# PHÂN LẬP, ĐỊNH DANH VÀ XÁC ĐỊNH CÁC CHỦNG *LACTOBACILLUS* CÓ TIỀM NĂNG PROBIOTIC TỪ CON NGƯỜI

**Hoàng Quốc Khánh** [(1)], **Phạm Thị Lan Thanh** [(2)]
(1) Viện Sinh Học Nhiệt Đới – Viện Khoa Học và Công Nghệ Việt Nam
(2) Trường Đại học Lạc Hồng

***TÓM TẮT:*** *Vi khuẩn Lactobacillus được sử dụng trong nhiều sản phẩm probiotic. Bài báo này đề cập đến các chủng Lactobacillus có đặc tính probiotic ở đường dạ dày – ruột người. 15 chủng Lactobacillus đã được phân lập từ các mẫu phân của những trẻ em bú sữa mẹ và xác định bằng các phương pháp truyền thống kết hợp phương pháp PCR với cặp mồi đặc hiệu cho giống Lactobacillus. Các thí nghiệm in vitro đã được thiết kế để nghiên cứu một số đặc điểm probiotic của các chủng Lactobacillus như: kháng với pH thấp và mật, tính kỵ nước của bề mặt tế bào, hoạt tính kháng khuẩn, tạo bacteriocin và các chất kháng khuẩn khác, kháng với kháng sinh và khử cholesterol. Kết quả chọn lọc được 12 chủng Lactobacillus có các đặc tính probiotic. Trong đó, 11 chủng có khả năng làm giảm mức cholesterol huyết thanh đáng kể 10% – 33,34%. Bằng phương pháp phân tích trình tự rDNA 16S, các chủng Lactobacillus có đặc tính probiotic này được định danh đến mức loài gồm: Lactobacillus gasseri, L. fermentum, L. salivarius, L. rhamnosus và L. paracasei/ casei.*

**Từ khóa:** *Lactobacillus*, probiotic, PCR, rDNA 16S

## 1. MỞ ĐẦU:

Vi khuẩn lactic (LAB) có vai trò rất quan trọng trong cuộc sống của chúng ta. Chúng tạo ra các thực phẩm lên men và bảo quản thực phẩm khỏi bị hư hỏng. Từ đầu thế kỷ 20, Elie Metchnikoff (1845-1916) đã đề xuất sử dụng các LAB cho mục đích chữa bệnh. Từ đó, lĩnh vực nghiên cứu probiotic đã ra đời và phát triển. Đến nay, những nghiên cứu về probiotic đã không ngừng cung cấp những bằng chứng có tính khoa học về hiệu quả thực sự của probiotic đối với sức khỏe con người. Bên cạnh đó, các sản phẩm chức năng sử dụng các vi khuẩn probiotic xuất hiện ngày càng nhiều ở Châu Âu, Nhật, Mỹ… Hiện nay, một số sản phẩm probiotic cũng được bày bán trên thị trường Việt Nam như: sữa bột Gain IQ (Abbott Laboratories)…

Probiotic bắt nguồn từ ngôn ngữ Hy Lạp có nghĩa là *vì sự sống* (*for life*). Guarner và Schaafsma (1998) đã định nghĩa: "*probiotic là những vi sinh vật sống mà khi tiêu thụ một lượng thích hợp, sẽ tạo nên những hiệu quả tốt đối với sức khỏe của cơ thể chủ*" [3]. Nhiều nghiên cứu về đặc tính probiotic của các LAB đã được công bố trên các tạp chí khoa học. Trong đó, *Lactobacillus* là LAB được sử dụng phổ biến trong các nghiên cứu cơ bản và ứng dụng về probiotic cho người vì tính an toàn của chúng đối với con người. *Lactobacillus* được tìm thấy ở nhiều nơi trong tự nhiên như: thực phẩm; thực vật; chất thải; đường dạ dày – ruột, đường miệng và đường sinh dục của con người và động vật… Phần lớn các loài *Lactobacillus* có nguồn gốc từ đường dạ dày – ruột người là đối tượng nghiên cứu về probiotic cho người sử dụng, vì chúng thường liên quan đến những ích lợi đối với sức khỏe con người như: kháng các vi khuẩn gây bệnh, khử cholesterol huyết thanh…

Các chủng *Lactobacillus* trong nghiên cứu này được phân lập từ phân trẻ em bú sữa mẹ và định danh bằng các phương pháp truyền thống kết hợp với các phương pháp sinh học phân tử hiện đại. Các đặc tính probiotic của chúng được xác định thông qua các thí nghiệm *in vitro* về khả năng tồn tại và sống sót của probiotic trong đường dạ dày – ruột người, những lợi ích của probiotic đối với sức khỏe con người và đặc điểm an toàn của probiotic đối với người sử dụng.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP:

### 2.1. Vật liệu:

Các chủng *Lactobacillus* được phân lập từ các mẫu phân trẻ em bú sữa mẹ khoẻ mạnh (dưới 12 tháng tuổi) ở 6 địa điểm, gồm: bệnh viện Thống Nhất (Đồng Nai), bệnh viện Đồng Nai (Đồng Nai), bệnh viện Hùng Vương (Tp. Hồ Chí Minh), các gia đình tại Tp. Biên Hoà (Đồng Nai), các gia đình tại Tp. Hồ Chí Minh và các gia đình tại Tp. Đà Lạt.

### 2.2. Phương pháp:

#### 2.2.1. phương pháp phân lập:

Các mẫu phân trẻ em được phân lập trên môi trường MRS – Agar pH 5,5, trong điều kiện kỵ khí và nhiệt độ nuôi ủ ở 37$^{o}$C. Điều kiện kỵ khí được tạo ra bằng cách sử dụng túi kỵ khí Anaerocult A$^{®}$(Merck). Những khuẩn lạc phát triển trên môi trường đặc trưng về màu sắc, hình dạng, kích thước

và có tế bào ở dạng hình que khi quan sát dưới kính hiển vi được chọn lọc và làm thuần. Các chủng thuần được bảo quản trong các ống thạch nghiêng ở $4^oC$ và trong dung dịch glycerol ở $-20^oC$.

**2.2.2. Phương pháp xác định giống *Lactobacillus*:**

Để xác định các chủng vi khuẩn thuộc giống *Lactobacillus*, một số thử nghiệm được thực hiện như sau: quan sát hình thái tế bào dưới kính hiển vi; xác định mối quan hệ với oxy bằng cách cấy trên môi trường thạch sâu; xác định đặc điểm Gram bằng phương pháp "String Test"; xác định khả năng tạo axít lactic dựa vào sự phân giải $CaCO_3$ trên môi trường Carbonate – Agar và sự đổi màu thuốc thử Uphenmen; thử nghiệm Catalase được thực nghiệm bằng cách sử dụng dung dịch $H_2O_2$ 3%; xác định khả năng lên men glucose bằng cách nuôi cấy chủng trong môi trường chứa glucose và chỉ thị đỏ phenol. Sau đó, các chủng vi khuẩn có những đặc điểm cơ bản của giống *Lactobacillus* được xác định chính xác giống *Lactobacillus* bằng phương pháp PCR. DNA của vi khuẩn được tách khỏi tế bào bằng DNAzol® Direct (Molecular Research Center, Inc.). 2 mồi Lac1 và Lac2 đặc hiệu cho giống *Lactobacillus* được sử dụng. Thiết lập chương trình phản ứng PCR cho máy luân nhiệt (Eppendorf – Gene Amp, Biosystem, PCR system 9700) như sau: bước 1 – $95^oC$ trong 5 phút; bước 2 – lặp lại 30 chu kỳ (mỗi chu kỳ gồm: $95^oC$ trong 1 phút, $55^oC$ trong 1 phút, $72^oC$ trong 2 phút); bước 3 – $72^oC$ trong 7 phút. Sản phẩm PCR mong đợi là các đoạn DNA có kích thước 340 bp.

**2.2.3. Phương pháp nghiên cứu đặc tính probiotic trong điều kiện *in vitro*:**

**2.2.3.1. Khả năng thích ứng pH thấp:**

Tế bào của các chủng *Lactobacillus* sau 24 giờ nuôi cấy được rửa sạch và đặt trong các dung dịch PBS (phosphate buffer saline) pH 1, pH 2, pH 3 và pH 6,4. Sau các thời điểm 0 giờ, 1 giờ, 2 giờ và 3 giờ, chuyển tế bào vi khuẩn trong dung dịch PBS vào môi trường MRS và ủ ở $37^oC$ trong 24 giờ. Sau đó, đo mật độ quang OD của dịch nuôi cấy ở bước sóng 610nm. Khả năng kháng pH thấp của các chủng *Lactobacillus* được xác định bằng cách so sánh các giá trị OD 610 nm (so sánh ở các dung dịch PBS có pH khác nhau với dung dịch PBS pH 6,4 và ở các thời điểm khác nhau với lúc 0 giờ).

**2.2.3.2. Khả năng kháng mật:**

Các chủng *Lactobacillus* được nuôi cấy trong môi trường MRS 1% Tween 80 bổ sung mật bò (American Laboratories Inc.) với các nồng độ mật 0%, 0,3%, 0,5%, 1% và 2%. Sau 24 giờ nuôi ủ ở $37^oC$, đo mật độ quang OD của dịch nuôi cấy ở bước sóng 610 nm. Khả năng kháng mật của các chủng *Lactobacillus* được xác định bằng cách so sánh các giá trị OD 610 nm của dịch nuôi có các nồng độ mật bò khác nhau với dịch nuôi không bổ sung mật bò.

**2.2.3.3. Tính kỵ nước của bề mặt tế bào:**

Tế bào của chủng *Lactobacillus* sau 24 giờ nuôi cấy được rửa sạch và huyền phù trong dung dịch nước muối sinh lý sao cho giá trị OD 600nm của dung dịch này đạt khoảng 0.4 – 0,6 (ODt). Tiếp theo, dịch huyền phù tế bào này được trộn với 1 trong 3 loại hydrocarbon (n-hexadecane, xylene, toluen), rồi giữ yên hỗn hợp này ở nhiệt độ phòng để nước và hydrocarbon tách thành 2 pha, đo OD 600nm của pha nước (ODs). Sự giảm hấp thu của pha nước được dùng để đo lường tính kỵ nước của bề mặt tế bào. Công thức tính % kỵ nước như sau: H% = (ODt – ODs) x 100 / ODt

**2.2.3.4. Hoạt tính kháng khuẩn:**

Chuyển dịch nuôi vi khuẩn sau 24 giờ nuôi cấy vào đĩa giấy vô trùng trên bề mặt môi trường MRS – Agar. Sau 24 giờ nuôi ủ ở $37^oC$, phủ lên trên môi trường MRS – Agar một lớp môi trường LB – Agar hoặc MRS – Agar (đối với vi khuẩn chỉ định là *Lactobacillus*) chứa vi khuẩn chỉ định, tiếp tục nuôi ủ ở $37^oC$ trong 24 giờ. Sau đó, ghi nhận vòng vô khuẩn tạo thành xung quanh các đĩa giấy. Các chủng vi khuẩn chỉ định gồm: *Escherichia coli* ATTC 25922, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Klebsiella sp.* 371, *Shigella sp.* 1640 và *L. acidophilus* NRRL B-2092.

**2.2.3.5. Khả năng tạo bacteriocin và các chất kháng khuẩn khác:**

Chủng *Lactobacillus* được nuôi cấy 48 giờ trong môi trường MRS 1% cao nấm men và ở nhiệt độ $37^oC$. Dịch nuôi cấy được loại bỏ tế bào bằng phương pháp ly tâm, điều chỉnh đến pH 6,5 bằng NaOH và vô trùng bằng màng lọc. Chuyển dịch nuôi cấy này vào các giếng thạch đã tạo trên môi trường LB – Agar chứa vi khuẩn chỉ thị, nuôi ủ ở $37^oC$ trong 48 giờ. Sau thời gian ủ, ghi nhận sự tạo thành vòng vô khuẩn xuất hiện xung quanh giếng thạch. Các vi khuẩn chỉ thị gồm: *E. coli* ATTC 25922 (Gram –) và *St. aureus* ATCC 25923 (Gram +).

**2.2.3.6. Khả năng kháng với kháng sinh:**

Sự kháng với kháng sinh của vi khuẩn được xác định dựa theo phương pháp khuếch tán đĩa (disc diffusion) của NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Đặt các đĩa giấy kháng sinh lên bề mặt môi trường MRS – Agar chứa vi khuẩn thử nghiệm, ủ ở $37^oC$ trong 24 giờ. Sau

thời gian ủ, đo đường kính vòng ức chế sinh trưởng và so sánh với bảng tiêu chuẩn về mức độ nhạy với kháng sinh. Các loại kháng sinh sử dụng thuộc 3 nhóm: *nhóm ức chế tổng hợp vách tế bào* (Penicillin G, Co-amoxiclav, Cefaclor và Vancomycin), *nhóm ức chế tổng hợp protein* (Erythromycin, Amikacin, Gentamicin, Kanamycin và Streptomycin) và *nhóm ức chế tổng hợp axít nucleic* (Co-trimoxazol).

**2.2.3.7. Khả năng khử cholesterol:**

Các chủng *Lactobacillus* được sinh trưởng trong môi trường MRS pH 6 bổ sung 0,3% mật bò (American Laboratories Inc.), 0,05% L-Cysteine-HCl và 100 – 150 mg/l huyết thanh bò. Sau 48 giờ nuôi ủ ở 37$^{o}$C và điều kiện kỵ khí, dịch nuôi không chứa tế bào vi khuẩn được thu nhận bằng phương pháp ly tâm. Đo hàm lượng cholesterol trong dịch thu nhận bằng phương pháp so màu phụ thuộc enzyme (Enzymatic colorimetric method) và máy sinh hóa tự động HITACHI 717.

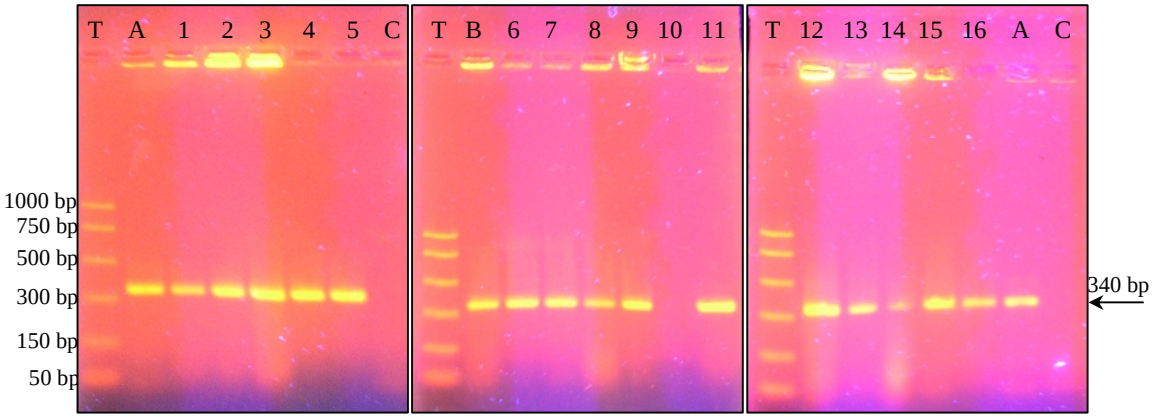
**2.2.4. Phương pháp phân tích trình tự rDNA 16S:**

Mẫu DNA được tách từ tế bào của các chủng *Lactobacillus* bằng DNAzol® Direct. Phản ứng khuếch đại đoạn rDNA 16S được thực hiện với 2 mồi Lac3 và Lac4 chuyên biệt cho giống *Lactobacillus*. Thiết lập chương trình phản ứng PCR cho máy luân nhiệt (Eppendorf – Gene Amp, Biosystem, PCR system 9700) như sau: bước 1 – 95$^{o}$C trong 5 phút; bước 2 – lặp lại 30 chu kỳ (mỗi chu kỳ gồm: 95$^{o}$C trong 1 phút, 55 $^{o}$C trong 1 phút, 72 $^{o}$C trong 2 phút); bước 3 – 72$^{o}$C trong 7 phút. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng GFX PCR and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences) và tiến hành giải trình tự. Các trình tự nucleotide hoàn chỉnh được so sánh với ngân hàng dữ liệu gen của NCBI bằng cách sử dụng công cụ BLAST.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN:

### 3.1. Phân lập và xác định giống *Lactobacillus*:

15 chủng *Lactobacillus* đã được phân lập và xác định từ các mẫu phân trẻ em bú sữa mẹ, gồm: B1, B3, B5, B6, B8a, B8b, B9a, B9b, B11, B12b, B15, B17, M3, M5 và T16. Các chủng này đều có những đặc điểm cần thiết của giống *Lactobacillus* như: tế bào có dạng hình que, kỵ khí tùy ý, Gram +, có khả năng tạo axít lactic, Catalase –, có khả năng lên men glucose, tạo sản phẩm PCR có kích thước 340 bp trong phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu cho giống *Lactobacillus* (hình 1).




**Hình 1.** Kết quả điện di trên gel agarose của các sản phẩm PCR với cặp mồi đặc hiệu cho giống *Lactobacillus* (T: thang DNA 50 – 1000 bp, A: *L. acidophilus* NRRL B-2092, B: L. *sakei* NRRL B-1917, C: *E. coli* ATTC 2592, 1: B1, 2: B3, 3: B5, 4: B6, 5: B8a, 6: B8b, 7: B9a, 8: B9b, 9: B11, 10: B12a, 11: B12b, 12: B15, 13: B17, 14: M3, 15: M5, 16: T16).

Trong nghiên cứu này, một số mẫu phân xu của những trẻ em vừa mới sinh được sử dụng để kiểm chứng phương pháp phân lập. Kết quả cho thấy *Lactobacillus* không phân lập được từ bất kỳ mẫu phân xu nào. Kết quả này phù hợp với lý thuyết về sự vô trùng của ruột bào thai [2].

So sánh 2 nhóm tuổi khác nhau: nhóm 1 (các trẻ em dưới 1 tuần tuổi) và nhóm 2 (các trẻ em từ 1 tuần tuổi trở lên) cho thấy số mẫu nhóm 1 phân lập được *Lactobacillus* chiếm 3,57%, trong khi số mẫu nhóm 2 phân lập được *Lactobacillus* chiếm 46,15%. Điều này chứng tỏ khả năng phân lập được *Lactobacillus* ở các mẫu nhóm 2 cao hơn ở các mẫu nhóm 1. Sự khác biệt này có thể do các trẻ nhóm 2 tiếp xúc với các vi sinh vật từ mẹ và môi trường bên ngoài trong thời gian dài hơn, nên hình thành một

hệ vi sinh vật đường ruột ổn định hơn các trẻ nhóm 1. Ngoài ra, theo một số nghiên cứu khác, mật độ *Lactobacillus* trong các mẫu phân của những trẻ từ 1 tuần tuổi trở lên thường cao hơn những trẻ em dưới 1 tuần tuổi [2], do đó *Lactobacillus* sẽ dễ dàng phân lập được từ các mẫu của nhóm 2 hơn các mẫu nhóm 1. Mặt khác, sự khác biệt này có thể liên quan đến nơi ở của những trẻ em được nghiên cứu. Những trẻ nhóm 1 thường ở các bệnh viện hoặc vừa mới xuất viện; trong khi những trẻ nhóm 2 thường đang sống ở các gia đình, nơi mà điều kiện vệ sinh ít nghiêm ngặt hơn môi trường bệnh viện, nên trẻ nhóm 2 có khả năng tiếp nhận vô số vi sinh vật khác nhau. Đó cũng là nguyên nhân khiến cho hệ vi sinh vật đường ruột của những trẻ trên 1 tuần tuổi trở nên ổn định hơn và *Lactobacillus* cũng thường xuyên hiện diện với mật độ cao hơn.

### 3.2. Đặc điểm probiotic của các chủng *Lactobacillus*:

#### 3.2.1. Khả năng thích ứng pH thấp:

Các probiotic sử dụng cho người hiện nay đều được nghiên cứu đưa vào cơ thể con người qua đường tiêu hóa. Để có thể vượt qua được dạ dày, chủng probiotic phải có khả năng kháng lại môi trường axít của dạ dày. Khả năng chịu đựng pH 3 trong ít nhất 3 giờ là điều kiện phù hợp đối với chủng probiotic cho người [6]. Kết quả thí nghiệm này cho thấy tất cả 15 chủng *Lactobacillus* ở trên đều có khả năng chịu đựng được pH 3 đến 3 giờ. Một số chủng có thể chịu đựng được pH rất thấp như chịu đựng được pH 1 đến 1 giờ (B8a, B8b, B9a và T16), đặc biệt chủng B12b có thể chịu được pH 1 đến 2 giờ. Chủng M5 có thể chịu đựng được pH 2 đến 3 giờ, trong khi các chủng B6, B9b và B15 chỉ chịu đựng được pH 2 đến 1 giờ. Kết quả này phù hợp với kết quả đạt được bởi Matijašić và Rogelj (2000) [6], Mishra và Prasad (2005) [7].

#### 3.2.2. Khả năng kháng mật:

Một thách thức khác đối với sự tồn tại của vi sinh vật trong đường dạ dày – ruột người là sự hiện diện của mật ở ruột non. Mật có tác dụng tiêu diệt vi sinh vật nhờ vào hoạt động phá hủy màng tế bào vi sinh vật. Kết quả thí nghiệm cho thấy phần lớn các chủng có khả năng chịu đựng đến nồng độ mật 2% (B1, B3, B5, B6, B8a, B8b, B9a, B9b, B11, B15, B17, M5 và T16). Tuy nhiên, chủng M3 chỉ chịu đựng được đến nồng độ mật 1% và chủng B12b chỉ chịu được đến nồng độ mật 0,5%. Nồng độ mật 0,3% thường được dùng để chọn lọc những chủng probiotic kháng mật vì nồng độ này được xem là nồng độ mật trung bình trong ruột người [6]. Tất cả 15 chủng *Lactobacillus* thử nghiệm ở đây đều có khả năng sinh trưởng ở nồng độ mật 0,3%. Kết quả này phù hợp với kết quả đạt được bởi Jacobsen *et al.* (1999) [4], Mishra và Prasad (2005) [7].

#### 3.2.3. Tính kỵ nước của bề mặt tế bào:

Khả năng định cư của các probiotic trong ruột người có thể được xác định dựa trên khả năng kết bám của chúng với biểu mô ruột. Các nhà nghiên cứu nhận thấy đặc tính kết bám với biểu mô của vi sinh vật liên quan đến tính kỵ nước bề mặt của chúng. Kết quả về tính kỵ nước bề mặt tế bào của các chủng *Lactobacillus* được thể hiện ở bảng 1.

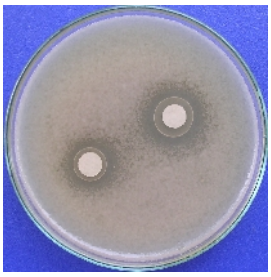
**Bảng 1.** Kết quả về tính kỵ nước bề mặt tế bào của các chủng *Lactobacillus* (–: không biểu hiện kết bám)

| Kí hiệu chủng | % kỵ nước (%) | | |
|---|---|---|---|
| | n-hexadecane | Xylene | Toluene |
| B1 | 3,85 | - | 1,49 |
| B3 | 0,51 | - | - |
| B5 | 17,91 | 30,86 | 44,73 |
| B6 | 34,49 | 22,47 | 22,95 |
| B8a | 84,23 | 75,79 | 65,10 |
| B8b | 25,51 | 38,69 | 55,14 |
| B9a | 40,45 | 52,07 | 55,53 |
| B9b | 49,18 | 51,19 | 45,55 |
| B11 | 5,92 | 26,34 | 33,56 |
| B12b | 38,84 | 28,37 | 20,16 |
| B15 | 0,51 | - | - |
| B17 | 29,44 | 55,47 | 48,48 |
| M3 | 51,00 | 45,55 | 38,3 |
| M5 | 25,75 | 37,71 | 28,89 |
| T16 | 16,20 | 30,83 | 55,62 |

Kết quả thí nghiệm này cho thấy trong 15 chủng *Lactobacillus* thử nghiệm, 12 chủng (B5, B6, B8a, B8b, B9a, B9b, B11, B12b, B17, M3, M5 và T16) có khả năng kết bám với biểu mô ruột vì chúng đều có % kỵ nước đáng kể đối với cả 3 loại hydrocarbon. Trong đó, chủng B8a có % kỵ nước cao nhất đối với cả 3 loại hydrocarbon (n-hexadecane: 84,23%, xylene: 75,79%, toluene: 65,10%). Ngược lại, các chủng B1, B3 và B15 ít kết bám với biểu mô vì chúng chỉ thể hiện % kỵ nước bề mặt tế bào rất thấp đối với 1 hoặc 2 loại hydrocarbon thí nghiệm. Chủng B3 và B15 có % kỵ nước rất thấp với n-hexadecane (0,51%) và không có tính kỵ nước bề mặt với xylene và toluene; trong khi chủng B1 không biểu hiện tính kỵ nước bề mặt tế bào với xylene, mà chỉ có % kỵ nước rất thấp với 2 loại hydrocarbone còn lại là n-hexadecane (3,85%) và toluene (1,49%). Kết quả này phù hợp với kết quả đạt được bởi Mishra và Prasad (2005) [7].

### 3.2.4. Hoạt tính kháng khuẩn:

Một trong những đặc điểm probiotic có lợi đối với sức khỏe con người là khả năng kháng các vi khuẩn gây bệnh. Kết quả hoạt tính kháng khuẩn của các chủng *Lactobacillus* được thể hiện ở bảng 2. 12 chủng *Lactobacillus* (B5, B6, B8a, B8b, B9a, B9b, B11, B12b, B17, M3, M5 và T16) đều có khả năng kháng lại 5 vi khuẩn gây bệnh gồm: *E. coli* ATTC 25922, *S. typhi*, *St. aureus* ATCC 25923, *Klebsiella sp.* 371 và *Shigella sp.* 1640 (hình 2 thể hiện sự đối kháng của chủng B9b đối với *Shigella sp.* 1640). Trong đó, chủng T16 kháng rất mạnh đối với cả 5 vi khuẩn gây bệnh này. Tuy nhiên, không có chủng *Lactobacillus* nào kháng lại *L. acidophilus* NRRL B-2092. Điều này chứng tỏ tất cả các chủng *Lactobacillus* thí nghiệm đều có hoạt tính kháng các vi khuẩn gây bệnh, nhưng không kháng lại vi khuẩn cùng loại với chúng. Khả năng kháng khuẩn của các chủng ở đây tương tự với các chủng *Lactobacillus* phân lập được từ phân trẻ em trong thí nghiệm của Jacobsen *et al.* (1999), mặc dù có sự khác nhau về phổ kháng khuẩn. Các chủng của Jacobsen *et al.* cũng kháng lại *E. coli* và *S. typhimurium*, nhưng không kháng lại *St. aureus* [4].



**Hình 2.** Sự đối kháng của chủng B9b đối với *Shigella sp.* 1640

**Bảng 2.** Hoạt tính kháng khuẩn của các chủng *Lactobacillus* ((–) = 0, (+) = 1 – 2 mm, (++) = 2,1 – 4 mm, (+++) = lớn hơn 4 mm)

| Kí hiệu chủng | Vùng ức chế sinh trưởng | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ***E. coli* ATTC 25922** | ***S. typhi*** | ***St. aureus* ATCC 25923** | ***Klebsiella sp.* 371** | ***Shigella sp.* 1640** | ***L. acidophilus* NRRL B-2092** |
| B5 | ++ | +++ | + | ++ | +++ | - |
| B6 | +++ | +++ | + | +++ | + | - |
| B8a | +++ | +++ | +++ | ++ | ++ | - |
| B8b | ++ | +++ | ++ | +++ | ++ | - |
| B9a | +++ | +++ | ++ | ++ | +++ | - |
| B9b | +++ | +++ | ++ | ++ | +++ | - |
| B11 | ++ | +++ | + | +++ | ++ | - |
| B12b | + | +++ | +++ | + | +++ | - |
| B17 | +++ | +++ | + | ++ | ++ | - |
| M3 | +++ | +++ | + | ++ | +++ | - |
| M5 | +++ | +++ | ++ | +++ | +++ | - |
| T16 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | - |

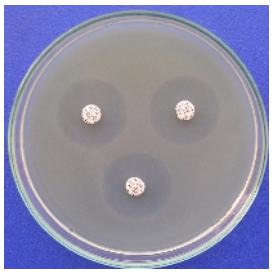
### 3.2.5. Khả năng tạo bacteriocin và các chất kháng khuẩn khác:

Nhiều nghiên cứu đã chứng tỏ các loài LAB có khả năng đối kháng chống lại các tác nhân gây bệnh đường ruột. Ngoài khả năng làm giảm pH môi trường bên trong khoang ruột bằng cách tạo ra các axít hữu cơ (như: axít lactic, axít acetic…) có tác dụng ức chế nhiều loài vi khuẩn Gram dương và Gram âm, các LAB còn có khả năng tạo ra bacteriocin và các chất kháng khuẩn khác (như: $H_2O_2$, $CO_2$, diacetyl…). Bacteriocin là chất kháng khuẩn tạo ra bởi nhiều loài vi khuẩn, có bản chất protein và thường có phổ diệt khuẩn hẹp, chỉ ức chế những vi sinh vật có quan hệ gần gũi với vi sinh vật sản xuất bacteriocin [9]. Kết quả thí nghiệm cho thấy dịch nuôi cấy của 12 chủng *Lactobacillus* (B5, B6, B8a,

B8b, B9a, B9b, B11, B12b, B17, M3, M5 và T16) sau khi trung hòa tính axít đều có khả năng tạo vòng kháng khuẩn đối với cả 2 loại vi khuẩn chỉ thị. Điều đó chứng tỏ 12 chủng này đều có khả năng tạo ra bacteriocin và các chất kháng khuẩn khác có khả năng tiêu diệt vi khuẩn Gram – (*E. coli* ATTC 25922) và vi khuẩn Gram + (*St. aureus* ATCC 25923). Kết quả này phù hợp với kết quả đạt được bởi Mishra và Prasad (2005) [7].

**3.2.6. Khả năng kháng với kháng sinh:**

Sự kháng với các loại kháng sinh là đặc điểm probiotic quan trọng. Trong thực tế, quá trình điều trị bệnh bằng kháng sinh tiêu diệt nhiều quần thể vi sinh vật một cách không chọn lọc, dẫn đến sự mất cân bằng hệ vi sinh vật đường ruột và có thể gây ra những rối loạn vùng ruột (như: bệnh tiêu chảy liên quan đến kháng sinh). Khi đó, các chủng vi khuẩn probiotic có khả năng kháng với kháng sinh có thể được đưa vào đường tiêu hóa của người bệnh, chúng sẽ tồn tại mà không bị tiêu diệt bởi kháng sinh và có tác dụng phục hồi hệ vi sinh vật bình thường ở ruột.



**Hình 3.** Chủng M5 nhạy với erythromycin

Kết quả kháng kháng sinh của các chủng *Lactobacillus* thể hiện ở bảng 3. Phần lớn các chủng kháng với các kháng sinh ức chế tổng hợp protein. 12 chủng *Lactobacillus* (B5, B6, B8a, B8b, B9a, B9b, B11, B12b, B17, M3, M5 và T16) đều kháng với amikacin và kanamycin, trong đó một số chủng kháng với gentamicin (B5, B6, B8a, B12b, B17 và M5) và streptomycin (B5, B6, B8a, B8b, B9a, B11, B12b, B17, M5 và T16). Bên cạnh đó, phần lớn các chủng cũng kháng với vancomycin (B5, B6, B8b, B9a, B11, B12b, B17, M3, M5 và T16) là kháng sinh ức chế tổng hợp vách tế bào. Đối với kháng sinh ức chế tổng hợp axít nucleic là co-trimoxazole, một số chủng kháng với kháng sinh này gồm: B11, B17, M3, M5 và T16.

**Bảng 3.** Khả năng kháng với kháng sinh của các chủng *Lactobacillus* (Pn: Penicillin G, Ac: Co-amoxiclav, Cr: Cefaclor, Va: Vancomycin, Er: Erythromycin, Ak: Amikacin, Ge: Gentamicin, Kn: Kanamycin, Sm: Streptomycin, Bt: Co-trimoxazole; R: kháng, S: nhạy cảm, I: trung gian)

| Kí hiệu chủng | Pn | Ac | Cr | Va | Er | Ak | Ge | Kn | Sm | Bt |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| B5 | S | S | S | R | S | R | R | R | R | S |
| B6 | S | S | S | R | S | R | R | R | R | S |
| B8a | S | S | S | S | S | R | R | R | R | I |
| B8b | S | S | S | R | S | R | S | R | R | S |
| B9a | S | S | S | R | S | R | S | R | R | S |
| B9b | S | S | S | S | S | R | S | R | I | S |
| B11 | S | S | S | R | S | R | S | R | R | R |
| B12b | S | S | S | R | S | R | R | R | R | S |
| B17 | S | S | S | R | S | R | R | R | R | R |
| M3 | S | S | S | R | S | R | S | R | I | R |
| M5 | S | S | S | R | S | R | R | R | R | R |
| T16 | I | S | S | R | S | R | S | R | R | R |

Ngoài ra, các chủng *Lactobacillus* ở trên cũng thể hiện sự an toàn đối với người sử dụng khi nhạy cảm với một số loại kháng sinh. Tất cả 12 chủng thử nghiệm đều nhạy với co-amoxiclav, cefaclor và erythromycin (hình 3 thể hiện sự nhạy cảm của chủng M5 với erythromycin). Trong đó, phần lớn các chủng còn nhạy với penicillin G (B5, B6, B8a, B8b, B9a, B9b, B11, B12b, B17, M3 và M5); một số chủng nhạy với vancomycin (B8a, B9b), gentamicin (B8b, B9a, B9b, B11, M3, T16) và co-trimoxazole (B5, B6, B8b, B9a, B9b, B12b). Kết quả này phù hợp với kết quả đạt được trong thí nghiệm của Arici *et al.* (2004) [1].

**3.2.7. Khả năng khử cholesterol:**

Theo các nhà khoa học, sự tiêu thụ các LAB có khả năng làm giảm mức cholesterol trong huyết thanh, giúp ngăn chặn bệnh tim mạch ở người. Phần lớn các chủng *Lactobacillus* trong nghiên cứu này đều có khả năng khử cholesterol huyết thanh (bảng 4). Mức khử cholesterol của các chủng từ 10% – 33,34%, trong đó 2 chủng B8a và B9b có khả năng khử cao nhất (33,34%) và chủng B6 có khả

năng khử thấp nhất (10%). Tuy nhiên, chủng B12b không biểu hiện khả năng làm giảm mức cholesterol. So sánh với khả năng khử cholesterol của các chủng *Lactobacillus* phân lập từ phân người trong thí nghiệm của Hyeong-Jun Lim *et al.* (2004), chúng cũng có khả năng khử cholesterol với % khử cholesterol khá cao 31,5% – 58,5% [5].

**Bảng 4.** Khả năng khử cholesterol của các chủng *Lactobacillus* (–: không khử cholesterol)

| Kí hiệu chủng | % Khử cholesterol (%) |
|---|---|
| B5 | 23,33 |
| B6 | 10 |
| B8a | 33,34 |
| B8b | 23,34 |
| B9a | 26,67 |
| B9b | 33,34 |
| B11 | 16,67 |
| B12b | - |
| B17 | 23,34 |
| M3 | 13,34 |
| M5 | 16,67 |
| T16 | 26,67 |

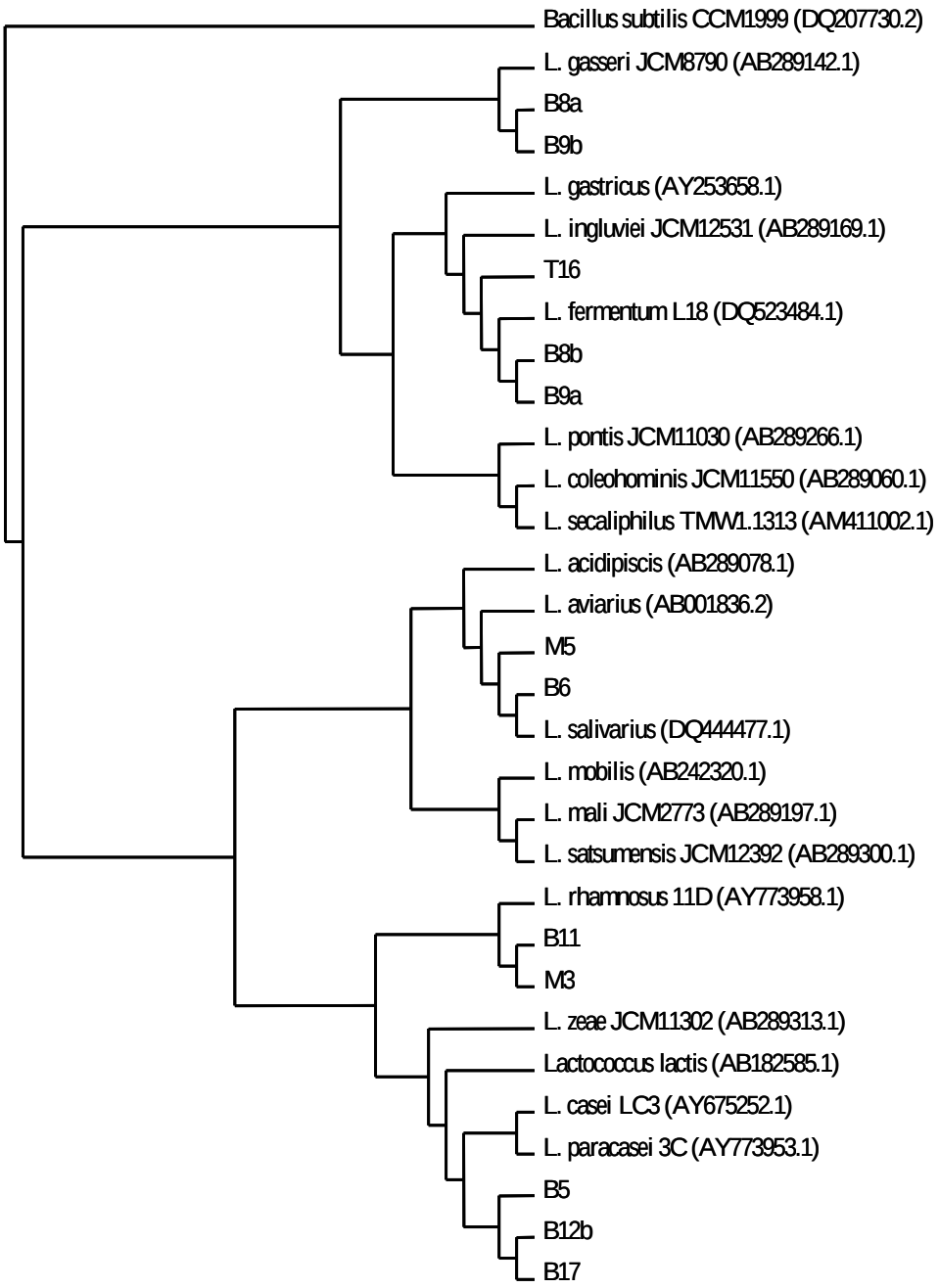
Liên hệ khả năng khử cholesterol với khả năng kháng mật của các chủng *Lactobacillus*. 11 chủng *Lactobacillus* (B5, B6, B8a, B8b, B9a, B9b, B11, B17, M3, M5 và T16) có khả năng khử cholesterol ở mức đáng kể đều có khả năng chịu đựng nồng độ mật 1% – 2%, trong khi chủng B12b không có khả năng làm giảm mức cholesterol chỉ có khả năng chịu đựng nồng độ mật 0,5%. Điều này cho thấy sự liên quan giữa khả năng kháng mật và khả năng khử cholesterol của các chủng *Lactobacillus*. Tuy nhiên, Walker và Gilliland (1993) đã khẳng định không có sự liên quan đáng kể giữa khả năng kháng mật và khả năng đồng hóa cholesterol của *L. acidophilus* [10]. Do đó, để có thể khẳng định những chủng vi khuẩn có khả năng kháng mật cao đều có khả năng khử cholesterol, vấn đề này cần được nghiên cứu một cách kỹ lưỡng hơn nữa.

### 3.3. Phân tích trình tự rDNA 16S:

Để xác định danh pháp đến mức loài của các chủng *Lactobacillus*, một trình tự khoảng 500 nucleotide từ gen mã hóa cho rRNA 16S của các chủng *Lactobacillus* được khuếch đại bằng phương pháp PCR với 2 mồi chuyên biệt cho giống *Lactobacillus* và được xác định trình tự nucleotide. Kết quả so sánh mức độ tương đồng trình tự của các chủng *Lactobacillus* với ngân hàng dữ liệu gen của NCBI được trình bày ở bảng 5 và mối quan hệ của các chủng vi khuẩn này thể hiện trên cây phát sinh loài ở hình 4.

Các đoạn trình tự rDNA 16S khoảng 500 nucleotide của các chủng *Lactobacillus* khi đem so sánh với ngân hàng dữ liệu gen đều có số nucleotide tương đồng trên 500 nucleotide và mức tương đồng trình tự từ 99% trở lên. Theo Hugenholtz *et al.* (1998), số nucleotide tương đồng và mức tương đồng trình tự như vậy đủ tin cậy cho việc sắp xếp trình tự nucleotide mới trong hệ thống phát sinh chủng loài [8]. Do đó, các chủng *Lactobacillus* được xác định thuộc về các loài như sau: *L. gasseri* (B8a, B9b), *L. fermentum* (B8b, B9a, T16), *L. salivarius* (B6, M5), *L. rhamnosus* (B11, M3) và *L. paracasei*/ *casei* (B5, B12b, B17). Các loài *Lactobacillus* này cũng được phát hiện trong các mẫu phân của những trẻ em có độ tuổi từ 3 ngày đến 3 tháng tuổi bằng phương pháp giải trình tự gen mã hóa cho rRNA 16S [11].

Kết quả trên cho thấy trình tự khoảng 500 nucleotide của gen mã hóa cho rRNA 16S được phân tích ở đây hiệu quả cho việc nhận diện phần lớn các loài *Lactobacillus*. Tuy nhiên, *L. paracasei* và *L. casei* là 2 loài có quan hệ rất gần với nhau, chúng có tính tương đồng cao trong trình tự gen mã hóa cho rRNA 16S, nên trình tự 500 nucleotide của rDNA 16S ở đây chưa đủ để phân biệt sự khác nhau giữa 2 loài này (Bảng 5).




**Hình 4.** Cây phát sinh chủng loài của các chủng *Lactobacillus* và các loài có liên quan dựa trên sự phân tích so sánh trình tự rDNA 16S.

**Bảng 5.** Kết quả so sánh mức độ tương đồng trình tự của các chủng *Lactobacillus* với các loài vi khuẩn trong ngân hàng dữ liệu gen của NCBI.

| Kí hiệu chủng | Các loài vi khuẩn từ ngân hàng dữ liệu gen của NCBI | Mã số lưu trữ trong ngân hàng dữ liệu gen | Mức độ tương đồng | Tỉ lệ nucleotide tương đồng |
|---|---|---|---|---|
| B5 | *L. paracasei* 3C | AY773953.1 | 100% | 516/ 516 |
| | *L. casei* LC3 | AY675252.1 | | |
| B6 | *L. salivarius* | DQ444477.1 | 100% | 524/ 524 |
| B8a | *L. gasseri* JCM 8790 | AB289142.1 | 100% | 520/ 520 |
| B8b | *L. fermentum* L18 | DQ523484.1 | 100% | 521/ 521 |
| B9a | *L. fermentum* L18 | DQ523484.1 | 100% | 520/ 520 |
| B9b | *L. gasseri* JCM 8790 | AB289142.1 | 100% | 520/ 520 |
| B11 | *L. rhamnosus* 11D | AY773958.1 | 99% | 519/ 520 |
| B12b | *L. paracasei* 3C | AY773953.1 | 100% | 520/ 520 |
| | *L. casei* LC3 | AY675252.1 | | |
| B17 | *L. paracasei* 3C | AY773953.1 | 100% | 514/ 514 |
| | *L. casei* LC3 | AY675252.1 | | |
| M3 | *L. rhamnosus* 11D | AY773958.1 | 99% | 514/ 515 |
| M5 | *L. salivarius* | DQ444477.1 | 100% | 520/ 520 |
| T16 | *L. fermentum* L18 | DQ523484.1 | 100% | 521/ 521 |

## 4. KẾT LUẬN:

Kết quả phân lập và xác định giống *Lactobacillus* đạt được 15 chủng *Lactobacillus* gồm: B1, B3, B5, B6, B8a, B8b, B9a, B9b, B11, B12b, B15, B17, M3, M5 và T16.

Qua các thí nghiệm *in vitro*, 12 chủng *Lactobacillus* có đặc tính probiotic thích hợp cho con người đã được chọn lọc. Chúng có thể tồn tại trong đường dạ dày – ruột người vì kháng lại pH thấp trong dạ dày, kháng lại mật trong ruột non và kết bám với biểu mô ruột. Các chủng này được định danh bằng phương pháp phân tích trình tự rDNA 16S gồm: *L. paracasei*/ *casei* B5, *L. salivarius* B6, *L. gasseri* B8a, *L. fermentum* B8b, *L. fermentum* B9a, *L. gasseri* B9b, *L. rhamnosus* B11, *L. paracasei*/ *casei* B12b, *L. paracasei*/ *casei* B17, *L. rhamnosus* M3, *L. salivarius* M5 và *L. fermentum* T16.

Ngoài ra, các chủng *Lactobacillus* có đặc tính probiotic ở trên cũng thể hiện một số ích lợi đối với sức khỏe con người như: kháng với các vi khuẩn gây bệnh, tạo ra bacteriocin và các chất kháng khuẩn khác. Đồng thời, chúng cũng kháng với một số loại kháng sinh. Tùy theo khả năng kháng kháng sinh của mỗi chủng, chúng có thể được đưa vào cơ thể của các bệnh nhân sử dụng các loại kháng sinh (như: amikacin, kanamycin, gentamicin, streptomycin, vancomycin và co-trimoxazole) mà không bị tiêu diệt bởi các loại kháng sinh mà chúng kháng lại, từ đó tạo nên những hiệu quả có lợi cho bệnh nhân. Hơn nữa, các chủng *Lactobacillus* này cũng an toàn đối với người sử dụng khi nhạy cảm với một số loại kháng sinh. Đặc biệt, 11 chủng *Lactobacillus* (gồm: *L. paracasei*/ *casei* B5, *L. salivarius* B6, *L. gasseri* B8a, *L. fermentum* B8b, *L. fermentum* B9a, *L. gasseri* B9b, *L. rhamnosus* B11, *L. paracasei*/ *casei* B17, *L. rhamnosus* M3, *L. salivarius* M5 và *L. fermentum* T16) có khả năng khử mức cholesterol huyết thanh đáng kể 10% – 33,34%. Các chủng *Lactobacillus* này cần được tiếp tục nghiên cứu sâu hơn để ứng dụng sản xuất các sản phẩm probiotic có tác dụng làm giảm cholesterol huyết thanh, nhằm ngăn chặn bệnh tim mạch ở người.

# ISOLATION, CLASSIFICATION AND IDENTIFICATION OF POTENTIAL PROBIOTIC *LACTOBACILLUS* STRAINS FROM INFANT FAECES

**Hoang Quoc Khanh** [(1)]**, Pham Thi Lan Thanh** [(2)]
(1) Institute of Tropical Biology, Viet Nam Academy of Science and Technology
(2) Lac Hong University

***ABSTRACT:*** *Lactobacillus bacteria present in many probiotic products. This paper investigated probiotic Lactobacillus strains isolated from the human gastrointestinal tract. 15 Lactobacillus strains were isolated from breast-fed infant faeces and identified by both traditional methods and genus-specific PCR method. In vitro experiments were designed to investigate some probiotic properties such as resistance to low pH and bile, cell surface hydrophobicity, antimicrobial activity, bacteriocin and other antimicrobials production, antibiotic resistance and cholesterol reduction. As a result, 12 probiotic Lactobacillus strains were selected. Significantly, 11 strains of them reduced 10 – 33.34% serum cholesterol level. By 16S rDNA analysis, the probiotic strains were classified at species level as Lactobacillus gasseri, L. fermentum, L. salivarius, L. rhamnosus and L. paracasei/ casei.*

**Key words:** *Lactobacillus*, probiotic, PCR, rDNA 16S

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. Arici M., Bilgin B., Sagdic O., Ozdemir C. *Some Characteristics of Lactobacillus Isolates from Infant Feaces*. Food Microbiology, 21, pp. 19-24 (2004).

[2]. Fanaro S., Chierici R., Guerrini P., Vigi V. *Intestinal Microflora in Early Infancy: Composition and Development*. Acta. Pædiatr. Suppl., 441, pp. 48-55 (2003).

[3]. FAO & WHO. *Health and Nutrient Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria*. Report of a joint FAO/ WHO expert consultation on evaluation of health and nutrient properties of probiotics including powder milk with live lactic acid bacteria, Córdoba, Argentina (2001).

[4]. Jacobsen C.N., Nielsen V.R., Hayford A.E., Møller P.L., Michaelsen K.F., Pærregaard A., Sandström B., Tvede M., Jakobsen M. *Screening of Probiotic Activities of Forty-Seven Strains of Lactobacillus spp. by In Vitro Techniques and Evaluation of the Colonization Ability of Five Selected Strains in Humans*. Appl. Environ. Microbiol., 65 (11), pp. 4949-4956 (1999).

[5]. Lim HJ., Kim SY., Lee WK. *Isolation of Cholesterol-Lowering Lactic Acid Bacteria from Human Intestine for Probiotic Use*. Journal of Veterinary Science, 5 (4), pp. 391-395 (2004).

[6]. Matijašić B.B., Rogelj I. *Lactobacillus K7 – a New Candidate for a Probiotic Strain*. Food Technol. Biotechnol., 38 (2), pp. 113-119 (2000).

[7]. Mishra V., Prasad D.N. *Application of In Vitro Methods for Selection of Lactobacillus casei Strains as Potential Probiotics*. International Journal of Food Microbiology, 103, pp. 109-115 (2005).

[8]. Osborn A.M., Smith C.J. *Molecular Microbial Ecology*. Taylor & Francis Group, UK (2005).

[9]. Spencer J.F.T., de Spencer A.L.R. *Public Health Microbiology – Methods and Protocols*. Methods in Molecular Biology, vol. 268, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, USA (2004).

[10]. Walker D.K., Gilliland S.E. *Relationships Among Bile Tolerance, Bile Salt Deconjugation and Assimilation of Cholesterol by Lactobacillus acidophilus*. J. Dairy Sci., 76, pp. 956-961 (1993).

[11]. Wall R., Fitzgerald G., Hussey S., Ryan T., Murphy B., Ross P., Stanton C. *Genomic Diversity of Cultivable Lactobacillus Populations Residing in the Neonatal and Adult Gastrointestinal Tract*. FEMS Microbiol. Ecol., 59, pp. 127-137 (2007).