Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ
Phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ Sinh học
ISSN 1859-2333 | e-ISSN 2815-5599

DOI:10.22144/ctujos.2025.188

TUYỂN CHỌN VÀ ĐỊNH DANH CHỦNG VI KHUẨN *Fructophilic lactic* CÓ MỘT SỐ ĐẶC TÍNH SINH HỌC CỦA PROBIOTIC

Huỳnh Ngọc Thanh Tâm, Trần Vũ Phương và Huỳnh Yến Nhi*
Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Đại học Cần Thơ, Việt Nam
**Tác giả liên hệ (Corresponding author): hynhi@ctu.edu.vn*

Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received): 01/04/2025
Sửa bài (Revised): 21/04/2025
Duyệt đăng (Accepted): 22/07/2025

Title: *Selection and Identification of Fructophilic Lactic Acid Bacteria with some probiotic properties*

Author(s): *Huynh Ngoc Thanh Tam, Tran Vu Phuong and Huynh Yen Nhi**

Affiliation(s): *Institute of Food and Biotechnology, Can Tho University, Vietnam*

TÓM TẮT

Nhằm tìm kiếm nguồn probiotic mới, nghiên cứu này đã được thực hiện với mục đích tuyển chọn được chủng vi khuẩn lactic ưa fructose (FLAB) tiềm năng từ sáp ong. Từ 15 chủng vi khuẩn phân lập đã xác định được chủng AG1.4 là chủng vi khuẩn probiotic tiềm năng nhất. AG1.4 được định danh thuộc nhóm Lactiplantibacillus với độ tương đồng 100%. Chủng vi khuẩn này thể hiện khả năng bám dính dung môi cao đạt 91,65%, hoạt tính kháng khuẩn mạnh chống lại vi khuẩn E. coli và S. aureus với đường kính vòng kháng khuẩn đạt lần lượt là 12,67 mm và 14,33 mm. Ngoài ra, AG1.4 còn có khả năng kháng cả ba loại kháng sinh ampicillin (10 µg/mL), tetracyclin (30 µg/mL) và ofloxacin (30 µg/mL), đây cũng là chủng duy nhất có khả năng phân giải đồng thời tinh bột, protein và cellulose. Khả năng sử dụng fructose và các đặc tính sinh học độc đáo được mang lại từ chủng AG1.4 sẽ mở ra hướng phát triển mới về các sản phẩm lên men chức năng mới, đa dạng hóa nguồn probiotic, góp phần đảm bảo an toàn của thực phẩm đồng thời nâng cao giá trị dinh dưỡng cho con người.

Từ khóa: *Bám dính, enzyme ngoại bào, kháng khuẩn, kháng kháng sinh, probiotic, vi khuẩn ưa fructose*

ABSTRACT

In order to explore new probiotic sources, this study investigated the potential of fructose-loving lactic acid bacteria (FLAB) from bee wax. From 15 isolated bacterial strains, AG1.4 strain was identified as the most promising probiotic strain. AG1.4 was classified under the Lactiplantibacillus group with 100% similarity. This strain demonstrated a high adhesion ability to solvents, reaching 91.65%, and exhibited strong antibacterial activity against E. coli and S. aureus, with inhibition zones measuring 12.67 mm and 14.33 mm, respectively. Additionally, AG1.4 showed resistance to all three antibiotics: ampicillin (10 µg/mL), tetracycline (30 µg/mL), and ofloxacin (10 µg/mL), and it was the only strain capable of simultaneously degrading starch, protein, and cellulose. The ability to utilize fructose and the unique biological properties provided by strain AG1.4 open new avenues for the development of novel functional fermented products, diversifying probiotic sources, ensuring food safety, and enhancing the nutritional value for humans.

Keywords: *Adhesion, antibacterial, antibiotic resistance, extracellular enzymes, fructophilic lactic acid bacteria, probiotic*

1. GIỚI THIỆU

Trong những năm gần đây, sự nhận thức về vai trò quan trọng của hệ vi sinh vật đối với sức khỏe con người đã thúc đẩy mạnh mẽ sự quan tâm và tiêu thụ các sản phẩm probiotic. Probiotic được định nghĩa là các vi sinh vật sống mang lại lợi ích sức khỏe cho vật chủ khi dùng đủ liều lượng, thường có trong các chế phẩm sữa lên men hoặc thực phẩm bổ sung có nguồn gốc từ hệ tiêu hóa của người và động vật. Hiện nay, nghiên cứu đang được thực hiện nhằm tập trung vào việc tìm kiếm các nguồn probiotic mới và đa dạng, trong đó vi khuẩn acid lactic (LAB), đặc biệt là nhóm vi khuẩn lactic ưa fructose (FLAB), nổi lên như một ứng cử viên đầy tiềm năng. Việc nghiên cứu và ứng dụng FLAB mở ra cơ hội phát triển các sản phẩm probiotic mới với những lợi ích sức khỏe độc đáo, đáp ứng nhu cầu ngày càng tăng của người tiêu dùng. Bên cạnh đó, việc sử dụng fructose như một thành phần thực phẩm ngày càng trở nên phổ biến do tính hiệu quả về chi phí và vị ngọt cao hơn so với glucose và sucrose (Patil et al., 2020). Do đó, probiotic ưa fructose có thể trở thành một thành phần tăng cường sức khỏe, nâng cao giá trị dinh dưỡng của các sản phẩm thực phẩm giàu fructose.

Vi khuẩn lactic (LAB) là nhóm vi khuẩn phổ biến trong đường tiêu hóa của con người và là thành phần quan trọng trong nhiều sản phẩm probiotic thương mại. Vi khuẩn lactic ưa fructose (FLAB) đang được nghiên cứu rộng rãi vì các chức năng sinh học đa dạng. Để sản xuất các sản phẩm probiotic hiệu quả, các tiêu chí quan trọng bao gồm khả năng kháng khuẩn, ức chế sự phát triển của tác nhân gây bệnh trong cơ thể vật chủ (Bantayehu et al., 2022) và khả năng bám dính vào biểu mô ruột. Khả năng bám dính này giúp ngăn chặn sự xâm nhập của mầm bệnh đường ruột và tạo lợi thế cạnh tranh với các vi khuẩn gây bệnh (Poonam et al., 2024). Một trong những cơ chế tiềm năng cho khả năng bám dính của LAB là sản xuất các hợp chất ngoại bào như exopolysaccharides (EPS), lipid, enzyme, carbohydrate, thụ thể liên kết màng và acid nucleic (Dominika et al., 2022). Đặc biệt, EPS từ LAB đã được chứng minh có hoạt tính chống màng sinh học, kháng virus, kháng khuẩn (ví dụ như *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica serovar typhimurium*) (Abdelmoneim et al., 2021) và chống viêm. Tình trạng kháng kháng sinh đang là vấn đề sức khỏe cộng đồng toàn cầu, do việc sử dụng kháng sinh quá mức và không đúng cách (Rodak, 2011). Tuy nhiên, LAB được công nhận là an toàn bởi GRAS (Generally Recognized As Safe) và QPS (Qualified Presumption Of Safety) từ FDA (Food And Drug Administration) và EFSA (European Food Safety Authority). Do đó, việc sử dụng các chủng FLAB kháng kháng sinh có thể giúp duy trì sức khỏe đường ruột, đặc biệt khi vật chủ cần điều trị bằng kháng sinh (Tina & Aleš, 2020). Ngoài ra, hoạt động enzyme của LAB cũng rất quan trọng trong quá trình lên men. Cụ thể, enzyme amylase cần thiết cho quá trình lên men tinh bột (Padmavathi et al., 2018), và protease giúp thủy phân protein trong quá trình lên men cá và các sản phẩm khác (Yang et al., 2016; Nofiani et al., 2022).

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định tiềm năng sinh học của các chủng vi khuẩn FLAB thông qua việc đánh giá khả năng bám dính vào biểu mô ruột, khả năng đối kháng với vi khuẩn *E. coli* và *S. aureus*, khả năng kháng một số loại kháng sinh thông thường và hoạt động sản xuất enzyme ngoại bào trong điều kiện phòng thí nghiệm. Kết quả nghiên cứu này được kỳ vọng sẽ góp phần đa dạng nguồn giống vi sinh vật lên men có hoạt tính sinh học cao. Nguồn giống này có thể được ứng dụng trong công nghiệp sản xuất các sản phẩm lên men, đa dạng hóa các phương pháp lên men truyền thống và nâng cao giá trị của các sản phẩm lên men chứa vi sinh vật có lợi cho sức khỏe đường ruột. Kết quả nghiên cứu này cũng mở ra tiềm năng phát triển các sản phẩm kết hợp giữa thực phẩm lên men và chế phẩm sinh học trong tương lai.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Bộ mẫu mười lăm chủng vi khuẩn FLAB đã được phân lập từ mẫu sáp ong tại Thành phố Cần Thơ, tỉnh Đắk Lắk và tỉnh An Giang

2.1.1. Tuyển chọn chủng vi khuẩn Fructophilic lactic có khả năng tự kết dính và bám dính với dung môi

(1) Khảo sát khả năng tự kết dính: Sinh khối tế bào vi khuẩn sau khi nuôi ở nhiệt độ phòng trong 48 giờ trong môi trường Fructose-Yeast-Peptone (FYP) (điều chỉnh mật số về 10^7 CFU/mL) sẽ được rửa 2 lần bằng đệm Phosphate Buffered Saline (PBS) bao gồm: 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na_2PO_4; 0,24 g KH_2PO_4, điều chỉnh pH 7,2). Sinh khối tế bào vi khuẩn sau đó được tái huyền phù vi khuẩn trong đệm PBS. Huyền phù vi khuẩn được để yên ở nhiệt độ phòng trong 5 giờ để tạo điều kiện cho vi khuẩn tự kết dính và lắng xuống.

(2) Khảo sát khả năng bám dính với dung môi: Sinh khối tế bào vi khuẩn sau khi nuôi ở nhiệt độ phòng trong 48 giờ trong môi trường FYP (điều

chỉnh mật số về 10^7 CFU/mL) sẽ được rửa bằng dung dịch KNO_3 0,1 M tại pH 6,2 và tái huyền phù vi khuẩn trong dung dịch. Cuối cùng, 1 mL dung môi ethyl acetate được chuyển vào ống nghiệm có sẵn 3 mL huyền phù tế bào vi khuẩn, sau đó hỗn hợp được vortex trong 2 phút. Hỗn hợp được để yên trong 20 phút tạo điều kiện cho vi khuẩn kết dính với dung môi. Chủng vi khuẩn có khả năng tự kết dính hoặc kết dính với dung môi sẽ có xu hướng tạo sinh khối có kết cấu chặt với nhau và lắng xuống đáy, vi khuẩn có độ kết dính cao sẽ làm cho độ đục huyền phù vi khuẩn ở tầng mặt giảm, giá trị OD ở bước sóng 600 nm cũng sẽ có xu hướng giảm so với giá trị OD được đo tại thời điểm ban đầu.

Ghi nhận chỉ tiêu:

Thí nghiệm được thực hiện với 3 lần lặp lại, khả năng bám dính được xác định bởi công thức:

$$\text{Khả năng bám dính (\%)} = (OD_{\text{ban đầu}} - OD_{\text{sau thời gian lắng}})/OD_{\text{ban đầu}} \times 100$$

2.1.2. Khả năng kháng vi khuẩn Escherichia coli và Staphylococcus aureus của các chủng phân lập

Canh trường của 15 chủng FLAB sau khi nuôi trong 48 giờ ở nhiệt độ phòng trong môi trường FYP (điều chỉnh mật số về 10^7 CFU/mL) được ly tâm 13.000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C. Dịch nổi sau ly tâm ly tâm được chuẩn độ về pH 6,5 bằng NaOH 1 N. 50 µL vi khuẩn *E. coli* và *S. aureus* sau khi nuôi ở 37°C trong 24 giờ, mật số 10^6 tế bào/mL (Huynh et al., 2016) được trải trên môi trường Nutrient agar. Các giếng trên môi trường được tạo ra bằng phương pháp đục lỗ, với đường kính mỗi giếng là 6 mm. Sau đó, 100 µL dịch ly tâm của từng chủng vi khuẩn đối kháng được chuyển lần lượt vào ba giếng, song song đó 100 µL nước cất (đối chứng âm) và 100 µL kháng sinh ampicilin (10 µg/mL) (đối chứng dương) sẽ chuyển lần lượt vào hai giếng còn lại.

Ghi nhận chỉ tiêu:

Hoạt tính kháng khuẩn được xác định thông qua đường kính vòng kháng khuẩn (ĐKVKK) tạo thành theo Leska et al. (2020), thí nghiệm được thực hiện với 3 lần lặp lại.

$$\text{ĐKVKK} = D - d \qquad (4)$$

Trong đó, D là đường kính tổng (mm) và d là đường kính giếng (6 mm).

2.1.3. Khả năng kháng kháng sinh của các chủng phân lập

Để tiến hành thực hiện, 15 chủng vi khuẩn FLAB được tiến hành khảo sát khả năng kháng 3 loại kháng sinh tetracyclin (30 µg/mL), ampicillin (10 µg/mL) và ofloxacin (30 µg/mL) bằng phương pháp khoanh giấy kháng sinh khuếch tán (Nguyen, 1991). Các chủng vi khuẩn tuyển chọn được nuôi trong 48 giờ ở nhiệt độ phòng trong môi trường FYP, tiến hành điều chỉnh mật số về 10^7 CFU/mL. Một lượng 50 µL huyền phù vi khuẩn được trải đều lên bề mặt đĩa petri chứa môi trường FYP agar. Sau thời gian ngâm 10 - 15 phút, các mẫu giấy lọc đã được tẩm từng loại kháng sinh được đặt nhẹ lên bề mặt môi trường đã cấy vi khuẩn. Mẫu đối chứng âm được thực hiện theo quy trình tương tự, tuy nhiên thay thế dung dịch kháng sinh bằng nước cất vô trùng.

Ghi nhận chỉ tiêu

Tính nhạy cảm của kháng sinh được đánh giá dựa vào ĐKVKK, mức độ nhạy cảm với kháng sinh được xác định theo Sharma et al. (2017): Kháng (ký hiệu R): ĐKVKK ≤ 14 mm; Nhạy cảm vừa (ký hiệu S+): 14 mm ≤ ĐKVKK ≤ 19 mm; Nhạy cảm mạnh (ký hiệu S++): ĐKVKK ≥ 20 mm. Thí nghiệm được thực hiện với 3 lần lặp lại.

2.1.4. Khả năng sinh tổng hợp enzyme ngoại bào của các chủng phân lập

Các chủng vi khuẩn FLAB sau khi được nuôi ở nhiệt độ phòng trong 48 giờ ở nhiệt độ phòng, sau đó điều chỉnh mật số về 10^7 CFU/mL, kế đến tiến hành ly tâm 13.000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C để loại bỏ tế bào. Sau khi ly tâm, 100 µL dịch nổi từ mỗi chủng vi khuẩn được nhỏ vào các giếng trên bề mặt các môi trường chuyên biệt nhằm khảo sát khả năng sinh enzyme. Cụ thể, môi trường Starch Agar (SA) được sử dụng để đánh giá hoạt tính amylase (Geetha et al., 2014), với thành phần gồm: 5 g/L peptone, 1,5 g/L yeast extract, 5 g/L NaCl, 2 g/L tinh bột tan và 20 g/L agar. Môi trường phân giải protein được sử dụng để xác định hoạt tính protease (Ha et al., 2008), bao gồm: 300 mL sữa tươi, 3 g/L meat extract, 5 g/L peptone, 2 g/L yeast extract và 20 g/L agar. Khả năng phân giải cellulose được kiểm tra trên môi trường Carboxy Methyl Cellulose (CMC) (Ryckeboer et al., 2002), có thành phần: 0,5 g/L KH_2PO_4, 5 g/L $MgSO_4$, 2 g/L CMC và 20 g/L agar. Hoạt tính lipase được khảo sát trên môi trường chứa Tween 20 (Bestawy et al., 2005), bao gồm: 10 g/L peptone, 5 g/L NaCl, 0,1 g/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 10 g/L Tween 20 và 20 g/L agar.

Ghi nhận chỉ tiêu

Để làm rõ sự xuất hiện của vòng halo, việc nhuộm màu đĩa thạch với Iodine đối với thí nghiệm xác định khả năng phân giải tinh bột cần được tiến hành, với dung dịch Congo Red 0,1% (trong 15

phút; rửa lại bằng NaCl 1 M) đối với thí nghiệm xác định khả năng phân giải cellulose, nhuộm dung dịch TCA (Trichloroacetic Acid) 10% đối với thí nghiệm xác định khả năng phân giải protein. Thí nghiệm được thực hiện với 3 lần lặp lại, khả năng phân giải (KNPG) cơ chất được tính bởi công thức sau:

$$KNPG = D - d \qquad (5)$$

Trong đó, D là đường kính tổng (mm) và d là đường kính giếng (6 mm).

2.1.5. Định danh

Dựa vào hình dạng, sinh hóa của chủng vi khuẩn có tiềm năng probiotic cao được chọn để giải trình tự đoạn gene 16S rRNA bằng phản ứng PCR với cặp mồi 1492R (5'–TACGGTTACCTTGTTACGACT–3') và 27F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTC–3') và những thành phần khác như mạch khuôn DNA, enzyme Taq polymecrase, dNTPs và $MgCl_2$. Sau đó, việc phân tích trình tự gene được tiến hành bằng kỹ thuật BLAST trên ngân hàng gene NCBI để so sánh với các trình tự tương đồng đã được công bố và tiến hành lập sơ đồ phả hệ bằng phần mềm MEGA 12.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khả năng tự kết dính và bám dính dung môi của các chủng FLAB

Các thí nghiệm về khả năng tự kết dính và bám dính dung môi của các chủng vi khuẩn FLAB giúp quá trình xâm nhập và bám dính vi khuẩn có tiềm năng probiotic vào các tế bào biểu mô trong đường tiêu hóa, dẫn đến việc ngăn ngừa sự xâm nhập của mầm bệnh thông qua sự tương tác của chúng (Abushelaibi et al., 2017). Các kết quả trong nghiên cứu này cho thấy tất cả các chủng vi khuẩn FLAB phân lập đều có khả năng bám dính dao động từ 48,67% đến 91,65%. Cụ thể, chủng vi khuẩn CT1.4 có tỷ lệ tự bám dính cao nhất đạt 74,82%, khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với tỷ lệ tự bám dính của chủng vi khuẩn ĐL8. Tuy nhiên, về khả năng bám dính với dung môi ethyl acetate thì chủng vi khuẩn AG1.4 lại mang đến khả năng bám dính cao nhất đạt 91,65% có khác biệt ý nghĩa thống kê so với các chủng vi khuẩn còn lại (Bảng 1 và Hình 1).

Bảng 1. Khả năng tự bám dính và bám dính với dung môi của các chủng vi khuẩn FLAB

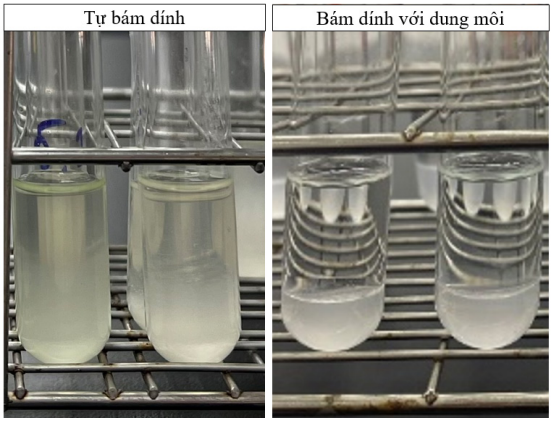
STT	Chủng vi khuẩn	Khả năng bám dính (%)	
		Tự kết dính	Bám dính với dung môi ethyl acetate
1	AG1.4	48,67±4,61^{h}	91,65±0,13^{a}
2	ĐL4.4	62,63±0,46^{cde}	69,82±1,95^{f}
3	CT1.4	74,82±0,18^{a}	73,91±0,75^{e}
4	ĐL4	58,20±1,65^{efg}	85,55±0,04^{b}
5	ĐL8.5	53,851,27^{g}	72,09±0,08^{ef}
6	AG11	70,04±0,44^{b}	82,91±0,12^{bc}
7	AG4	64,20±0,15^{c}	82,18±0,19^{cd}
8	CT1.3	62,41±0,43^{cde}	51,35±0,84^{h}
9	ĐL1.3	55,20±0,66^{fg}	85,17±0,63^{b}
10	CT4.2	63,21±1,47^{cd}	72,63±0,04^{ef}
11	CT8.2	54,07±0,49^{g}	63,87±0,93^{g}
12	CT2	64,20±0,91^{c}	85,20±1,00^{b}
13	AG12	56,36±1,66^{fg}	82,71±0,41^{bc}
14	ĐL15	59,16±0,96^{def}	79,26±2,60^{d}
15	ĐL8	70,94±0,45^{ab}	61,27±0,68^{g}

Ghi chú: Trong cùng một cột, các giá trị trung bình theo sau có các mẫu tự giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức ý nghĩa 5% theo kiểm định Tukey.

Khả năng bám dính tốt được thể hiện thông qua sự tương tác của các thành phần trên bề mặt tế bào của các chủng vi khuẩn FLAB, đây là một trong những đặc điểm quan trọng của vi khuẩn được chọn làm đối tượng có tiềm năng probiotic (Kumari et al., 2016). 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 chủng vi sinh vật.

Mặt khác, 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. Trong nghiên cứu này, sự bám dính hay gắn kết của vi khuẩn lactic có ái lực cao hơn với niêm mạc ruột trở thành một yếu tố quan trọng. Do đó, các vi sinh vật có khả năng bám dính cao vào ruột được ưu tiên khi lựa chọn vi sinh vật probiotic (Andrea et al., 2019). Theo kết quả từ nhiều nghiên cứu trong và ngoài nước, các loài *Lactobacillus* và *Bifdobacterium* là nhóm vi sinh vật probiotic được sử dụng phổ biến nhất và quan trọng nhất trong số các vi khuẩn acid lactic (Tridip et al., 2022 và Mariarosaria, 2024).

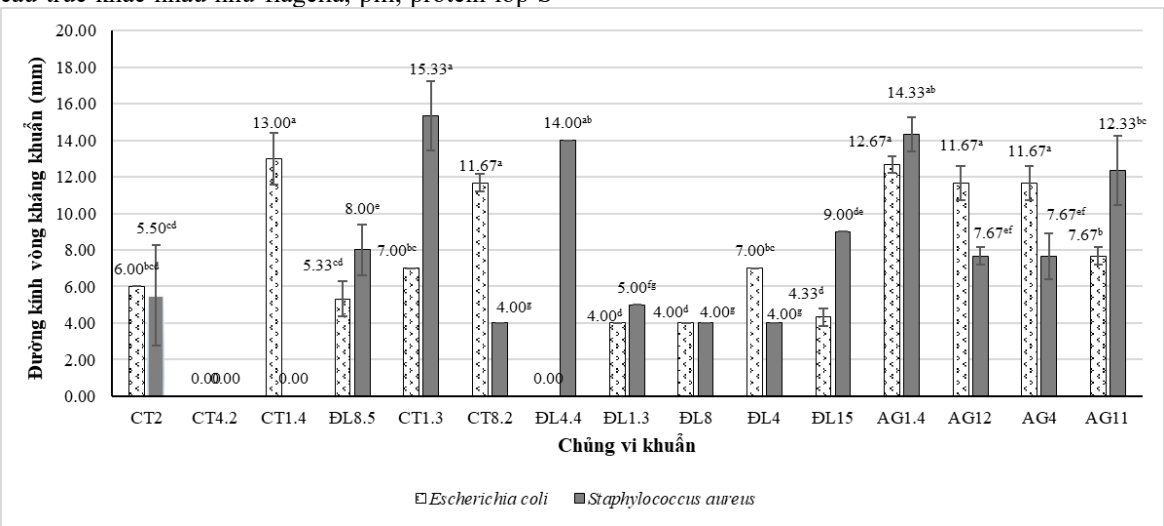


Hình 1. Khả năng bám dính của các chủng vi khuẩn FLAB

Để bám dính vào các tế bào ruột, vi khuẩn lactic đặc biệt là FLAB thường sử dụng nhiều cơ chế và cấu trúc khác nhau như flagella, pili, protein lớp S (loại bỏ lớp S sẽ dẫn đến việc mất khả năng bám dính vào các tế bào biểu mô ruột), acid lipoteichoic (là phức hợp của acid teichohic và lipid, đây là thành phần chính của thành tế bào vi khuẩn Gram dương), exopolysaccharides và protein liên kết chất nhầy (Duygu et al., 2019). Một số chủng vi khuẩn có cấu trúc protein liên kết chất nhầy (Mub) được biết là có tác dụng trung gian liên kết vi sinh vật với chất nhầy. Kết quả từ nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng *L. reuteri* và *L. fermentum* có protein MapA (protein tăng cường bám dính vào niêm mạc) và có chức năng trung gian tạo sự liên kết của vi khuẩn với chất nhầy, một số chủng *L. plantarum* ngăn chặn sự bám dính của *E. coli* vào các tế bào chất nhầy ruột bằng các gen đặc hiệu như MUC2 và MUC3 (Keita et al., 2016; Lidia et al., 2020).

3.2. Khả năng kháng vi khuẩn *Escherichia coli* và *Staphylococcus aureus* của các chủng FLAB

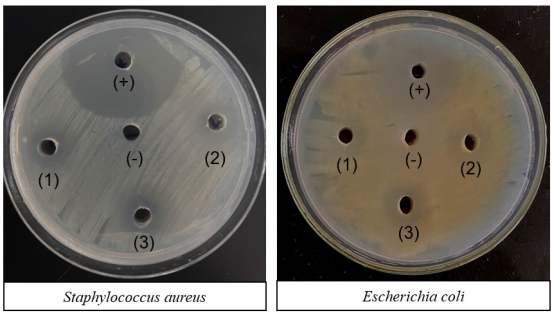
Kết quả nghiên cứu này cho thấy, các chủng vi khuẩn FLAB đều khả năng ức chế đối với *E. coli* và *S. aureus* (ngoại trừ chủng vi khuẩn CT4.2 và CT1.4). Khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh được thể hiện qua đường kính vòng kháng khuẩn dao động từ 4 mm đến 15,33 mm (Hình 2 và Hình 3). Cụ thể, chủng vi khuẩn AG1.4 là chủng vi khuẩn thể hiện hoạt tính đối kháng cao nhất với vi khuẩn *E. coli* và *S. aureus* với đường kính vòng kháng khuẩn lần lượt là 12,67 mm và 14,33 mm, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các chủng vi khuẩn còn lại.



Hình 2. Biểu đồ thể hiện khả năng đối kháng của các chủng FLAB với vi khuẩn *Escherichia coli* và *Staphylococcus aureus*

Ghi chú: Trong cùng một cột, các giá trị trung bình theo sau có các mẫu tự giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức ý nghĩa 5% theo kiểm định Tukey.

Hoạt động kháng khuẩn của các chủng probiotic chủ yếu được giải thích bởi khả năng sản xuất nhiều hợp chất khác nhau của các vi khuẩn này, trong đó các hợp chất có bản chất là protein, chẳng hạn như bacteriocin và peptidoglycan hydrolase, gần đây đã thu hút được sự quan tâm đáng kể về mặt thương mại và khoa học (Yesica et al., 2022).



Hình 3. Khả năng đối kháng với vi khuẩn *Staphylococcus aureus* và *Escherichia coli* của chủng vi khuẩn AG1.4

Ghi chú: Ký hiệu (+): ampicillin (10 µg/mL); (-): nước cất; (1); (2) và (3) dịch ly tâm huyền phù vi khuẩn AG1.4

3.3. Khả năng kháng kháng sinh của các chủng FLAB

Ampicillin là một loại kháng sinh được xác định là ức chế khả năng tổng hợp thành tế bào của vi khuẩn; tetracyclin là chất ức chế tổng hợp protein của tế bào vi khuẩn (Álvarez-Cisneros & Ponce-alquicira, 2018; Nunziata et al., 2022; Ojha et al., 2023) và ofloxacin có tác dụng ngăn chặn quá trình sao chép DNA của vi khuẩn (Shariati et al., 2022) . Kết quả nghiên cứu đã xác định được 10/15 chủng vi khuẩn FLAB phân lập có khả năng kháng lại cả ba loại kháng sinh khảo sát. Điều đặc biệt rằng, tất cả các chủng FLAB phân lập đều có khả năng kháng lại hoàn toàn tetracyclin và ofloxacin (Bảng 2 và Hình 4).

Bảng 2. Mức độ nhạy cảm với một số loại kháng sinh của các chủng vi khuẩn FLAB

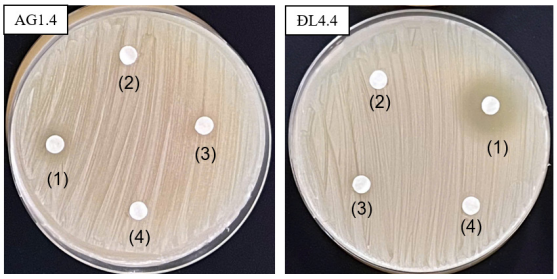
STT	Chủng vi khuẩn	Khả năng kháng kháng sinh (mm)		
		Ampicillin (10 µg/mL)	Tetracyclin (30 µg/mL)	Ofloxacin (30 µg/mL)
1	CT2	R	R	R
2	CT4.2	S+	R	R
3	CT1.4	S+	R	R
4	ĐL8.5	R	R	R
5	CT1.3	R	R	R
6	CT8.2	R	R	R
7	ĐL4.4	S++	R	R
8	ĐL1.3	R	R	R
9	ĐL8	R	R	Rs
10	ĐL4	R	R	R
11	ĐL15	R	R	R
12	AG1.4	R	R	R
13	AG12	R	R	R
14	AG4	S+	R	R
15	AG11	S+	R	R

Ghi chú: kháng: R (Resistant) ≤ 14 mm, nhạy cảm vừa: 14 < S+ ≤ 19 mm, nhạy cảm mạnh: S++ ≥ 20 mm, S (Susceptible) theo Sharma et al. (2017).

Tetracycline là một trong những loại kháng sinh được sử dụng phổ biến nhất trong liệu pháp lâm sàng và là chất thúc đẩy tăng trưởng trong chăn nuôi và thú y (Cecilia et al., 2021). Do đó, khả năng xảy ra tỷ lệ kháng tetracycline cao trong các nguồn thực phẩm hiện nay.

Tuy nhiên, nếu khả năng kháng là một đặc điểm vốn có (tự nhiên), liên quan đến thông tin di truyền được mã hóa trong nhiễm sắc thể, thì không có lý do gì đáng báo động, vì khả năng truyền gen kháng kháng sinh sang vi sinh vật khác là rất nhỏ. Nhưng nếu các chủng có khả năng kháng mắc phải, bắt nguồn từ đột biến điểm hoặc chuyển gen sẽ dẫn đến sự phát tán thông qua chuyển gen ngang. Ngoài ra, kết quả từ các báo cáo đáng lo ngại đã chỉ ra rằng LAB, bao gồm các chủng probiotic, đang phát triển khả năng kháng thuốc mắc phải đối với một loạt các nhóm kháng sinh đang mở rộng, đặc biệt là tetracycline và macrolide (Chajecka-Wierzchowska & Zadernowska, 2019). Để ngăn chặn sự truyền kháng thuốc không mong muốn từ hệ vi sinh vật nội

sinh thì các chủng probiotic không được biểu hiện khả năng kháng thuốc mắc phải (Niu et al., 2019). Như đã đề cập trước đó, khả năng kháng thuốc tự nhiên của LAB không gây nguy hiểm; ngược lại mà còn là một đặc điểm mong muốn để phục hồi hệ vi khuẩn đường ruột trong quá trình điều trị bằng kháng sinh (Niu et al., 2019; Chajecka-Wierzchowska & Zadernowska, 2019). Do đó, yếu tố chính quyết định tính an toàn của một chủng cụ thể là khả năng truyền tính năng kháng thuốc chứ không phải chỉ là sự hiện diện của khả năng kháng thuốc. Do đó, nhiều nghiên cứu cần thiết cần được thực hiện thêm để xác định xem gen kháng thuốc có nằm trên các yếu tố di truyền di động hay không hay chúng là đặc điểm cố hữu (Chajecka-Wierzchowska & Zadernowska, 2019).



Hình 4. Khả năng kháng kháng sinh của các chủng vi khuẩn FLAB

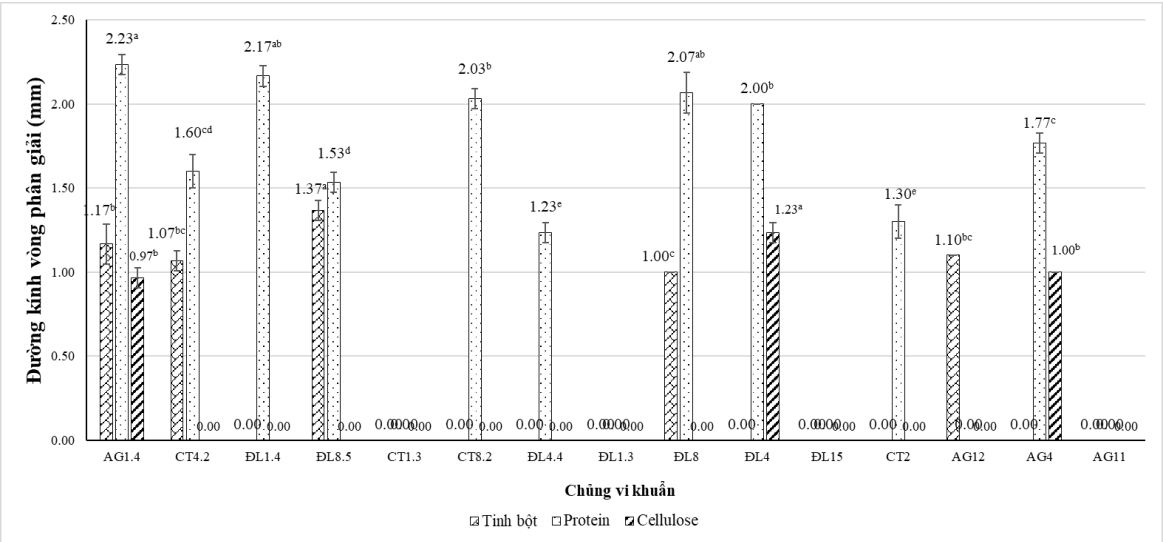
Ghi chú: ký hiệu (1): ampicillin (10 µg/mL), (2): tetracyclin (30 µg/mL), (3): ofloxacin (30 µg/mL), (4): nước cất (đối chứng âm).

3.4. Khả năng sinh enzyme ngoại bào của các chủng FLAB

Để cải thiện giá trị dinh dưỡng của các sản phẩm thực phẩm bằng cách tăng hàm lượng hợp chất hoạt tính sinh học (hợp chất phenolic, acid béo chuỗi ngắn, peptide hoạt tính sinh học, v.v.), việc sản xuất các enzyme liên quan là một đặc điểm tích cực trong chế phẩm sinh học sẽ mang lại lợi ích sức khỏe cho vật chủ (Christian et al., 2024).

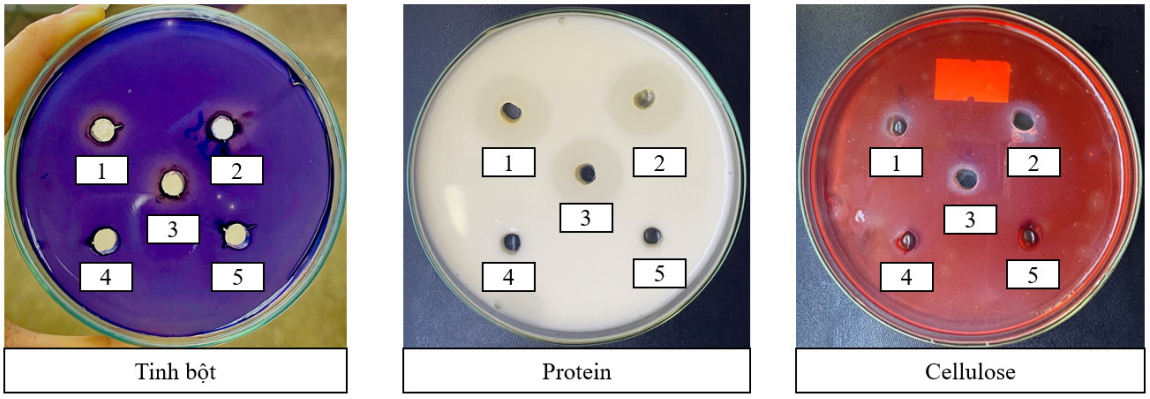
Kết quả trong nghiên cứu này cho thấy không có sự sản xuất hệ enzyme lipase từ các chủng vi khuẩn FLAB khảo sát. Tuy nhiên, chủng vi khuẩn AG1.4 là chủng vi khuẩn duy nhất trong nghiên cứu thể hiện hoạt tính phân giải ba loại cơ chất còn lại như tinh bột, protein và cellulose với đường kính vòng phân giải đạt lần lượt là 1,17 mm; 2,23 mm và 0,97 mm (Hình 5 và Hình 6).

α-amylase là enzyme phân hủy tinh bột, có khả năng thủy phân các liên kết α-1,4 glycosidic của polysaccharide, bao gồm cả quá trình lên men tinh bột bởi vi khuẩn lactic (Padmavathi et al., 2018). hoạt động của protease góp phần vào sự phân hủy protein bằng cách gây ra sự phân rã thịt trong quá trình lên men cá. Một số sản phẩm như nước mắm lên men cần protease để phân hủy protein từ thịt. Trong khi đó, một số quá trình lên men cá không cho phép sự phân hủy thịt cá với *Lactobacillus plantarum* có thể làm tăng các acid amin như acid aspartic, acid glutamic và alanine, dẫn đến vị umami và ngọt (Yang et al., 2016; Nofiani et al., 2022).



Hình 5. Biểu đồ thể hiện khả năng phân giải cơ chất của các chủng vi khuẩn FLAB

Ghi chú: Trong cùng một cột, các giá trị trung bình theo sau có các mẫu tự giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức ý nghĩa 5% theo kiểm định Tukey.



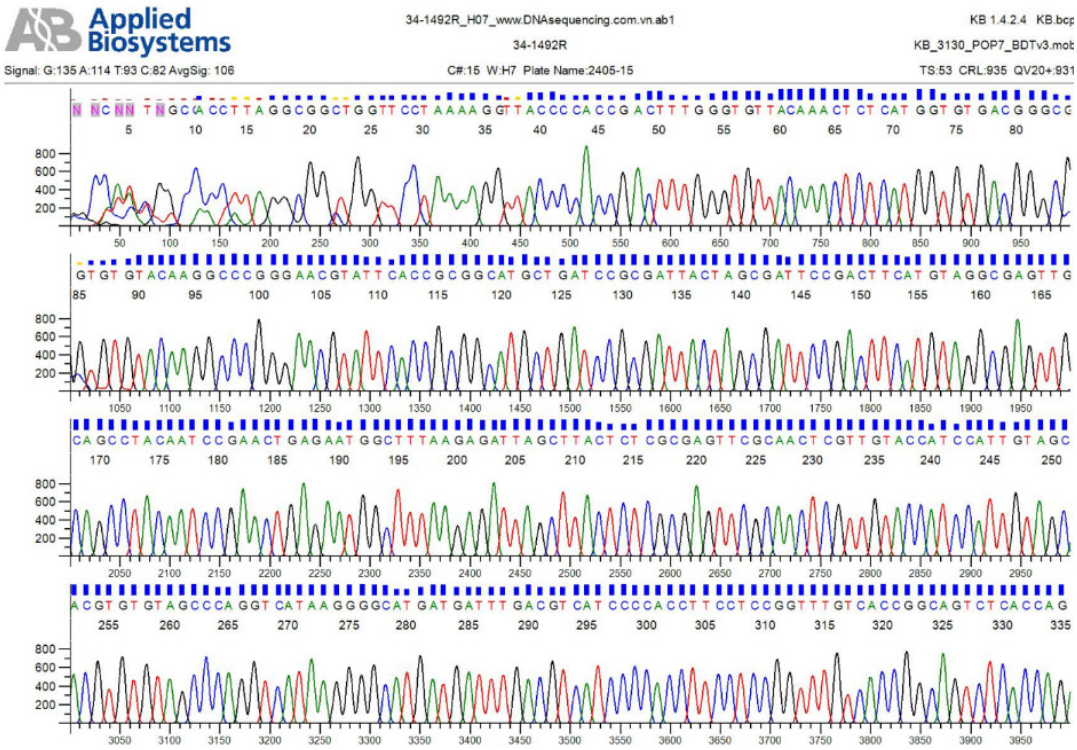
Hình 6. Khả năng phân giải cơ chất của các chủng vi khuẩn FLAB

Ghi chú: Các giếng 1,2 và 3 chứa enzyme ngoại bào của chủng vi khuẩn AG1.4; giếng 4 và 5 chứa lần lượt môi trường FYP broth và nước cất.

Các chủng vi khuẩn có các đặc tính phân giải các cơ chất này sẽ mở ra một hướng đi mới cho ngành lên men thực phẩm, các chủng vi khuẩn có tiềm năng probiotic sẽ đóng vai trò tăng hương vị của các sản phẩm lên men đồng thời hỗ trợ tốt trong sức khỏe đường ruột.

3.5. Định danh chủng FLAB tiềm năng

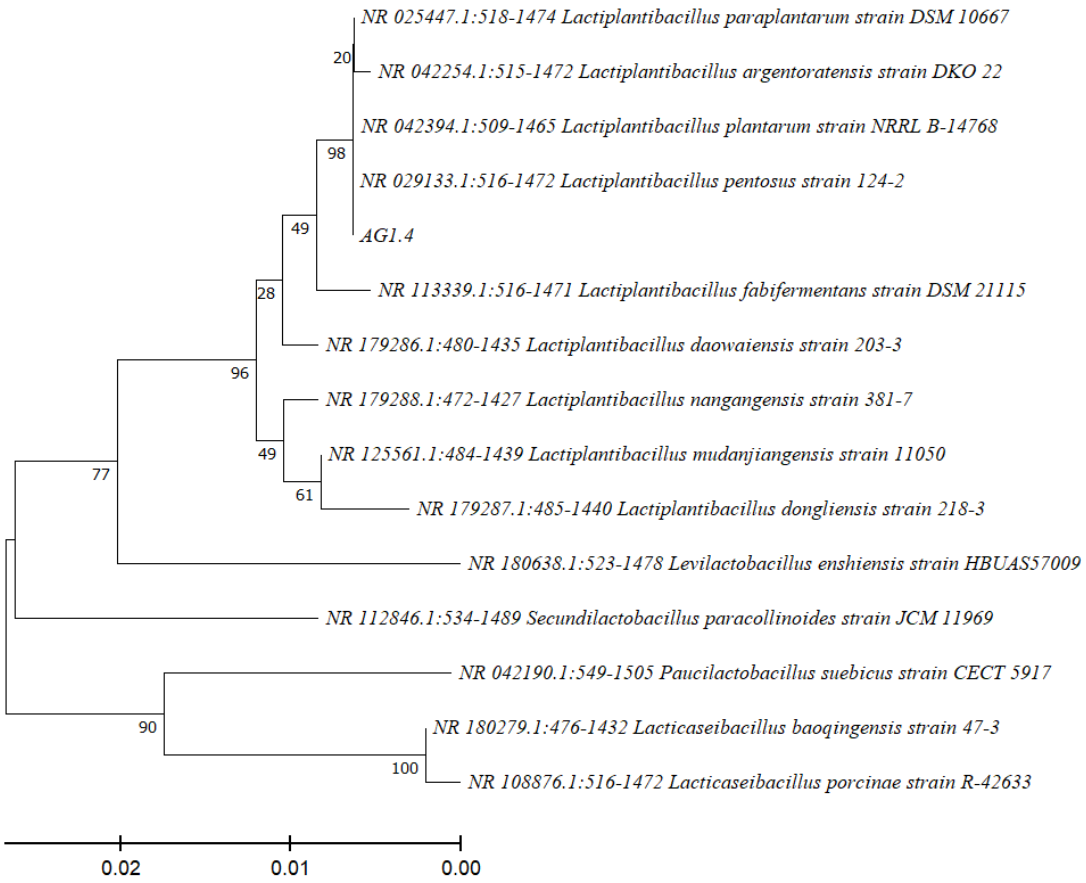
Kết quả nghiên cứu trên cho thấy chủng FLAB – AG1.4 có tiềm năng cao được tuyển chọn để tiến hành khuếch đại trình tự gene 16S rRNA (Hình 7). Kết quả BLAST trình tự vùng gen 16S trên ngân hàng gene NCBI và từ giản đồ phả hệ cho thấy chủng vi khuẩn AG1.4 được phân loại cùng nhóm với các chủng vi khuẩn *L. paraplantarum* (mã gene NR025447.1), *L. argentoratensis* (mã gene NR042254.1), *L. plantarum* (mã gene NR042394.1) và *L. pentosus* (mã gene NR029133.1) với độ tương đồng 100% (Hình 8), mức độ tin cậy của nhánh được thể hiện qua chỉ số bootstrap 98% (Hình 9).



Hình 7. Kết quả giải trình tự gene 16S rRNA bằng mồi tổng

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Lactiplantibacillus plantarum strain NRRL B-14768 16S ribosomal RNA, partial sequence	Lactiplantibacill...	1768	1768	100%	0.0	100.00%	1474	NR_042394.1
Lactiplantibacillus paraplantarum strain DSM 10667 16S ribosomal RNA, partial sequence	Lactiplantibacill...	1768	1768	100%	0.0	100.00%	1502	NR_025447.1
Lactiplantibacillus plantarum strain CIP 103151 16S ribosomal RNA, partial sequence	Lactiplantibacill...	1768	1768	100%	0.0	100.00%	1527	NR_104573.1
Lactiplantibacillus plantarum strain NBRC 15891 16S ribosomal RNA, partial sequence	Lactiplantibacill...	1768	1768	100%	0.0	100.00%	1492	NR_113338.1
Lactiplantibacillus pentosus strain 124-2 16S ribosomal RNA, partial sequence	Lactiplantibacill...	1768	1768	100%	0.0	100.00%	1519	NR_029133.1
Lactiplantibacillus plantarum strain JCM 1149 16S ribosomal RNA, partial sequence	Lactiplantibacill...	1768	1768	100%	0.0	100.00%	1519	NR_115605.1
Lactiplantibacillus plantarum strain NBRC 15891 16S ribosomal RNA, partial sequence	Lactiplantibacill...	1768	1768	100%	0.0	100.00%	1454	NR_112690.1
Lactiplantibacillus plantarum strain JCM 1149 16S ribosomal RNA, partial sequence	Lactiplantibacill...	1760	1760	99%	0.0	100.00%	1466	NR_117813.1
Lactiplantibacillus argentoratensis strain DKO 22 16S ribosomal RNA, partial sequence	Lactiplantibacill...	1753	1753	100%	0.0	99.69%	1517	NR_042254.1
Lactiplantibacillus fabifermentans strain DSM 21115 16S ribosomal RNA, partial sequence	Lactiplantibacill...	1733	1733	100%	0.0	99.37%	1491	NR_113339.1
Lactiplantibacillus fabifermentans strain LMG 24284 16S ribosomal RNA, partial sequence	Lactiplantibacill...	1733	1733	100%	0.0	99.37%	1532	NR_042676.1
Lactiplantibacillus pingfangensis strain 382-1 16S ribosomal RNA, partial sequence	Lactiplantibacill...	1727	1727	100%	0.0	99.37%	1425	NR_179289.1
Lactiplantibacillus daowaiensis strain 203-3 16S ribosomal RNA, partial sequence	Lactiplantibacill...	1727	1727	100%	0.0	99.27%	1446	NR_179286.1

Hình 8. Kết quả BLAST trình tự gene trên ngân hàng gene NCBI của chủng vi khuẩn AG1.4



Hình 9. Cây phân loại loài

Chi *Lactobacillus* là một nhóm đồng nhất về mặt phát sinh loài bao gồm sáu phân loài là *L. Plantarum, L. paraplantarum, L. pentosus*, *L. fabifermentans* và *L. xiangfangensis*. Khi kết hợp lại, chúng tạo thành một đơn vị phân loại có quan hệ gần gũi được gọi là nhóm *L. plantarum*. Trong nhóm này, một số phân loài đã được xác định bao gồm *L. plantarum* subsp. *argentoratensis* và *L. plantarum* subsp. *plantarum* (Roland et al., 2011). Tất cả các loài này đều lên men dị loại tùy ý, tạo ra Natri D,l - lactate và chứa acid meso-diaminopimelic trong

thành tế bào của chúng. *L. pentosus* , trước đây được coi là tương tự như *L. plantarum,* chủng vi khuẩn này lên men được đường xylose, trong khi *L. arizonensis* và *L. paraplantarum* không thể lên men carbohydrate này. Không giống như *L. plantarum* và *L. paraplantarum*, *L. pentosus* lên men glycerol nhưng không lên men melezitose (Darby & Jones, 2017). Nhiều chủng *L. plantarum* và bacteriocin của chúng được nghiên cứu là an toàn về mặt gen kháng kháng sinh. Do đó, chúng mang lại cơ hội tuyệt vời để cải thiện thành phần dinh dưỡng, thời hạn sử dụng, hoạt động chống oxy hóa, đặc tính hương vị và hoạt động kháng khuẩn trong ngành công nghiệp thực phẩm. Hơn nữa, *L. plantarum* có khả năng làm giảm các hợp chất không mong muốn như aflatoxin, chúng có tiềm năng sử dụng trong việc duy trì an toàn thực phẩm và ngăn ngừa thực phẩm bị hư hỏng (Yilmaz et al., 2022).

4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy tất cả các chủng FLAB khảo sát đều có khả năng tự bám dính và bám dính với dung môi ethyl acetate. Trong đó, 12/15 chủng có khả năng kháng cả hai loại vi khuẩn chỉ thị *Escherichia coli* và *Staphylococcus aureus*. Đặc biệt, 10/15 chủng có khả năng kháng đồng thời ba loại kháng sinh ampicillin, tetracycline và ofloxacin. Chủng vi khuẩn AG1.4 nổi bật là chủng duy nhất có khả năng phân giải ba loại cơ chất: tinh bột, protein và cellulose. Kết quả giải trình tự vùng gene 16S rRNA cho thấy chủng vi khuẩn AG1.4 thuộc nhóm *Lactiplantibacillus*, với độ tương đồng đạt 100%. Kết quả nghiên cứu này không chỉ giúp xác định khả năng probiotic của các chủng vi khuẩn lactic mà còn khẳng định nhóm vi khuẩn *Lactiplantibacillus* có xu hướng sử dụng fructose làm nguồn carbon. Điều này mở ra hướng nghiên cứu mới và tiềm năng phát triển các sản phẩm lên men từ các giống vi khuẩn có đặc tính lên men độc đáo.

LỜI CẢM TẠ

Đề tài này được tài trợ bởi Trường Đại học Cần Thơ, mã số: T2024-132.

TÀI LIỆU THAM KHẢO (REFERENCES)

Abdelmoneim, K. A., Mutamed, M. A., Amin, N. O., Tareq, M. O., Anas, A. A., Nagendra, P. S., & Richard, H. (2021). Exopolysaccharides as Antimicrobial Agents: Mechanism and Spectrum of Activity. *Front Microbiol*., 12, 664395. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.664395

Abushelaibi, A., Suheir, A., & Khaled, T. (2017). Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from camel milk. *Lwt - Food Science And Technology*, *79*, 316-325. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.01.041

Álvarez-Cisneros, Y. M., & Ponce-alquicira, E. (2018) Antibiotic resistance in lactic acid bacteria: a review. *International Journal of Biology, Pharmacy and Allied Sciences*. *10*(4): 22-28. https://doi.org/10.5772/intechopen.80624

Andrea, M., Robert, A. R., Glenn, R. G., Dimitris, C., & Afroditi, C. (2019). Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. *Appl Microbiol Biotechnol*, *103*(16), 6463–6472. https://doi.org/10.1007/s00253-019-09978-7

Bantayehu, A. T., & Bekalu, K. (2022). Probiotics, their prophylactic and therapeutic applications in human health development: A review of the literature. *Heliyon*, *8*(6), e09725. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09725

Bestawy, E. I. (2005). *Biodegradation of palm oil mill effluent (POME) by bacterial.*

Cecilia, F., Vania, P., Constanza, M. L., Lorenzo, M., & Annalisa, R. (2021). Incidence of Tetracycline and Erythromycin Resistance in Meat-Associated Bacteria: Impact of Different Livestock Management Strategies. *Microorganisms*, *9*(10), 2111. https://doi.org/10.3390/microorganisms9102111

Chajecka-Wierzchowska, W., & Zadernowska, A. (2019). Lactic acid bacteria including probiotic strains as a reservoir of antibiotic resistance genes. *Food Sci Technol Qual*, *3*(120), 22–35. https://doi.org/10.15193/zntj/2019/120/294

Christian, K. A., Taghi, M., & Helen, O. (2024). Multifunctional Applications of Lactic Acid Bacteria: Enhancing Safety, Quality, and Nutritional Value in Foods and Fermented Beverages. *Foods*, *13*(23), 3714. https://doi.org/10.3390/foods13233714

Darby, T. M., & Jones, R. M. (2017). Beneficial Influences of *Lactobacillus plantarum on Human Health and Disease. The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology Implications for Human Health, Prebiotics, Probiotics, and Dysbiosis*, 109-117. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804024-9.00010-0

Dominika, J., Susana, C. R., & Celia C. G. S. (2022). Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria: From Biosynthesis to Health-Promoting Properties. *Foods*, *11*(2), 156. https://doi.org/10.3390/foods11020156

Duygu, A., & Hakan, K. (2019). Adhesion mechanisms of lactic acid bacteria: conventional and novel approaches for testing. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35, 156. https://doi.org/10.1007/s11274-019-2730-x

Geetha, K., Venkatesham, E., Hindumathi, A., & Bhadraiah, B. (2014). Isolation, screening & characterization of plant growth promoting bacteria & their efect on *Vigna radita* (L.) R. Wilczek. *Original Research Artide*, *6*, 799-809.

Ha, T. T., Mai, T. T., Nguyen, T. P., Tran, L. K. N., Bui, T. V., & Cao, N. D. (2008). Isolation of proteolytic, cellulolytic and amylolytc bacteria in wastewater from municipal solidwaste plant in CanTho city. *CTU Journal of Innovation and Sustainable Development*, *10*, 195-205 *(in Vietnamese).*

Huynh, N. T., Tran, T. T., Nguyen, V. M., & Ha, T. T. (2016). Selection of antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from fermented small melon (*Cucumis melo* L.). *CTU Journal of Innovation and Sustainable Development*, *1*, 18-24 (*in Vietnamese*). https://doi.org/10.22144/ctu.jsi.2016.017

Keita, N., Makoto, S., & Takao, M. (2016). Adhesion Properties of Lactic Acid Bacteria on Intestinal Mucin. *Microorganisms*, *4*(3), 34. https://doi.org/10.3390/microorganisms4030034

Kumari, A., Kunzes, A., Monika, & Tek, C. B. (2016). Probiotic attributes of indigenous *Lactobacillus* spp. Isolated from traditional fermented foods and beverages of north-western Himalayas using in vitro screening and principal component analysis. *J Food Sci Technol*, *53*(5), 2463–2475. https://doi.org/10.1007/s13197-016-2231-y

Leska, A., Nowal, A., Szulc, J., Motyl, I., & Chrebelska, K. H. C. (2022). Antagonistic Activity of Potentially Probiotic Lactic Acid Bacteria against Honeybee (*Apis mellifera* L.). *Pathogens. Pathogens*, 11, 1367. https://doi.org/10.3390/pathogens11111367

Lidia, M., Barbara, D. S., Rosangela, M. (2020). *Lactobacillus* Cell Surface Proteins Involved in Interaction with Mucus and Extracellular Matrix Components. *Curr Microbiol*, *77*(12), 3831–3841. https://doi.org/10.1007/s00284-020-02243-5

Mariarosaria, M. (2024). Bifidobacteria, Lactobacilli... when, how and why to use them. *Global Pediatrics*, 8, 100139. https://doi.org/10.1016/j.gpeds.2024.100139

Nguyen, T. H. (1991). A*ntibiotic Paper Disk Diffusion Method. Medical Microbiology Testing Technique*. Medical Publishing House, Hanoi (pages 329-338) *(in Vietnamese).*

Niu, K., Kothari, D., Cho, S., Sung, G., Song, I., Kim, S., & Kim, S. (2019). Exploring the probiotic and compound feed fermentative applications of *Lactobacillus plantarum* SK1305 isolated from Korean green chili pickled pepper. *Probiotics Antimicrob Proteins*, *11*(3), 801–812. https://doi.org/10.1007/s12602-018-9447-2

Nofiani, R., Puji, A, Adhitiyawarman, Sarwiyati. (2022). Characteristics of Lactic Acid Bacteria isolated from traditional fermented fish. *Biodiversitas*, *23*(11), 5662-5669. https://doi.org/10.13057/biodiv/d231116

Nunziata, L., Brasca, M., Morandi, S., & Silvetti, T. (2022). Antibiotic resistance in wild and commercial non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria strains of dairy origin: an update. *Food Microbiology*, *104*, 103999. https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.103999

Ojha, A. K., Nagendra, P. S., Vijendra, M., Neela, E., & Neetu, K. T. (2023). Prevalence of antibiotic resistance in lactic acid bacteria isolated from traditional fermented Indian food products. *Food Science and Biotechnology*, *32,* 2131–2143. https://doi.org/10.1007/s10068-023-01305-1

Padmavathi T, Bhargavi, R., Priyanka, P. R., Niranjan, N. R., & Pavitra, P.V. (2018). Screening of potential probiotic lactic acid bacteria a.nd production of.amylase and its partial purification. *J Gen Eng Biotechnol*, *16*(2), 357-362. https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.03.005

Patil, M. , Jadhav, A., & Patil, U. (2020). Functional characterization and in vitro screening of *Fructobacillus fructosus* MCC 3996 isolated from Butea monosperma flower for probiotic potential. *Letters in Applied Microbiology,* 70, 331-339. https://doi.org/10.1111/lam.13280

Poonam, V., Divya, J., Leya, S. V., Sangeetha, A. B., & Kumar, V. (2024). Efficacy of Probiotics in Reducing Pathogenic Potential of Infectious Agents. *Fermentation*, 10, 599. https://doi.org/10.3390/fermentation10120599

Rodak, E. (2011). Antibiotic resistance in lactic acid bacteria. *Bromatol Chem Toksykol*, 2, 204–210.

Roland, J. S., & Johan E. T. van H. V. (2011). Genomic diversity and versatility of *Lactobacillus plantarum*, a natural metabolic engineer. *Microbial Cell Factories*, *10* (Suppl 1):S3, 1-13. https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-S1-S3

Ryckeboer, J., Mergaet, J., Gosemans, J., Deprins, K., & Swings, J. (2003). Microbiological aspects of biowaste during composting in a monitored compost bin. *Journal of Applied Microbiology*, *94*, 127-137.

https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01800.x

Shariati, A., Maniya, A., Mohammad, A. K., Mostafa, A., Mahsa, G., Abbas, M., Mohsen, H., & Saeed, K. (2022). The resistance mechanisms of bacteria against ciprofloxacin and new approaches for enhancing the efficacy of this antibiotic. *Front Public Health*, *10*, 1025633. https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.1025633

Sharma, C., Gulati S., Thakur, N., Singh, B. P., Gupta, S., Kaur, S., Mishra, S. K., Puniya, A. K., Gill, J. P. S., & Panwar, H. (2017). Antibiotic sensitivity pattern of indigenous *Lactobacilli* isolated from curd and human milk samples. *Biotech, 7*(1), 53. https://doi.org/10.1007/s13205-017-0682-0

Tina, V. P., & Aleš, B. (2020). Safety Aspects of Genetically Modified Lactic Acid Bacteria. *Microorganisms*, *8*(2), 297. https://doi.org/10.3390/microorganisms8020297

Tridip, K. D., Shrabani, P., Sudipta, C., Keshab, Chandra, M., & Kunta, G. (2022). Current status of probiotic and related health benefits. *Applied Food Research*, *2*(2), 1-17. https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100185

Yang, F., Xia, W. S., Zhang, X. W., Xu, Y. S., & Jiang, Q. X. (2016). A comparison of endogenous and microbial proteolytic activities during fast fermentation of silver carp inoculated with *Lactobacillus plantarum*. *Food Chem,* 207, 86-92. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.049

Yesica, R., Paula, C. R., Adelfo, E., Martha, G., & Rogelio, V. (2022). Probiotic activity traits in vitro and production of antimicrobial peptides by Lactobacillaceae isolates from pulque using *Lactobacillus acidophilus* NCFM as control. *Braz J Microbiol*, *53*(2), 921–933. https://doi.org/10.1007/s42770-022-00684-7

Yilmaz, B., Bangar, S. P., Noemi, E., Shweta, S., Igor, T., Jose, M. L., Ebra, M., Rocha, J. M., & Fatih, O. (2022). The Impacts of *Lactiplantibacillus plantarum* on the Functional Properties of Fermented Foods: A Review of Current Knowledge. *Microorganisms*, *10*(4), 826. https://doi.org/10.3390/microorganisms1004082.