



DOI:10.22144/ctu.jsi.2019.042

## ĐÁNH GIÁ TIỀM NĂNG KHÁNG KHUẨN CỦA VI KHUẨN ACID LACTIC PHÂN LẬP TỪ SỮA MẸ VÀ PHÂN TRẺ EM

Nguyễn Tăng Phú<sup>1\*</sup> và Nguyễn Thị Liên<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Sinh viên ngành Công nghệ sinh học Khóa 40

<sup>2</sup>Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

\*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Nguyễn Tăng Phú (email: [ngtangphu103@gmail.com](mailto:ngtangphu103@gmail.com))

### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 13/11/2018

Ngày nhận bài sửa: 21/02/2019

Ngày duyệt đăng: 12/04/2019

### Title:

Determination of antimicrobial potential of lactic acid bacteria isolated from mothers' breast milk and children stools

### Từ khóa:

Bacteriocin, *Enterococcus faecalis*, kháng khuẩn, vi khuẩn acid lactic.

### Keywords:

Antimicrobial, bacteriocin, *Enterococcus faecalis*, lactic acid bacteria

### ABSTRACT

This study is aimed to assess the ability against some pathogenic bacteria of isolated lactic acid bacteria from mothers' breast milk and children stools. Thirty isolates were isolated on MRS-Cys medium, including 13 isolates from mothers' breast milk and 17 isolates from children stools. All the isolates were able to inhibit the growth of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Aeromonas hydrophila* strains which were screened by agar spot assay test. Only strain HF4.2 was able to inhibit the growth of *Candida albicans*. Bacteriocin production was observed by agar well diffusion assay. A subset of 11 isolates among 30 isolates were able to produce bacteriocin against *Escherichia coli*, 9/30 isolates against *Staphylococcus aureus*, 22/30 isolates against *Pseudomonas aeruginosa*, 22/30 isolates against *Aeromonas hydrophila* and no isolate was able to produce bacteriocin against *Candida albicans*. In combination of Agar spot assay test and Agar well diffusion assay, strain HF4.2 was potential. Identification of bacteria by DNA sequencing method and biochemical characterization showed that strain HF4.2 is *Enterococcus faecalis*.

### TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm khảo sát khả năng đối kháng lại một số vi sinh vật gây bệnh của các dòng vi khuẩn acid lactic được phân lập từ sữa mẹ và phân trẻ em. Ba mươi dòng vi khuẩn acid lactic được phân lập trên môi trường MRS-Cys, trong đó có 13 dòng được phân lập từ sữa mẹ và 17 dòng được phân lập từ phân trẻ em. Kết quả khảo sát khả năng đối kháng bằng phương pháp nhỏ giọt cho thấy tất cả 30 dòng vi khuẩn phân lập đều kháng lại 4 vi khuẩn chỉ thị là *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* và *Aeromonas hydrophila*. Chỉ có một dòng vi khuẩn HF4.2 có khả năng kháng lại nấm *Candida albicans*. Kết quả khảo sát khả năng ức chế vi sinh vật chỉ thị của bacteriocin từ các dòng vi khuẩn acid lactic cho thấy có 11/30 dòng ức chế *Escherichia coli*, 9/30 dòng ức chế *Staphylococcus aureus*, 22/30 dòng ức chế *Pseudomonas aeruginosa*, 22/30 dòng ức chế *Aeromonas hydrophila* và không có dòng vi khuẩn nào có khả năng ức chế *Candida albicans*. Từ kết quả khảo sát khả năng đối kháng qua hai phương pháp nhỏ giọt và khuếch tán giếng thạch đã chọn lọc được dòng vi khuẩn có tiềm năng là HF4.2. Kết quả giải trình tự vùng gen 16S rRNA và các thử nghiệm sinh hóa đã xác định được dòng HF4.2 là *Enterococcus faecalis*.

Trích dẫn: Nguyễn Tăng Phú và Nguyễn Thị Liên, 2019. Đánh giá tiềm năng kháng khuẩn của vi khuẩn acid lactic phân lập từ sữa mẹ và phân trẻ em. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 55(Số chuyên đề: Công nghệ Sinh học)(2): 41-48.

## 1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Hệ vi sinh vật ở con người là một yếu tố quan trọng và có tác động lớn đến sức khỏe cũng như cuộc sống của mỗi người. Trong các nhóm vi sinh vật ở con người thì vi khuẩn acid lactic là nhóm vi khuẩn rất đa dạng và có thể đem lại một số lợi ích cho sức khỏe. Chúng hiện diện trong đường ruột và cũng được tìm thấy trong khoang miệng, âm đạo hay sữa mẹ (Juan, 2014). Chúng có khả năng sản sinh nhiều hoạt chất kháng khuẩn như acid lactic, bacteriocin tạo môi trường bất lợi, từ đó ức chế vi sinh vật gây bệnh.

Trong những năm gần đây, vấn đề kháng lại kháng sinh của một số vi khuẩn gây bệnh tăng lên quá mạnh được coi là mối khủng hoảng trên toàn cầu và cần được nền công nghiệp dược phẩm, các viện và tổ chức chính phủ quan tâm chú ý (Varish *et al.*, 2016). Các vi khuẩn ngày càng dần trở nên kháng kháng sinh do nhiều nguyên nhân như: tỷ lệ vi khuẩn kháng các kháng sinh thông thường khá cao từ đó chúng tiếp tục lan truyền sang các chủng vi khuẩn khác; các kháng sinh bị lạm dụng khá nhiều trong các lĩnh vực như y tế, nông nghiệp và thực phẩm đặc biệt là ở những nước nghèo và đang phát triển kéo theo những tác động không tốt đến sức khỏe của con người. Do đó, đòi hỏi phải tìm ra được các chất kháng sinh mới có tiềm năng và an toàn.

Sức khỏe của con người luôn bị đe dọa bởi nhiều yếu tố, đặc biệt là các vi sinh vật gây bệnh. Bên cạnh đó vi khuẩn acid lactic rất phổ biến và có tiềm năng vô cùng to lớn trong việc bảo vệ sức khỏe cho con người. Xuất phát từ nhu cầu tìm ra được các tác nhân kiểm soát sinh học có lợi có nguồn gốc từ con người, nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân lập và tuyển chọn các dòng vi khuẩn acid lactic từ sữa mẹ và phân trẻ em có khả năng ức chế một số vi sinh vật gây bệnh thường gặp ở người.

## 2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Thu thập mẫu

Đối với mẫu sữa mẹ, 6 mẫu sữa từ các bà mẹ đang cho con bú trong 6 tháng đầu sau sinh được thu tại Bệnh viện Phụ sản thành phố Cần Thơ và tại hộ gia đình trong địa bàn thành phố Cần Thơ. Mỗi mẫu sữa được chứa trong các ống falcon vô trùng và trữ lạnh ở 4°C trong bình trữ đá để vận chuyển về phòng thí nghiệm. Đối với mẫu phân trẻ em, 8 mẫu phân của các bé ở những độ tuổi khác nhau được thu tại Bệnh viện Phụ sản thành phố Cần Thơ và tại hộ gia đình trong địa bàn thành phố Cần Thơ nhằm tạo nên sự đa dạng về nguồn mẫu phân lập cũng như về hệ vi sinh đường ruột của trẻ ở các độ tuổi. Độ tuổi của

trẻ có thể dao động khác nhau tùy thuộc vào điều kiện thực tế khi thu mẫu. Mỗi mẫu phân trộn đều trước khi thu mẫu và chứa trong các ống falcon vô trùng và trữ lạnh ở 4°C trong bình trữ đá để vận chuyển về phòng thí nghiệm.

Các vi sinh vật chi thị bao gồm: *Escherichia coli* (*E. coli*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Aeromonas hydrophila* (*A. hydrophila*), *Candida albicans* (*C. albicans*) được cung cấp bởi Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học.

### 2.2 Phân lập vi khuẩn acid lactic từ mẫu sữa mẹ và phân trẻ em

Môi trường Man, Rosaga và Sharpe bổ sung 0,5 g/L L-Cysteine (MRS-Cys) được dùng để phân lập vi khuẩn từ mẫu. L-Cystein được bổ sung nhằm mục đích tăng tính kỵ khí cho môi trường, theo kết quả nghiên cứu của Ana *et al.* (2014) sự bổ sung L-Cystein không ảnh hưởng đến sự phát triển của các nhóm vi khuẩn acid lactic khác. Các mẫu sữa được trộn đều và chuyển vào môi trường MRS-Cys lỏng vô trùng với tỷ lệ 1 mL mẫu/4 mL môi trường để hoạt hóa trong 24 giờ dưới điều kiện kỵ khí ở 37°C. Điều kiện kỵ khí này được tạo bằng cách đặt một ngọn nến đang cháy vào trong một bình thủy tinh đầy kín chứa môi trường nuôi cấy vi khuẩn, khi ngọn nến cháy hết sẽ tạo ra được điều kiện kỵ khí (Nguyễn Phước Hiền và Nguyễn Hữu Hiệp, 2014). Cân 1 g mẫu phân và chuyển vào 4 mL môi trường MRS-Cys lỏng, trộn đều để làm tan mẫu phân sau đó ủ trong điều kiện và thời gian tương tự với mẫu sữa mẹ. Sau khi hoạt hóa, dung dịch mẫu chứa vi khuẩn được pha loãng thành dãy nồng độ từ  $10^{-1}$  đến  $10^{-6}$  và trải lên môi trường MRS-Cys agar để tạo các khuẩn lạc rời rạc. Sau đó tiến hành quan sát, chọn lọc và phân lập các dòng vi khuẩn trên môi trường MRS-Cys agar cho đến khi thuần chủng.

### 2.3 Nhận diện nhóm vi khuẩn acid lactic

Sau khi được phân lập thuần chủng, các dòng vi khuẩn được ghi nhận đặc điểm khuẩn lạc sau 72 giờ ủ ở điều kiện kỵ khí ở 37°C. Hình dạng tế bào được quan sát dưới kính hiển vi quang học, khả năng di động được kiểm tra bằng cách cấy sâu trong ống thạch MRS-Cys bán rắn (0,3% agar). Sau đó tiến hành thử nghiệm sinh acid phân giải  $\text{CaCO}_3$ , catalase, oxidase, nhuộm Gram, KOH String và nhuộm bào tử. Vi khuẩn lactic được xác định khi có những đặc điểm như: Gram dương, không sinh bào tử, không di động, có khả năng phân giải được  $\text{CaCO}_3$ , catalase âm tính và oxidase âm tính (Ngô Thị Phương Dung *et al.*, 2011).

## 2.4 Khảo sát khả năng đối kháng các vi sinh vật gây bệnh

### 2.4.1 Phương pháp nhỏ giọt

Các dòng vi khuẩn phân lập được nuôi trong 5 mL môi trường MRS-Cys lỏng ở 37°C trong 24 giờ. Nhỏ 3 µL dịch vi khuẩn lên đĩa chứa sẵn 10 mL môi trường MRS-Cys agar, để khô rồi đem ủ ở 37°C trong điều kiện kỵ khí trong 24 giờ. Sau đó các đĩa được phủ lên bằng một lớp 5 mL môi trường Mueller Hinton Agar (MHA) bán rắn (0,7% agar) đã được chủng với 1% dịch nuôi các vi khuẩn *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *A. hydrophila* và môi trường Sabouraud bán rắn (0,7% agar) đã chủng với 1% dịch nuôi nấm *C. albicans*. Những đĩa này được ủ trong 48 giờ ở 37°C (riêng vi khuẩn *A. hydrophila* được ủ ở 30°C). Quan sát vòng ức chế xuất hiện quanh khuẩn lạc. Vi khuẩn được xem là có khả năng ức chế nếu đường kính vòng ức chế rộng hơn 2 mm (Ngô Thị Phương Dung và ctv., 2011).

### 2.4.2 Phương pháp khuếch tán giếng thạch

Các chủng vi khuẩn có khả năng kháng các vi sinh vật gây bệnh được nuôi trong 20 mL MRS-Cys lỏng dưới điều kiện kỵ khí ở 37°C trong 48 giờ; ly tâm dịch vi khuẩn ở 13.000 rpm trong 5 phút ở 4°C; lấy phần nước trong của dung dịch sau ly tâm; điều chỉnh dung dịch về pH 6,5 bằng NaOH 5N nhằm trung hòa lượng acid lactic có trong dịch ly tâm, lọc phần dịch qua màng lọc 0,22 µm và trữ lạnh ở 4°C.

Dùng tấm bông vô trùng trải đều dịch huyền phù vi khuẩn hoặc nấm có độ đục bằng với 0,5 McFarland lên đĩa môi trường MHA đối với các vi khuẩn *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *A. hydrophila* và Sabouraud agar đối với nấm *C. albicans*. Sau đó, tạo 4 giếng/đĩa và mỗi giếng có đường kính 6 mm. Thêm 100 µL dịch ly tâm đã chuẩn bị vào 3 giếng và thêm 100 µL môi trường MRS-Cys lỏng vào giếng đối chứng, ủ các đĩa ở 4°C trong vòng 30 phút để các chất lỏng dễ dàng khuếch tán trong thạch. Sau 30 phút chuyển các đĩa sang ủ ở 37°C (trừ vi khuẩn *A. hydrophila* được ủ ở 30°C).

Quan sát sự tạo vòng đối kháng sau 24 giờ và ghi nhận kết quả. Khi xuất hiện vòng ức chế quanh các giếng thạch chứng tỏ phần dịch thu được có chứa bacteriocin.

## 2.5 Nhận diện vi khuẩn bằng phương pháp giải trình tự vùng gen 16S rRNA

Dòng vi khuẩn acid lactic có khả năng đối kháng mạnh với các vi sinh vật chỉ thị được chọn để ly trích DNA và khuếch đại vùng gen 16S rRNA bằng cặp mồi 27F và 1492R (Lane *et al.*, 1991). Cặp mồi khuếch đại vùng gen 16S rRNA có trình tự như sau:

Mồi 27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC-3'

Mồi 1492R 5'-GGTTACCTGTACGACTT-3'

Kết quả giải trình tự vùng gen 16S rRNA của vi khuẩn được so sánh với các trình tự trong ngân hàng dữ liệu của NCBI bằng công cụ BLAST. Tỷ lệ tương đồng với các trình tự trên cơ sở dữ liệu là cơ sở để định danh vi khuẩn đối kháng.

## 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1 Kết quả phân lập vi khuẩn acid lactic từ mẫu sữa mẹ và phân trẻ em

Bốn mươi tám dòng vi khuẩn được phân lập từ 6 mẫu sữa mẹ và 8 mẫu phân trẻ em. Trong đó, có 22/48 dòng được phân lập từ 6 mẫu sữa mẹ và 26/48 dòng được phân lập từ 8 mẫu phân trẻ em. Phần lớn các dòng vi khuẩn phân lập có khuẩn lạc hình tròn hoặc không đều, màu trắng đục hoặc trắng ngà, độ nổi mô hoặc lồi, bìa nguyên hoặc răng cưa. Qua các thử nghiệm sinh hóa chọn lọc được 30/48 dòng có đặc điểm giống với nhóm vi khuẩn acid lactic là có khả năng phân giải CaCO<sub>3</sub>, catalase âm tính, oxidase âm tính, Gram dương, không sinh bào tử và không có khả năng di động. Đặc điểm tế bào của các dòng vi khuẩn được quan sát dưới kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 1000 lần. Nguồn gốc phân lập, ký hiệu và đặc điểm tế bào của 30 dòng vi khuẩn acid lactic được trình bày trong Bảng 1.

**Bảng 1: Đặc điểm của các dòng vi khuẩn acid lactic phân lập từ sữa mẹ và phân trẻ em**

Nguồn gốc mẫu	Dòng vi khuẩn	Đặc điểm khuẩn lạc (Màu sắc, hình dạng, bìa, độ nổi)	Hình dạng
Sữa mẹ	HM1.2	Trắng trong, tròn, nguyên, lồi	Cầu kết đôi
	HM1.3	Trắng ngà, tròn, nguyên, lồi	Cầu kết đôi
	HM2.1	Trắng trong, tròn, nguyên, lồi	Cầu kết đôi
	HM2.2	Trắng trong, tròn, nguyên, lồi	Que kết thành chữ Y
	HM3.1	Trắng trong, tròn, nguyên, lồi	Que kết thành chữ Y
	HM3.4	Trắng ngà, tròn, nguyên, lồi	Cầu kết đôi
	HM4.1	Trắng trong, tròn, nguyên, lồi	Que kết thành chữ Y
	HM4.3	Trắng đục, tròn, nguyên, lồi	Cầu kết đôi
	HM5.1	Trắng đục, tròn, nguyên, lồi	Que kết thành chữ Y, V
	HM5.3	Trắng đục, tròn, nguyên, lồi	Cầu kết đôi
	HM6.1	Trắng ngà, tròn, nguyên, lồi	Cầu kết đôi
	HM6.2	Trắng đục, không đều, nguyên, lồi	Cầu kết đôi
	HM6.3	Trắng đục, tròn, nguyên, lồi	Cầu kết đôi
Phân trẻ em	HF1.2	Trắng ngà, tròn, nguyên, mô	Cầu kết chuỗi
	HF2.1	Trắng đục, tròn, nguyên, lồi	Que kết chuỗi
	HF2.2	Trắng ngà, tròn, nguyên, mô	Que kết thành chữ Y
	HF2.4	Trắng trong, tròn, răng cưa, lồi	Que kết chuỗi
	HF3.2	Trắng trong, tròn, nguyên, lồi	Que kết thành chữ Y, V
	HF3.3	Trắng đục, tròn, nguyên, mô	Que kết thành chữ Y
	HF4.1	Trắng đục, tròn, nguyên, lồi	Que kết đôi
	HF4.2	Trắng trong, không đều, nguyên, lồi	Cầu kết đôi
	HF5.1	Trắng ngà, tròn, nguyên, lồi	Cầu kết chuỗi
	HF5.3	Trắng ngà, tròn, răng cưa, lồi	Que kết thành chữ Y
	HF6.1	Trắng trong, tròn, nguyên, lồi	Que kết thành chữ Y
	HF6.3	Trắng đục, tròn, nguyên, mô	Que kết thành chữ Y
	HF7.1	Trắng trong, tròn, nguyên, lồi	Que kết thành chữ Y
	HF7.2	Vàng nhạt, tròn, răng cưa, phẳng	Que kết chuỗi
	HF8.2	Trắng đục, tròn, nguyên, mô	Que kết chuỗi
	HF8.3	Trắng đục, không đều, răng cưa, lồi	Cầu kết đôi
HF8.4	Trắng ngà, tròn, nguyên, lồi	Cầu kết chuỗi	

**3.2 Kết quả khảo sát khả năng đối kháng một số vi sinh vật gây bệnh**

Vi khuẩn lactic trong quá trình phát triển tạo ra một số sản phẩm trao đổi chất như acid lactic hay bacteriocin có khả năng kháng khuẩn. Khả năng đối kháng các vi sinh vật chỉ thị được kiểm tra lần lượt bằng hai phương pháp nhỏ giọt và khuếch tán giếng thạch.

**3.2.1 Phương pháp nhỏ giọt**

Khả năng kháng khuẩn của các chủng vi khuẩn lactic thể hiện qua đường kính vòng ức chế, kết quả thu được như ở Bảng 2. Hoạt tính đối kháng của các chủng vi khuẩn tuyên chọn được tính bằng đường kính vòng ức chế ( $\Delta D$ ).

$$\Delta D = D - d \text{ (mm)}$$

D: đường kính vòng ức chế (mm); d: đường kính vòng khuẩn lạc vi khuẩn (mm).

Qua khảo sát đặc tính đối kháng bằng phương pháp nhỏ giọt, kết quả cho thấy cả 30 dòng vi khuẩn

phân lập đều có khả năng kháng lại *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* và *A. hydrophila*. Duy chỉ có 1 dòng vi khuẩn HF4.2 có khả năng kháng lại *C. albicans*. Phần lớn các chủng vi khuẩn lactic thể hiện tính kháng mạnh với các vi sinh vật chỉ thị, đường kính vòng ức chế khác nhau ở các vi sinh vật chỉ thị như *E. coli* (5,33 – 23,00 mm), *S. aureus* (2,67 – 12,67 mm), *P. aeruginosa* (6,00 – 18,33 mm), *A. hydrophila* (5,33 – 25,67 mm), *C. albicans* (0,00 – 5,67 mm). Tuy nhiên chủng HF2.1 thể hiện khả năng đối kháng mạnh nhất với các vi sinh vật chỉ thị so với các dòng vi khuẩn khác. Đường kính vòng ức chế phụ thuộc vào mức độ nhạy cảm của các vi sinh vật chỉ thị với các sản phẩm trao đổi chất vi khuẩn acid lactic tiết ra môi trường như acid lactic hay bacteriocin.

Trong nghiên cứu của Yalian *et al.* (2014) các chủng vi khuẩn acid lactic phân lập từ phân trẻ em có khả năng kháng lại *E. coli* với đường kính vòng ức chế 9 – 17,9 mm. Theo Hoàng Quốc Khánh và Nguyễn Thị Lan Thanh (2011) các chủng vi khuẩn acid lactic phân lập từ sữa mẹ có khả năng kháng *S.*



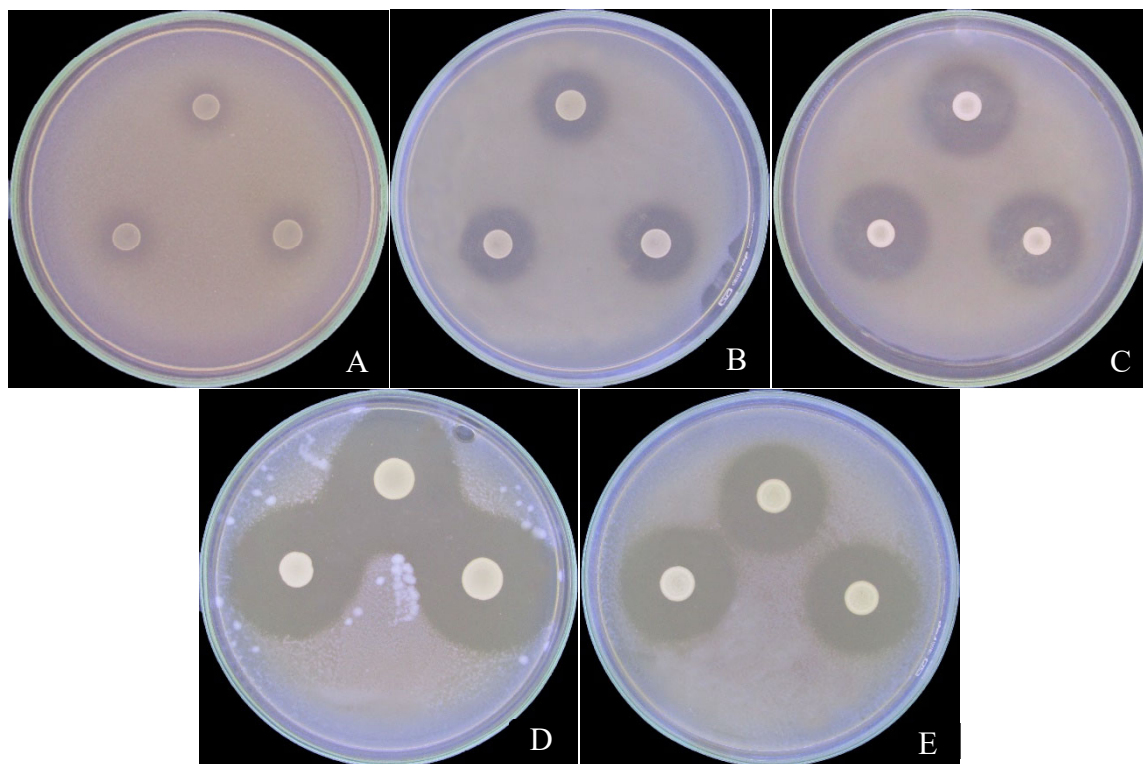
*aureus* với đường kính vòng ức chế 1 – 4 mm. Khi so sánh với các kết quả nghiên cứu khác cho thấy tùy thuộc vào dòng vi khuẩn và nguồn gốc phân lập

mà hoạt tính đối kháng của các dòng vi khuẩn sẽ khác nhau.

**Bảng 2: Kết quả khảo sát khả năng đối kháng các vi sinh vật chỉ thị bằng phương pháp nhỏ giọt**

Vi sinh vật chỉ thị	Số dòng vi khuẩn đối kháng	Đường kính vòng ức chế (mm)	
		Cao nhất	Thấp nhất
<i>Escherichia coli</i>	30/30	HF3.2 (23,00 <sup>a</sup> ) HF2.1 (22,67 <sup>a</sup> )	HF2.4 (5,33 <sup>m</sup> )
<i>Staphylococcus aureus</i>	30/30	HF2.1 (12,67 <sup>a</sup> )	HF4.1 (2,67 <sup>n</sup> )
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30/30	HF2.1 (18,33 <sup>a</sup> ) HF8.2 (18,00 <sup>a</sup> )	HM6.1 (6,00 <sup>o</sup> )
<i>Aeromonas hydrophila</i>	30/30	HF2.1 (25,67 <sup>a</sup> )	HM6.2 (6,00 <sup>p</sup> ) HM6.3 (5,33 <sup>p</sup> ) HF4.1 (5,33 <sup>p</sup> )
<i>Candida albicans</i>	1/30	HF4.2 (5,67)	-

Chú thích: Số liệu trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại. Các giá trị theo sau có các mẫu tự giống nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức 5%.



**Hình 1: Khả năng ức chế các vi sinh vật chỉ thị của một số dòng vi khuẩn acid lactic bằng phương pháp nhỏ giọt**

(A: HF4.2 - *C. albicans*; B: HF4.2 - *S. aureus*; C: HF2.1 - *P. aeruginosa*; D: HF2.1 - *A. hydrophila*; E: HF2.1 - *E. coli*)

### 3.2.2 Phương pháp khuếch tán giếng thạch

Qua khảo sát khả năng sinh tổng hợp bacteriocin của các dòng vi khuẩn, kết quả thu được có 11/30 dòng vi khuẩn có khả năng ức chế *E. coli*, 9/30 dòng vi khuẩn có khả năng ức chế *S. aureus*, 22/30 dòng vi khuẩn có khả năng ức chế *P. aeruginosa*, 22/30 dòng vi khuẩn có khả năng ức chế *A. hydrophila* và không có dòng vi khuẩn nào có khả năng sinh tổng

hợp bacteriocin ức chế *C. albicans*. Đối với *P. aeruginosa* và *A. hydrophila* khả năng nhạy cảm với bacteriocin từ các dòng vi khuẩn acid lactic trong khi chỉ có một số dòng có khả năng ức chế *E. coli* và *S. aureus*. Điều này được thể hiện qua đường kính vòng ức chế rất khác nhau giữa các vi sinh vật chỉ thị, *P. aeruginosa* cho đường kính vòng ức chế đạt 12,33 – 23,00 mm, *E. coli* đạt 4,33 – 22,67 mm, *A. hydrophila* đạt 12,67 – 16,33 mm nhưng với *S.*

*aureus* đường kính vòng ức chế chỉ đạt 2,67 – 16,33 mm. Kết quả phù hợp với đặc điểm của bacteriocin là có phổ kháng hẹp, chỉ có khả năng ức chế các vi sinh vật có quan hệ gần gũi với loài sản sinh ra chúng. Đường kính vòng ức chế thay đổi theo từng dòng vi khuẩn lactic và vi sinh vật chỉ thị. Dòng HF2.1 và HF4.2 là 2 dòng thể hiện khả năng ức chế các vi khuẩn chỉ thị rất mạnh. Kết quả chi tiết được thể hiện trong Bảng 3.

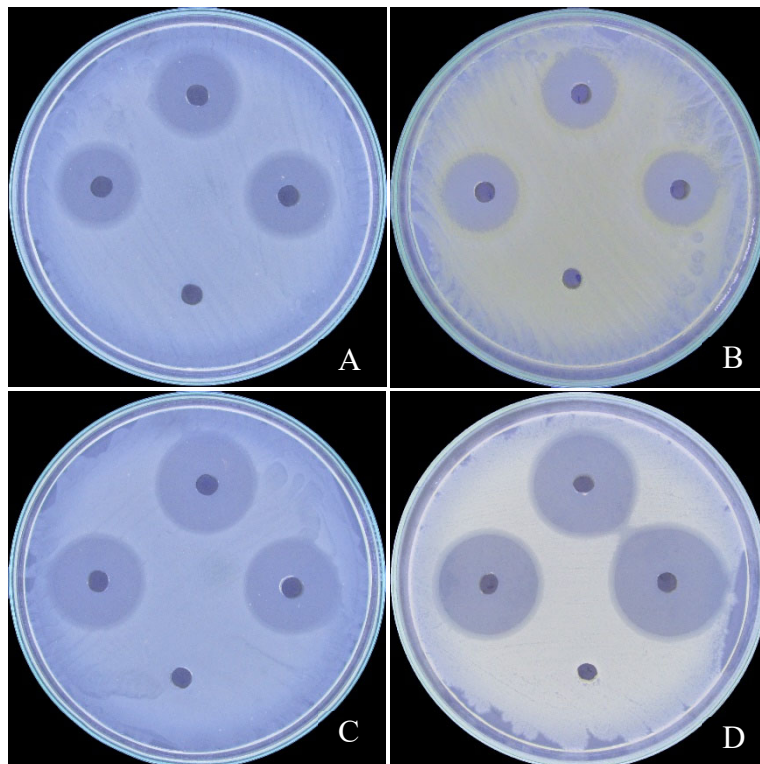
Serrano-Niño *et al.* (2016) khi khảo sát khả năng sinh bacteriocin của vi khuẩn acid lactic phân lập từ sữa mẹ cho kết quả có 3 dòng vi khuẩn

*Lactobacillus delbrueckii*, *L. mesenteroides*, *L. fermentum* có khả năng kháng *E. coli* với đường kính vòng kháng đều là 10 mm và 1 dòng *L. mesenteroides* có khả năng kháng *S. aureus* với đường kính vòng kháng là 10 mm. Dallal *et al.* (2017) khi khảo sát khả năng đối kháng *P. aeruginosa* của *Lactobacillus fermentum* và *Lactobacillus plantarum* phân lập từ phân của trẻ sơ sinh cho kết quả vòng kháng lần lượt là 20 mm và 24 mm. Kết quả cho thấy tùy thuộc vào dòng vi khuẩn và nguồn phân lập mà khả năng đối kháng của chúng sẽ khác nhau.

**Bảng 3: Khả năng đối kháng các vi sinh vật chỉ thị của bacteriocin thô từ các dòng vi khuẩn phân lập**

Vi sinh vật chỉ thị	Số dòng vi khuẩn sinh bacteriocin đối kháng	Đường kính vòng ức chế (mm)	
		Cao nhất	Thấp nhất
<i>Escherichia coli</i>	11/30	HF4.2 (22,67 <sup>a</sup> )	HM6.2 (4,33 <sup>i</sup> )
<i>Staphylococcus aureus</i>	9/30	HM1.3 (14,33 <sup>a</sup> ) HM2.1 (13,33 <sup>a</sup> )	HF8.2 (4,33 <sup>e</sup> )
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22/30	HF2.1 (23,00 <sup>a</sup> )	HM6.2 (12,33 <sup>k</sup> )
<i>Aeromonas hydrophila</i>	22/30	HF4.2 (16,33 <sup>a</sup> )	HF7.2 (12,67 <sup>l</sup> )
<i>Candida albicans</i>	0/30	-	-

Chú thích: Số liệu trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại. Các giá trị theo sau có các mẫu tự giống nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức 5%.



**Hình 2: Khả năng ức chế các vi sinh vật chỉ thị của bacteriocin thô từ một số dòng vi khuẩn acid lactic**

(A: HF2.1 - *A. hydrophila*; B: HM1.3 - *S. aureus*; C: HF4.2 - *P. aeruginosa*; D: HF4.2 - *E. coli*)

### 3.3 Kết quả nhận diện loài bằng phương pháp giải trình tự

Kết quả so sánh trình tự vùng gen 16S rRNA của dòng HF4.2 với trình tự gen của các loài vi khuẩn khác trong cơ sở dữ liệu GenBank của National Center for Biotechnology Information (NCBI) bằng

công cụ BLAST cho thấy, trình tự vùng gen 16S rRNA của dòng HF4.2 có độ tương đồng cao nhất là 99% với trình tự của vi khuẩn: *Enterococcus faecalis*. Kết hợp với các đặc điểm tế bào hình cầu, dạng liên kết đôi và các thử nghiệm sinh hóa xác định nhóm vi khuẩn acid lactic có thể khẳng định rằng dòng vi khuẩn HF4.2 là *Enterococcus faecalis*.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<a href="#">Enterococcus faecalis strain UJ-07 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1936	1936	100%	0.0	99%	<a href="#">EU547775.1</a>
<a href="#">Enterococcus faecalis strain 38CB2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1934	1934	100%	0.0	99%	<a href="#">MH158266.1</a>
<a href="#">Enterococcus faecalis strain FDAARGOS_324 chromosome, complete genome</a>	1934	7732	100%	0.0	99%	<a href="#">CP028285.1</a>
<a href="#">Enterococcus faecalis strain ACD47-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1934	1934	100%	0.0	99%	<a href="#">MH127511.1</a>
<a href="#">Enterococcus faecalis strain HCD42-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1934	1934	100%	0.0	99%	<a href="#">MH111684.1</a>
<a href="#">Enterococcus faecalis strain HCD41-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1934	1934	100%	0.0	99%	<a href="#">MH111683.1</a>
<a href="#">Enterococcus faecalis strain HCD40-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1934	1934	100%	0.0	99%	<a href="#">MH111678.1</a>
<a href="#">Enterococcus faecalis strain HCD38-7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1934	1934	100%	0.0	99%	<a href="#">MH111668.1</a>
<a href="#">Enterococcus faecalis strain HCD38-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1934	1934	100%	0.0	99%	<a href="#">MH111666.1</a>
<a href="#">Enterococcus faecalis strain HCD38-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1934	1934	100%	0.0	99%	<a href="#">MH111665.1</a>
<a href="#">Enterococcus faecalis strain HCD38-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1934	1934	100%	0.0	99%	<a href="#">MH111664.1</a>
<a href="#">Enterococcus faecalis strain HCD34-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1934	1934	100%	0.0	99%	<a href="#">MH111640.1</a>
<a href="#">Enterococcus faecalis strain HCD32-7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1934	1934	100%	0.0	99%	<a href="#">MH111632.1</a>
<a href="#">Enterococcus faecalis strain HCD32-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1934	1934	100%	0.0	99%	<a href="#">MH111631.1</a>
<a href="#">Enterococcus faecalis strain HCD32-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1934	1934	100%	0.0	99%	<a href="#">MH111630.1</a>
<a href="#">Enterococcus faecalis strain HCD32-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1934	1934	100%	0.0	99%	<a href="#">MH111629.1</a>
<a href="#">Enterococcus faecalis strain HCD32-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1934	1934	100%	0.0	99%	<a href="#">MH111627.1</a>
<a href="#">Enterococcus faecalis strain HCD32-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1934	1934	100%	0.0	99%	<a href="#">MH111626.1</a>
<a href="#">Enterococcus faecalis strain HCD31-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1934	1934	100%	0.0	99%	<a href="#">MH111620.1</a>
<a href="#">Enterococcus faecalis strain HCD31-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1934	1934	100%	0.0	99%	<a href="#">MH111618.1</a>

**Hình 3: Kết quả tìm kiếm trình tự tương đồng với trình tự vùng gen 16S rRNA của dòng HF4.2 bằng công cụ BLAST của NCBI**

Mặc dù *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) được báo cáo là có khả năng gây bệnh nhưng chúng cũng có một vài lợi ích. Theo Charles *et al.* (2011) vài chủng *E. faecalis* được sử dụng như probiotic, chủ yếu dưới dạng được phẩm. Các probiotic này được sử dụng để điều trị bệnh tiêu chảy, tiêu chảy liên quan đến kháng sinh hoặc hội chứng ruột kích thích, làm giảm mức cholesterol hoặc cải thiện miễn dịch cho cơ thể chủ. Ngoài ra *E. faecalis* còn có thể sinh ra nhiều loại bacteriocin như cytolysin và các enterocin khác nhau (Ness *et al.*, 2014).

### 4 KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu đã phân lập được 48 dòng vi khuẩn trên môi trường MRS-Cys agar, trong đó 22 dòng được phân lập từ sữa mẹ và 26 dòng được phân lập từ phân trẻ em. Qua khảo sát các đặc điểm hình thái và sinh hóa tuyển chọn được 30 dòng vi khuẩn thuộc nhóm vi khuẩn acid lactic.

Qua khảo sát đặc tính đối kháng bằng phương pháp nhỏ giọt, kết quả cho thấy cả 30 dòng vi khuẩn

phân lập đều có khả năng kháng lại *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* và *A. hydrophila*. Chỉ có duy nhất 1 dòng vi khuẩn HF4.2 có khả năng kháng lại *C. albicans*.

Kết quả kiểm tra khả năng sinh tổng hợp bacteriocin của các dòng vi khuẩn cho thấy có 11/30 dòng vi khuẩn có khả năng ức chế *E. coli*, 9/30 dòng vi khuẩn có khả năng ức chế *S. aureus*, 22/30 dòng vi khuẩn có khả năng ức chế *P. aeruginosa*, 22/30 dòng vi khuẩn có khả năng ức chế *A. hydrophila* và không có dòng vi khuẩn nào có khả năng sinh tổng hợp bacteriocin ức chế *C. albicans*.

Dựa trên kết quả định danh bằng phương pháp giải trình tự gen 16S rRNA, đặc điểm hình dạng tế bào và các thử nghiệm sinh hóa đã xác định được dòng vi khuẩn HF4.2 là *Enterococcus faecalis*.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

Ana, S., Virginia, M., Esther, J., Isabelle, M., Juan, M.R. and Leonides, F., 2014. Lactobacilli and Bifidobacteria in human breast milk: Influence of

- antibiotherapy and other host and clinical factors. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 59(1): 78-88.
- Charles, M.A.P.F., Melanie, H., Hikmate, A., Wilhelm, H. and Antonio, G., 2011. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *International Journal of Food Microbiology*. 151(2): 125-40.
- Dallal, M.M.S., Davoodabadi, A., Abdi, M., Hajiabdolbaghi, M., Sharifi Yazdi, M.K., Douraghi, M. and Bafghi, S.M.T., 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.
- Hoàng Quốc Khánh và Nguyễn 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): 62-76.
- Juan, M.R., 2014. The origin of human milk bacteria: Is there a bacterial entero-mammary pathway during late pregnancy and lactation. *Advances in Nutrition*. 5: 779-784.
- Lane, D.J., 1991. 16S/23S rRNA sequencing. *In: Stackebrandt, E. and Goodfellow, M. (Eds.). Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley and Sons. New York, pp. 115-175.
- Ness, I.F., Diep, D.B. and Ike Y., 2014. Enterococcal bacteriocins and antimicrobial proteins that contribute to niche control. *In: Gilmore, M.S., Clewell, D.B. and Ike, Y. (Eds.). Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection* [Internet]. Massachusetts Eye and Ear Infirmary. Boston, pp. 637-668.
- Ngô Thị Phương Dung, Huỳnh Thị Yến Ly và Huỳnh Xuân Phong, 2011. Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn lactic có khả năng sinh chất kháng khuẩn. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. 19a: 176-184.
- Nguyễn Phước Hiền và Nguyễn Hữu Hiệp, 2014. Đánh giá tiềm năng probiotic và nhận diện vi khuẩn acid lactic phân lập từ sữa người và chế phẩm men tiêu hóa. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. 31: 21-31.
- Serrano-Niño, J.C., Solís-Pacheco, J.R., Gutierrez-Padill, J.A., Cobián-García, A., Cavazos-Garduño, A., González-Reynoso, O. and Aguilar-Uscanga, B.R., 2016. Isolation and identification of lactic acid bacteria from human milk with potential probiotic role. *Journal of Food and Nutrition Research*. 4(3): 170-177.
- Varish, A., Mohd, S.K., Qazi, M.S.J., Mohammad, A.A., Mohammad, A.A.K. and Mughees, U.S., 2016. Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 49(1): 1-11.
- Yalian, S., Xiuyu, L., Xuan, Z., Han, J. and Qing, G., 2014. Isolation and characterization of lactic acid bacteria producing bacteriocin from newborn infants feces. *Journal of Bacteriology and Mycology*. 1(2): 1-7.