



ĐỊNH DANH VÀ KHẢO SÁT MỘT SỐ TÍNH CHẤT CỦA CHỦNG *Lactobacillus farciminis* NM6 PHÂN LẬP TỪ NƯỚC MẮM

Đỗ Thị Bích Thủy*, Nguyễn Thị Diễm Hương

Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế, 102 Phùng Hưng, Huế, Việt Nam

Tóm tắt. Bên cạnh khả năng lên men đường thành sản phẩm chính là axit lactic được ứng dụng trong lên men thực phẩm, hệ vi khuẩn lactic còn có nhiều tính chất có lợi khác cần được khai thác như chức năng probiotic, khả năng chịu muối, khả năng gây hương trong lên men nước mắm... Trong công trình này, bằng phương pháp định danh MADLI-TOF MS, chủng NM6 phân lập từ nước mắm được xác định thuộc loài *Lactobacillus farciminis*. Chủng này sau đó được khảo sát một số tính chất có lợi. Kết quả khảo sát cho thấy rằng chủng NM6 có khả năng chịu muối NaCl ở các nồng độ 10%, 15%, 20% và 25%. Nghiên cứu về tiềm năng probiotic cho thấy *Lb. farciminis* NM6 là chủng có nhiều triển vọng. Khả năng chịu axit của chủng NM6 cao; số tế bào sống sót sau khi ủ với dịch pH 2 qua 3 giờ còn khá cao đạt 7,204 log CFU/mL. Chủng này cũng thể hiện khả năng tự kết dính và đồng kết dính với *Staphylococcus aureus* cao với tỷ lệ phần trăm kết dính đạt 75,02% và 48,36%; khả năng bám dính với dung môi ethyl acetate là 67,45%. Kết quả về khả năng kháng *E. coli* và *Salmonella* của chủng vi khuẩn lactic này cho thấy xuất hiện các vòng sáng vô khuẩn với đường kính khác nhau nằm trong khoảng 10-12 mm.

Từ khóa: chịu muối, định danh, nước mắm, probiotic, vi khuẩn lactic

1 Đặt vấn đề

Vi khuẩn lactic có vai trò quan trọng trong đời sống của con người. Vi khuẩn lactic thuộc họ *Lactobacteriaceae*, đây thường là những trực khuẩn ngắn, dài khác nhau hoặc cầu khuẩn, mặc dù không đồng nhất về mặt hình thái, nhưng về mặt sinh lý chúng lại tương đối đồng nhất. Tất cả đều là vi khuẩn gram dương, không sinh bào tử, bất động, catalase âm, oxydase và nitratoreductase âm. Bên cạnh khả năng lên men đường thành sản phẩm chính là axit lactic được ứng dụng trong lên men thực phẩm, hệ vi khuẩn lactic còn có nhiều tính chất có lợi cho sức khỏe, chức năng probiotic, nên hệ vi khuẩn này được nhiều nhà khoa học nghiên cứu. Khả năng sinh tổng hợp bacteriocin của vi khuẩn lactic làm cho chúng ức chế các vi khuẩn gây bệnh đường ruột [18]. Hệ vi khuẩn lactic có thể cạnh tranh không gian với vi khuẩn gây bệnh bằng cách cản chúng bám dính vào thành ruột nên vi khuẩn lactic có thể làm giảm nguy cơ tiêu chảy [10, 17]. Khả năng chịu axit và muối mật bò của vi khuẩn lactic cũng được nhiều công trình công bố [8, 13]. Các

* Liên hệ: dothibichthuy@huaf.edu.vn

ngiên cứu về probiotic trên vi khuẩn lactic ở Việt Nam tập trung khảo sát khả năng bám dính, khả năng sinh bacteriocin, khả năng chịu muối mật và axit [1, 3].

Một số tính chất có lợi khác của các chủng vi khuẩn lactic như khả năng chịu muối cũng được công bố trong sản phẩm nước mắm, các loại mắm... Các chủng vi khuẩn này có mặt trong nước mắm và các loại mắm ngoài tác dụng tốt cho sức khỏe, nó còn có khả năng tạo hương trong quá trình chuyển hóa lên men làm tăng chất lượng của sản phẩm [4, 19].

Với mục đích cung cấp một phần thông tin về sự đa dạng, tính chất của hệ vi khuẩn lactic có trong nước mắm (sản phẩm được thủy phân và lên men từ cá với nồng độ muối 15–20%); đồng thời làm tiền đề cho các nghiên cứu khai thác hệ vi khuẩn này để sản xuất chế phẩm vi sinh có khả năng hoàn thiện chất lượng của sản phẩm nước mắm. Trong công trình này, chúng tôi định danh chủng vi khuẩn lactic từ nước mắm và khảo sát một số tính chất của các chủng phân lập được như khả năng chịu muối và một số chức năng probiotic.

2 Vật liệu và phương pháp

Vật liệu

Chủng NM6 được phân lập từ nước mắm, được sản xuất theo phương pháp lên men truyền. Mẫu nước mắm được thu nhận tại xã Phú Thuận, huyện Phú Vang, tỉnh Thừa Thiên Huế.

Lấy mẫu và phân lập hệ vi khuẩn lactic trong nước mắm

Mẫu nước mắm được hòa loãng bằng nước muối sinh lý vô trùng, 50 μ L dịch hòa loãng được dàn trên môi trường MRS rắn ở các nồng độ từ 10^{-5} đến 10^{-7} , ủ ở 37 °C trong 24 giờ và 48 giờ. Cấy ria các khuẩn lạc đơn sang đĩa thạch nhiều lần để thu được dòng thuần. Để xác định sơ bộ chủng phân lập được là vi khuẩn lactic, chúng tôi tiến hành nhuộm gram và thử catalase. Những chủng có tế bào gram dương và catalase âm tính được dự đoán là vi khuẩn lactic.

Định danh bằng phương pháp MALDI-TOF MS [6]

Định danh vi khuẩn được thực hiện ở Phòng thí nghiệm vi sinh thuộc Bộ môn sinh lý, sinh hóa, vi sinh – Khoa Khoa học, Đại học Ghent, Bỉ.

Chuẩn bị mẫu: Tế bào vi khuẩn lactic được bảo quản trong môi MRS chứa 30% glycerol được cấy chuyển sang môi trường MRS agar và nuôi cấy yếm khí ở 37 °C cho đến khi thu được thể hệ thứ tư. Tế bào thể hệ thứ tư lần lượt được rửa trong 300 μ L milli-Q water và 900 μ L cồn tuyệt đối. Tế bào sạch thu nhận sau khi ly tâm dịch huyền phù ở 13.000 vòng/phút trong 3 phút tiếp tục được tái huyền phù trong 50 μ L formic acid 70% và 50 μ L acetonitrile. Dịch tái huyền phù sau đó được ly tâm ở 13.000 vòng/phút ở 4 °C trong 3 phút để thu dịch nổi chính là dịch chiết protein của tế bào dùng cho phân tích MALDI-TOF MS.

Cho 1 μL dịch chiết protein của tế bào vào các điểm trên đĩa MALDI (AB Sciex, Netherlands). Sau khi dịch chiết này được làm khô ở nhiệt độ phòng, tiếp tục cho 1 μL dung dịch gồm α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (α -CHCA) 0,5% trong dung dịch có tỷ lệ acetonitrile:nước:trifluoroacetic acid là 50:48:2 vào đĩa và chờ khô. Tất cả các dịch chiết protein của tế bào được thực hiện phân tích ít nhất 2 lần.

Phân tích MALDI-TOF MS

Quá trình phân tích protein tế bào được thực hiện trên hệ thống 4800 Plus MALDI TOF/TOF™ Analyzer (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) dựa trên khả năng tích điện dương của protein. Kết quả của quá trình phân tích là các khối phổ protein từ 2.000 đến 20.000 Da.

Phân tích dữ liệu MALDI-TOF MS

Các file dữ liệu từ hệ thống 4800 Plus MALDI TOF/TOF™ Analyzer được phân tích trên phần mềm Data Explorer (Applied Biosystem) để chuyển thành file văn bản. Các file văn bản sau đó được đưa vào hệ thống Bionumerics để phân tích tiếp theo.

Khảo sát khả năng chịu muối

Khả năng chịu muối của chủng vi khuẩn lactic được đánh giá qua giá trị $\text{OD}_{600\text{nm}}$ sau khi nuôi chúng trong môi trường MRS lỏng chứa các nồng độ muối tương ứng là 10%, 15%, 20%, 25% qua các mốc thời gian là 2 ngày, 4 ngày, 6 ngày theo phương pháp của Kobayashi [9]. Phân tích kết quả dựa trên sự so sánh giá trị $\text{OD}_{600\text{nm}}$ ở các mốc thời gian sau so với mốc thời gian trước để đưa ra kết luận khả năng tồn tại và phát triển của chủng ở các nồng độ muối khác nhau.

Khảo sát khả năng chịu axit

Khả năng chịu axit của chủng khảo sát được đánh giá qua lượng vi khuẩn sống sót sau khi ủ ở pH 2 trong 3 giờ. Số tế bào vi khuẩn sống sót được xác định theo phương pháp đếm khuẩn lạc trên đĩa thạch [11].

Khảo sát khả năng bám dính

Khảo sát khả năng tự kết dính [10]

Sinh khối tế bào của vi khuẩn thu được sau khi nuôi cấy được rửa 2 lần bằng đệm PBS (8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na_2HPO_4 ; 0,24 g KH_2PO_4 ; nước cất đủ 1 lít); pH 7,2 vô trùng; sau đó được tái huyền phù trong đệm PBS ($\text{OD}_{600\text{nm}}=1$) (OD ban đầu). Để yên huyền phù này ở 37 °C trong 5 giờ để tạo điều kiện cho các vi khuẩn lactic tự kết dính và lắng xuống và đo OD dịch trên bề mặt. Khả năng tự kết dính là phần trăm độ giảm $\text{OD}_{600\text{nm}}$ dịch bề mặt của mẫu đã để yên 5 giờ so với ban đầu.

Khảo sát khả năng đồng kết dính với *Staphylococcus aureus* [20]

Sau khi rửa 2 lần bằng đệm PBS, sinh khối tế bào của chủng NM6 và *Staphylococcus aureus* được tái huyền phù đến OD_{600nm} = 1. Đồng thời trộn lẫn hai huyền phù này với nhau với thể tích bằng nhau. Tiến hành đo OD_{600nm} dung dịch trên bề mặt sau khi để yên huyền phù của mỗi chủng và hỗn hợp huyền phù của hai chủng ở 37 °C trong 5 giờ. Khả năng đồng kết dính được tính theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ đồng kết dính (\%)} = \frac{\frac{A_X + A_Y}{2} - A_{(X+Y)}}{\frac{A_X + A_Y}{2}} \times 100$$

trong đó A_X là OD_{600nm} sau 5 giờ của vi khuẩn lactic; A_Y là OD_{600nm} sau 5 giờ của *Staphylococcus aureus*; và A_{X+Y} là OD_{600nm} sau 5 giờ của vi khuẩn lactic và *Staphylococcus aureus*.

Khảo sát khả năng kết dính với dung môi [10]

Rửa sinh khối tế bào chủng NM6 bằng dung dịch KNO₃ 0,1 M, pH 6,2 và tái huyền phù vào dung dịch này đến OD_{600nm} = 1. Cho 1 mL dung môi ethyl acetate vào ống nghiệm chứa 3 mL huyền phù tế bào, trộn đều mẫu bằng máy vortex trong 2 phút, sau đó để yên 20 phút ở nhiệt độ phòng, tách pha nước và đo độ hấp thụ quang. Khả năng kết dính với dung môi được đánh giá là phần trăm độ giảm OD_{600nm} của pha nước thu được trong các ống nghiệm có dung môi sau 20 phút để yên so với ban đầu (OD_{600nm} = 1).

Khảo sát khả năng kháng khuẩn

Sử dụng phương pháp khuếch tán giếng thạch để khảo sát khả năng kháng khuẩn của vi khuẩn lactic theo mô tả của Mishra và Prasad [15]. Theo đó, dịch nổi thu được bằng cách ly tâm (14.000 vòng/phút, 10 phút ở 4 °C) canh trường đã nuôi cấy ở 37 °C trong 24 giờ, được cho vào các giếng thạch đã tạo trên môi trường MRS agar chứa chủng kiểm định (*E. coli*, *Salmonella*). Đĩa thạch sau đó được ủ ở 37 °C trong 48 giờ. Sau thời gian ủ, ghi nhận sự tạo thành vòng vô khuẩn xuất hiện xung quanh giếng thạch.

Xử lý số liệu

Sử dụng phần mềm SPSS 18.0 và Excel 2007 để xử lý số liệu.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Phân lập chủng NM6

Kết quả phân lập được chủng vi khuẩn lactic NM6 từ nước mắm. Chủng vi khuẩn có hình thái khuẩn lạc nhỏ, dạng hình tròn, màu trắng và quan sát hình thái tế bào cho thấy tế bào của nó có hình que, gram (+) (hình 1). Có kết quả âm tính với khả năng sinh catalase.



Hình 1. Hình thái khuẩn lạc và hình thái tế bào của chủng vi khuẩn NM6 phân lập được



Hình 2. Phổ MALDI-TOF MS của chủng vi khuẩn lactic NM6

3.2 Định danh chủng vi khuẩn lactic

Chủng NM6 được định danh bằng phương pháp MALDI-TOF MS (Hình 2). Kết quả được tra cứu trên ngân hàng phổ thông qua phần mềm BioNumerics 5.1 và dựa vào sự tương đồng của khối phổ để định danh đến cấp độ loài. Kết quả phân tích khối phổ cho thấy rằng chủng vi khuẩn lactic NM6 sau khi định danh bằng phương pháp MALDI-TOF MS có các đỉnh trong khối phổ tương đồng với khối phổ của chủng *Lactobacillus farciminis* với độ tương đồng đạt đến 99%. Vì vậy đã xác định được chủng NM6 thuộc loài *L. farciminis*.

Kết quả định danh trên cho thấy trong sản phẩm nước mắm sản xuất theo phương pháp lên men truyền thống ở Huế tồn tại chủng vi khuẩn lactic, *L. farciminis* NM6. Với mục đích khai thác hệ vi khuẩn lactic có trong nước mắm để nghiên cứu sản xuất chế phẩm vi sinh ứng dụng trong hoàn thiện sản phẩm này, khả năng chịu muối và một số tính chất có tiềm năng probiotic (khả năng chịu axit, khả năng kết dính, khả năng kháng khuẩn...) của chủng *L. farciminis* NM6 được tiếp tục nghiên cứu.

3.3 Khả năng chịu muối của chủng *L. farciminis* NM6 ở các nồng độ khác nhau

Khả năng chịu muối của chủng *L. farciminis* NM6 tại các nồng độ 10–25% qua các mốc thời gian là 0 ngày, 2 ngày, 4 ngày, 6 ngày được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ muối đến khả năng phát triển của chủng *L. farciminis* NM6 qua các mốc thời gian

STT	Nồng độ (%)	OD _{600nm}			
		0 ngày	2 ngày	4 ngày	6 ngày
1	10	0,965 ^{aA}	0,789 ^{aB}	0,544 ^{abD}	0,612 ^{aC}
2	15	0,939 ^{aA}	0,478 ^{bC}	0,602 ^{aB}	0,310 ^{bcD}
3	20	0,824 ^{abA}	0,244 ^{cC}	0,145 ^{cD}	0,348 ^{bb}
4	25	0,817 ^{abA}	0,157 ^{dC}	0,132 ^{cdD}	0,241 ^{dB}

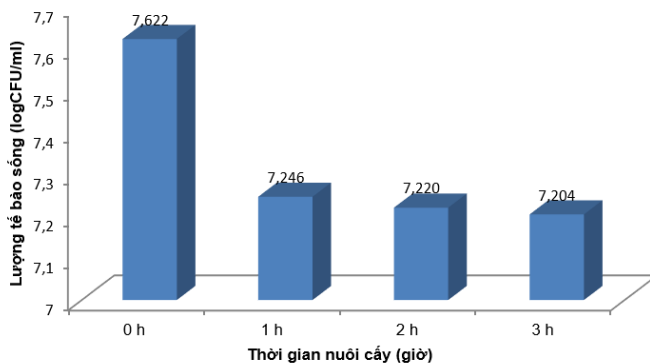
Ghi chú: Số liệu xử lý Duncan's theo dòng (chữ cái in hoa) thể hiện sự sai khác theo thời gian của từng nồng độ muối, và theo cột (chữ cái in thường) thể hiện sự sai khác giữa các nồng độ trong cùng mốc thời gian. Các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác về ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Qua Bảng 1 nhận thấy chủng *L. farciminis* NM6 có khả năng thích nghi và phát triển ở nồng độ muối là 10–25%. Trong đó, chủng *L. farciminis* NM6 có khả năng thích nghi và phát triển mạnh nhất ở nồng độ muối 10% với giá trị OD đạt 0,612 ở 6 ngày. Ở môi trường có nồng độ muối 25%, chủng vi khuẩn lactic này thể hiện khả năng thích nghi và phát triển kém; sau 6 ngày nuôi cấy, giá trị OD chỉ đạt 0,241. Ở mốc 0 ngày, không có sự sai khác về giá trị OD giữa các nồng độ. Tuy nhiên, sau 2 ngày, 4 ngày và 6 ngày nuôi cấy đã có sự sai khác rõ rệt về giá trị OD của chủng vi khuẩn lactic tại các nồng độ khác nhau. Sau 2 ngày nuôi cấy giá trị OD giảm đi rõ rệt so với 0 ngày. Nguyên nhân là do các chủng chưa thích nghi với môi trường nuôi cấy, nhưng đến 4 ngày và 6 ngày các chủng bắt đầu thích nghi và phát triển do đó giá trị OD tăng ở 2 mốc thời gian này. So sánh giá trị OD của 2 mốc thời gian 4 ngày và 6 ngày có thể thấy ở ngày thứ 4 giá trị OD cao hơn và cao nhất trong các mốc thời gian khảo sát; đến ngày thứ 6 các giá trị OD bắt đầu giảm dần.

Đối với khả năng chịu muối, ở nồng độ muối càng cao thì khả năng sống sót của các tế bào vi khuẩn lactic càng giảm đi. Điều này hoàn toàn phù hợp với nghiên cứu của Udomsil và đồng tác giả đã công bố *Tetragelococcus halophilus* có khả năng chịu muối tại nồng độ 25%; tác giả đã tiến hành khảo sát khả năng chịu muối của *Tetragenococcus halophilus* tại nồng độ 25% trong các mẫu nước mắm và cho thấy chúng vẫn sống sót trong nước mắm sau bảy tháng [19]. Juste và cs. đã công bố *Tetragenococcus halophilus* có khả năng phát triển tại nồng độ muối 25% và 28,5% ở pH 7 [7]. Chủng *L. farciminis* NM6 vẫn có khả năng chịu muối đến nồng độ 25%, nhưng nồng độ 10% là điều kiện thích hợp và phát triển tốt của chủng vi khuẩn lactic này. Như vậy, khả năng chịu muối của chủng *L. farciminis* NM6 là cao. Chính vì vậy, chủng *L. farciminis* NM6 phân lập từ nước mắm có tiềm năng ứng dụng lớn trong việc sản xuất các sản phẩm lên men với nồng độ muối cao như nước mắm và các sản phẩm mắm cá.

3.4 Khả năng chịu axit

Khả năng chịu axit của chủng *L. farciminis* NM6 được khảo sát bằng cách xác định số tế bào sống qua các mốc thời gian liên tục từ 0 đến 3 giờ trong môi trường pH 2 (Hình 3). Kết quả sau 1 giờ, 2 giờ và 3 giờ ở pH 2 lượng tế bào sống vẫn còn tương ứng là 7,246 logCFU/mL; 7,220 logCFU/mL và 7,204 logCFU/mL. Qua kết quả trên có thể thấy chủng *L. farciminis* NM6 có khả năng chịu axit rất cao.



Hình 3. Khả năng sống sót của chủng *L. farciminis* NM6 khảo sát trong điều kiện pH 2

Kết quả nghiên cứu về khả năng chịu axit phù hợp với nghiên cứu của Maragkoudakis và cs. khảo sát khả năng chịu axit của một số chủng *Lactobacillus* cho thấy các chủng có khả năng chịu axit mạnh nhất là *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* ACA-DC 130, *Lb. plantarum* ACA-DC 146, *Lb. rhamnosus* ACA-DC 112, với mức giảm log CFU/mL từ 8,6 xuống còn lần lượt là 6,8; 5,7 và 7,1 sau 3 giờ ủ ở pH 2; ngoài ra, một số chủng trong nghiên cứu của nhóm tác giả này không có khả năng sống sót ở pH 2 sau 1 giờ [13]. Kết quả nghiên cứu của Kim và cs. cho thấy khi xử lý bằng dịch dạ dày pH = 2,5, có 3/7 chủng vi khuẩn có khả năng chịu môi trường axit. Tỷ lệ sống của các chủng này giảm từ khoảng 8,519–8,477 (logCFU/mL) xuống còn 6,431–7,380 (logCFU/mL) sau 30 phút xử lý và tiếp tục giảm còn 5,568–5,699 (logCFU/mL) sau 2 giờ [8]. Chủng *L. farciminis* NM6 phân lập từ nước mắm có khả năng chịu axit tốt đáp ứng được tiêu chí chịu axit của các chủng probiotic.

3.5 Khả năng bám dính

Chúng tôi đã tiến hành khảo sát khả năng bám dính của chủng *L. farciminis* NM6 bằng cách khảo sát khả năng tự kết dính, khả năng đồng kết dính với *Staphylococcus aureus* và khả năng bám dính vào dung môi ethyl acetate.

Kết quả ở Bảng 2 cho thấy khả năng bám dính của chủng *L. farciminis* NM6 ở các điều kiện khác nhau là hoàn toàn khác nhau. Trong đó, khả năng tự kết dính của chủng *L. farciminis* NM6 cao với tỷ lệ phần trăm kết dính đạt 75,02%. Chủng này cũng thể hiện khả năng đồng kết dính với *Staphylococcus aureus* nhưng với tỷ lệ thấp hơn với giá trị đạt được là 48,36%, khả năng bám dính với dung môi ethyl acetate là 67,45%.

Bảng 2. Khả năng bám dính của chủng *L. farciminis* NM6

Tiêu chí đánh giá	Khả năng bám dính (%)
Khả năng tự kết dính	75,02
Khả năng đồng kết dính với <i>Staphylococcus aureus</i>	48,36
Khả năng bám dính với dung môi ethyl acetate	67,45

Khả năng tự kết dính giúp cho vi khuẩn lactic kết dính lại với nhau để hình thành một quần thể lớn, giúp tăng cường được sức sống và sự phát triển của chúng theo kiểu mối quan hệ hỗ trợ cùng loài. Khả năng tự kết dính còn liên quan đến khả năng bám dính đường ruột và còn làm tăng khả năng lưu lại trong đường tiêu hóa của chúng vi sinh vật. Maria khi nghiên cứu khả năng tự kết dính của *Lactobacillus* và *Bifidobacterium* đã nhận thấy có sự biến động lớn trong khả năng tự kết dính của các chủng; năm chủng được khảo sát trong thí nghiệm có kết quả tự kết dính là 5,5%, 15%, 23%, 75% và 77% ở nhiệt độ phòng [14]. Một kết quả nghiên cứu khác của chúng tôi đã đưa ra tỷ lệ kết dính của chủng *Lactobacillus fermentum* DC1 sau 5 giờ là 24,49% [2]. Qua đó có thể nhận thấy khả năng tự kết dính của chủng *L. farciminis* NM6 phân lập từ nước mắm cao hơn so với kết quả công bố của các nhà khoa học trên.

Khả năng đồng kết dính của vi khuẩn lactic với vi sinh vật gây bệnh làm tăng khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn gây bệnh, góp phần cân bằng hệ vi sinh đường ruột. Collado và cs. đã khảo sát khả năng đồng kết dính của các chủng vi khuẩn lactic và cho thấy sau 4 giờ, tỷ lệ đồng kết dính trong khoảng 6% đến 27% [5]. Kos và cs. đã nghiên cứu khả năng đồng kết dính của *Lb. acidophilus* M92 (chủng này đang được sử dụng sản xuất chế phẩm probiotic) với *Enterococcus faecium* L3, *Escherichia coli* 3014, *Salmonella* công bố kết quả từ 15,11% đến 19,46% [10]. Các kết quả này cho thấy rằng khả năng đồng kết dính với vi khuẩn gây bệnh của chủng *L. farciminis* NM6 (48,36%) khá cao nên có thể làm điều kiện sử dụng trong probiotic.

Khả năng bám dính dung môi được xem là một phương pháp gián tiếp để nghiên cứu chọn lọc dòng tế bào có khả năng bám dính đường ruột cao. Khả năng bám dính vào ethyl acetate (dung môi có tính base) phản ánh tính phân cực và tính acid của bề mặt tế bào vi khuẩn lactic. Theo Maria [14], khả năng bám dính ethyl acetate của một số chủng *L. johnsonii*, *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. casei* nằm trong khoảng 0 ÷ 79,2%. Các kết quả đã công bố cho thấy chủng *L. farciminis* NM6 có khả năng bám dính dung môi ethyl acetate rất cao (67,45%). Điều này cho thấy tiềm năng probiotic của chủng này khá lớn.

3.6. Khả năng kháng khuẩn

Kết quả kiểm tra tính kháng khuẩn của chủng *L. farciminis* NM6 thể hiện hoạt tính bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch cho thấy xuất hiện các vòng sáng vô khuẩn với đường kính khác nhau (Bảng 3).

Bảng 3. Khả năng kháng *E. coli* và *Salmonella* của chủng *L. farciminis* NM6

STT	Chủng chi thị	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)
1	<i>E. coli</i>	12 ± 1,25
2	<i>Salmonella</i>	12 ± 2,16

Qua Bảng 3 có thể thấy chủng *L. farciminis* NM6 có khả năng kháng khuẩn với hai chủng chỉ thị là *E. coli* và *Salmonella*. Trong đó đường kính vòng kháng với *E. coli* là $12 \pm 1,25$ mm, đối với *Salmonella* có vòng kháng $12 \pm 2,16$ mm.

Kết quả nghiên cứu về khả năng kháng khuẩn phù hợp với nghiên cứu của nhiều tác giả. Wakil và cs. đã khảo sát khả năng kháng *E. coli* và *Salmonella* của các chủng thuộc *Lactobacillus* và cho thấy *L. brevis* kháng *E. coli* với đường kính vòng kháng khuẩn là $10 \pm 0,1$ mm, kháng *Salmonella spp.* là $5 \pm 0,1$ mm, *L. plantarum* kháng *Salmonella* với kích thước vòng kháng khuẩn là $10 \pm 0,1$ mm [21]. Nwafor đã khảo sát khả năng kháng *E. coli* và *Salmonella typhi* của các loài vi khuẩn lactic *L. acidophilus*, *L. lactic*, *L. bugaricus*, *L. casei*, *Leuconotoc sp*, *S. thermophiles*, *S. cremoris*, *S. pyogenes*. Đường kính vòng kháng khuẩn kháng *E. coli* dao động từ $3 \pm 0,05$ mm đến $6 \pm 0,25$ mm, đường kính vòng kháng khuẩn kháng *Salmonella typhi* dao động từ $4 \pm 0,2$ mm đến $10 \pm 0,02$ mm [16]. Qua kết quả nghiên cứu có thể thấy chủng *L. farciminis* NM6 có khả năng kháng khuẩn tốt với hai chủng *E. coli* và *Salmonella*.

4 Kết luận

Từ các mẫu nước mắm đã phân lập được chủng vi khuẩn lactic NM6. Theo kết quả định danh bằng phương pháp MADLI-TOF MS, chủng này thuộc loài *Lactobacillus farciminis*. Chủng *L. farciminis* NM6 có khả năng chịu muối NaCl đến nồng độ 25%. Trong đó, nồng độ muối NaCl 10% là điều kiện thích hợp để các chủng sinh trưởng và phát triển tốt. Khả năng tự kết dính và đồng kết dính với *Staphylococcus aureus* của chủng *L. farciminis* NM6 là cao với tỷ lệ phần trăm kết dính đạt 75,02% và 48,36%; khả năng bám dính với dung môi ethyl acetate là 67,45%. Chủng này có số tế bào sau khi ủ với dịch pH 2 qua 3 giờ còn khá cao đạt 7,204 log CFU/mL. *L. farciminis* NM6 có khả năng ức chế sự phát triển của *Salmonella* và *E. coli*.

Tài liệu tham khảo

1. Nguyễn Thị Hoài Hà, Phạm Văn Ty, Nguyễn Thị Kim Quy (2002), Nghiên cứu khả năng sinh tổng hợp bacterioxin của loài *Lactobacillus plantarum* L24, *Tạp chí Di truyền học và ứng dụng, Chuyên san Công nghệ sinh học*, Hà Nội, 47–52.
2. Đỗ Thị Bích Thủy, Nguyễn Thị Diễm Hương (2012), Xác định và khảo sát một số tính chất có lợi của chủng *Lactobacillus fermentum* DC1 phân lập từ sản phẩm dưa cải Huế, *Tạp chí khoa học, Đại học Huế*, 71(2), 175–185.
3. Nguyễn Vũ Tường Vy, Nguyễn Văn Thanh, Trần Thu Hoa (2007), Khảo sát khả năng chịu đựng acid, muối mật và kháng sinh của một số vi sinh vật là nguyên liệu sản xuất probiotic dùng đường uống, *Tạp chí Dược học*, 378, 255–263.
4. Chaiyanani S., Maugel T., Huq A., Robbi F. T. and Colwell R. R. (1999), Polyphasic Taxonomy of a Novel *Halobacillus*, *Halobacillus thailandensis* sp. nov. isolated from Fish Sauce, *Systematic and Applied Microbiology*, 22, 360–365.

5. Collado M. C., Meriluoto J., Salminen S. (2007), Development of new probiotics by strain combinations: Is it possible to improve the adhesion to Intestinal Mucus?, *Journal of Dairy Science*, 90, 2710–2716.
6. Doan N. T. L., Hoorde V. K., Cnockaert M., De Brandt E., Aerts M., Le T. B. and Vandamme P. (2012), Validation of MALDI-TOF MS for rapid classification and identification of lactic acid bacteria, with a focus on isolates from traditional fermented foods in Northern Vietnam, *Letters in Applied Microbiology*, 55, 265–273.
7. Juste A., Lievens B., Frans I., Marsh T. L., Klinge berg M., Michiels C. W., Willems K. A. (2008), Genetic and physiological diversity of *Tetragenococcus halophilus* strains isolated from sugar anhydrous salt rich environment, *Microbiology*, 154, 2600–2610.
8. Kim P. I., Jung M. Y., Chang Y. H., Kim S., Kim S. J., Park Y. H. (2007), Probiotic properties of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains isolated from porcine gastrointestinal tract, *Applied Microbiology Biotechnology*, 74, 1103–1111.
9. Kobayashi, Kajiwara, Wahyuni M., Hamada-Sato N., Imada C., Watanabe E. (2004), Effect of culture conditions on lactic acid production of *Tetragenococcus* species, *Journal Appl Microbiol.* 96(6), 1215–21.
10. Kos B., Suskovic M. J., Vukovic S., Simpraga M., Frece1 J. (2003), Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92, *Journal of Applied Microbiology*, 94, 981–987.
11. Lee J., Yun H.S., Cho K.W., Oh S., Kim S.H., Chun T., Kim B., Whang K.Y. (2011), “Evaluation of probiotic characteristic so newly isolated *Lactobacillus* spp.: Immunomodulation and longevity”, *International Journal of Food Microbiology* 148, 80–86.
12. Lee Y. K., Salminen S. (2009), *Handbook of probiotics and prebiotics*, 2nd edition, John Wiley & Sons Inc, Canada.
13. Maragkoudakis P. A., Zoumpopoulou G., Miarisa C., Kalantzopoulou G., Potb B., Tsakalidou E. (2006), Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products, *International Dairy Journal*, 16, 189–199.
14. Maria V. P., (2006), Molecular and physiological studies on the functionality of probiotic lactobacilli, *Doctor thesis on Biochemistry, Karlsruhe University, Argentina*.
15. Mishra V., Prasad D. N. (2005), Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics, *International Journal Food Microbiol*, 103, 109–115.
16. Nwafor O. E. (2014), Isolation and identification of lactic acid bacterial (LAB) from yoghurt and antibacterial activity against some clinical isolates, *International Journal of Food Nutrition and Safety*, 5(1), 31–38.
17. Rahman M., Kim W. S., Kumura H., Shimazaki K. (2008), Autoaggregation and surface hydrophobicity of *Bifidobacteria*, *World Journal of Microbiology Biotechnology*, 24, 1593–1598.
18. Rhys J. J., Hassan M. H., Monique Z., Gale B., John R. T. (2008), Isolation of lactic acid bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organisms associated with fresh meat, *Food Microbiology*, 25, 228–234.
19. Udomsil N., Rodtong S., Tanasupawat S., Yongsawatdigul J. (2010), Proteinase producing halophilic lactic acid bacteria isolated from fish sauce fermentation and their ability to produce volatile compounds, *International Journal of Food Microbiology*, 141, 186–194.
20. Vlková E., Rada V., Smehilová M., Killer J. (2008), Auto-aggregation and co-aggregation ability in bifidobacteria and clostridia, *Folia Microbiol (Praha)*, 53(3), 263–269.
21. Wakil S. M., Osamwonyi U. O. (2012), Isolation and screening of antimicrobial producing lactic acid bacteria from fermenting millet gruel, *International Research Journal of Microbiology*, 3(2), 072–079.

IDENTIFICATION AND SOME BENEFIT PROPERTIES OF *Lactobacillus farciminis* NM6 ISOLATED FROM FISH SAUCE

Do Thi Bich Thuy*, Nguyen Thị Diem Huong

Hue University of Agriculture and Forestry, 102 Phung Hung St., Hue, Vietnam

Abstract. Lactic acid bacteria (LAB) have not only the capacity of transferring sugar to lactic acid but also benefit characteristics such as probiotic properties, halophilic ability, flavour creation in fish sauce fermentation. In this work, a LAB strain was isolated from fish sauce and identified using MADLI-TOF MS. This strain was closest to *Lactobacillus farciminis* and named as *Lb. farciminis* NM6. Several benefit characteristics of this strain were also investigated. *Lb. farciminis* NM6 could grow in the medium containing NaCl with concentrations ranging from 10% to 25%. The potential probiotic function showed that this strain was promising. *Lb. farciminis* NM6 resisted low pH: the survival cells of this strain remained relatively high after 3 hours of incubation at pH 2 at $7.204 \log$ CFU/mL. The autoaggregation ability was 75.02%, and the coaggregation with *Staphylococcus aureus* was 48.36%. The ability of adhesion to ethyl acetate was 67.45%. The clear zone with a diameter of 10–12 mm appeared in the inhibition test against *Escherichia coli* and *Salmonella*.

Keywords: identification, fish sauce, halophilic, lactic acid bacteria, probiotic