



Bài báo nghiên cứu

TUYỂN CHỌN VÀ XÂY DỰNG BỘ SƯU TẬP VI KHUẨN FRUCTOPHILIC LACTIC ACID (FLAB) TỪ HỆ TIÊU HÓA ONG MẬT

Cao Thanh Nhẹ*, Phạm Thị Mai Hương, Nguyễn Thúy Hương

Trường Đại học Bách khoa, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

*Tác giả liên hệ: Cao Thanh Nhẹ – Email: 1770179@hcmut.edu.vn

Ngày nhận bài: 10-9-2020; ngày nhận bài sửa: 02-11-2020; ngày duyệt đăng: 30-12-2020

TÓM TẮT

Nghiên cứu này bao gồm: phân lập, định danh và tuyển chọn vi khuẩn FLAB từ hệ tiêu hóa ong mật với khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh thối ấu trùng ở ong mật, định hướng sử dụng probiotic cho ong, định hướng cho giải pháp thay thế hoặc phối hợp với việc sử dụng kháng sinh trong điều trị bệnh ở ong hiện nay. Kết quả tuyển chọn được 4 chủng vi khuẩn FLAB có khả năng kháng cao với vi khuẩn gây bệnh thối ấu trùng trên ong mật gồm *Melissococcus pluton*, *Paenibacillus larvae* và *Paenibacillus alvei* với đường kính vòng kháng khuẩn từ $8,67 \pm 0,58$ mm đến $15,33 \pm 0,58$ mm, có khả năng bám dính khá cao và tồn tại được trong điều kiện pH thấp của hệ tiêu hóa ong mật. Bên cạnh đó, các vi khuẩn đều không nhạy cảm với 2 loại kháng sinh thường sử dụng trong điều trị bệnh ở ong là streptomycin và kanamycin để có thể phối hợp sử dụng trong giới hạn cho phép, mà không làm ảnh hưởng đến hệ vi sinh vật có lợi. Các vi khuẩn được khảo sát có khả năng tồn tại ở nhiệt độ đến 60°C trong định hướng cho việc tạo chế phẩm bằng phương pháp sấy phun. Kết quả định danh theo trình tự 16s rRNA xác định cả 4 chủng đều là *Lactobacillus kunkeei* với độ tương đồng là 99,24%-99,44%. Nổi bật là chủng *L. kunkeei* M8, chủng FLAB bản địa với các hoạt tính probiotic cao để có thể phát triển tạo chế phẩm probiotic cho ong mật.

Từ khóa: bệnh thối ấu trùng ở ong; vi khuẩn Fructophilic lactic acid; vi khuẩn Lactic acid; *Lactobacillus kunkeei*

1. Giới thiệu

Vi khuẩn Fructophilic lactic acid (FLAB) được xem là nhóm vi khuẩn lactic acid (LAB) “không thông thường” do việc ưu tiên sử dụng fructose thay vì glucose làm nguồn carbon chính. Chúng thường được tìm thấy ở các môi trường giàu fructose như hoa quả, trái cây lên men, ruột các loại côn trùng giàu fructose như ong mật, ruồi nhiệt đới (*Camponotus japonicas*). Cho đến nay, nhiều nghiên cứu đã phát hiện ra nhiều vi khuẩn FLAB thuộc hai chủng: *Fructobacillus* (*F. fructosus*, *F. durionis*, *F. ficulneus*) và *Lactobacillus* (*L. kunkeei*, *L. apinorum*, *L. florum*) (Endo & Dicks, 2014).

Cite this article as: Cao Thanh Nhe, Phạm Thị Mai Hương, & Nguyễn Thúy Hương (2020). Creating a collection of Fructophilic lactic acid bacteria (FLAB) from the gastrointestinal tracts of honeybees. *Ho Chi Minh City University of Education Journal of Science*, 17(12), 2793-2305.

Nhóm nghiên cứu của Endo và cộng sự (2009-2014) đã báo cáo vi khuẩn FLAB tiêu biểu trong hệ tiêu hóa ong mật là các chủng vi khuẩn thuộc *L. kunkeei* và *Fructobacillus* và có tác động tích cực đến ong mật (Endo & Dicks, 2014; Endo, 2018). Do tập tính tìm kiếm thức ăn, hệ vi sinh vật có lợi có thể tồn tại trong bầy ong thông qua nguồn thức ăn (Vásquez & Olofsson, 2009). Nhiều nghiên cứu về khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh thối ấu trùng của vi sinh vật phân lập từ hệ tiêu hóa ong mật với kết quả nổi bật là *L. kunkeei* thể hiện tính ức chế cao đối với *Melissococcus pluton*, *Paenibacillus larvae* và *Ascophaera apis* (Ugras, 2017; Arrendondo, 2018; Iorizzo, 2020). Các nghiên cứu *in vivo* cũng được tiến hành và thu được các kết quả tích cực như bổ sung lactic acid và acetic acid vào chế độ ăn của đàn ong giúp tăng sản lượng mật (Pătruică, 2012), hay tỉ lệ tử vong của ấu trùng nhiễm *P. larvae* giảm tới 56,67% khi bổ sung *L. kunkeei* vào chế độ ăn của ong (Arrendondo, 2018; Al-Ghamdi, 2018). Khi bổ sung các vi khuẩn *Lactobacillus* vào thức ăn cho ong, sự có mặt của các vi khuẩn có lợi tăng, hoạt động phân giải protein của ấu trùng tăng, mầm bệnh xâm nhập vào cơ thể ong giảm (Daisley, 2020).

Do đó, nghiên cứu khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh của FLAB là một giải pháp điều trị các bệnh thối ấu trùng ở ong mật, thay thế việc sử dụng kháng sinh, giúp hạn chế dư lượng kháng sinh trong các sản phẩm từ ong mật và hiện tượng kháng kháng sinh những năm gần đây. Trên thế giới, việc nghiên cứu và bổ sung probiotic trong ngành nuôi ong đã được thực hiện trên nhiều nước. Tuy nhiên, hướng nghiên cứu này chưa được nghiên cứu tại Việt Nam và chưa có chế phẩm probiotic cho ong trên thị trường. Vì vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân lập các chủng vi khuẩn FLAB từ hệ tiêu hóa ong mật và khảo sát khả năng kháng khuẩn gây bệnh thối ấu trùng ở ong cùng một số hoạt tính probiotic khác. Kết quả mong muốn là tuyển chọn được vi khuẩn FLAB có tiềm năng để làm tiền đề phát triển tạo chế phẩm probiotic cho các nghiên cứu sau này.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu và hóa chất

6 mẫu ong mật được thu thập tại trại ong Long Kiều (Di Linh, Lâm Đồng).

Các chủng vi sinh vật gây bệnh thối ấu trùng ở ong mật gồm *Melissococcus pluton*, *Paenibacillus larvae* và *Paenibacillus alvei* được cung cấp từ Bộ môn bệnh học, Trại ong mật trong Khu Thực nghiệm Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh.

Hóa chất: bộ hóa chất nhuộm Gram, đĩa kháng sinh streptomycin 10 µg/mL và kanamycin 30 µg/mL (cung cấp bởi Công ty TNHH Nam Khoa), đệm Phosphate-Buffered Saline (PBS).

Môi trường de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) phân lập, nhân giống, nuôi cấy và giữ giống vi khuẩn; môi trường Fructose-Yeast-Peptone (FYP) lỏng sàng lọc chủng vi khuẩn FLAB; môi trường Glucose-Yeast-Peptone (GYP) lỏng nhằm sàng lọc chủng vi khuẩn FLAB có ưu thế; môi trường Nutrient Agar (NA) và Nutrient Broth (NB) để tăng sinh vi khuẩn gây bệnh thối ấu trùng ở ong và khảo sát hoạt tính kháng khuẩn.

2.2. Phân lập và sàng lọc vi khuẩn FLAB từ hệ tiêu hóa ong mật

• **Phân lập:** Ong mật được ngâm trong cồn 96° trong 2 phút để loại bỏ các vi khuẩn bên ngoài, sau đó rửa lại 3 lần với nước cất vô trùng. Tiến hành giải phẫu trong điều kiện vô trùng, dùng kéo và kẹp tách hệ tiêu hóa ong mật. Mẫu thu được chuyển vào ống vô trùng chứa 10 mL MRS lỏng được bổ sung 2% fructose. Đồng nhất mẫu trong 1-2 phút và thu dịch huyền phù. Pha loãng dịch huyền phù với nước muối sinh lý 0,9%. Hút 200 μ L dịch huyền phù với các nồng độ khác nhau được cấy trang lên các đĩa Petri chứa môi trường thạch MRS, ủ ở 37°C, 48 giờ. Quan sát và chọn các khuẩn lạc dựa vào màu sắc, kích thước và hình dạng, chuyển vào đĩa thạch MRS mới và ủ ở điều kiện đã nêu trên, quá trình cấy được lặp lại nhiều lần cho đến khi độ thuần vi khuẩn được xác định (Salman, 2018).

• **Sàng lọc FLAB trên môi trường đặc hiệu:** Nhằm sàng lọc các ứng viên FLAB, các vi khuẩn phân lập được tăng sinh trong 5 mL FYP lỏng, ủ ở 37°C, sau 24 giờ đo OD_{610nm} để kiểm tra khả năng sinh trưởng. Các chủng vi khuẩn phát triển tốt trong môi trường FYP tiếp tục được tăng sinh trong cả hai môi trường FYP lỏng và GYP lỏng và so sánh khả năng sinh trưởng bằng phương pháp đo OD_{610nm} sau 18, 24, 30 giờ.

Kiểm tra hình thái khuẩn lạc đặc trưng, kích thước, màu sắc và quan sát vi thể dưới kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 40x và 100x. Kiểm tra sinh hóa vi khuẩn FLAB bằng các thí nghiệm sinh hóa: nhuộm Gram và thử nghiệm Catalase (Kandler, 1986).

2.3. Sàng lọc và tuyển chọn các chủng vi khuẩn FLAB có khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh cho ong mật

Các ứng viên FLAB được tăng sinh trong môi trường FYP lỏng ở 30°C trong 24 giờ. Các chủng vi khuẩn gây bệnh cho ong mật gồm *M. pluton*, *P. larvae* và *P. alvei*, được nuôi cấy trong 5 mL môi trường NB ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ. Sau đó hút 200 μ L dịch khuẩn chỉ thị được cấy trang lên các đĩa Petri chứa môi trường NA, với mật độ 10⁸ CFU/mL, ổn định trong 30 phút và đục 5 giếng, giếng đối chứng âm chỉ chứa môi trường FYP, đường kính giếng 5 mm. Hút 100 μ L dịch vi khuẩn FLAB được cho vào các giếng, ủ ở điều kiện vi hiếu khí, nhiệt độ 37°C trong 24-48 giờ. Sau thời gian ủ, đo đường kính vòng kháng khuẩn (ĐKVKK) được tính theo công thức (1):

$$H = D - d \quad (1)$$

Với H là đường kính vòng kháng khuẩn (mm), D là đường kính vòng vô khuẩn (mm), d là đường kính giếng (mm).

Hoạt được tính theo phương pháp Moore và cộng sự (2013) (Moore, 2013). Thí nghiệm được lặp lại ba lần.

2.4. Khảo sát các hoạt tính probiotic khác

2.4.1. Khảo sát khả năng chịu pH thấp

Các chủng vi khuẩn tuyển chọn được tăng sinh trong môi trường MRS lỏng ở 37°C trong 48 giờ. Thu lấy sinh khối vi khuẩn bằng cách li tâm 4000 vòng/phút trong 10 phút.

Rửa sinh khối thu được với 1,5 mL nước cất vô trùng và chuyển dịch huyền phù vi khuẩn vào ống nghiệm chứa môi trường MRS đã chỉnh pH 3 và pH 4. Khả năng chịu pH thấp được khảo sát bằng cách xác định mật độ tế bào ở 0 và 3 giờ ở điều kiện pH khảo sát, kiểm tra mật độ tế bào bằng phương pháp định lượng gián tiếp (Hoben, 1982).

2.4.2. Khảo sát khả năng tự bám dính

Thí nghiệm được tiến hành theo phương pháp của Kos và cộng sự (2003). Vi khuẩn được tăng sinh trong 30 mL môi trường MRS lỏng, li tâm 4000 vòng/phút trong 15 phút và thu sinh khối. Sinh khối tế bào vi khuẩn được rửa 2 lần bằng đệm PBS pH 7,2 vô trùng, sau đó được tái huyền phù trong 4 mL đệm PBS ($OD_{600nm}=1$) (OD ban đầu). Để yên huyền phù ở 37°C trong 5 giờ. Đo OD dịch trên bề mặt. Các tế bào vi khuẩn tự kết dính lại với nhau sẽ tạo nên những hạt có kích thước lớn hơn và lắng xuống trong dung dịch. Do đó theo thời gian mật độ tế bào ở bề mặt dịch vi khuẩn sẽ giảm đi. Mức giảm của OD phản ánh tỉ lệ vi khuẩn đã kết dính. Khả năng tự kết dính là phần trăm độ giảm OD_{600nm} dịch bề mặt của mẫu đã để yên 5 giờ so với ban đầu được tính bằng công thức (2):

$$\left(1 - \frac{A_t}{A_o}\right) \times 100 \quad (2)$$

Với A_o là OD_{600nm} tại thời điểm 0 giờ; A_t là OD_{600nm} tại thời điểm 1 đến 5 giờ (Kos, 2003).

2.4.3. Khảo sát độ nhạy cảm kháng sinh

Độ nhạy cảm kháng sinh của chủng vi khuẩn tuyển chọn được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán đĩa có hiệu chỉnh (Salman, 2018). Tiến hành trải 200 μ L dịch vi khuẩn đã tăng sinh trong môi trường MRS lỏng (ủ ở 37°C trong 24 giờ) lên đĩa Petri. Kháng sinh sử dụng gồm: Streptomycin nồng độ 10 μ g/mL và kanamycin 30 μ g/mL. Đĩa kháng sinh, đường kính đĩa 5mm, được đặt lên mặt thạch và ủ ở 37°C trong 24 giờ. Sau thời gian ủ, đo kích thước vòng vô khuẩn và so sánh với các giá trị tiêu chuẩn về mức độ nhạy cảm với kháng sinh.

Tính nhạy cảm với kháng sinh được đánh giá theo hướng dẫn của CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014). ĐKVKK (mm) tương ứng sẽ được xác định là: kháng: R (Resistant) ≤ 14 mm, nhạy cảm vừa: $14 \text{ mm} < S+ \text{ (Susceptible)} \leq 19$ mm, nhạy cảm mạnh: $S++ \geq 20$ mm (Sharma, 2015).

2.4.4. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ

Chủng vi khuẩn khảo sát được nuôi trên môi trường MRS lỏng ở 37°C trong 24 giờ. 100 μ L dịch tăng sinh được cấp vào ống nghiệm chứa 5 mL môi trường MRS lỏng. Ủ các ống nghiệm lần lượt ở nhiệt độ 40°C, 45°C, 50°C, 55°C và 60°C. Sau 24 giờ nuôi cấy, đo mật độ quang học của dịch nuôi vi khuẩn ở OD_{610nm} để kiểm tra khả năng chịu nhiệt của chủng vi khuẩn khảo sát.

- **Định danh vi khuẩn**

Chọn các vi khuẩn có các hoạt tính probiotic cao định danh bằng phương pháp giải trình tự gen 16sRNA tại Công ty Nam Khoa.

- **Xử lý thống kê**

Độ lặp lại của các thí nghiệm thử hoạt tính được xử lý bằng phần mềm Excel và SPSS version 22.0.

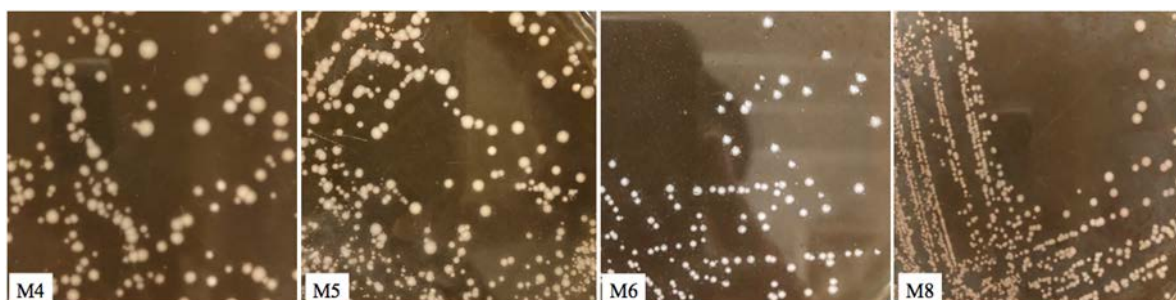
3. Kết quả và thảo luận

3.1. Phân lập và sàng lọc vi khuẩn FLAB từ hệ tiêu hóa ong mật

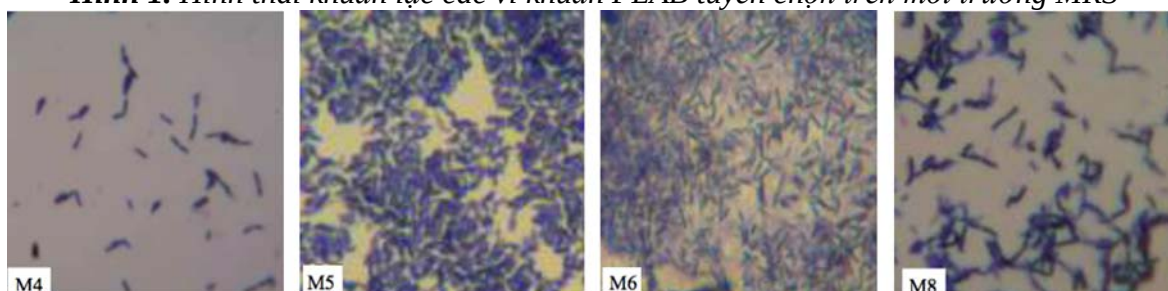
Từ 6 mẫu ong mật ban đầu, sau quá trình phân lập trên môi trường MRS và sàng lọc trên môi trường FYP thu được 9 chủng FLAB được kí hiệu từ M1 đến M9. Tiếp tục sàng lọc chọn chủng FLAB ưu thế trên 2 môi trường đặc hiệu FYP và GYP, kết quả thu được 4 chủng M4, M5, M6 và M8 với các đặc điểm hình thái được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1. Đặc điểm hình thái các vi khuẩn FLAB phân lập từ hệ tiêu hóa ong mật

STT	Kí hiệu	Hình thái khuẩn lạc				Hình dạng tế bào
		Hình dạng	Màu sắc	Kích thước (mm)	Bề mặt	
1	M4	Tròn	Trắng đục	1-2	Phẳng, không nhân	Que ngắn, đơn hoặc đôi
2	M5	Tròn	Trắng đục	0,5-1,5	Phẳng, không nhân	Que ngắn, chùm
3	M6	Tròn	Trắng sữa	1-3	Bóng, lồi, không nhân	Que dài, đơn
4	M8	Tròn	Trắng đục	0,5-1,5	Bóng, lồi, không nhân	Que dài, đơn, đôi, chuỗi dài



Hình 1. Hình thái khuẩn lạc các vi khuẩn FLAB tuyển chọn trên môi trường MRS



Hình 2. Hình ảnh vi thể các vi khuẩn FLAB tuyển chọn

3.2. Sàng lọc và tuyển chọn các chủng vi khuẩn FLAB có khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh cho ong mật

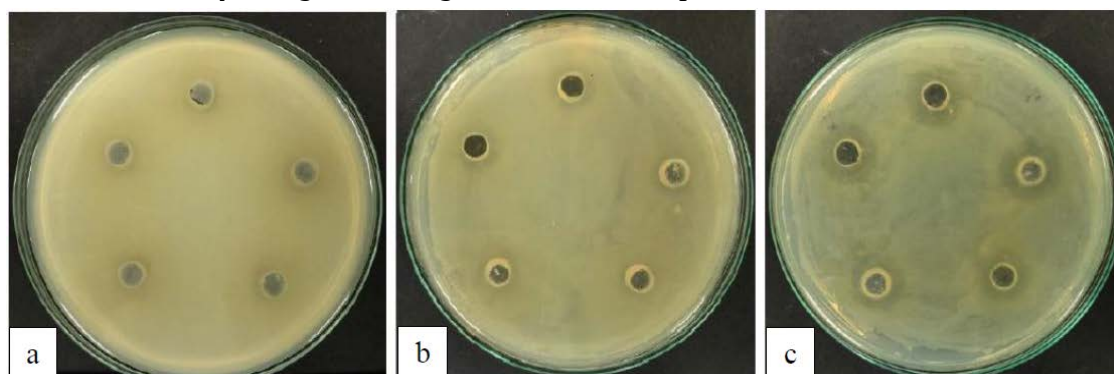
Tiến hành kiểm tra khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh thối ấu trùng của 4 chủng FLAB là M4, M5, M6 và M8. Sau 24 giờ ủ, kết quả thu được 4 chủng vi khuẩn FLAB đều có khả năng kháng cả 3 chủng gây bệnh thối ấu trùng ở ong. Trong đó, các chủng M4, M5 và M8 có hoạt tính kháng khuẩn mạnh ($9 \text{ mm} \leq \text{ĐKVKK} \leq 20 \text{ mm}$) với cả 3 chủng vi khuẩn gây bệnh (Bảng 2).

Kết quả của đề tài tương tự kết quả của Forsgren (2010) chứng minh rằng nhóm vi khuẩn LAB, gồm cả vi khuẩn *L. kunkeei* phân lập từ hệ tiêu hóa ong mật có khả năng kháng khuẩn mạnh với *P. larvae* (Forsgren, 2010). Nghiên cứu của D. Arredondo (2017), 57/65 chủng phân lập có khả năng kháng với *P. larvae*, trong đó có 7 chủng FLAB với *L. kunkeei* có ĐKVKK từ 8 ± 1 đến $20 \pm 8 \text{ mm}$ (Arredondo, 2018). Thí nghiệm của Ugras (2017), phân lập được chủng *L. kunkeei* HD1 có khả năng kháng mạnh với *M. pluton* với ĐKVKK 17 mm (Ugras, 2017). Các chủng đề tài đã phân lập được có khả năng kháng mạnh như các chủng của các nghiên cứu phân lập được trước đó.

Bảng 2. Đường kính vùng kháng khuẩn của các vi khuẩn phân lập đối kháng với vi khuẩn gây bệnh thối ấu trùng ở ong mật

STT	Chủng vi khuẩn	Đường kính vùng kháng khuẩn H=D-d (mm)		
		<i>M. pluton</i>	<i>P. larvae</i>	<i>P. alvei</i>
1	M4	$14,33 \pm 0,58$	$9,33 \pm 0,58$	$9,33 \pm 0,58$
2	M5	$14,33 \pm 0,58$	$9,67 \pm 0,58$	$9,33 \pm 0,58$
3	M6	$14,00 \pm 1,00$	$8,67 \pm 0,58$	$9,00 \pm 1,00$
4	M8	$15,33 \pm 0,58$	$9,33 \pm 0,58$	$10,00 \pm 1,00$

Ghi chú: Kết quả là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại



Hình 3. Kết quả đối kháng của chủng M8 với *M. pluton* (Hình a), *P. larvae* (Hình b) và *P. alvei* (Hình c)

3.3. Khảo sát các hoạt tính probiotic khác

Khả năng tồn tại và bám dính vào biểu mô của FLAB trong hệ tiêu hóa ong mật là điều kiện quan trọng để các chủng tăng sinh trong đường tiêu hóa, chống lại sự loại bỏ ngay lập tức do tác động của nhu động ruột và cạnh tranh về vị trí bám, nguồn thức ăn trong hệ vi

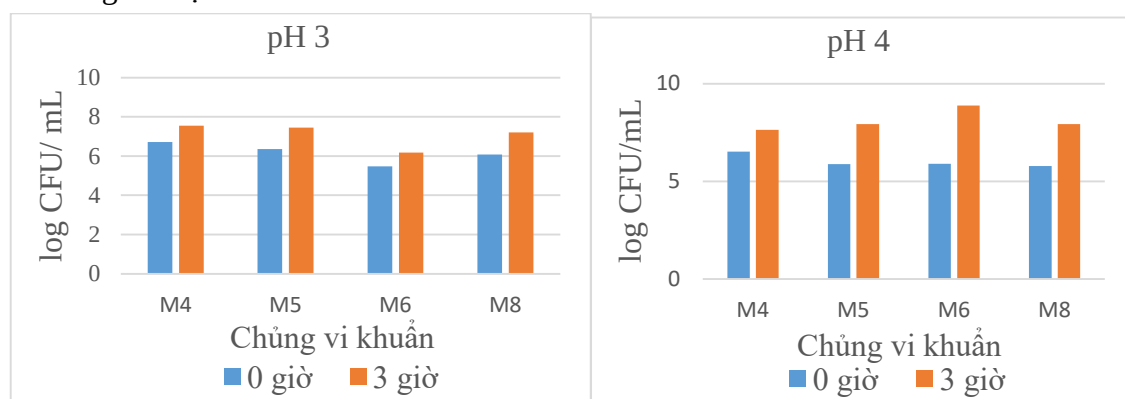
sinh đường ruột với các vi sinh vật có hại, kích thích hệ miễn dịch và kháng khuẩn chống lại vi khuẩn gây bệnh (Kos, 2003).

3.3.1. Khảo sát khả năng chịu pH thấp

Cả 4 chủng FLAB M4, M5, M6, M8 được theo dõi khả năng chịu pH từ 0 giờ đến 3 giờ. Kết quả được trình bày ở Hình 4 cho thấy các chủng này có khả năng tồn tại và sinh trưởng trong môi trường pH 3 và 4. Đặc biệt, chủng M5 và M8 có khả năng sinh trưởng tốt ở pH 3 (tăng lần lượt là 1,09 và 1,13 log CFU/mL sau 3 giờ khảo sát) trong khi ở pH 4, chủng M6 và M8 có sự sinh trưởng đáng kể hơn (tăng lần lượt là 2,98 và 2,17 logCFU/mL sau 3 giờ khảo sát) các chủng còn lại.

Các chủng vi khuẩn phân lập từ hệ tiêu hóa ong mật có khả năng tồn tại và sinh trưởng ở điều kiện pH 3 và 4, kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Serp Ugras (2017), chủng *L. kunkeei* HD1 phân lập từ hệ tiêu hóa ong mật có khả năng phát triển tốt trong môi trường pH 3 (Ugras, 2017), hay nghiên cứu của D. Arredondo (2017), tất cả các chủng phân lập từ hệ tiêu hóa ong mật đều cho thấy khả năng tồn tại ở pH 5 và 7, nhưng chỉ 27/65 chủng tồn tại trong môi trường pH 3 với khả năng mật độ tế bào còn lại sau 4 giờ ủ từ 23-100% so với mật độ ban đầu (Arredondo, 2018).

Kết quả khảo sát cho thấy cả 4 chủng đều có xu hướng phát triển trong môi trường pH thấp của điều ong mật. Đặc biệt là chủng M5, M8 có khả năng tồn tại và phát triển tốt hơn các chủng còn lại.



Hình 4. Đồ thị biểu diễn sự thay đổi mật độ vi khuẩn ở điều kiện pH 3 và pH 4

3.3.2. Khảo sát khả năng tự bám dính

Khả năng tự bám dính là tiêu chí để đánh giá tiềm năng probiotic do liên quan đến khả năng bám dính vào biểu mô của hệ tiêu hóa, thể hiện khả năng sống sót, hoạt động ổn định, khả năng cạnh tranh và khả năng đối kháng với vi sinh vật khác trong đường ruột. Các vi khuẩn cùng dòng có thể liên kết được với nhau, giúp tăng cường sức sống và sự phát triển theo kiểu mối quan hệ hỗ trợ cùng loài tạo hàng rào sinh học bảo vệ hệ tiêu hóa (Kos, 2003). Các nghiên cứu đi trước đã báo cáo về các protein, glycoprotein, trichoic và lipoteichoic acid trên bề mặt tế bào các vi khuẩn *Lactobacillus* có vai trò quan trọng trong bản chất kỵ nước bề mặt và khả năng tự bám dính của chủng vi khuẩn (Tou, 2013). Kết quả cho thấy khả

năng tự kết dính của 4 chủng khảo sát khá cao. Đặc biệt là chủng M8 và M4 đạt lần lượt là 48,99% và 59,71% (Bảng 3).

Kết quả này tương tự với kết quả của một số nghiên cứu về khả năng tự bám dính của các chủng *Lactobacillus* đã được công bố như *Lactobacillus acidophilus* M92 lên đến 70% ở nhiệt độ phòng theo nghiên cứu của Kos và cộng sự (năm 2003) (Kos, 2003). Khả năng tự bám dính của 20 chủng vi khuẩn thuộc cái loài *L. plantarum*, *L. casei*, *L. rhamnosus* trong nghiên cứu của Yanfeng Tou (năm 2013) đạt từ 24,16-41,39% sau 5 giờ ủ ở 37°C (Tou, 2013).

Bảng 3. Khả năng bám dính của các vi khuẩn tuyển chọn

STT	Chủng vi khuẩn	Khả năng bám dính (%)
1	M4	59,71
2	M5	29,05
3	M6	35,63
4	M8	48,99

Từ các công bố tương tự về vi khuẩn *Lactobacillus*, kết quả khả năng tự bám dính của các chủng vi khuẩn khảo sát trong đề tài này tương đối cao và đặc biệt là 2 chủng M4 và M8.

3.3.3. Khảo sát độ nhạy cảm kháng sinh

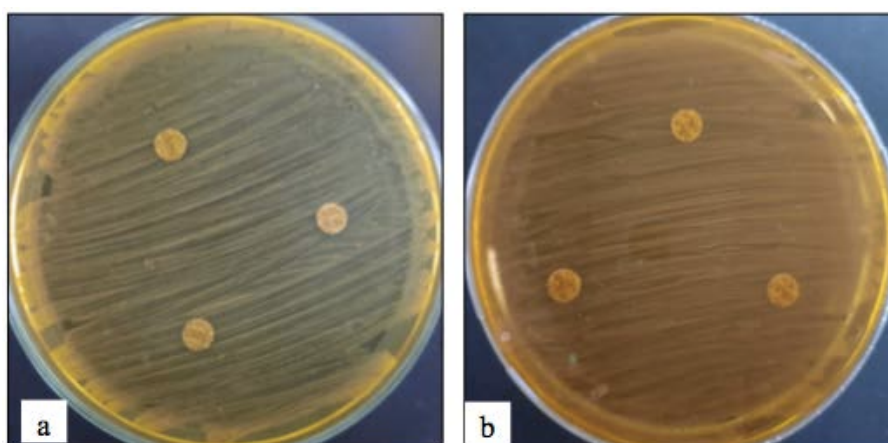
Nhiều vi khuẩn *Lactobacillus* có khả năng kháng kháng sinh với cơ chế kháng nội tại như các kiểu hình phổ biến kháng trimethoprim, vancomycin và kanamycin. Cơ chế nội tại hữu ích để phục hồi hệ vi sinh vật đường ruột sau khi điều trị bằng kháng sinh. Tuy nhiên, cơ chế kháng nội tại thường không phổ biến, trong khi đề kháng do thu nhận các yếu tố di truyền di động phổ biến hơn. Khi kháng kháng sinh do gene kháng nằm trên các yếu tố di truyền di động (như plasmid hoặc transposon) thì đặc tính này mang nguy hiểm do nó có thể truyền cho các chủng vi khuẩn gây bệnh. Các nghiên cứu đi trước đã khẳng định khả năng và bản chất kháng kháng sinh của các chủng vi khuẩn probiotic là rất khác nhau, ngay cả trong cùng một loài và cần có các nghiên cứu để đảm bảo các chủng kháng kháng sinh là an toàn khi sử dụng (Jaimee, 2015).

Cả 4 chủng vi khuẩn M4, M5, M6, M8 đều không nhạy cảm với 2 loại kháng sinh sử dụng phổ biến trong điều trị bệnh ở ong mật. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của G. Jaimee và cộng sự (2015) về việc các loài *Lactobacillus* có bản chất đề kháng với aminoglycoside (gentamycin, kanamycin, streptomycin và neomycin) do chất vận chuyển bị suy giảm hoặc bất hoạt bởi 3 loại enzyme biến đổi aminoglycoside (AMEs) gồm N-acetyltransferases (AACs), O-phosphotransferases (APHs), và O-nucleotidyltransferases (ANTs) làm cho kháng sinh không gắn được vào tiểu phân 30S của ribosome (Jaimee, 2015).

Bảng 4. Kết quả độ nhạy cảm kháng sinh của các chủng vi khuẩn tuyển chọn

STT	Chủng vi khuẩn	Streptomycin (10 µg/mL)	Kanamycin (30 µg/mL)
1	M4	R	R
2	M5	R	R
3	M6	R	R
4	M8	R	R

Ghi chú: R: kháng; S: nhạy cảm

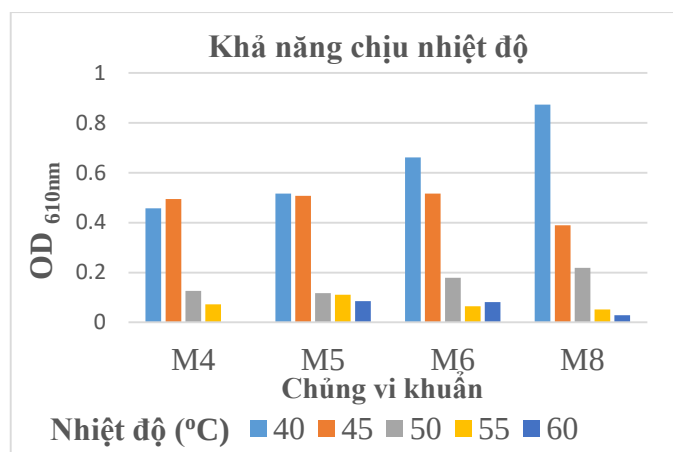


Hình 5. Thí nghiệm kháng kháng sinh của chủng M4 với 2 loại kháng sinh streptomycin (Hình a) và kanamycin (Hình b)

Như vậy, trong quá trình điều trị bệnh cho ong mật, giải pháp trước mắt có thể đặt ra là phối hợp sử dụng các chủng vi khuẩn này và các chất kháng sinh với liều lượng và tiêu chuẩn cho phép, do các kháng sinh này không có khả năng tiêu diệt và làm mất đi hoạt tính của các chủng vi sinh vật hữu ích đã tuyển chọn bên trong cơ thể ong mật.

3.3.4. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ

Với định hướng làm tiền đề tạo chế phẩm bằng quá trình sấy phun, vi khuẩn probiotic sử dụng phải chịu được nhiệt độ của quá trình sản xuất. Thông thường, nhiệt độ đầu ra của quá trình sấy phun các vi khuẩn *Lactobacillus* ở các nghiên cứu đã công bố từ 45°C trở lên (Huang, 2017). Đề tài tiến hành khảo sát sự phát triển của các vi khuẩn tuyển chọn ở các nhiệt độ khác nhau từ 40°C đến 60°C.



Hình 6. Đồ thị biểu diễn giá trị OD_{610nm} các chủng vi khuẩn tăng sinh ở các nhiệt độ khảo sát (môi trường MRS lỏng, sau 24 giờ)

Mật độ tế bào của các chủng khảo sát có xu hướng giảm khi nhiệt độ tăng dần. Các chủng vi khuẩn đều phát triển ở nhiệt độ 40°C và 45°C, ở các nhiệt độ cao hơn, mật độ vi khuẩn bắt đầu giảm. Các chủng M5, M6 và M8 có thể phát triển trong khoảng nhiệt độ từ 40°C đến 60°C. Trong khi chủng M4 không có dấu hiệu phát triển khi ủ ở nhiệt độ 60°C. Kết quả thu được ở đề tài phù hợp với các công bố về khả năng chịu nhiệt độ của các loài FLAB. Ở các loài FLAB, khoảng nhiệt độ trung bình từ 20-40°C, tối đa là 50°C, một số ít có thể phát triển ở 55°C (Endo & Dicks, 2014).

Như vậy, các chủng M5, M6, M8 có khả năng chịu nhiệt độ đến 60°C trong định hướng tạo chế phẩm probiotic bằng phương pháp sấy phun.

3.3.5. Định danh vi khuẩn

Từ kết quả của các thí nghiệm trên, 4 chủng M4, M5, M6 và M8 mang nhiều tiềm năng để tạo chế phẩm probiotic điều trị bệnh thối ấu trùng cho ong thay thế và phối hợp sử dụng kháng sinh. Vì vậy, đề tài tiến hành định danh 4 chủng vi khuẩn này bằng kỹ thuật giải trình tự 16S rRNA.

Kết quả giải trình tự gene 16S rRNA của 4 chủng tuyển chọn được giải trình tự trực tiếp và so sánh trình tự với ngân hàng dữ liệu NCBI. Kết quả cho thấy 4 chủng M4, M5, M6 và M8 có độ tương đồng khác nhau lần lượt là 99,24%, 99,43%, 99,44% và 99,43% với chủng *Lactobacillus kunkeei*. Vì các chủng được phân lập từ các mẫu ong khác nhau và độ tương đồng về trình tự 16S rRNA cũng có sự khác nhau nên có thể nói *L. kunkeei* là chủng lợi khuẩn chiếm ưu thế trong hệ tiêu hóa ong mật.

Kết quả này tương đồng với các nghiên cứu đi trước về chủng vi khuẩn chiếm ưu thế trong hệ vi sinh đường ruột và mang các đặc tính để trở thành probiotic tiềm năng cho ong mật như nghiên cứu của Endo và cộng sự (2009-2014) với kết quả trong hệ tiêu hóa của ong mật đa số là các dòng vi khuẩn thuộc chủng *Lactobacillus kunkeei* và các chủng *Fructobacillus* (Endo & Dicks, 2014); nghiên cứu của D. Arredondo và cộng sự (2017) cũng tiến hành phân lập vi khuẩn từ hệ tiêu hóa ong mật trên môi trường MRS, các phân tích hóa

lí và định danh, thu được cả 4 đều thuộc chủng *L. kunkeei*, với các đặc tính probiotic bổ sung nhau, với các hoạt tính probiotic cao (Arrendondo, 2018).

Bảng 5 Kết quả định danh các chủng vi khuẩn tuyển chọn bằng kỹ thuật giải trình tự 16S rRNA

STT	Chủng vi khuẩn	Mức tương đồng với <i>Lactobacillus kunkeei</i> (%)
1	M4	99,24
2	M5	99,43
3	M6	99,44
4	M8	99,43

Như vậy, đề tài đã tuyển chọn được 4 chủng FLAB *L. kunkeei* mang các hoạt tính probiotic tiềm năng tạo chế phẩm probiotic cho ong mật và từ kết quả của thí nghiệm kiểm tra hoạt tính probiotic cho thấy chủng *L. kunkeei* M8 là chủng có ưu thế hơn các chủng còn lại.

4. Kết luận và kiến nghị

Nghiên cứu này tuyển chọn được 4 chủng thuộc loài *L. kunkeei*, góp phần xây dựng bộ sưu tập FLAB, đây là chủng vi khuẩn ưu thế trong hệ vi sinh vật đường ruột của ong mật. Với các đặc điểm probiotic ưu thế và khả năng kháng mạnh vi khuẩn gây bệnh thối ấu trùng trên ong của bộ chủng, đặc biệt là chủng *L. kunkeei* M8, làm định hướng cho các nghiên cứu mở rộng *in vivo* làm tiền đề tạo chế phẩm điều trị các bệnh thối ấu trùng ở ong mật, hướng tới thay thế và phối hợp sử dụng kháng sinh trong tương lai.

Nghiên cứu kiến nghị thực hiện kiểm tra gene kháng kháng sinh của chủng *L. kunkeei* M8 nhằm đảm bảo tính an toàn của chủng giống trước khi sử dụng tạo chế phẩm probiotic cho ong mật.

❖ **Tuyên bố về quyền lợi:** Các tác giả xác nhận hoàn toàn không có xung đột về quyền lợi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Al-Ghamdi, A. (2018). Effect of gut bacterial isolates from *Apis mellifera jemenitica* on *Paenibacillus* larvae infected bee larvae. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(2), 383-387.
- Arrendondo, D. (2018). *Lactobacillus kunkeei* strains decreased the infection by honey bee pathogens *Paenibacillus* larvae and *Nosema ceranae*. *Beneficial Microbes*, 9(2), 279-290 .
- Daisley, A. B. (2020). Novel probiotic approach to counter *Paenibacillus* larvae infection in honey. *The ISME Journal*, 14, 476-491.
- Endo, A. (2018). Fructophilic Lactic Acid Bacteria, a Unique Group of Fructose-Fermenting Microbes . *Appl Environ Microbiol*, 84(19), e01290-18.

- Endo, A., & Dicks, L. M. (2014). The genus *Fructobacillus*. In W. H. Holzapfel, & B. J. Wood (Eds.), *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy* (pp. 381-398). Turku, Finland: John Wiley & Sons.
- Forsgren, E. (2010). European foulbrood in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, S5-S9.
- Hoben, H. J. (1982). Comparison of the pour, spread and drop plate methods for enumeration of *Rhizobium* spp. in inoculants made from presterilized peat. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(5), 246-247.
- Huang (2017). Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria: A review. *Trends in Food Science & Technology*.
- Iorizzo, M., Lombardi, S. J., Ganassi, S., Testa, B., Ianiro, M., Letizia, F., ... & Sorrentino, E. (2020). Antagonistic Activity against *Ascosphaera apis* and Functional Properties of *Lactobacillus kunkeei* Strains. *Antibiotics*, 9(262).
- Jaimee, G. (2015). Emerging resistance to aminoglycosides in lactic acid bacteria of food origin—an impending menace. *Appl Microbiol Biotechnol*, 100(3), 1137-1151.
- Kandler, O. (1986). Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, 212AL. *Bergeys Manual of system Bacteriology*, 2(1), 1209-1234.
- Kos (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 981-987.
- Moore, T., Globa, L., Barbaree, J., Vodyanoy, V., & Sorokulova, I. (2013). Antagonistic activity of *Bacillus* bacteria against food-borne pathogens. *Probiotics and healthy*, 1(3).
- Olofsson, A. V. (2015). The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread. *Journal of Apicultural Research*, 48(3).
- Pătruică, S. D. (2012). The Effect of Prebiotic and Probiotic Feed Supplementation on the Wax Glands of Worker Bees (*Apis Mellifera*). *Scientific Papers: Animal Sciences and Biotechnologies*, 45(2), 268-271.
- Salman, S. M. (2018). Fructophilic lactic acid bacteria symbionts in honeybees - a key role to antimicrobial activities. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 13(1), 58-62.
- Sharma (2015). Antibiotic Resistance of *Lactobacillus* ssp. Isolated from Commercial Probiotic Preparations. *Journal of Food Safety*, 36(1), 38-51.
- Tou, Y. (2013). Aggregation and adhesion properties of 22 *Lactobacillus* strains. *Journal of Dairy Science*, 96(7), 4252-4257.
- Ugras, S. (2017). Isolation, identification and characterization of probiotic properties of bacterium from the honey stomachs of Yigilca honeybees in Turkey. *Turkish journal of entomology*, 41, 253-261.
- Vásquez, A., & Olofsson, T. (2009). The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread. *Journal of Apicultural Research*, 48(3).

CREATING A COLLECTION OF FRUCTOPHILIC LACTIC ACID BACTERIA (FLAB) FROM THE GASTROINTESTINAL TRACTS OF HONEYBEES

Cao Thanh Nhẹ*, Pham Thi Mai Huong, Nguyen Thuy Huong

Ho Chi Minh City University of Technology Vietnam National University Ho Chi Minh City, Vietnam

*Corresponding author: Cao Thanh Nhẹ – Email: 1770179@hcmut.edu.vn

Received: September 10, 2020; Revised: November 02, 2020; Accepted: December 30, 2020

ABSTRACT

This study aims to isolate, name, and choose Fructophilic lactic acid bacteria (FLAB) from the gastrointestinal tracts of honeybees and also to determine their antibacterial activity against foulbrood disease bacteria in honey bees. The FLABs are oriented to create probiotic products that are alternated or coordinated with the current antibiotic treatment in bees. Four strains were selected with high antibacterial activity against *Melissococcus pluton*, *Paenibacillus larvae*, and *Paenibacillus alvei* with inhibitory zones of $8,67 \pm 0,58$ mm to $15,33 \pm 0,58$ mm. All the four strains had potential probiotic properties as auto-aggregation and acid intolerance. Besides, all strains showed resistance to streptomycin and kanamycin in the treatment of bee diseases so that they can be alternated or coordinated with antibiotic within the permitted limits, without affecting the beneficial microbiota. The bacteria were able to survive at 60°C involving several stresses of spray-drying conditions. All strains were identified as *Lactobacillus kunkeei* by sequencing of the 16S rRNA gene with from 99.24% to 99.44% identity score. The *L. kunkeei* M8 strain possesses the best probiotic potential amongst the four strains. Therefore, it may be used as a candidate in the applications of probiotic additives for honey bees.

Keywords: Foulbrood disease; Fructophilic lactic acid bacteria; Lactic acid bacteria; *Lactobacillus kunkeei*