

Sàng lọc các chủng vi khuẩn sinh lactic acid có hoạt tính kháng khuẩn từ một số rau củ quả tươi tại Thành phố Hồ Chí Minh

Nguyễn Thanh Loan*, Ngô Nguyên Vũ, Vũ Minh Thiết

Viện Kỹ Thuật Công nghệ cao NTT, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

*loannt@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Vi khuẩn lactic là nhóm vi khuẩn có vai trò quan trọng trong lên men thực phẩm, có tiềm năng ứng dụng làm lợi khuẩn (probiotic) nhờ tính an toàn và khả năng sinh các hợp chất kháng khuẩn tự nhiên. Nghiên cứu này đã phân lập được 91 chủng vi khuẩn từ 4 loại rau củ tươi, trong đó có 30/91 chủng có khả năng ức chế ít nhất 1 chủng vi khuẩn gây bệnh, và 9 chủng có phổ ức chế rộng đối với 5 chủng vi khuẩn (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* và *Salmonella enterica*). Sau quá trình sàng lọc, 5 chủng (OHT2, OTT1, OTT4, OXC2 và OXC3) vẫn duy trì được hoạt tính kháng khuẩn khi được nuôi cấy trong môi trường lỏng. Phân tích các đặc điểm sinh hóa và hình thái cho thấy 4 chủng (OTT1, OTT4, OXC2 và OXC3) có đặc trưng của nhóm LAB: trực khuẩn Gram dương, không sinh nội bào tử, có khả năng chịu muối tốt ($> 3\%$ NaCl) và không gây tán huyết β ; trong khi chủng OHT2 là một chủng nấm men. Kết quả định danh bằng trình tự 16S rRNA xác định OTT1 thuộc loài *Lactiplantibacillus plantarum*, OXC3 là loài *Lactiplantibacillus pentosus*, còn OTT4 và OXC2 là loài *Weissella cibaria*. Các chủng LAB phân lập có tiềm năng ứng dụng trong lên men thực phẩm, bảo quản thực phẩm và phát triển chế phẩm probiotic.

Nhận 31/12/2025

Được duyệt 12/03/2025

Công bố 28/06/2025

Từ khóa

vi khuẩn lactic,
kháng khuẩn,
rau củ tươi,
thực phẩm lên men,
probiotic

© 2024 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Đặt vấn đề

Trong những năm gần đây, việc nghiên cứu ứng dụng vi khuẩn lactic (Lactic acid bacteria – LAB) trong thực phẩm và y học ngày càng được quan tâm nhờ vào những lợi ích cho sức khỏe. LAB không chỉ tham gia vào quá trình lên men thực phẩm, ức chế các vi sinh vật có hại, giúp bảo quản thực phẩm mà còn giúp cân bằng hệ vi sinh đường ruột, bảo vệ sức khỏe người sử dụng [1]. Vi khuẩn LAB có khả năng sản xuất các hợp chất kháng khuẩn như lactic acid, hydrogen peroxide và các peptide kháng khuẩn, ức chế các loài vi khuẩn gây bệnh như *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* và *Listeria monocytogenes* trong thực phẩm [2]. Một trong những

nguồn chủng LAB tiềm năng nhưng chưa được quan tâm nghiên cứu nhiều là từ các loại rau củ quả tươi được sử dụng hàng ngày [3]. Trong số các loại rau củ tươi thì củ cải, cà rốt, bắp cải thảo và ớt hiểm là các loại rau củ phổ biến, thường xuất hiện trong khẩu phần ăn hằng ngày của người Việt Nam, cũng như là thường được sử dụng trong các món muối chua, lên men truyền thống. Hơn nữa, một số nghiên cứu trước đây cũng đã ghi nhận có nhiều loài LAB tồn tại trên các loại rau củ này [4]. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng, khi có sự hiện diện của LAB, đặc biệt trong quá trình lên men rau củ, khả năng phát triển của các nhóm vi khuẩn gây bệnh giảm đi đáng kể. Điều này là do LAB có thể tạo ra môi trường

với độ pH thấp, vốn là điều kiện bất lợi cho sự sinh trưởng của nhiều loài vi khuẩn gây bệnh, đồng thời LAB còn sản sinh các hợp chất có khả năng tiêu diệt hoặc ức chế các vi khuẩn có hại này [2]. Mặc dù hướng nghiên cứu về LAB và hoạt tính kháng khuẩn của chúng được khá nhiều sự quan tâm, các nghiên cứu khác phần lớn chỉ tập trung vào các chủng LAB phân lập được từ các sản phẩm lên men, chưa khai thác nguồn vi khuẩn đa dạng từ rau củ tươi [5-7]. Quá trình lên men như một quá trình chọn lọc, làm giảm đáng kể tính đa dạng của hệ vi sinh ban đầu có trên rau củ tươi, làm giảm đi khả năng phát hiện ra các chủng vi khuẩn mới với hoạt tính sinh học tiềm năng. Vì vậy, việc phân lập các chủng LAB từ rau củ tươi như củ cải, cà rốt, bắp cải thảo và ớt hiểm sẽ cho cơ hội cao hơn tìm thấy các chủng chỉ tồn tại trên rau tươi và có thể có hoạt tính sinh học tốt hơn so với các nghiên cứu trước đây trên thực phẩm lên men.

2 Vật liệu và Phương pháp

2.1 Thu mẫu rau củ tươi

Các loại rau củ được sử dụng để phân lập vi khuẩn LAB bao gồm: bắp cải thảo, củ cải, cà rốt và ớt hiểm (gọi chung là mẫu rau củ). Rau củ được mua tại các chợ trên địa bàn Thành phố Hồ Chí Minh: chợ Xóm Chiếu (Quận 4), chợ Phạm Văn Hai (Quận Tân Bình), chợ Hoàng Hoa Thám (Quận Tân Bình) và chợ Tân Trụ (Quận Tân Bình). Rau củ được lựa chọn với tiêu chí như vỏ còn tươi, còn nguyên vẹn thân, lá, và cuống. Mẫu rau củ sau khi được thu gom sẽ được sử dụng để phân lập trong vòng (2-4) giờ để tránh sự thay đổi về hệ vi sinh trên mẫu hoặc các thành phần tạp nhiễm khác.

2.2 Phân lập chủng vi khuẩn từ mẫu rau củ

Mẫu rau củ tươi sau khi thu nhận, được phân loại, rửa sơ bằng nước sạch để loại bỏ bụi bẩn, đất dơ, sau đó được xử lý theo từng loại rau củ. Cụ thể, bắp cải thảo được xử lý bằng cách tách các lá cải thảo, cắt nhỏ thành các phần có kích thước 5 cm × 5 cm; củ cải và cà rốt được xử lý bằng cách cắt thành các khối lập phương kích thước 5 cm × 5 cm × 5 cm; còn ớt hiểm được giữ nguyên cuống và ngâm trực tiếp vào các bình tam giác chứa dung dịch nước muối sinh lý (NaCl 0,9 %). Các

mẫu rau củ được ngâm trong dung dịch nước muối sinh lý 30 phút ở điều kiện nhiệt độ phòng, lắc trộn định kỳ để vi khuẩn có trên bề mặt mẫu rau củ được giải phóng ra nước rửa. Sau đó, nước rửa được trải lên môi trường thạch DE MAN, ROGOSA and SHARPE (MRS, OXOID, Anh) – môi trường chọn lọc cho nhóm vi khuẩn Lactobacilli, và ủ ở 37 °C trong 24 giờ. Các khuẩn lạc được đánh giá và phân loại theo hình thái, kích thước và màu sắc, sau đó được cấy truyền lặp lại nhiều lần đến khi thu được dòng thuần và bảo quản trong các ống trữ mẫu chứa môi trường MRS với 30 % Glycerol ở -80 °C.

2.3 Chọn lọc vi khuẩn có hoạt tính kháng

Hoạt tính kháng khuẩn của các chủng phân lập được sàng lọc sơ bộ bằng phương pháp cấy chéo đối kháng [8]. Vi khuẩn phân lập được cấy vạch lên đĩa môi trường, sau đó ủ 7 ngày ở 37 °C để chủng phát triển và tiết chất kháng sinh ra phần thạch quanh đường cấy. Sau 7 ngày các vi khuẩn gây bệnh được cấy vuông góc đến khi chạm vào đường cấy của chủng vi khuẩn ban đầu và được ủ ở 37 °C. Sau 24 giờ ủ, sự ức chế của vi khuẩn gây bệnh trên diện tích vùng thạch xung quanh đường cấy vi khuẩn cho thấy hoạt tính ức chế vi khuẩn gây bệnh của chủng này. Vi khuẩn gây bệnh sử dụng trong thí nghiệm đối kháng bao gồm *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella enterica* ATCC 6539 và *Bacillus cereus* ATCC 10876.

2.4 Kiểm tra khả năng kháng khuẩn từ môi trường

Vi khuẩn phân lập được nuôi lỏng trong môi trường MRS và ủ trong bình nén nhằm tạo môi trường yếm khí hỗ trợ cho vi khuẩn sản xuất các hoạt chất kháng khuẩn [9]. Môi trường nuôi khuẩn sau 14 ngày được thu hồi, ly tâm loại bỏ sinh khối vi và đông khô bằng thiết bị OPERON FDB-5503 (OPERON, Korea) để thu cao chiết vi khuẩn. Cao chiết đông khô sau đó được hoà với nước cất theo tỉ lệ 1:1 (w/v) và được kiểm tra khả năng kháng khuẩn bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch (phương pháp Kirby-

Bauer). Các chủng vi khuẩn gây bệnh được sử dụng khảo sát tương tự như mô tả tại Mục 2.3.

2.5 Kiểm tra đặc điểm sinh hóa

Nhuộm Gram và quan sát hình thái: sau 24 giờ tăng sinh, dịch vi khuẩn được dàn mỏng lên lam kính và cố định bằng nhiệt. Mẫu vi khuẩn được nhuộm với thuốc nhuộm Crystal violet (REMEL, USA) trong 1 phút rồi rửa nhẹ với nước. Tiếp theo, dung dịch Lugol (REMEL, USA) được thêm vào và để trong 1 phút rồi rửa lại. Sau đó, mẫu được tẩy màu với dung dịch ethanol:acetone với tỉ lệ 1:1 (v/v), rửa sạch sau đó nhuộm với Safranin (REMEL, USA) trong 1 phút, rửa và để khô. Tiêu bản được quan sát đánh giá hình thái tế bào, sự hiện diện của nội bào tử và phân loại nhóm vi khuẩn Gram âm và Gram dương bằng kính hiển vi ZEISS Axiolab5 với vật kính dầu (100X).

Khả năng lên men đường lactose: các chủng vi khuẩn phân lập được nuôi trong môi trường lỏng Phenol Red (REMEL, USA) có bổ sung 1 % đường lactose và ủ ở 37 °C trong 24 giờ. Kết quả được đánh giá trực quan dựa trên màu sắc của môi trường: các chủng có khả năng lên men lactose sản xuất các hợp chất có tính acid làm giảm pH của dung dịch, khiến màu đỏ của môi trường Phenol Red đổi thành màu vàng, ngược lại vi khuẩn không sử dụng đường lactose không làm đổi màu môi trường [10].

Khả năng chịu mặn: các vi khuẩn phân lập được cấy vào các ống nghiệm chứa môi trường Tryptic Soy (TSB, OXOID, England) với các nồng độ muối NaCl khác nhau là (0, 0,5, 1, 2, 3, 4 và 5) %. Sau 24 giờ, ủ ở 37 °C, sự phát triển của vi khuẩn được đánh giá dựa trên độ đục của môi trường nuôi cấy, các ống nghiệm vẫn trong suốt cho thấy vi khuẩn không phát triển ở nồng độ muối tương ứng. Khả năng chịu mặn được đánh giá dựa trên nồng độ muối cao nhất mà vi khuẩn có thể phát triển [11].

Khả năng tán huyết: vi khuẩn phân lập được cấy lên môi trường thạch máu (Blood agar, OXOID, USA) bổ sung 5 % máu cừu và ủ ở 37 °C trong 24 giờ và quan

sát vùng phân giải máu xung quanh khuẩn lạc để đánh giá dạng tán huyết α , β hoặc γ [12].

2.6 Định danh vi khuẩn bằng phương pháp phân tử

DNA tổng số của các chủng vi khuẩn phân lập được tách chiết bằng bộ kit Monarch HMW DNA Extraction Kits (#T3060, NEB). Phản ứng PCR nhân gen 16S rRNA được thực hiện bằng Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (#M0491, NEB) với cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1492R: (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3') [13]. Chương trình nhiệt của PCR bao gồm các bước biến tính ban đầu ở 95 °C trong 5 phút, 30 chu kỳ của 95 °C trong 30 giây, 52 °C trong 30 giây và 72 °C trong 90 giây, và bước kéo dài cuối cùng ở 72 °C trong 5 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1 % và được tinh sạch bằng bộ kit Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit (#T1030, NEB) trước khi được giải trình tự tại Công ty DNA Sequencing (Cần Thơ, Việt Nam). Danh tính loài của vi khuẩn được xác định bằng cách so sánh trình tự vùng gene đã giải với ngân hàng trình tự Genbank trên trang web NCBI (Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia, Thư viện Y khoa Quốc gia Mỹ) bằng công cụ BLAST.

3 Kết quả

3.1 Kết quả phân lập vi sinh từ mẫu rau củ và sàng lọc khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh

Tổng cộng 91 chủng phân lập được từ nước rửa rau củ thu mua các chợ khác nhau. Kết quả thí nghiệm cấy chéo đối kháng cho thấy trong số 91 chủng phân lập có 30 chủng có khả năng ức chế ít nhất một trong sáu chủng vi khuẩn gây bệnh. Cụ thể, tổng cộng có 16 chủng phân lập có hoạt tính ức chế lại một chủng vi khuẩn gây bệnh; 03 chủng phân lập có hoạt tính ức chế 02 chủng vi khuẩn gây bệnh; 02 chủng có hoạt tính ức chế 03 chủng vi khuẩn gây bệnh; 09 chủng có khả năng ức chế 05 chủng vi khuẩn gây bệnh, và không có chủng phân lập nào có thể ức chế toàn bộ cả 06 chủng vi khuẩn khảo sát. Đáng chú ý, có 05 chủng vi khuẩn gây bệnh bị ức chế bởi LAB bao gồm *S. aureus*, *B. cereus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* và *S. enterica*, trong khi vi khuẩn *E. faecalis* không bị ức chế bởi bất cứ chủng LAB nào.

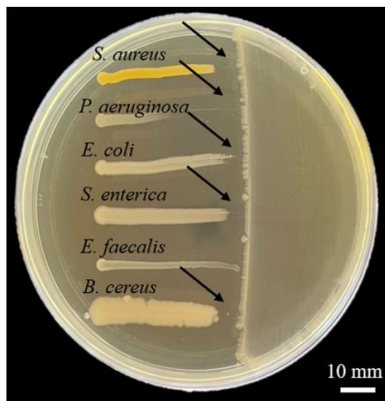
Các chủng LAB phân lập có khả năng ức chế từ 03 loài vi khuẩn gây bệnh trở lên được chọn cho các nghiên cứu tiếp theo. Theo tiêu chí này, có 11 chủng phân lập được chọn (Bảng 1). Trong đó, chủng CCB1 có khả năng ức chế 03 chủng vi khuẩn là *S. aureus*, *B. cereus* và *S. enterica*;

chủng OXC1 có khả năng ức chế 03 chủng là *S. aureus*, *P. aeruginosa* và *S. enterica*; có 09 chủng còn lại có khả năng ức chế lại 05 chủng gây bệnh (gồm *S. aureus*, *B. cereus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* và *S. enterica*).

Bảng 1 Các chủng vi khuẩn vi sinh phân lập có khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh

STT	Tên chủng	Vi khuẩn đối kháng					
		<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. enterica</i>
1	CTH12	+++	-	+++	+++	++	++
2	CCH4	++++	-	+++	++++	+++	+++
3	OHT2	++	-	+++	++++	++	+++
4	CTB1	++	-	++	++++	+	++
5	CCB1	++	-	++	-	-	++
6	OTT1	++	-	+++	++++	++	++
7	OTT4	++	-	+++	++++	++	++
8	CCX2	++++	-	+++	++++	+++	+++
9	OXC1	++	-	++	+++	-	-
10	OXC2	+++	-	+++	++++	++	+++
11	OXC3	++	-	+++	++++	++	++

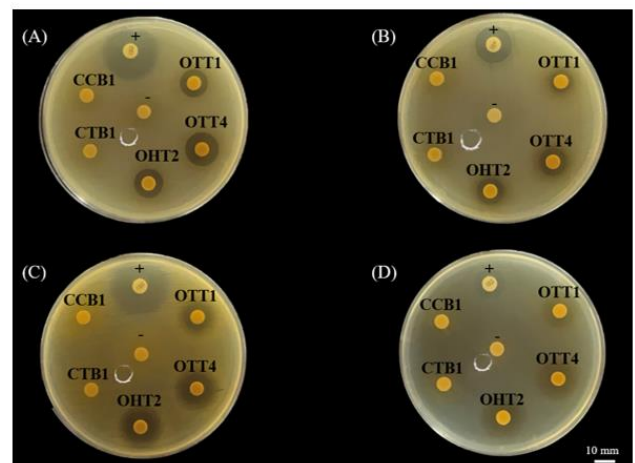
Chú thích: độ dài vùng ức chế là khoảng cách tính từ mép vạch cấy của vi khuẩn đối kháng đến rìa vùng vi khuẩn gây bệnh không thể phát triển. -: không có khả năng ức chế; +: vùng ức chế từ (1-3) mm; ++: vùng ức chế từ (3-5) mm; +++: vùng ức chế từ (6-8) mm; ++++: vùng ức chế > 8 mm.



Hình 1 Kết quả cấy chéo đối kháng của chủng CTB1. Vị trí mũi tên màu đen chỉ các vùng sinh khối gần hơn của các chủng bị ức chế.

3.2 Khả năng kháng khuẩn từ dịch nuôi cấy của các chủng phân lập

Hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết dịch nuôi cấy của 11 chủng được chọn được trình bày trong Bảng 2. So sánh với phương pháp cấy chéo đối kháng trên đĩa thạch (Bảng 1), dịch nuôi cấy của 03 chủng OHT2, OTT4 và OXC2 vẫn duy trì khả năng ức chế 5 chủng vi



Hình 2 Một số hình ảnh kết quả kháng khuẩn của dịch nuôi cấy đông khô. (A) Chủng *S. enterica*; (B) Chủng *E. coli*; (C) Chủng *S. aureus*; (D) Chủng *E. faecalis*.

khẩn gây bệnh khảo sát (*S. aureus*, *B. cereus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* và *S. enterica*). Các chủng còn lại, dịch nuôi cấy có sự suy giảm hoặc mất hoàn toàn không

hoạt tính kháng khuẩn khi so sánh với kết quả thí nghiệm cấy chéo đối kháng. Chủng CCB1, trong thí nghiệm cấy chéo có khả năng ức chế 03 chủng (*S. aureus*, *B. cereus* và *S. enterica*), chỉ thể hiện hoạt tính kháng khuẩn đối với *B. cereus* trong khoảng 6 giờ khi sử dụng dịch nuôi

cấy, sau đó mất hoạt tính hoàn toàn và không có tác dụng đối với các chủng vi khuẩn còn lại. Tương tự, các chủng CTH12, CCH4, CTB1 và OXC1 cũng bị mất hoạt tính kháng khuẩn sau 6 giờ ủ hoặc dịch nuôi cấy không có hoạt tính kháng khuẩn rõ rệt.

Bảng 2 Kích thước vòng kháng khuẩn của dịch nuôi cấy vi khuẩn phân lập từ rau củ.

Tên chủng	Vi khuẩn đối kháng					
	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. enterica</i>
CTH12	-	-	11,23 ± 0,25	-	*	-
CCH4	-	-	11,90 ± 0,46	9,87 ± 0,90	*	7,25 ± 0,78
OHT2	11,1 ± 0,14	*	15,27 ± 1,42	14,00 ± 0,20	9,00 ± 1,41	12,23 ± 0,25
CCB1	-	-	*	-	-	-
CCX2	*	-	7,77 ± 0,87	7,60 ± 1,04	7,27 ± 0,31	7,15 ± 0,78
CTB1	*	-	7,07 ± 0,12	*	*	*
OTT1	9,23 ± 0,68	*	15,13 ± 0,12	13,00 ± 0,92	8,13 ± 1,10	7,00 ± 0,30
OTT4	9,73 ± 1,48	*	16,90 ± 0,85	15,40 ± 1,22	8,23 ± 0,49	8,97 ± 0,55
OXC1	*	-	7,03 ± 0,38	*	*	*
OXC2	7,67 ± 0,47	-	11,17 ± 0,91	11,07 ± 1,14	8,23 ± 0,97	9,40 ± 0,57
OXC3	9,77 ± 0,25	*	9,53 ± 0,72	10,77 ± 1,25	7,87 ± 0,31	9,43 ± 0,93
Kháng sinh	22,10 ± 0,60	13,00 ± 0,50	15,40 ± 0,36	10,90 ± 0,79	10,57 ± 0,51	18,20 ± 1,00

Chú thích:

(*) có vòng kháng khuẩn sau 6 giờ ủ, nhưng mất vòng sau 18 giờ

(-) không có vòng kháng khuẩn

Trong Bảng 2, kháng sinh đối với chủng *E. faecalis* là Vancomycin (30 µg), đối với chủng *E. coli* là Kanamycin (30 µg), đối với các chủng còn lại là Tetracycline (30 µg). Đơn vị tính: mm, đường kính khoan giấy: 6 mm.

Dựa trên kết quả ở Bảng 1 và Bảng 2, có 05 chủng OHT2, OTT1, OTT4, OXC2 và OXC3 được lựa chọn để tiếp tục nghiên cứu. Các chủng này thể hiện khả năng ức chế phổ rộng đối với nhiều vi khuẩn gây bệnh, có thể tiết chất kháng khuẩn vào môi trường. Các thí nghiệm sinh hóa và định danh được tiến hành nhằm đánh giá tiềm năng ứng dụng của các chủng này trong nhiều lĩnh vực.

3.3 Các đặc điểm hình thái và sinh hoá của các chủng phân lập

Nấm chủng được chọn được khảo sát khả năng chịu mặn, khả năng sử dụng/lên men đường lactose, khả năng phân giải hồng cầu, và đặc điểm về hình thái tế bào và khuẩn

lạc. Các đặc điểm sinh hoá và hình thái của năm chủng có hoạt tính tốt nhất được liệt kê trong Bảng 3.

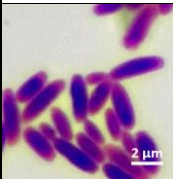
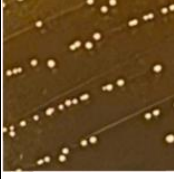
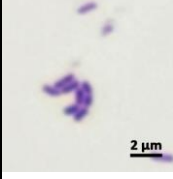
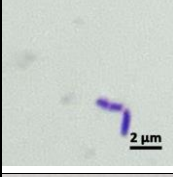
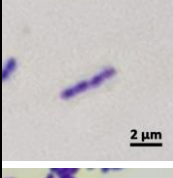
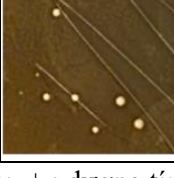
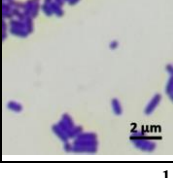
Theo Bảng 3, kết quả nhuộm Gram và quan sát hình thái tế bào dưới kính hiển vi cho thấy chủng OHT2 có đặc điểm hình thái điển hình của nấm men, với hình elip dài và sinh sản bằng cách nảy chồi ở một đầu. Trong khi đó, 04 chủng OTT1, OTT4, OXC2 và OXC3 đều là trực khuẩn ngắn, Gram dương và không sinh nội bào tử. Về khả năng chịu mặn, cả 05 chủng đều thể hiện mức chịu mặn tương đối cao. Cụ thể, chủng OTT4 có thể phát triển trong môi trường chứa 3,5 % NaCl, chủng OTT1 chịu được 5 % NaCl, 02 chủng OHT2 và OXC3 có thể phát triển ở nồng độ muối tối đa 5,5 %, trong khi chủng OXC2 có khả năng chịu mặn vượt ngưỡng khảo sát (> 6 % NaCl). Về khả năng phân giải hồng cầu, 03 chủng OHT2, OTT4 và OXC2 thể hiện khả năng tán huyết α, trong khi 02 chủng OTT1 và OXC3 không có hoạt tính tán huyết (tán huyết γ). Về khả năng lên men đường lactose, chỉ có chủng nấm men OHT2 có khả năng sử dụng đường lactose trong môi trường hiếu khí, chủng OTT1 chỉ lên men được đường lactose trong điều kiện yếm khí, còn 03 chủng OTT4, OXC2 và

OXC3 thì không có khả năng lên men và chuyển hoá đường lactose.

Dựa trên các đặc điểm tế bào trực khuẩn, Gram dương, không sinh nội bào tử và khuẩn lạc có hình dạng tròn, bóng, màu trắng ngà khi nuôi cấy trên môi trường MRS, bốn chủng OTT1, OTT4, OXC2 và OXC3 được xác định là vi khuẩn thuộc nhóm LAB. Do đó, các

chủng này sẽ tiếp tục được định danh bằng phương pháp phân tích trình tự gene 16S rRNA. Mặc dù chủng OHT2 có hoạt tính kháng khuẩn tốt, nhưng là chủng nấm men và không thuộc phạm vi nghiên cứu LAB trong đề tài này. Do đó, cần có một nghiên cứu khác để đánh giá tiềm năng ứng dụng của chủng OHT2.

Bảng 3 Một số đặc điểm của các chủng phân lập có hoạt tính kháng khuẩn

Tên chủng	Hình thái khuẩn lạc	Mô tả khuẩn lạc	Nhuộm gram	Mô tả hình thái	Độ mặn tối đa (%)	Lên men lactose	Tán huyết
OHT2		Khuẩn lạc tròn nhẵn, màu trắng, kích thước (2-3) mm		Nấm men hình elip dài, nảy chồi ở 1 đầu	5,5	+	Tán huyết α
OTT1		Khuẩn lạc tròn nhẵn, màu trắng ngà, kích thước (2-3) mm		Trực khuẩn ngắn, gram dương, không sinh nội bào tử	5	+(yếm khí)	Tán huyết γ
OTT4		Khuẩn lạc tròn nhẵn, màu trắng ngà, kích thước (3-4) mm		Trực khuẩn ngắn, gram dương, không sinh nội bào tử	3,5	-	Tán huyết α
OXC2		Khuẩn lạc tròn nhẵn, màu trắng ngà, kích thước (2-3) mm		Trực khuẩn ngắn, gram dương, không sinh nội bào tử	> 6	-	Tán huyết α
OXC3		Khuẩn lạc tròn nhẵn, màu trắng ngà, kích thước (2-3) mm		Trực khuẩn ngắn, gram dương, không sinh nội bào tử	5,5	-	Tán huyết γ

Chú thích: + : dương tính; - : âm tính

3.4. Kết quả định danh vi khuẩn

Bốn chủng vi khuẩn OTT1, OTT4, OXC2 và OXC3 được nuôi tăng sinh qua đêm trong môi trường MRS, sau đó thu sinh khối và tiến hành tách chiết DNA tổng số. Kết quả định danh cho thấy 02 chủng OTT4 và OXC2 thuộc loài *Weissella cibaria*, còn 02 chủng OTT1 và OXC3 thuộc chi *Lactiplantibacillus*, với tên

loài lần lượt là *Lactiplantibacillus plantarum* và *Lactiplantibacillus pentosus*.

Bảng 1 Kết quả định danh dựa trên trình tự 16S rRNA

Tên chủng	Tên loài	Độ tương đồng trình tự DNA cao nhất (%)
OTT1	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	100
OTT4	<i>Weissella cibaria</i>	100

OXC2	<i>Weissella cibaria</i>	100
OXC3	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	93,79

4 Thảo luận

Kết quả nghiên cứu cho thấy các rau củ tươi như củ cải, cà rốt, bắp cải và ớt hiểm được thu nhận tại các chợ truyền thống tại Thành phố Hồ Chí Minh, là các nguồn phong phú của các chủng vi sinh vật. Nổi bật trong đó là nhiều chủng có tiềm năng kháng sinh ra các hợp chất kháng khuẩn, đây cũng là một trong những nghiên cứu đầu tiên về hoạt tính kháng khuẩn của các chủng vi sinh vật được phân lập từ nguồn rau củ tươi tại Việt Nam.

Trong số các chủng phân lập, chỉ có năm chủng (OHT2, OTT1, OTT4, OXC2 và OXC3) thể hiện hoạt tính kháng khuẩn nhất quán ở cả hai phương pháp: cấy chéo đối kháng và khuếch tán dịch nuôi cấy trên thạch. Các chủng còn lại hoạt tính kháng khuẩn của dịch nuôi cấy bị suy giảm hoặc mất hoàn toàn khả năng kháng khuẩn so với phương pháp cấy chéo đối kháng. Hiện tượng này cũng đã được đề cập trong các nghiên cứu của Lertcanawanichakul và cộng sự, cũng như Chau và cộng sự, với các nguyên nhân được lý giải bao gồm: sự khác biệt về điều kiện nuôi cấy (như pH, pha sinh trưởng và môi trường nuôi), thiếu tương tác cạnh tranh trực tiếp giữa vi khuẩn sản xuất và vi khuẩn đối kháng, hoặc do bản chất kém bền của các protein kháng khuẩn được tiết ra như bacteriocin [13], [14]. Đây là một vấn đề đáng lưu ý, cần phải tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy nhằm tăng hiệu quả sinh tổng hợp và duy trì hoạt tính kháng khuẩn, qua đó nâng cao tiềm năng ứng dụng của các chủng LAB trong công nghệ lên men, sản xuất hợp chất sinh học và chế phẩm probiotic.

Trong số năm chủng có hoạt tính tốt, phân tích sinh hoá và hình thái xác định OHT2 là nấm men, không thuộc nhóm LAB nên không tiếp tục trong nghiên cứu này. Tuy nhiên, với hoạt tính kháng khuẩn rõ rệt và ổn định, OHT2 có thể là đối tượng tiềm năng cho nghiên cứu về nấm men sinh chất kháng khuẩn trong tương lai. Hai chủng OTT4 và OXC2 được xác định là loài *Weissella cibaria* – loài LAB thường được tìm thấy trong kim chi và các loại rau củ lên men, được ghi nhận có khả năng tiết Weissellicin, một loại bacteriocin kháng khuẩn phổ rộng, có tiềm năng ứng dụng trong lên men thực phẩm

[15-17]. Mặc dù vậy, một số báo cáo lâm sàng đã ghi nhận *W. cibaria* có thể gây nhiễm trùng huyết, viêm nội tâm mạc nhiễm khuẩn, và áp xe khớp nhân tạo ở bệnh nhân có hệ miễn dịch suy giảm, đặc biệt là những người đang điều trị ung thư hoặc sau phẫu thuật [18]. Do vậy, mặc dù chủng OTT4 và OXC2 thể hiện hoạt tính tán huyết α , ít nguy hiểm hơn tán huyết β cần đánh giá độc tính và an toàn sinh học toàn diện trước khi đưa chúng vào ứng dụng.

Chủng *L. plantarum* OTT1 với đặc điểm chịu được nồng độ muối cao ($\geq 3,5\%$ NaCl), có khả năng lên men đường lactose và không gây tán huyết (tán huyết γ), bước đầu cho thấy chủng này có tiềm năng ứng dụng trong việc lên men các sản phẩm từ rau củ, từ sữa hoặc làm probiotic. Các nghiên cứu cũng cho thấy *L. plantarum* có khả năng tạo ra bacteriocin với tên gọi Plantaricin, có tiềm năng ứng dụng làm chất bảo quản sinh học trong thực phẩm. Với những đặc điểm trên, vi khuẩn *L. plantarum* đã được nghiên cứu và ứng dụng trong các chế phẩm probiotic, đặc biệt là probiotic cho người. Một số sản phẩm tiêu biểu có thể kể đến như Vitafor® probi-intestis® chứa chủng *L. plantarum* 299v, FloraFIT® được bổ sung chủng *L. plantarum* Lp-115, AB-LIFE có chứa các chủng *L. plantarum* CECT 7527, 7528, và 7529. Các chế phẩm trên đã được chứng minh có khả năng cải thiện chức năng ruột, cân bằng hệ vi sinh đường ruột và ức chế vi khuẩn có hại như *Clostridium difficile*, *E. coli* và *Salmonella* spp. [19]. Tuy nhiên, *L. plantarum* OTT1 là một chủng mới phân lập và đánh giá tiềm năng kháng khuẩn sơ bộ, chưa có thí nghiệm so sánh hoạt tính sinh học của chủng OTT1 với các chủng thương mại đã có. Do đó, dù có tiềm năng nhưng cần thực hiện thêm các thí nghiệm để so sánh hoạt tính và đánh giá độ an toàn của chủng OTT1 so với các sản phẩm thương mại khác trước khi kết luận khả năng ứng dụng thực tiễn.

Chủng *L. pentosus* OXC3 có quan hệ gần gũi với loài *L. plantarum* và có các đặc điểm tương tự với chủng *L. plantarum* OTT1 khả năng chịu muối cao và khả năng tán huyết γ . Tiềm năng của loài *L. pentosus* là khá lớn, nhưng chưa có nhiều nghiên cứu ứng dụng.

Tóm lại, cả bốn chủng LAB được phân lập đều có triển vọng ứng dụng trong sản phẩm lên men, probiotic hoặc

bảo quản sinh học. Nghiên cứu hiện tại mở ra một số hướng nghiên cứu tiếp theo gồm: (1) Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy để tăng sinh bacteriocin và đánh giá độ bền của chúng; (2) Khảo sát khả năng chịu acid, enzyme và bám dính thành ruột để đánh giá khả năng sống sót trong hệ tiêu hóa; (3) Kiểm tra độc tính và tương tác với hệ vi sinh đường ruột để đảm bảo tính an toàn sinh học cho các ứng dụng probiotic.

5 Kết luận

Trong nghiên cứu này, 04 chủng LAB có khả năng kháng khuẩn tốt đã được phân lập và xác định hoạt tính gồm OTT1, OTT4, OXC2 và OXC3. Các chủng này đều có đặc điểm điển hình của LAB: trực khuẩn Gram

dương, không sinh nội bào tử, chịu muối tốt và không gây tán huyết β , phù hợp cho việc ứng dụng lên men thực phẩm. Kết quả định danh phân tử đã xác định OTT1 là chủng thuộc loài *Lactiplantibacillus plantarum*, OXC3 là loài *Lactiplantibacillus pentosus*, OTT4 và OXC2 là *Weissella cibaria*. Cần có các nghiên cứu để đánh giá thêm về độ an toàn cũng như đánh giá khả năng lên men thực phẩm và tiềm năng ứng dụng làm probiotic của các chủng đã phân lập

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học Công nghệ Trường Đại học Nguyễn Tất Thành, mã đề tài số 2024.01.26/HĐ-KHCN.

Tài liệu tham khảo

1. Ayed, L., M'hir, S., Nuzzolese, D., Di Cagno, R., & Filannino, P. (2024). Harnessing the Health and Techno-Functional Potential of Lactic Acid Bacteria: A Comprehensive Review. *Foods*, 13(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/foods13101538>
2. Ibrahim, S. A., Ayivi, R. D., Zimmerman, T., Siddiqui, S. A., Altemimi, A. B., Fidan, H., Esatbeyoglu, T., & Bakhshayesh, R. V. (2021). Lactic Acid Bacteria as Antimicrobial Agents: Food Safety and Microbial Food Spoilage Prevention. *Foods*, 10(12), 3131. <https://doi.org/10.3390/foods10123131>
3. Jackson, C. R., Stone, B. W. G., & Tyler, H. L. (2015). Emerging Perspectives on the Natural Microbiome of Fresh Produce Vegetables. *Agriculture*, 5(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/agriculture5020170>
4. J Linares-Morales, J. R., Cuellar-Nevárez, G. E., Rivera-Chavira, B. E., Gutiérrez-Méndez, N., Pérez-Vega, S. B., & Nevárez-Moorillón, G. V. (2020). Selection of Lactic Acid Bacteria Isolated from Fresh Fruits and Vegetables Based on Their Antimicrobial and Enzymatic Activities. *Foods*, 9(10), 1399. <https://doi.org/10.3390/foods9101399>
5. Huỳnh Ngọc Tâm, Hà Thanh Toàn, Nguyễn Văn Mười, & Trần Thanh Trúc. (2016). Phân lập và tuyển chọn dòng vi khuẩn lactic có khả năng kháng khuẩn từ dưa lê non (*Cucumis melo* L.) muối chua. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, Số chuyên đề Nông nghiệp 2016. <https://doi.org/10.22144/ctu.jsi.2016.017>
6. Nguyễn Thị Phương, Võ Ngọc Chi, Nguyễn Thị Ánh Tuyết, Đinh Anh Khoa, Phan Bích Tuyền, Hoàng Diễm Hằng, & Lê Thị Thuỷ. (2021). Khảo sát khả năng sinh bacteriocin của vi khuẩn lactic phân lập trên nem chua Thủ Đức. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển*, 20(2), Article 2. <https://doi.org/10.52997/jad.8.02.2021>
7. Ngô Thị Phương Dung, Huỳnh Thị Yến Ly, & Huỳnh Xuân Phong. (2011). Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn lactic có khả năng sinh chất kháng khuẩn. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, 19a, 176-184.

8. Velho-Pereira, S., & Kamat, N. M. (2011). Antimicrobial Screening of Actinobacteria using a Modified Cross-Streak Method. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 73(2), 223-228. <https://doi.org/10.4103/0250-474x.91566>
9. Hu, C., Ren, L., Zhou, Y., & Ye, B. (2019). Characterization of antimicrobial activity of three *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Chinese traditional dairy food. *Food Science & Nutrition*, 7(6), 1997-2005. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1025>.
10. Clarke, P. H., & Cowan, S. T. (1952). Biochemical Methods for Bacteriology. *Journal of General Microbiology*, 6(1-2), 187-197. <https://doi.org/10.1099/00221287-6-1-2-187>
11. Hall, G. S. (2013). Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology, 13th Edn. *Laboratory Medicine*, 44(4), e138–e139. <https://doi.org/10.1309/LM5JC0PH0OGBSZZ>.
12. “Blood Agar, Hemolysis, and Hemolytic Reactions | Encyclopedia.com. Retrieved August 14, 2023, from <https://www.encyclopedia.com/science/encyclopedias-almanacs-transcripts-and-maps/blood-agar-hemolysis-and-hemolytic-reactions>
13. Chau, K. M., Van Quyen, D., Fraser, J. M., Smith, A. T., Van, T. T. H., & Moore, R. J. (2020). Broad spectrum antimicrobial activities from spore-forming bacteria isolated from the Vietnam Sea. *PeerJ*, 8, e10117. <https://doi.org/10.7717/peerj.10117>
14. Lertcanawanichakul, M., & Sawangnop, S. (2008). A Comparison of Two Methods Used for Measuring the Antagonistic Activity of *Bacillus* Species. *Walailak J Sci & Tech*, 5(2), 161-171.
15. Dương Thị Hồng Nga, Mai Thanh Hải, Lư Bảo Hân, Lý Thị Xuân Mai, & Bùi Thị Quỳnh Hoa. (2023). Phân lập, tuyển chọn dòng vi khuẩn lactic trong nem chua thịt có tiềm năng ứng dụng làm vi khuẩn giống trong sản xuất nem chua. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, 59(3), Article 3. <https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2023.136>
16. Kang, M.-S., Lee, D.-S., Kim, M., Lee, S.-A., & Nam, S.-H. (2021). A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial to Assess the Acidogenic Potential of Dental Biofilms through a Tablet Containing *Weissella cibaria* CMU. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/ijerph18094674>
17. Yasmin, I., Saeed, M., Khan, W. A., Khaliq, A., Chughtai, M. F. J., Iqbal, R., Tehseen, S., Naz, S., Liaqat, A., Mehmood, T., Ahsan, S., & Tanweer, S. (2020). In Vitro Probiotic Potential and Safety Evaluation (Hemolytic, Cytotoxic Activity) of *Bifidobacterium* Strains Isolated from Raw Camel Milk. *Microorganisms*, 8(3), 354. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030354>
18. Kamboj, K., Vasquez, A., & Balada-Llasat, J.-M. (2015). Identification and significance of *Weissella* species infections. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1204. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01204>
19. Seddik, H. A., Bendali, F., Gancel, F., Fliss, I., Spano, G., & Drider, D. (2017). *Lactobacillus plantarum* and Its Probiotic and Food Potentialities. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 9(2), 111-122. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9264-z>

Screening of Antibacterial Lactic Acid Bacteria Strains Isolated from Fresh Vegetables in Ho Chi Minh City

Nguyen Thanh Loan*, Ngo Nguyen Vu, Vu Minh Thiet

NTT Hi-tech Institute, Nguyen Tat Thanh University, Ho Chi Minh City, Viet Nam

loannt@ntt.edu.vn

Abstract Lactic acid bacteria (LAB) play a crucial role in food fermentation and have potential applications as probiotics due to their ability to produce natural antimicrobial compounds. In this study, 91 microbial strains were isolated from four Chinese cabbage, radish, carrot, and chili collected from different markets in Ho Chi Minh City. The results showed that 30 out of 91 strains exhibited antibacterial activity against at least one pathogenic bacterium, with nine strains displaying inhibitory activity against a broad spectrum of pathogens (e.g. *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, and *Salmonella enterica*). Five strains (OHT2, OTT1, OTT4, OXC2, and OXC3) retained antibacterial activity when cultured in liquid medium. Biochemical and morphological analyses revealed that OTT1, OTT4, OXC2, and OXC3 strains exhibited typical LAB characteristics: Gram-positive rod-shaped bacteria, non-spore-forming, salt-tolerant ($> 3\%$ NaCl), and non- β -hemolytic, whereas OHT2 strain was identified as a yeast strain. Results from 16S rRNA sequencing analysis confirmed that the strain OTT1 belonged to *Lactiplantibacillus plantarum*, OXC3 to *Lactiplantibacillus pentosus*, OTT4 and OXC2 to *Weissella cibaria*. The isolated LAB strains demonstrated potential applications in food fermentation, food preservation, and probiotics.

Keywords Lactic acid bacteria, antibacterial activity, fresh vegetables, fermented foods, probiotics.