TUYỂN CHỌN CHỦNG VI KHUẨN *LACTIC* CÓ TIỀM NĂNG ỨNG DỤNG TẠO CHẾ PHẨM SINH HỌC (PROBIOTIC) BỔ SUNG VÀO THỨC ĂN CHĂN NUÔI

Nguyễn Thị Hồng Nhung, Lê Thị Thương, Nguyễn Thị Thu Hằng, Nguyễn Thị Huyền
Trường Đại học Lâm nghiệp

TÓM TẮT

Probiotic là những vi sinh vật sống khi được bổ sung vào cơ thể với liều lượng đủ lớn sẽ tạo ra lợi ích đối với sức khỏe của vật chủ. Mục đích nghiên cứu này là phân lập được vi khuẩn lactic từ các mẫu thực phẩm lên men đánh giá một số đặc tính probiotic của chúng để ứng dụng tạo chế phẩm probiotic bổ sung vào thức ăn chăn nuôi. Mười chủng vi khuẩn đã được phân lập sử dụng môi trường MRS (de Man, Rogosa & Sharpe). Sử dụng phương pháp khuếch tán đĩa thạch, 3 chủng C2, LA6 và LT7 có khả năng đối kháng tốt nhất với cả 3 loại vi khuẩn gây bệnh: *E. coli*, *Samonella* sp, *Shigella* sp. Những chủng này tiếp tục được đánh giá khả năng sinh enzyme ngoại bào (protease, cellulase, amylase). Kết quả cho thấy, chủng LT7 và C2 có khả năng sinh enzyme ngoại bào cao hơn chủng LA6. Hai chủng LT7 và C2 được đánh giá khả năng chịu pH thấp (từ 2 đến 4), chịu muối mật (0,5 - 3%), kháng 3 loại kháng sinh ((Tetracycline, Gentamycin, Streptomycin) nồng độ 10 - 50 µg/ml, nhận thấy chủng LT7 có khả năng chịu, pH thấp, muối mật và kháng sinh cao hơn chủng C2. Chủng LT7 đã được lựa chọn là chủng probiotic tiềm năng và được định danh là *Lactobacillus plantarum* dựa trên trình tự gen 16S rRNA (1445 bp) đã được phân tích. Nghiên cứu đặc tính sinh lý, sinh hóa của chủng này cho kết quả: tế bào hình que dài, không sinh catalase, có khả năng lên men lactose.

Từ khóa: *Lactobacillus plantarum*, muối mật, probiotics thức ăn chăn nuôi, thực phẩm lên men.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Probiotics đóng một vai trò quan trọng, là chất thích hợp nhất để thay thế kháng sinh vì nhiều lợi ích của nó và được sử dụng như chất kích thích tăng trưởng cho người và động vật bao gồm gia cầm và thủy sản (Palamidi I, 2016). Probiotics được định nghĩa là "các sinh vật sống mà khi được đưa vào cơ thể với lượng đủ lớn sẽ tạo ra lợi ích về sức khỏe cho vật chủ" (FAO/WHO, 2002). Probiotics cũng được định nghĩa như là thức ăn bổ sung vi sinh vật sống có lợi đối với vật chủ thông qua tăng cường sự cân bằng trong đường ruột và do đó nâng cao hiệu quả sử dụng thức ăn, hấp thụ chất dinh dưỡng, tốc độ tăng trưởng và mang lại hiệu quả kinh tế cho ngành chăn nuôi gia cầm (Abd El-Hack ME, 2017).

Các loài vi sinh vật phổ biến được tìm thấy trong các sản phẩm probiotics hiện nay là một số loài vi khuẩn có lợi, nấm hoặc nấm men và thường gặp nhất là các chủng *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* và *Streptococcus*, ngoài sự gia tăng hoạt động của chúng cũng làm giảm số lượng vi khuẩn có hại như: *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*... (Iannitti T, 2010).

Vi khuẩn lactic (LAB - Lactic Acid Bacteria) là vi sinh vật phổ biến được phân lập từ một số nguồn chính như: thực phẩm lên men, đất và thực vật. Chúng cũng là một phần của nhóm vi khuẩn có lợi sống trong đường tiêu hóa của động vật trên cạn và thủy hải sản. LAB là vi khuẩn Gram dương, tế bào hình que hoặc cầu; Chúng không di động, không sinh bào tử, không khử nitrate và catalase, oxidase âm tính. Những vi khuẩn này sử dụng carbonhydrate như là năng lượng chính và tạo ra axit lactic là sản phẩm duy nhất hoặc như là sản phẩm chính khi kết thúc quá trình của quá trình trao đổi chất. LAB gồm các chủng *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* và *Pediococcus* (Ringø E, 1998).

LAB có thể sản xuất axit, hydrogen peroxide, bacteriocin và có tiềm năng ứng dụng lớn làm chất bảo quản sinh học trong thực phẩm (Aslim, 2005). Đã có các nghiên cứu sử dụng các chủng LAB khác nhau để tạo chế phẩm probiotics, chủ yếu là *Lacobacillus*

và *Bifidobacteria* (nhóm vi khuẩn hội sinh sống trong đường ruột của người và động vật), cho thấy khả năng điều trị bệnh tốt (Lavanya, 2011).

LAB được coi như là một nhóm vi khuẩn probiotic chính cho con người và động vật (Chen, 2005). Vì chúng an toàn, có thể chịu được axit và muối mật. Chúng bám dính tốt vào biểu mô ruột của các vật chủ và có thể ức chế sự phát triển của vi khuẩn gây bệnh như *Escherichia coli* và *Salmonella* đó là những vi sinh vật gây bệnh chính trong đường ruột của gà (Murry, 2004). Chúng có thể duy trì khả năng tồn tại trong quá trình chế biến và bảo quản thức ăn gia súc (Lin, 2007). Vì vậy, nỗ lực để giảm kháng sinh trong chăn nuôi bằng cách sử dụng probiotic đang ngày càng được quan tâm, như một giải pháp thay thế hiệu quả về chi phí kiểm soát bệnh động vật và cải tiến năng suất vật nuôi (Reuter, 2001).

Mục tiêu của nghiên cứu này là tuyển chọn được các dòng LAB từ nguồn thực phẩm lên men để lựa chọn các chủng vi sinh vật tiềm năng có thể ứng dụng làm chế phẩm vi sinh bổ sung vào thức ăn chăn nuôi, chúng tôi đã thực hiện những thí nghiệm sàng lọc như: thử nghiệm hoạt tính đối kháng với vi khuẩn gây bệnh, khả năng sinh emzyme ngoại bào, khả năng chịu axit và chịu muối mật, khả năng kháng kháng sinh.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Các mẫu thực phẩm lên men (dưa muối, cà muối, măng chua, nem chua...) được thu mua tại khu vực Xuân Mai, Chương Mỹ, Hà Nội vào thời gian từ tháng 4 - 12/2017.

Các chủng vi khuẩn kiểm định: *E. coli*, *Samonella* sp, *Shigella* sp nằm trong bộ sưu tập giống vi sinh vật của Bộ môn Công nghệ Vi sinh - Hóa sinh, Viện Công nghệ Sinh học Lâm nghiệp.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập vi khuẩn lactic

Pha loãng mẫu đến các nồng độ khác nhau: 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}… hút 0,05 ml dịch mẫu ở mỗi nồng độ nhỏ lên đĩa peptri chứa môi trường thạch MRS (pH = 6,5; khử trùng 121^0C/15 phút). Nuôi ở 37^0C trong 48 giờ. Kiểm tra sự xuất hiện các khuẩn lạc trên đĩa petri, tách và thuần khiết các khuẩn lạc có vòng trong suốt xung quanh chúng (axit phân giải $CaCO_3$ tạo vòng trong).

2.2.2. Khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh

Ba chủng vi khuẩn kiểm định sử dụng là: *E. coli*, *Salmonella* sp, *Shigella* sp được nuôi qua đêm ở 28ºC trong môi trường Meat-Peptone (MP) lỏng. Sau đó, vi khuẩn kiểm định được cấy trải trên môi trường MP agar và đục những lỗ thạch đường kính 9 mm. LAB được nuôi trong 2 ml MRS lỏng, dưới điều kiện yếm khí tránh hình thành H_2O_2, tới giai đoạn pha tĩnh (khoảng 48 - 36 giờ). Dung dịch được ly tâm 10.000 vòng/phút trong 15 phút ở 4^0C. Loại bỏ phần cặn chứa xác tế bào vi khuẩn, lấy phần nước trong của dung dịch sau ly tâm, điều chỉnh pH tới 6,5 bằng NaOH 0,1 N thu được dung dịch bacteriocin thô. Lấy 0,1 ml dung dịch bacteriocin thô nhỏ vào mỗi giếng của đĩa thạch đã chứa dòng vi khuẩn chỉ thị. Ủ mẫu ở 4^0C trong 30 phút. Sau đó, ủ ở 37^0C cho vi khuẩn chỉ thị phát triển. Đối chứng: Giếng chứa 0,1 ml môi trường MRS lỏng. Hoạt tính kháng khuẩn của những dòng phân lập được tính bằng vùng vô khuẩn quanh miệng giếng trên đĩa (Buntin N, 2008).

2.2.3. Khả năng sinh enzyme ngoại bào

Thử nghiệm khả năng sinh một số enzyme: amylase, protease và cellulase thông qua các cơ chất tương ứng: tinh bột, casein, CMC (Carboxymethyl cellulose) bằng phương pháp đục lỗ thạch.

Chuẩn bị môi trường thạch (15% w/v) có bổ sung 1% chất cảm ứng thích hợp (tinh bột, casein, CMC), đục lỗ thạch có đường kính 0,9 cm. Nuôi các chủng vi LAB trên môi trường MRS lỏng trong khoảng 48 - 72 giờ, ly tâm 8.000 vòng/phút thu dịch enzyme thô. Nhỏ 0,1 ml dịch enzym vào các lỗ đã đục, để ở 4^0C trong vòng 30 phút, sau đó ủ ở 37^0C trong 24 giờ. Nhuộm bằng thuốc thử lugol, coomassie brilliant blue, congo đỏ để phát hiện vòng phân giải cơ chất tương ứng là: tinh bột, casein,

CMC. Đo vòng phân giải D-d (mm), D là đường kính vòng ngoài, d là đường kính lỗ nhỏ dịch (Trần Thanh Thủy, 1998).

2.2.4. Thử nghiệm khả năng chịu axit và muối mật

a. Khả năng chịu pH thấp

Các chủng LAB được nuôi qua đêm 16 - 18 giờ. Ly tâm 5000 vòng/10 phút ở 4^0C, thu cặn và huyền phù lại trong PBS (photphatse buffered saline) pH 7,0 tạo thành huyền dịch có độ đục McFarland 0,5 (0,5 ml dung dịch $BaCl_2$ 1% và 99,5 ml dung dịch H_2SO_4 1%, OD_{625} = 0,08 - 0,1) tương đương 10^8 CFU/mL. Chuyển dịch vi khuẩn vào bình nón chứa nước muối sinh lý (0,9% w/v) và chỉnh pH có giá trị lần lượt là: 1,5; 2; 2,5. Ủ ở 37^0C. Ở mỗi thời điểm 1 giờ, 2 giờ và 3 giờ lấy 1 ml dung dịch mẫu thử trung hòa về pH = 7. Tiến hành pha loãng đến mật độ thích hợp đếm được trong dung dịch đệm và trải trên đĩa peptri chứa môi trường MRS agar. Ủ ở 37^0C, trong 24 - 48 giờ. Đếm khuẩn lạc và tính số đơn vị sống của vi khuẩn khảo sát. Mỗi thí nghiệm tiến hành 3 lần (Cukrowska B, 2009).

b. Khả năng chịu muối mật

Các chủng LAB được hoạt hóa trong môi trường MRS, ủ qua đêm khoảng 16 - 18 giờ. Vi khuẩn được pha loãng đến độ đục McFarland 0,5 tương đương 10^8 CFU/mL. Lấy 1ml dịch vi khuẩn ly tâm, cho tiếp xúc với dịch muối mật với các nồng độ lần lượt 0,5%, 1%, 2%, 3% trong 1 giờ, 2 giờ, 3 giờ. Sau đó ly tâm rửa sạch và huyền phù tế bào vi khuẩn bằng dịch PBS (pH = 7). Tiến hành pha loãng đến mật độ thích hợp và cấy trải trên đĩa peptri chứa môi trường MRS agar. Ủ ở 37^0C, trong 24 - 48 giờ và đếm khuẩn lạc và tính số đơn vị sống của vi khuẩn khảo sát. Mỗi thí nghiệm tiến hành 3 lần.

Phần trăm sống sót = Ni/Nx ×100, Ni: Số lượng khuẩn lạc đếm được tại thời điểm nuôi cấy (1, 2, 3 giờ), Nx: Số lượng khuẩn lạc đếm được tại thời điểm 0 giờ (Cukrowska B, 2009).

2.2.5. Đánh giá độ nhạy cảm kháng sinh

Độ nhạy cảm kháng sinh của các chủng vi khuẩn đã phân lập được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán trên thạch theo hướng dẫn của CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014). Các kháng sinh được sử dụng bao gồm: Gentamycin nồng độ: 10 µg/ml; Streptomycin, Tetracylin nồng độ: 10, 50 µg/ml. Đo kích thước vòng vô khuẩn và đánh giá độ nhạy cảm kháng sinh (kháng R, trung gian I và nhạy cảm S).

2.2.6. Phương pháp định danh chủng vi khuẩn

a. Định danh bằng phương pháp sinh học phân tử

Tách chiết DNA và khuyếch đại gen 16S rRNA bằng phản ứng PCR (polymerase chain reaction). Vùng gen 16S rRNA được khuếch đại bằng cặp mồi phổ biến:

Mồi xuôi 27F: 5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG - 3';

Mồi ngược 1525R: 5'-AAA GGA GGT GAT CCA GCC - 3'.

Thành phần phản ứng PCR:

Thành phần	Thể tích (µl)
Master mix 2x	10
Primer xuôi (20 pmol/µl)	2
Primer ngược (20 pmol/µl)	2
DNA khuôn	2
H_2O	vừa đủ 20

Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR:

Bước 1	Bước 2: lặp lại 40 chu kỳ			Bước 3	
94^0C: 5 phút	94^0C: 45 giây	$54,5^0$C: 45 giây	72^0C: 1 phút	72^0C: 7 phút	4^0C: ∞

b. Phương pháp nghiên cứu sử dụng công cụ BLAST và phân tích phát sinh loài

Dữ liệu trình tự nucleotide 16S rRNA của chủng vi khuẩn được gửi vào cơ sở dữ liệu trên NCBI để xác định loài gần nhất đã biết của một phần trình tự 16S rRNA thu được, tìm kiếm các trình tự tương đồng bằng công cụ BLAST (Saeedi M, 2015).

Cây phát sinh loài được xây dựng bởi phương pháp thống kê "neighbor-joining" với phiên bản Mega 6.0 (Kumar M, 1980).

c. Xác định đặc tính sinh lý, sinh hóa: Nhuộm Gram; Quan sát hình dạng khuẩn lạc, tế bào; phản ứng catalase, khả năng lên men các loại đường (Trần Thanh Thủy, 1998).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập các chủng vi khuẩn

Từ các mẫu thực phẩm lên men (rau quả lên men, nem chua, thịt chua) đã phân lập được 10 chủng vi khuẩn. Mười chủng này được quan sát hình thái khuẩn lạc và một số đặc tính sinh hóa, sinh lý cho kết quả: khuẩn lạc có màu trắng sữa, tròn, nhẵn, mép trơn, bề mặt ướt và xung quanh có vòng trong suốt do $CaCO_3$ bị phân giải bởi axit lactic, tế bào hình que dài, gram dương, không sinh bào tử, catalase âm tính.

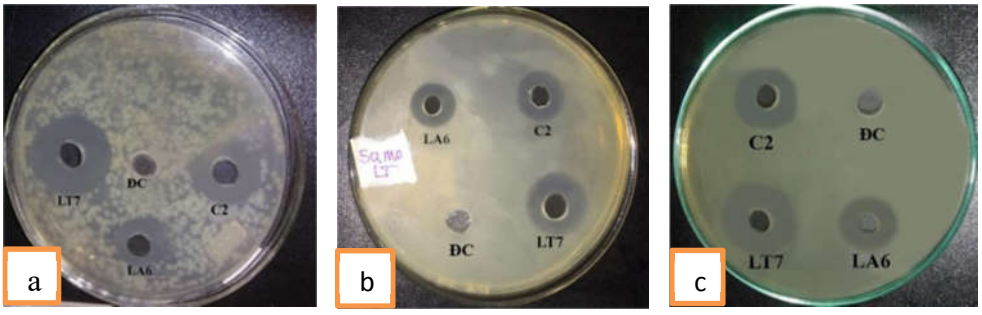
3.2. Kết quả khảo sát hoạt tính đối kháng với vi sinh vật kiểm định

Để hạn chế sự phát triển của vi khuẩn gây bệnh, ngoài việc cạnh tranh vị trí bám dính thì khả năng đối kháng với vi khuẩn gây bệnh là một đặc tính rất quan trọng của các chủng vi sinh vật được chọn làm probiotics. Từ 10 chủng phân lập được, tuyển chọn chủng có hoạt tính đối kháng mạnh với 3 chủng vi khuẩn kiểm định gồm *E. coli* (gây tiêu chảy, viêm ruột, tạo độc tố đường ruột ở động vật), *Salmonella* sp (sốt thương hàn, gây tiêu chảy ở người và vật nuôi) và *Shigella* sp (trực khuẩn lị gây bệnh đường ruột, tiêu chảy ở người và vật nuôi). Kết quả thu được ở bảng 1 và hình 1.

Bảng 1. Kết quả vòng kháng vi sinh vật kiểm định

STT	Kí hiệu chủng	Đường kính vòng kháng khuẩn (D-d) mm		
		E. coli	***Salmonella***	***Shigella***
1	LA1	10 ± 0,01	11,5 ± 0,01	10 ± 0,01
2	LA2	13 ± 0,02	9 ± 0,01	12,5 ± 0,01
3	C2	20 ± 0,01	19 ± 0,01	17,5 ± 0,01
4	LA4	10,5 ± 0,01	14 ± 0,02	9,5 ± 0,01
5	LA5	12,5 ± 0,01	10 ± 0,01	6 ± 0,01
6	LA6	19 ± 0,02	16,5 ± 0,01	18 ± 0,01
7	LT7	22 ± 0,01	18 ± 0,01	18,5 ± 0,01
8	LA8	15,5 ± 0,01	13 ± 0,02	14,5 ± 0,01
9	LA9	15,5 ± 0,01	12 ± 0,01	16 ± 0,01
10	LA10	14 ± 0,01	13,5 ± 0,02	15 ± 0,01

D: Đường kính vòng kháng khuẩn; d: đường kính lỗ thạch; n = 3



Hình 1. Khả năng đối kháng với vi khuẩn kiểm định của các chủng Lactic

a. E. coli *b. Samonella* sp *c. Shigella* sp

Hầu hết các chủng phân lập được điều có khả năng kháng các vi sinh vật kiểm định. Trong đó, có 7 chủng kháng từ yếu đến trung bình: vòng kháng khuẩn đo được từ 6 ÷ 16 mm và 3 chủng C2 , LA6 và LT7 có khả năng kháng mạnh với hầu hết các chủng vi sinh vật gây bệnh từ 16,5 ÷ 22 mm. Cụ thể, vòng kháng khuẩn đo được của 3 chủng C2, LT7, LA6 đối với *Ecoli* sp là: 18 ÷ 22 mm, đối với 2 chủng *Samonella* sp và *Shigella* sp là: 16,5 ÷ 19 mm. Như vậy, 3 chủng vi khuẩn: C2, LA6, LT7 được chọn lọc để thực hiện những nghiên cứu tiếp theo.

3.3. Kết quả xác định khả năng sinh enzyme ngoại bào

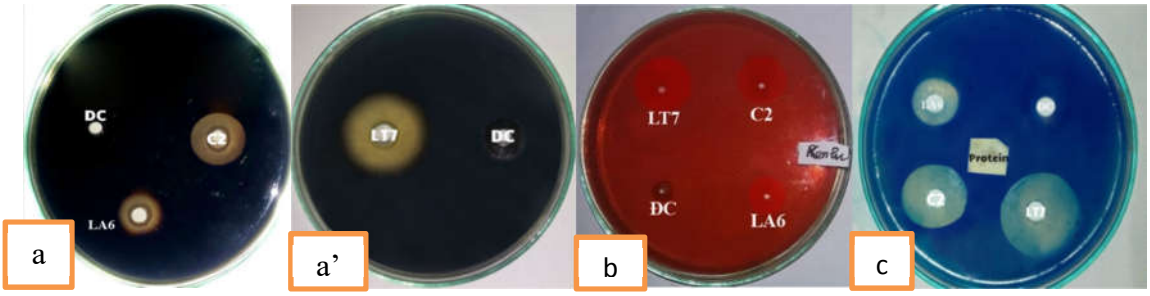
Khả năng sinh enzyme ngoại bào của các chủng probiotics có vai trò rất quan trọng, nhằm hỗ trợ tiêu hóa thức ăn, chuyển hóa các chất khó tiêu thành các chất dễ tiêu, phân hủy các thức ăn dư thừa trong chuồng nuôi làm giảm mùi hôi thối của chuồng trại.

Từ 3 chủng lactic đã được chọn lọc ở bước trên, khảo sát khả năng sinh enzyme ngoại bào (amylase, protease, cellulase). Kết quả thu được như bảng 2 và hình 2.

Bảng 2. Hoạt tính enzyme ngoại bào của các chủng vi sinh vật

STT	Kí hiệu chủng	Đường kính vòng phân giải (D-d) mm		
		Tinh bột	CMC	Casein
1	C2	20 ± 0,01	25 ± 0,01	19,5 ± 0,01
2	LT7	20 ± 0,01	30 ± 0,01	30 ± 0,01
3	LA6	16 ± 0,01	16,5 ± 0,01	16,5 ± 0,01

D: Đường kính vòng phân giải; d: đường kính lỗ thạch



Hình 2. Khả năng sinh enzyme ngoại bào của các chủng Lactic

a, a': Amylase b. Cellulase c. Protease

Cả 3 chủng đều có khả năng sinh enzyme ngoại bào ở mức từ trung bình đến mạnh. Cụ thể vòng phân giải cơ chất của các chủng: LA6 từ 16 ÷ 16,5 mm (khả năng sinh enzyme ở mức trung bình); C2 từ 19,5 ÷ 25 mm (khả năng sinh enzyme ở mức cao); LT7 từ 20 ÷ 30 mm (khả năng sinh enzyme ở mức rất cao). Do vậy, chọn lựa 2 chủng là: C2, LT7 để tiếp tục nghiên cứu tiếp theo.

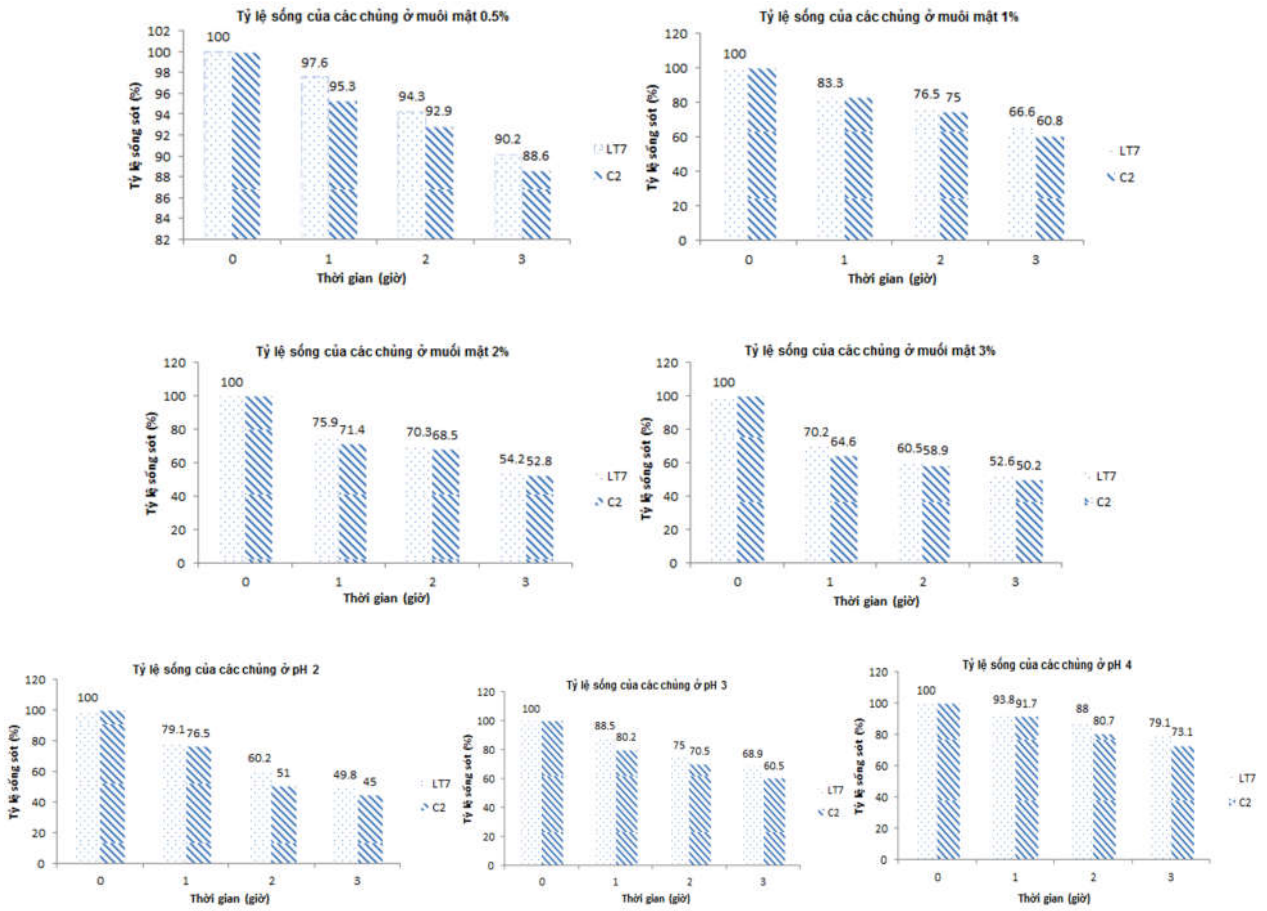
3.3. Kết quả xác định khả năng chịu pH thấp và muối mật

Tiến hành thử nghiệm các chủng trên ở 3 mức pH 2, 3, 4 và muối mật ở các nồng độ 0,5%, 1%, 2%, 3% trong khoảng thời gian từ 1 đến 3 giờ. Theo hình 3, dưới tác động của pH thấp và muối mật cả 2 chủng khảo sát đều có xu hướng giảm tỉ lệ sống khi kéo dài thời gian xử lý (0 đến 3 giờ), giảm độ pH (4 xuống 2) và tăng nồng độ muối mật (từ 0,5% đến 3%).

Ta thấy, sau 3 giờ nuôi ủ, số lượng tế bào sống sót ở pH 2 của 2 chủng là khá cao: đạt > 50% (chủng LT7) và 45% (chủng C2), ở pH 3 và 4 thì tỉ lệ này lần lượt là: > 60% và > 70% đối với 2 chủng. Ở nồng độ muối mật 0,5%, sau 3 giờ nuôi ủ, 2 chủng có tỷ lệ sống cao trên 90% (chủng LT7) và gần 90% (chủng C2). Còn ở nồng độ muối mật cao 3% thì sau 3 giờ tỷ lệ sống là > 50% đối với cả 2 chủng (Hình 3). Nhận thấy chủng LT7 có khả năng chịu pH thấp và muối mật tốt hơn chủng C2.

Theo Zhou và cộng sự (2007) cho rằng giá trị pH 2 và pH 3 được xem là giới hạn quyết định trong sàng lọc các chủng vi sinh vật có tiềm năng sử dụng làm probiotic. Kết quả nghiên cứu của Kim và cộng sự (2007) cho thấy khi xử lý bằng dịch dạ dày pH 2,5 có 3/7 chủng vi khuẩn có khả năng chịu môi trường acid, tuy nhiên, tỉ lệ sống của các chủng này giảm mạnh chỉ còn 0,8% đến 8% sau 30 phút xử lý và tiếp tục giảm mạnh sau 2 giờ xử lý (từ 0,04% đến 0,2% so với ban đầu). Nhóm tác giả Dương Nhật Linh và cộng sự (2011) khi phân lập được các chủng probiotic có tỷ lệ sống ≥ 60% sau 3 giờ ở pH 2,5 và ở nồng độ muối mật 0,3% sau 3 giờ các chủng có tỷ lệ sống > 90%.

Tương tự kết quả nghiên cứu của chúng tôi, nghiên cứu của Kim và cộng sự (2007), Trần Quốc Việt và cộng sự (2009) cũng cho thấy các chủng vi sinh vật thử nghiệm đều có khả năng tồn tại trong môi trường chứa muối mật với nồng độ 0,3%.



Hình 3. Tỷ lệ sống của các chủng vi khuẩn Lactic thử nghiệm theo thời gian 1, 2 và 3 giờ ở pH 2; 3; 4 và muối mật ở các nồng độ 0,5%; 1%; 2%; 3%

3.4. Kết quả khả năng đề kháng kháng sinh

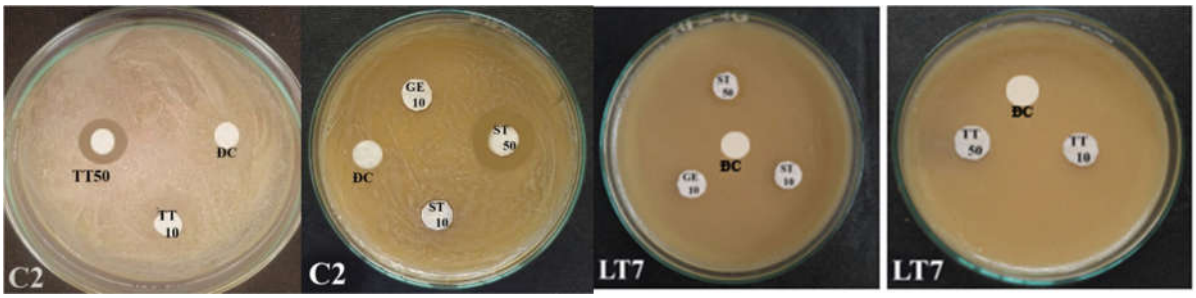
Tiến hành thử nghiệm với 3 loại kháng sinh: Gentamycin, Tetracycline, Streptomycin là 3 loại kháng sinh được dùng phổ biến để chữa các bệnh thường gặp ở gia súc và gia cầm (Lavanya, 2011).

Sử dụng với liều tối thiểu có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn gây bệnh (5 - 30 µg/ml): Gentamycin (Ge) nồng độ 10 µg/ml; Tetracycline (TT) nồng độ 50 µg/ml, 10 µg/ml Streptomycin (St) nồng độ 50 µg/ml, 10 µg/ml. Kết quả thu được ở bảng 3.

Bảng 3. Kết quả kháng kháng sinh của các chủng vi khuẩn lactic

STT	Kí hiệu mẫu	Tetracycline (µg/ml)		Gentamycin (µg/ml)	Streptomycin (µg/ml)	
		10	50	10	10	50
1	C2	R	S	R	R	S
2	LT7	R	R	R	R	R

Ghi chú: R: Kháng; S: Nhạy cảm.



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

Hầu hết các chủng vi sinh vật được tuyển chọn đều có khả năng kháng mạnh cả 3 loại kháng sinh khảo sát: Streptomycine, Tetramycline, Gentamycin ở nồng độ 10 µg/ml. Như vậy, trong quá trình điều trị bệnh thường gặp cho vật nuôi, có thể phối hợp sử dụng các chủng vi sinh vật này với các chất kháng sinh (Tetracycine, Streptomycin, Gentamycin) 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 trên trong đường ruột của vật nuôi.

Chủng LT7 có khả năng sinh enzyme ngoại bào cao, khả năng chịu pH thấp và muối mật và kháng kháng sinh tốt nhất trong số các chủng phân lập được. Chủng LT7 được chọn là chủng probiotic tiềm năng ứng dụng tạo chế phẩm sinh học bổ sung vào thức ăn chăn nuôi. Chủng LT7 được nghiên cứu đặc điểm sinh học và định danh đến loài.

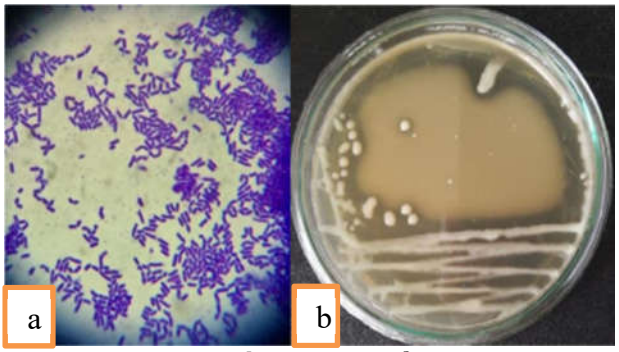
3.4. Kết quả định danh chủng

Đặc điểm sinh lý, sinh hóa của chủng LT7 thể hiện ở bảng 4 và hình 5.

Bảng 4. Đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa của chủng LT7

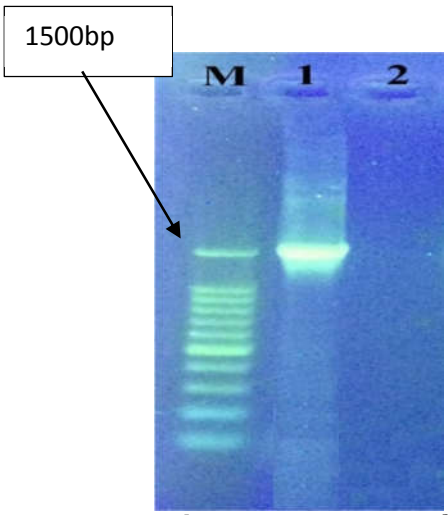
Hình dạng khuẩn lạc	Hình dạng tế bào	Gram	Catalase
Khuẩn lạc hình tròn, trắng sữa, bề mặt lồi trơn, mép nhẵn, kích thước 1,5 – 2,5 mm.	Trực khuẩn (hình que dài), đứng riêng rẽ hoặc thành đám.	+	-

Khả năng lên men các loại đường				
Glucose	Manitol	Fructose	Sucrose	Lactose
+	+	+	+	+



Hình 5. Hình thái tế bào và khuẩn lạc chủng LT7

a: Hình thái tế bào; b: Hình thái khuẩn lạc

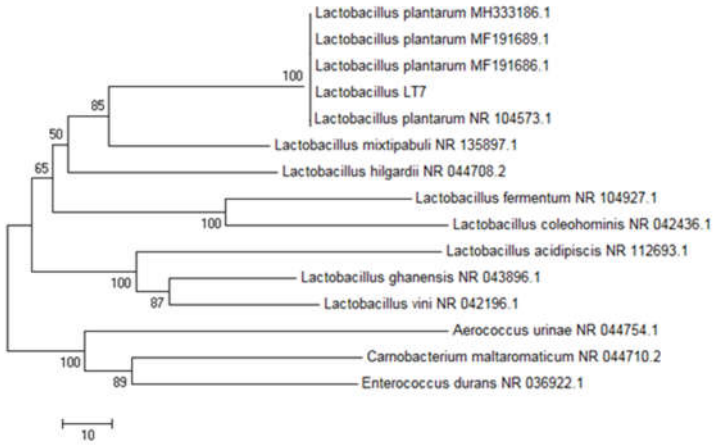


Hình 6. Kết quả điện di sản phẩm PCR

Giếng M: Thang DNA 100bp, Giếng 1: Chủng LT7. Giếng 2: Mẫu âm tính vi khuẩn

Kết quả ở hình 6 cho thấy hệ gen của chủng LT7 đã được tách chiết và đoạn gen 16S rRNA được khuếch đại thành công với sản phẩm PCR thu được có chất lượng tốt: một băng sáng rõ duy nhất trên gel điện di với kích thước đoạn gen khoảng 1500 bp.

Sản phẩm PCR của chủng LT7 được gửi đến Công ty TNHH Phát Triển Công Nghệ Ứng Dụng Việt Nam, để giải trình tự định danh đến loài. Kết quả giải trình tự đoạn gen 16S rRNA của LT7 cho thấy đoạn gen gồm 1445 bp. Cây phát sinh loài được xây dựng (hình 7), chủng LT7 nằm trên cùng một nhánh với nhóm *Lactobacillus plantarum.* Tiến hành so sánh trên Genbank của NCBI trình tự gen 16s rRNA của chủng LT7 có độ tương đồng là 100% với loài *Lactobacillus plantarum* MH33186.1 khi tiến hành BLAST.



Hình 7. Cây phát sinh loài của chủng LT7

Lactobacillus plantarum, một trong những vi khuẩn lactic khá phổ biến được tìm thấy trong các thực phẩm lên men và trong đường ruột của người và động vật. Chúng được sử dụng làm probiotic ngày càng nhiều trong những năm gần đây. Hơn nữa, chúng được nghiên cứu là không những an toàn tuyệt đối cho con người và động vật mà còn có nhiều ưu điểm trong việc điều trị chứng rối loạn tiêu hóa liên quan đến kháng sinh (Alba I.P, 2011). Do vậy, chủng tuyển chọn LT7 có tiềm năng sử dụng làm probiotic bổ sung vào thức ăn chăn nuôi. Tuy nhiên, cần phải có các nghiên cứu thêm khi ứng dụng vào thực tiễn.

4. KẾT LUẬN

Từ các mẫu thực phẩm lên men (rau quả lên men, nem chua, thịt chua) đã phân lập 10 chủng vi khuẩn lactic (khuẩn lạc có màu trắng sữa, tròn, nhẵn, mép trơn, bề mặt ướt và xung quanh có vòng trong suốt và có một số đặc tính sinh lý, sinh hóa là: là trực khuẩn, gram dương, không sinh bào tử, catalase âm tính).

Chọn lọc được 3 chủng C2, LT7 và LA6 có hoạt tính kháng khuẩn tốt nhất với cả 3 loại vi khuẩn gây bệnh: *E. coli*, *Samonella* sp, *Shigella* sp, đường kính vòng vô khuẩn từ 16,5 ÷ 22 mm. Ba chủng này được đánh giá khả năng sinh enzyme ngoại bào (protease, cellulase, amylase). Kết quả cho thấy, chủng LT7 và C2 (đường kính vòng phân giải 19,5 ÷ 30 mm) có khả năng sinh enzyme ngoại bào cao hơn chủng LA6 (đường kính vòng phân giải từ 16 ÷ 16,5 mm).

Hai chủng LT7 và C2 được đánh giá khả năng chịu pH thấp (2 ÷ 4), chịu muối mật (0,5 ÷ 3%), kháng 3 loại kháng sinh (Tetracycline, Gentamycin, Streptomycin) nồng độ 10 ÷ 50 µg/ml, nhận thấy chủng LT7 có khả năng chịu pH thấp, muối mật và kháng sinh cao hơn chủng C2. Chủng LT7 đã được lựa chọn là chủng probiotic tiềm năng và được định danh là *Lactobacillus plantarum* dựa trên trình tự gen 16S rRNA (1445 bp) đã được phân tích. Nghiên cứu đặc tính sinh lý, sinh hóa của chủng này cho kết quả: tế bào hình que dài, không sinh catalase, có khả năng lên men lactose.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Dương Nhật Linh, Nguyễn Văn Minh, Đan Duy Pháp, Vũ Thanh Thảo, Trần Cát Đông (2011). Phân lập và sàng lọc một số vi khuẩn lactic có tiềm năng làm probiotic. *Tạp chí Y học Thành phố Hồ Chí Minh*, tập 15 (số 1): 182-188.

2. Trần Quốc Việt, Bùi Thị Thu Huyền, Dương Văn Hợp và Vũ Thành Lâm (2009). Phân lập, tuyển chọn và đánh giá các đặc tính probiotic của một số chủng vi sinh vật hữu ích để sản xuất các chế phẩm probiotic dùng trong chăn nuôi. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Chăn nuôi*, tập 16: 35-45.

3. Trần Thanh Thủy (1998). *Hướng dẫn thực hành vi sinh vật học*. Nhà xuất bản giáo dục.

4. Abd El-Hack ME, Mahgoub SA, Alagawany M, Ashour EA (2017). Improving productive performance and mitigating harmful emissions from laying hen excreta via feeding on graded levels of corn DDGS with or without Bacillus subtilis probiotic. *Anim Physiol Anim Nutr,* 101(5): 904–913.

5. Alba I.P, Arturo L.M (2012). *Lactobacillus: classification, uses and health implications*, Chapter: Lactobacillus planturum: An overview with emphasis in biochemical and healthy propertites. Nova Publishing.

6. Aslim, B., Yukesekdag, Z. N., Sarikaya, E. and Beyatli, Y (2005). Determination of the bacteriocin-like substances produced by some lactic acid bacteria isolated from Turkish dairy products. *LWT-Food Science and Technology*, 38: 691-694.

7. Buntin N., Chanthachum S., Hongpattarakere T. (2008). Screening of lactic acid bacteria from gastrointestinal tracts of marine fish for their potential use as probiotic. *Songklanakarin J. Sci. Technol*, 30: 141-148.

8. Chen, Y.J., K.S. Son, B.J. Min, J.H. Cho, O.S. Kwon and I.H. Kim (2005). Effects of dietary probiotic on growth performance, nutrients digestibility, blood characteristics and fecal noxious gas content in growing pigs. *Asian-Aust. J. Anim. Sci*, 18: 1464–1468.

9. Clinical and Laboratory Standards Institute (2014). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Twenty-fourth Informational Supplement. (CLSI document M100-S24)*.

10. Cukrowska B., Motyl I., Kozáková H., Schwarzer M., Górecki R. K., Klewicka E., Śliżewska K., Libudzisz Z. (2009). Probiotic *Lactobacillus* Strains: in vitro and in vivo Studies Folia Microbiol. *Folia Microbiologica*, 54: 533-537.

11. FAO/WHO (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. [Cited Oct 2012]. Available from http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf

12. Iannitti T, Palmieri B (2010). Therapeutical use of probiotic formulations in clinical practice. *Clin Nutr*, 29: 701–725.

13. 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. *Appl Microbiol Biotechnol*, 74: 1103-1111.

14. Kimura M (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Mol Evol*, 16: 111–120.

15. Kumar S, Stecher G, Tamura K (2015). *MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 for bigger datasets*. Mol Biol Evol, 33(7): 1870–1874.

16. Lavanya, B., Sowmiya, S., Balaji, S. and Muthuvelan, B (2011). Screening and characterization of lactic acid bacteria from fermented milk. *British Journal of Dairy Sciences*, 2(1): 5-10.

17. Lin, W-H, B. Yu, J. Sheng-Hon and T. Hau-Yang (2007). Different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* strains isolated from swine and poultry. *Anaerobe*, 13: 107-113.

18. Murry, A.C., A. Hinton and H. Morrison (2004). Inhibition of growth of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Clostridium perfringens* on chicken feed media by *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus plantarum.* Int. J. Poult. Sci, 3 (9): 603-607.

19. M. M. Brashears, D. Jaroni, and J. Trimble (*2003*). Isolation, Selection, and Characterization of Lactic Acid Bacteria for a Competitive Exclusion Product To Reduce Shedding of Escherichia coli O157:H7 in Cattle. *J. of Food Protection*: March 2003, Vol. 66, No. 3, pp. 355-363.

20. Palamidi I, Fegeros K, Mohnl M, Abdelrahman WHA, Schatzmayr G, Theodoropoulos G, Mountzouris KC (2016). Probiotic form effects on growth performance, digestive function, and immune related biomarkers in broilers. *Poult Sci* 95:1598–1608

21. Reuter, G. (2001). *Probiotics-possibilities and limitations of their application in food, animal feed, and in pharmaceutical preparations for men and animals*. Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 114: 410-419.

22. Ringø E, Gatesoupe FJ (1998). Lactic acid bacteria in fish: a review. Aquaculture 160:177–203

23. Saeedi M, Shahidi F, Mortazavi SA, Milani E, Yazdi FT (2015). Isolation and identification of lactic acid bacteria in winter salad (Local Pickle) during fermentation using 16S rRNA gene sequence analysis. *J. Food Saf* 35: 287–294

24. Saitou N, Nei M (1987). *The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees*. Mol Biol Evol 4:406–425.

25. Vural HC, Ozgun D (2011). An improving DNA isolation method for identification of anaerobic bacteria in human colostrum and faeces samples. *J Med Genet Genom* 3:95–100

26. Zhou X., Pan Y., Wang Y., and Li W (2007). In vitro assessment of gastrointestinal viability of two photosynthetic bacteria, Rhodopseudomonas palustris and Rhodobacter sphaeroides. *J. Zhejiang Univ Sci B*, 8(9): 686-692.

SCREENING OF LACTIC ACID BACTERIA AS POTENTIAL PROBIOTIC ADD TO ANIMAL FEED

Nguyen Thi Hong Nhung, Le Thi Thuong, Nguyen Thi Thu Hang, Nguyen Thi Huyen
Vietnam National University of Forestry

SUMMARY

Probiotics are defined as "Live microorganisms which when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host". This study aimed to isolate lactic acid bacteria from fermented foods and evaluate their probiotic properties for application as probiotic additives in animal feed. Ten bacteria strains were isolated using MRS (de Man, Rogosa & Sharpe) media. Using an agar well diffusion method, three strains, LT7, C2 and LA6, showed the best antagonistic activities against all test pathogens belonging to *E. coli*, *Salmonella* sp, *Shigella* sp. These strains were evaluated the potential production of extracellular enzymes. The results showed that LT7 and C2 strains were able to higher extracellular enzyme production than LA6 strain. Two strains, LT7 and C2, were evaluated tolerance to low pH (2 - 4), bile salt tolerance (0.5 - 3%), resistance to 3 antibiotics (Tetracycline, Gentamycin, Streptomycin) 10 - 50 μg/ml, found that strain LT7 displayed higher tolerance than strain C2. Thus, strain LT7 was selected as a probiotic candidate and identified as *Lactobacillus plantarum* based on the sequences determined in 16S rRNA gene (1445 bp) analysis. It was observed to be ovoid in shape and to be catalase-negative, to be able to fermented lactose.

Keywords: Animal feed, bile salt, fermented food, *Lactobacillus plantarum*, probiotics.

Ngày nhận bài : 25/12/2018
Ngày phản biện : 18/3/2019
Ngày quyết định đăng : 25/3/2019