻⁷ sẽ được cấy gọt trên môi trường thạch MRS (de Man, Rogosa & Sharpe) và được nuôi cấy trong điều kiện kỵ khí ở 37°C trong 48 giờ. Các khuẩn lạc phát triển trên các đĩa MRS sẽ được lựa chọn và làm sạch bằng cách cấy ria trên đĩa MRS để thu nhận những khuẩn lạc riêng lẻ. Những khuẩn lạc này sẽ được giữ trên đĩa thạch MRS để sử dụng cho những nghiên cứu tiếp và được lưu trữ lâu dài ở (-)80°C trong dịch MRS có bổ sung 20% glycerol. Các mẫu vi khuẩn sẽ được kiểm tra hình thái dưới kính hiển vi, hoạt tính catalase và nhuộm Gram. Chỉ những khuẩn lạc âm tính với hoạt tính catalase và là Gram dương sẽ được lựa chọn cho nghiên cứu tiếp theo.

Phương pháp định tính và định lượng H₂O₂

Phương pháp của Martín & Suárez (2010) được sử dụng để xác định sự có mặt của H₂O₂ trong dịch nuôi các chủng vi khuẩn *Lactobacillus* đã phân lập (Martín & Suárez, 2010). Vi khuẩn được cấy chuyển sang 5 mL môi trường MRS nuôi lắc 200 vòng/phút ở 37°C trong 24 giờ. Tế bào vi khuẩn được loại bỏ bằng ly tâm, dịch nổi thu được bổ sung vào hỗn hợp có chứa enzyme HRP (horseradish peroxidase, Sigma, USA) và TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbezidine, Sigma) trong đệm phosphate (pH 6) với tổng thể tích 1 mL. Ban đầu TMB ở dạng khử, không màu, khi có mặt của HRP và H₂O₂, TMB bị oxi hóa và chuyển thành màu xanh.

Phương pháp trên cũng được sử dụng để định lượng nồng độ H_2O_2 do các chủng vi khuẩn sản xuất được. Tiến hành dựng đường chuẩn về mối tương quan giữa nồng độ H_2O_2 và mật độ quang ở bước sóng 620 nm của sản phẩm màu sau phản ứng với TMB bằng cách sử dụng dung dịch chuẩn H_2O_2 100 mM. Nồng độ H_2O_2 do các chủng vi khuẩn *Lactobacillus* sinh ra được tính toán dựa vào đường chuẩn khi đo độ hấp thụ quang ở bước sóng 620 nm. Mỗi một thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Phương pháp xác định khả năng chịu muối mật và axit

Các chủng vi khuẩn đã sàng lọc có khả năng sinh H_2O_2 được nuôi cấy trong bình chứa môi trường MRS có bổ sung muối mật Oxgall (Sigma) với nồng độ 0,3% và bình đối chứng không bổ sung muối mật. Bình nuôi cấy được ủ ở nhiệt độ 37°C trong vòng 24 giờ, sau đó kiểm tra khả năng sống sót của các chủng vi khuẩn bằng phương pháp pha loãng và cấy trên đĩa thạch, đếm số lượng khuẩn lạc.

Sau 24 giờ nuôi cấy các chủng vi khuẩn *Lactobacillus* trong môi trường MRS, tiến hành thử nghiệm khả năng chịu axit bằng cách ủ ở pH 2 và pH 3 trong 3 giờ. Pha loãng và cấy trên đĩa thạch để xác định khả năng sống sót của các chủng vi khuẩn.

Phương pháp định danh các chủng *Lactobacillus* bằng giải trình tự gen 16S rRNA

16S rARN gồm các vùng bảo tồn và biến đổi cao, thường được sử dụng để nhận dạng loài và phân biệt loài (Tomas et al., 2013). Các chủng vi khuẩn được chọn lọc, sẽ được định danh bằng phương pháp sinh học phân tử dựa theo kỹ thuật giải trình tự đoạn gen 16S rARN (Nanda et al., 2018).

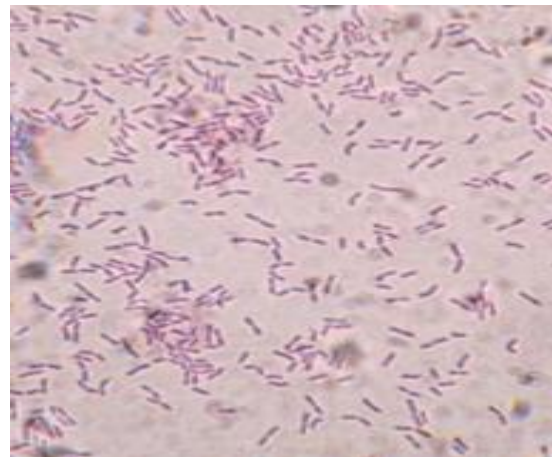
Xác định khả năng ức chế sinh trưởng trên vi khuẩn gây bệnh *Staphylococcus*

Một mL dịch tế bào vi khuẩn *S. aureus* ATCC-23235 được trải đều trên bề mặt đĩa petri chứa 15 mL môi trường thạch BHI (Brain Heart Infusion), sau đó hút bỏ dịch thừa. Để đĩa thạch vào tủ ấm 37°C trong 15 phút. Dịch nuôi vi khuẩn *Lactobacillus* 24 giờ

được ly tâm loại bỏ tế bào. Nhỏ 20 μ L dịch ly tâm các chủng vi khuẩn *Lactobacillus* gồm Lac.VFE-04, Lac.VFE-08, Lac.VFE-14 hoặc dung dịch muối sinh lý (làm đối chứng) thành từng điểm riêng trên đĩa petri đã trải vi khuẩn *S. aureus* ATCC-23235. Ủ các đĩa petri đã được cấy vi khuẩn trong điều kiện hiếu khí với nhiệt độ 37°C. Sau 48 giờ nuôi cấy, quan sát hiện tượng và đo kích thước vòng kháng khuẩn quanh điểm nhỏ dịch ly tâm các chủng vi khuẩn *Lactobacillus* để xác định khả năng ức chế sinh trưởng của dịch nuôi đối với vi khuẩn *S. aureus* ATCC-23235.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Chúng tôi đã phân lập được trên môi trường MRS 115 chủng *Lactobacillus*. Các khuẩn lạc chủ yếu có dạng lồi, mịn (không nhăn), trắng đục, không màu, rìa trơn hoặc xé thùy. Trên môi trường MRS, các khuẩn lạc trên cùng một đường rìa mọc đều nhau, phát triển đồng nhất về hình thái và màu sắc không lẫn khuẩn lạc lạ (hình 1). Các vi khuẩn này đồng nhất dưới kính hiển vi quang học, hình que, dương tính khi nhuộm Gram và âm tính với thử nghiệm catalase.

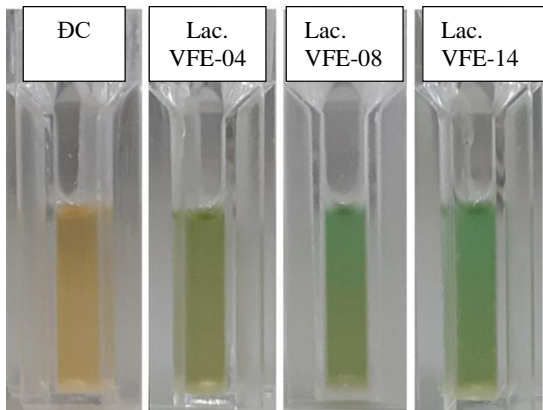


Hình 1. Tế bào *Lactobacillus* (Lac.VFE-14) nhuộm gram quan sát dưới kính hiển vi điện tử

Định tính và định lượng H_2O_2

Phương pháp đo màu dựa trên HRP/TMB được chúng tôi sử dụng để xác định sự có mặt của H_2O_2 trong dịch nuôi vi khuẩn có độ nhạy

cao và độc tính thấp (Xianyu et al., 2013). Các phản ứng màu với TMB có độ nhạy rất cao, phát hiện được nồng độ H₂O₂ từ lượng rất thấp từ nanomolar đến millimolar (Martin et al., 2010).



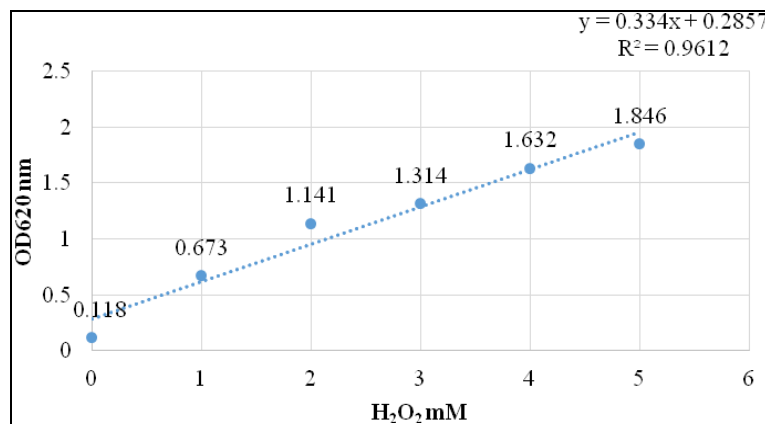
Hình 2. Khả năng sinh H₂O₂ của các chủng vi khuẩn *Lactobacillus* so với đối chứng

Sau khi bổ sung HRP và TMB vào dịch nuôi vi khuẩn *Lactobacillus* đã ly tâm, môi trường chuyển ngay từ màu vàng sang xanh ở hầu hết các mẫu với độ đậm nhạt khác nhau tùy thuộc vào lượng H₂O₂ có mặt trong dịch nuôi của từng chủng vi khuẩn (hình 2).

Kết quả kiểm tra khả năng sinh H₂O₂ của các chủng vi khuẩn *Lactobacillus* đã phân lập được thể hiện trên bảng 1. Trong đó, chủng có khả năng sinh ra lượng H₂O₂ lớn nhất là Lac.VFE-14 đạt 2,183 mM, tiếp theo là

Lac.VFE-08 và Lac.VFE-04 với nồng độ H₂O₂ tương ứng đạt 2,081 mM và 2,067 mM sau 24 giờ nuôi cấy. Lượng H₂O₂ sinh ra của các chủng đã phân lập được tương đối cao so với với các chủng ở các nghiên cứu trước đó.

Nghiên cứu cho thấy khả năng sinh H₂O₂ phụ thuộc vào từng loài cụ thể. Trong thí nghiệm của Hertzberger et al. (2014), khả năng sinh H₂O₂ của chủng *L. johnsonni* NCC 533 là 1 mM, trong khi khả năng sản sinh H₂O₂ của *L. plantarum* 2142 là 0,16 mM còn *L. casei* Shiota là 0,056 mM (Zalán et al., 2005). Nguồn carbon cũng có ảnh hưởng nhất định đến nồng độ H₂O₂. Khi sử dụng nguồn carbon là galactose, *L. bulgaricus* sản xuất được lượng H₂O₂ cao nhất là 0,02 mM, nhưng khi sorbitol được sử dụng, lượng H₂O₂ được tạo ra là 0,0006 mM. Ngoài ra, nguồn nitơ hay yếu tố nhiệt độ cũng có khả năng tác động lên khả năng sinh H₂O₂ của vi khuẩn (Enitan et al., 2011). Như vậy, ở các điều kiện nuôi cấy khác nhau sự tổng hợp H₂O₂ là khác nhau. Lượng H₂O₂ sản xuất được cũng phụ thuộc vào khả năng của từng chủng vi sinh vật. Ngoài ra, phương pháp định lượng có ảnh hưởng lớn đến việc xác định nồng độ H₂O₂ mà vi sinh vật sản xuất được trong môi trường. Vì vậy cần tối ưu điều kiện nuôi cấy và chọn lọc các chủng vi sinh vật để thu được hàm lượng H₂O₂ cao nhất, đồng thời cần lựa chọn phương pháp định lượng phù hợp để xác định hàm lượng H₂O₂ vi sinh vật tổng hợp được.



Hình 3. Đường chuẩn thể hiện mối tương quan giữa nồng độ H₂O₂ và mật độ quang của sản phẩm màu sau phản ứng với TMB

Bảng 1. Giá trị trung bình của 3 lần đo OD_{620nm} và hàm lượng H₂O₂ có trong dịch nuôi

Chủng vi khuẩn	Giá trị OD _{620nm}	Nồng độ H ₂ O ₂ (mM)
Lac.VFE-04	0,976 ± 0,011	2,067 ± 0,008
Lac.VFE-08	0,981 ± 0,012	2,081 ± 0,003
Lac.VFE-09	0,621 ± 0,017	1,005 ± 0,012
Lac.VFE-14	1,015 ± 0,014	2,183 ± 0,006
Lac.VFE-16	0,557 ± 0,012	0,812 ± 0,012
Lac.VFE-17	0,454 ± 0,013	0,504 ± 0,001
Lac.VFE-48	0,560 ± 0,012	0,822 ± 0,002
Lac.VFE-72	0,327 ± 0,011	0,125 ± 0,005
Lac.VFE-76	0,294 ± 0,014	0,024 ± 0,001

Khả năng chịu pH axit và muối mật của các chủng được chọn lọc

Đề đến được ruột non và đại tràng ở người, thực hiện chức năng sinh học, vi sinh vật cần phải vượt qua dạ dày, nơi có pH rất thấp (pH < 3) (Derrien et al., 2015). Khả năng chịu axit của các chủng vi khuẩn được khảo sát bằng cách xác định số lượng khuẩn lạc sau khi ủ vi khuẩn ở pH 2 và 3 trong 3 giờ. Kết quả được thể hiện ở bảng 2. Sau 3 giờ ủ ở pH 3, tỷ lệ sống sót của các chủng vi khuẩn này khá cao, tương ứng 95,27%, 94,15% và 98,54%. Ở pH 2, lượng tế bào còn sống so với

đối chứng vẫn tương đối cao, với tỷ lệ sống của Lac.VFE-04, Lac.VFE-08 và Lac.VFE-14 tương ứng 85,12%, 84,51% và 88,22%.

Sau khi di chuyển qua dạ dày, vi sinh vật lại phải đối mặt với dịch mật. Sự tiếp xúc với mật là một thử thách cho các vi khuẩn xâm nhập vào đường tiêu hóa. 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 (Urdaneta et al., 2017). Vì thế khả năng chịu axit và muối mật là đặc tính quan trọng cần có của hệ vi khuẩn đường ruột.

Bảng 2. Tỷ lệ sống sót sau khi ủ của các chủng vi khuẩn đã chọn lọc so với đối chứng

Chủng	Tỷ lệ sống sót sau khi ủ (%)		
	0,3% muối mật	pH 2	pH 3
Lac.VFE-04	97,02 ± 1,12	85,12 ± 5,44	95,27 ± 3,21
Lac.VFE-08	95,15 ± 1,14	84,51 ± 8,01	94,15 ± 5,69
Lac.VFE-14	99,08 ± 1,02	88,22 ± 5,14	98,54 ± 6,68

Nồng độ muối mật 0,3% được xem là nồng độ quan trọng để xác định khả năng chịu muối mật của các chủng vi khuẩn probiotic LAB (Belicová et al., 2013). Hầu hết các chủng được chúng tôi thử nghiệm đều duy trì khả năng sinh trưởng tốt trong môi trường MRS có bổ sung muối mật 0,3%. So với đối chứng không có muối mật, tỷ lệ sinh trưởng của các chủng này dao động từ 90 đến 99%. Chủng Lac.VFE-14 có khả năng sinh trưởng tốt nhất với tỷ lệ 99,08%, gần như không có sự khác biệt so với đối chứng. Các chủng Lac.VFE-04 và Lac.VFE-08 có tỷ lệ sống sót tương ứng là 97,02% và 95,15% (bảng 2).

Kết quả trên cho thấy, các chủng vi khuẩn trong nghiên cứu này có khả năng chịu axit và muối mật tốt so với với các chủng vi khuẩn lactic ở các nghiên cứu trước. Trong nghiên cứu của Nguyễn Văn Thanh và nnk. (2007) cũng đã chỉ ra trong môi trường pH 3 và 4, tỷ lệ sống của các chủng *L. acidophilus* và *L. casei* là 41 và 65%. Trong điều kiện pH 2, tỷ lệ sống sót của 2 chủng vi khuẩn lactic *L. casei* VTCC186 và *L. pentosus* D3 trong sản phẩm kefir chanh dây là 39,36 và 52,01%. Các chủng này cũng có khả năng sinh trưởng trên môi trường có sự hiện diện của muối mật với nồng độ 0,3% (Quách Đức Tính và nnk.,

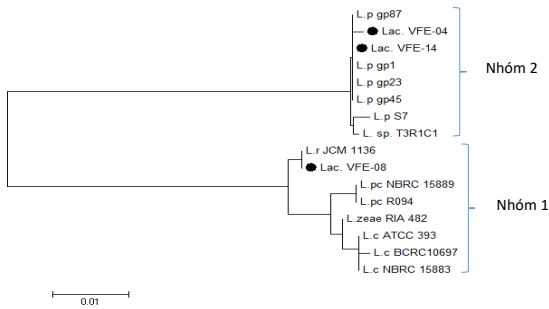
2013). Một nghiên cứu khác (Shehata et al., 2016) cho thấy, trong môi trường MRS có bổ sung 0,3% muối mật, tỷ lệ sống sót của các chủng vi khuẩn lactic dao động trong khoảng 69,8 đến 85%. Các chủng này cũng có tỷ lệ sống sót từ 68 đến 88,3% sau 3 giờ ủ trong môi trường dịch dạ dày nhân tạo ở pH 2. Như vậy, có thể thấy, so với những chủng đã được nghiên cứu trước đây, 3 chủng Lac.VFE-04, Lac.VFE-08 và Lac.VFE-14 có khả năng chịu pH axit và muối mật vượt trội hơn hẳn.

Kết quả định danh vi khuẩn theo phương pháp giải trình tự gen 16S rRNA

Sau khi so sánh trình tự 16S rRNA của 3 chủng chọn lọc được với các trình tự 16S rRNA đã được công bố trên ngân hàng gen (NCBI), cho thấy Lac.VFE-14 và Lac.VFE-04 có mức độ tương đồng là 100% và 99% tương ứng so với chủng *L. plantarum* ZZU 23 và *L. plantarum* S7. Trong khi đó, Lac.VFE-08 có độ tương đồng lên tới 98,65% so với *L. rhamnosus* JCM 1136 (bảng 3).

Bảng 3. Kết quả so sánh với các trình tự 16S đã được công bố trên ngân hàng gen (NCBI) của Lac.VFE -04, Lac.VFE -08 và Lac.VFE -14

Kí hiệu chủng phân lập	Tên chủng	Mã số đăng ký trên NCBI	Identify (Tương đồng)
Lac.VFE -04	<i>L. plantarum</i> S7	GU195646.1	99%
	<i>L. plantarum</i> T3R1C1	JX193637.1	99%
	<i>L. plantarum</i> ST-III	CP002222.1	99%
Lac.VFE -08	<i>L. rhamnosus</i> JCM 1136	NR_113332.1	98,65%
	<i>L. rhamnosus</i> NBRC 3425	NR_043408.1	98,38%
	<i>L. rhamnosus</i> JCM 1136	NR_043408.1	98,38%
Lac.VFE -14	<i>L. plantarum</i> ZZU 23	AB830324.1	100%
	<i>L. plantarum</i> C	KM507561.1	100%
	<i>L. plantarum</i> KLB 416	KM670024.1	100%



Hình 4. Quan hệ phát sinh chủng loại trình tự gene 16S các chủng phân lập Lac. VFE-04, Lac. VFE-08, Lac. VFE-14 phân tích bằng phần mềm MEGA7 Neighbor-Joining Tree

Với kết quả này, khi xây dựng cây phát sinh chủng loại để đánh giá mối quan hệ di truyền của các chủng phân lập với một số chủng thuộc chi *Lactobacillus*. Kết quả thu được cho thấy, các chủng được khảo sát chia thành 2 nhóm rõ rệt. Trong đó, **nhóm 1** cho thấy chủng phân lập Lac. VFE-08 có mối

quan hệ di truyền gần nhất với chủng *L. rhamnosus* JCM 1136 và các chủng thuộc chi *Lactobacillus* như *L. paracasei*, *L. casei* và *L. zeae* (hình 4). **Nhóm 2**, các chủng phân lập Lac. VFE-04, Lac. VFE-14 thể hiện mối quan hệ di truyền cao nhất với các chủng thuộc loài *L. plantarum*.

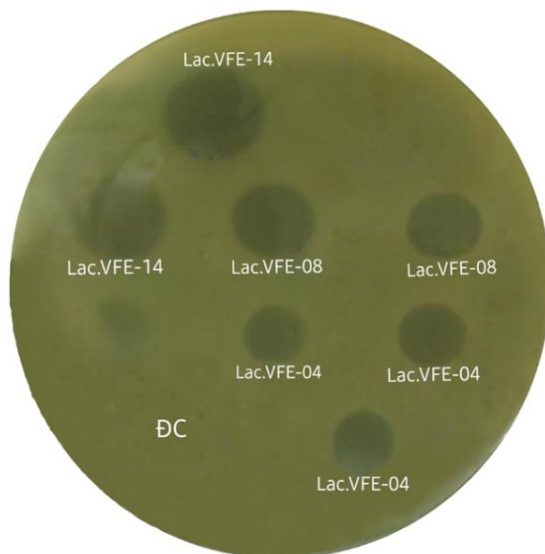
Dựa trên kết quả cây phát sinh loài, 2 dòng Lac.VFE-04 và Lac.VFE-14 có quan hệ gần với *L. plantarum* và Lac.VFE-08 là *L. rhamnosus*.

Khả năng ức chế sinh trưởng trên vi khuẩn gây bệnh *S. aureus*

S. aureus là một trong những tác nhân chính gây nhiễm trùng ở người cũng như động vật (Johansson et al., 2016; Ren et al., 2017). Việc sử dụng kháng sinh liều cao để tiêu diệt vi khuẩn này có nguy cơ gây kháng kháng sinh. Vì vậy, hiện nay sản phẩm probiotics đang được sử dụng như một liệu pháp thay thế

kháng sinh để chống lại vi khuẩn này (Eggers et al., 2018).

Lactobacillus đã được biết đến từ lâu với khả năng sinh chất kháng khuẩn bao gồm H_2O_2 , kháng sinh, các axit hữu cơ. Trong nghiên cứu này, dịch nuôi vi khuẩn đã loại bỏ tế bào của các chủng vi khuẩn Lac.VFE-04, Lac.VFE-08 và Lac.VFE-14 đều thể hiện khả năng ức chế sinh trưởng của vi khuẩn *S. aureus* ATCC-23235, khả năng ức chế của mỗi chủng là khác nhau được thể hiện trên hình 5. Hoạt tính ức chế sự sinh trưởng của *S. aureus* ATCC-23235 của các chủng vi khuẩn này được xác định bằng cách đo đường kính vòng kháng khuẩn trên đĩa petri. Chủng Lac.VFE-14 có đường kính vòng kháng khuẩn lớn nhất là $19,0 \pm 1,0$ mm, tiếp theo là các chủng Lac.VFE-08 với đường kính là $14,0 \pm 1,0$ mm và Lac.VFE-04 là $11,7 \pm 1,3$ mm.



Hình 5. Khả năng ức chế sự sinh trưởng trên *S. aureus* của các chủng *Lactobacillus*

Trong nghiên cứu về *L. rhamnosus*, Fornitano et al. (2019) cho thấy khả năng ức chế sự sinh trưởng của *S. aureus* cũng như làm giảm khả năng sản xuất enzyme gây độc coagulase (giảm từ 20,45 đến 22,73%). Đối với probiotic *L. rhamnosus* HN001, sau 4 tuần thử nghiệm trên các đối tượng bình sĩ dương tính với nhiễm *S. aureus*, số lượng *S. aureus*

giảm 73 đến 83% so với nhóm dùng giả dược (Eggers et al., 2018). Nghiên cứu của Misaghi et al. (2017) cho thấy các vi khuẩn *Lactobacillus* gồm *L. acidophilus*, *L. fermentum* và *L. paracasei* ức chế sự sản xuất các Staphylococcal enterotoxin (SE) bao gồm SEA, SEC và SEE của vi khuẩn *S. aureus*.

Như vậy, có thể thấy các chủng vi khuẩn Lac.VFE-04, Lac.VFE-08 và Lac.VFE-14 trong nghiên cứu này có khả năng ức chế sự sinh trưởng của *S. aureus* ATCC-23235, có tiềm năng trong tương lai để hỗ trợ điều trị bệnh nhiễm trùng do *S. aureus*.

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã phân lập được 115 chủng *Lactobacillus* trên môi trường MRS từ các mẫu phân của những người khỏe mạnh. Trong đó, ba chủng biểu hiện hoạt tính sinh H_2O_2 mạnh nhất lần lượt là Lac.VFE-14 (2,183 mM), Lac.VFE-08 (2,081 mM) và Lac.VFE-04 (2,067 mM). Kết quả trình tự 16S rARN của 3 chủng cho thấy Lac.VFE-14 có độ tương đồng 100% với *L. plantarum* ZZU 23; Lac.VFE-04 có độ tương đồng 99% với *L. plantarum* S7 và Lac.VFE-08 có độ tương đồng 98,65% với *L. rhamnosus* JCM 1136. Sản phẩm tiết của các chủng này có tác dụng ức chế vi khuẩn *S. aureus* ATCC-23235. Các chủng này có tiềm năng dùng cho sản xuất probiotic nhờ khả năng chịu được môi trường pH axit và muối mật cũng như khả năng ức chế sự sinh trưởng của vi khuẩn *S. aureus* ATCC-23235.

Lời cảm ơn: Công trình này được thực hiện nhờ sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài mã số CT0000.03/18-19 do TS. Nguyễn Thị Tuyết Nhung làm chủ nhiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Belicová A., Mikulášová M., Dušinský R., 2013. Probiotic potential and safety properties of *Lactobacillus plantarum* from Slovak Bryndza cheese. *BioMed research international*, 2013(ID 760298): 8 pp.
- Bermudez-Brito M., Plaza-Díaz J., Muñoz-Quezada S., Gómez-Llorente C., Gil A., 2012. "Probiotic mechanisms of action."

- Annals of Nutrition and Metabolism*, 61(2): 160–174.
- Boateng, M., S. Price, K. Huddersman and S. E. Walsh ., 2011. Antimicrobial activities of hydrogen peroxide and its activation by a novel heterogeneous Fenton's-like modified PAN catalyst. *Journal of applied microbiology*, 111(6): 1533–1543.
- Chen C., Lai C., Huang L., Huang Y., Toh S., Weng C., Chuang C., Lu C., H.-J. Tang ., 2019. Antimicrobial activity of *Lactobacillus* species against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Frontiers in microbiology*, 10: 789.
- Corry J.E.L., Curtis G.D.W., Baird R. M., 2003. Handbook of Culture Media for Food Microbiology. *Elsevier Science*, 37.
- Davoodabadi A., Dallal M. M. S., Foroushani A. R., Douraghi M., Harati F. A., 2015. Antibacterial activity of *Lactobacillus* spp. isolated from the feces of healthy infants against enteropathogenic bacteria. *Anaerobe*, 34: 53–58.
- Derrien M., van Hylckama Vlieg J. E., 2015. Fate, activity, and impact of ingested bacteria within the human gut microbiota. *Trends in microbiology*, 23(6): 354–366.
- Thi Bich Thuy Do, Thi Diem Huong Nguyen, 2018. Determination of salt intolerance and probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from gut of *Decapterus lajang*. *HUAF journal of agricultural science & technology, Hue University - University of Agriculture and Forestry*, 2(2): 799–806 [in Vietnamese].
- Eggers S., Barker A. K., Valentine S., Hess T., Duster M., Safdar N., 2018. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* HN001 on carriage of *Staphylococcus aureus*: results of the impact of probiotics for reducing infections in veterans (IMPROVE) study. *BMC infectious diseases*, 18(1): 129.
- Enitan A., Adeyemo J., Ogunbanwo S., 2011. Influence of growth conditions and nutritional requirements on the production of hydrogen peroxide by lactic acid bacteria. *African journal of microbiology research*, 5(15): 2059–2066.
- Fornitano A., Amêndola I., Santos S., 2019. *Lactobacillus rhamnosus* versus *Staphylococcus aureus*: influence on growth and expression of virulence factors. *J Dent Maxillofacial Res*, 2(2): 29–33.
- Hertzberger R., Arents J., Dekker H. L., Pridmore R. D., Gysler C., Kleerebezem M., de Mattos M. J. T., 2014. H₂O₂ production in species of the *Lactobacillus acidophilus* group: a central role for a novel NADH-dependent flavin reductase. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80(7): 2229–2239.
- Johansson M. A., Björkander S., Mata Forsberg M., Qazi K. R., Salvany Celades M., Bittmann J., Eberl M., Sverremark-Ekström E., 2016. Probiotic lactobacilli modulate *Staphylococcus aureus*-induced activation of conventional and unconventional T cells and NK cells. *Frontiers in immunology*, 7: 273.
- Kang D.-K., Oh H., Ham J.-S., Kim J., Yoon C., Ahn Y., Kim H., 2005. Identification and characterization of hydrogen peroxide-generating *Lactobacillus fermentum* CS12-1. *Asian-australasian journal of animal sciences*, 18(1): 90–95.
- Nanda., Chaudhary., Kumar., 2018. Molecular Approaches for Identification of Lactobacilli from Traditional Dairy. *Advances in Animal Biotechnology and its Applications*, 181–196.
- Van Thanh Nguyen, Thu Hoa Tran, Vu Tuong Vy Nguyen, 2007. Investigation of acid, bile salt and antibiotic tolerance of some oral probiotics. *Pharmaceutical journal*, 378: 255–263 [in Vietnamese].
- Markowiak P., Śliżewska K., 2017. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*, 9(9): 1021.
- Martín R., Suárez J. E., 2010. Biosynthesis and degradation of H₂O₂ by vaginal lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76(2): 400–405.

- Misaghi A., Parsaeimehr M., Akhondzadeh A., Gandomi H., Azizkhani M., 2017. The inhibitory effects of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus paracasei* isolated from yoghurt on the growth and enterotoxin A gene expression of *S. aureus*. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, 11(2): 191–201.
- Tomas Vetrovsky, Petr Baldrian ., 2013. The Variability of The 16S rRNA Gene in Bacterial Genomes and Its Consequences for Bacterial Community Analyses. *Plos One* 8: (2).
- Duc Tinh Quach, Thanh Trung Tong, Ngoc Duy Nguyen, Thuy Huong Nguyen, 2013. Investigation of some probiotic properties of traditional and *Lactobacillus casei* VTCC186-supplemented Kefir. *Science & Technology Development*, 16(3): 40–47 [in Vietnamese].
- Ren D., Gong S., Shu J., Zhu J., Rong F., Zhang Z., Wang D., Gao L., Qu T., Liu H., 2017. Mixed *Lactobacillus plantarum* strains inhibit *Staphylococcus aureus* induced inflammation and ameliorate intestinal microflora in mice. *BioMed research international.*, 2017(ID 7476467): 7 pages.
- Shehata M., El Sohaimy S., El-Sahn M. A., Youssef M., 2016. Screening of isolated potential probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering property and bile salt hydrolase activity. *Annals of Agricultural Sciences*, 61(1): 65–75.
- Urdaneta V., Casadesús J., 2017. Interactions between bacteria and bile salts in the gastrointestinal and hepatobiliary tracts. *Frontiers in medicine*, 4: 163.
- Xianyu Y., Zhu K., Chen W., Wang X., Zhao H., Sun J., Wang Z., Jiang X., 2013. Enzymatic assay for Cu (II) with horseradish peroxidase and its application in colorimetric logic gate. *Analytical chemistry*, 85(15): 7029–7032.
- Zalán Z., Németh E., Baráth Á., Halász A., 2005. Influence of growth medium on hydrogen peroxide and bacteriocin production of *Lactobacillus* strains. *Food Technology and Biotechnology*, 43(3): 219–225.