

## PHÂN LẬP VÀ ĐÁNH GIÁ ĐẶC TÍNH SINH HỌC CỦA CÁC CHỦNG VI KHUẨN *LACTOBACILLUS* CÓ TIỀM NĂNG PROBIOTICS SỬ DỤNG TRONG CHĂN NUÔI

Nguyễn Thị Quỳnh Anh<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Hoa<sup>1</sup>, Phan Thị Hằng<sup>1</sup>,  
Nguyễn Xuân Hòa<sup>1</sup>, Phan Vũ Hải<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Kim Nga<sup>2</sup>, Lê Minh Đức<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế;

<sup>2</sup>Công ty cổ phần Công nghệ sinh học R.E.P.

\*Tác giả liên hệ: [leminhduc.1104@huaf.edu.vn](mailto:leminhduc.1104@huaf.edu.vn)

Nhận bài: 31/10/2023 Hoàn thành phản biện: 03/12/2023 Chấp nhận bài: 07/12/2023

### TÓM TẮT

Nghiên cứu này nhằm phân lập chủng vi khuẩn *Lactobacillus* từ phân gà và đánh giá các đặc tính sinh học của chúng nhằm hướng đến chọn chủng tiềm năng cho việc nghiên cứu sản xuất probiotics. Mẫu được xét nghiệm tại phòng thí nghiệm Khoa Chăn nuôi Thú y, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế. Kết quả nghiên cứu cho thấy có 28 chủng vi khuẩn đã được phân lập với các đặc điểm hình thái và sinh hoá của *Lactobacillus* như các tài liệu đã mô tả trước đây. Kết quả kiểm tra tính đề kháng kháng sinh cho thấy có 100% chủng vi khuẩn kháng với 2/5 loại kháng sinh thử nghiệm, tất cả 28 chủng đều có khả năng sinh protease và amylase ngoại bào, có 24/28 chủng đề kháng với các loại vi khuẩn đường ruột như *E. coli* và *Salmonella* trong đó các chủng LB14, LB21, LB27 có khả năng kháng *Salmonella* mạnh nhất (đường kính 22mm) và chủng LB17 có khả năng kháng lại *E. coli* mạnh nhất (đường kính 15mm). Kết quả nghiên cứu này là tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo về các điều kiện tối ưu hóa cho sự phát triển của vi khuẩn *Lactobacillus* nhằm hướng đến sản xuất chế phẩm probiotics sử dụng trong chăn nuôi.

**Từ khóa:** *Lactobacillus*, Emzym nội bào, Kháng kháng sinh

## ISOLATION, AND BIOLOGICAL CHARACTERISTICS EVALUATION OF *LACTOBACILLUS* STRAINS FOR POTENTIAL PROBIOTIC USE IN ANIMAL PRODUCTION

Nguyen Thi Quynh Anh<sup>1</sup>, Nguyen Thi Hoa<sup>1</sup>, Phan Thi Hang<sup>1</sup>,  
Nguyen Xuan Hoa<sup>1</sup>, Phan Vu Hai<sup>1</sup>, Nguyen Thi Kim Nga<sup>2</sup>, Le Minh Duc<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>University of Agriculture and Forestry, Hue University;

<sup>2</sup>R.E.P. Biotechnology Joint Stock Company.

### ABSTRACT

The purpose of this study was to isolate potentially probiotic *Lactobacillus* strains from chicken manure and evaluate their biological properties. The experiment was implemented at the laboratory of the Department of Animal sciences and Veterinary medicine, University of Agriculture and Forestry, Hue University. After isolation, *Lactobacillus* strains were tested for antibiotic resistance, extracellular enzyme production and resistance to intestinal bacteria. The study results indicated that all of 28 isolated strains had typical characteristics of *Lactobacillus* bacteria. Regarding the biological characteristics of bacteria, the results showed that 100% of bacterial strains were resistant to 2/5 tested antibiotics, all 28 strains were capable of producing extracellular protease and amylase. Furthermore, 24/28 strains were resistant to intestinal bacteria. Among them, strains LB14, LB21, LB27 had the strongest resistance to *Salmonella* (22mm) and strain LB17 had the strongest resistance to *E. coli* (15mm). The results of this study are the basis for further research on optimal conditions for the growth of *Lactobacillus* bacteria with a view to develop the probiotic products using in animal farming.

**Keywords:** *Lactobacillus*, Intracellular enzyme, Antibiotic resistance

## 1. MỞ ĐẦU

Theo tổ chức Nông Lương thế giới (FAO), Việt Nam là một trong ba nước trong khu vực được dự đoán có tỷ lệ sử dụng thuốc kháng sinh ở vật nuôi tăng cao nhất trong giai đoạn 2010 – 2030 (FAO, 2016). Hiện tượng kháng thuốc kháng sinh có ảnh hưởng đến tính bền vững của hệ thống sản xuất lương thực, quản lý chăn nuôi và an toàn dịch bệnh. Do đó, việc phát triển các chất thay thế kháng sinh đang nhận được sự quan tâm đáng kể (Turner và cs., 2001). Kháng sinh khi được sử dụng trong thời gian kéo dài đã dẫn đến tình trạng kháng thuốc của vi khuẩn hoặc rối loạn hệ vi sinh vật đường ruột. Ngoài ra, sự tồn dư kháng sinh trong thịt gia súc, gia cầm và thủy, hải sản đã ảnh hưởng đến chất lượng thịt, giảm giá thành sản phẩm ảnh hưởng đến sức khỏe con người, gây ra những tác động tiêu cực đến năng suất, chất lượng và ảnh hưởng xấu cho môi trường sinh thái (Nguyễn Thị Trúc Linh, 2018).

Các sản phẩm có nguồn gốc tự nhiên ngày càng được sử dụng phổ biến nhằm nâng cao sức khỏe và bảo vệ con người trước các yếu tố bệnh tật, một trong số đó là các probiotic ngày càng được quan tâm và sử dụng nhiều trên thế giới (Senok, 2005). Vi khuẩn thuộc nhóm *Lactobacillus* là nhóm điển hình được sử dụng trong nhiều sản phẩm probiotic cho người và động vật. Vi khuẩn này mang lại nhiều lợi ích cho vật chủ như bám vào tế bào biểu mô ruột, tồn tại và tăng mật độ trong vật chủ, ngăn chặn hoặc giảm sự bám vào tế bào của các tác nhân gây bệnh, cạnh tranh dinh dưỡng với vi khuẩn gây bệnh, kích thích miễn nhiễm cho vật chủ, tạo ra acid, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> và bacteriocin để ức chế sự tăng trưởng của các tác nhân gây bệnh (Reid, 2006). Bacteriocin được

tạo ra bởi các chủng *Lactobacillus* có khả năng ức chế được nhiều loài vi khuẩn gây bệnh (Kizerwetter-Swida and Binek, 2009). Trịnh Hùng Cường (2011) và cs. đã phân lập các chủng *Lactobacillus* spp. có khả năng ức chế được vi khuẩn *Vibrio* spp.. Hệ vi sinh vật có lợi trong đường tiêu hóa gia súc gia cầm có sự khác biệt về quá trình thích nghi trên các cấu trúc niêm mạc khác nhau vì vậy Timmerman và cs., (2006) đã cung cấp bằng chứng cho thấy chế phẩm sinh học đặc trưng cho loài có tác dụng tốt hơn so với chế phẩm sinh học có nguồn gốc từ các loài khác. Chính vì vậy, khi phát triển chế phẩm sinh học dùng cho gia cầm, việc sử dụng các vi sinh vật bản địa được ưu tiên hơn, vì nó không chỉ mang lại cơ hội tốt nhất cho sự sống sót của lợi khuẩn mà còn làm giảm bớt nhiều thách thức liên quan đến việc đưa vi khuẩn ngoại lai vào (Dunne, 2001; Schrezenmeir và De Vrese, 2001). Một số chế phẩm probiotic đang lưu hành tại Việt Nam có nhiều thành phần vi khuẩn trong đó chủ yếu là *Bacillus* và *Lactobacillus*, tuy nhiên nguồn nguyên liệu hoàn toàn ngoại nhập, giá thành cao. Do đó việc nghiên cứu các vi sinh vật, đặc biệt là nhóm vi khuẩn *Lactobacillus* có tiềm năng để tạo chế phẩm probiotic nhằm khắc phục các tình trạng trên là hết sức cần thiết.

Để tạo tiền đề cho việc sản xuất một chế phẩm sinh học đảm bảo cho chăn nuôi gia cầm, chúng tôi tiến hành tuyển chọn các chủng *Lactobacillus* được phân lập từ ruột gà, kiểm tra các đặc điểm sinh học của vi khuẩn *Lactobacillus* để phát triển chế phẩm sinh học cải thiện sức khỏe đường tiêu hóa, thông qua đó làm tăng khả năng tiêu hóa các chất dinh dưỡng, tăng hiệu quả sinh trưởng và hiệu quả kinh tế, giảm sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi gà thịt.

## 2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Nội dung

Phân lập các chủng *Lactobacillus* spp. từ đường tiêu hóa gà thịt.

Xác định một số đặc tính sinh học của các chủng *Lactobacillus* phân lập được bao gồm: khả năng sinh enzyme ngoại bào, khả năng kháng kháng sinh của vi khuẩn, khả năng kháng *E. coli* và *Salmonella* của các chủng phân lập được.

### 2.2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Vật liệu nghiên cứu

Mẫu phân lập *Lactobacillus* spp.: 52 mẫu phân gà được lấy từ 26 hộ chăn nuôi gà thịt lông màu thả vườn tại tỉnh Thừa Thiên - Huế. Gà được chọn để lấy mẫu không sử dụng các chế phẩm sinh học hay sử dụng kháng sinh trong vòng 3 tuần trước khi lấy mẫu. Mẫu phân được lấy trực tiếp từ đường ruột của gà và bảo quản lạnh trước xét nghiệm. Mẫu được xử lý trong vòng 24h sau khi lấy mẫu.

Môi trường nghiên cứu: de Man, Rogosa and Sharpe broth/agar (MRS broth/agar, SBC Scientific, Ấn Độ), nước muối sinh lý, Luria-Bertani Broth (LB broth, SBC Scientific, Ấn Độ), Mueller-Hinton, CaCO<sub>3</sub>....

Chủng vi khuẩn đường ruột *E. coli* ATCC 25922 và *Salmonella* ATCC 25923 (Được cung cấp bởi Công ty R.E.P Biotech) sử dụng để đánh giá khả năng ức chế của các chủng *Lactobacillus* được phân lập.

#### 2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

##### **Phân lập các chủng *Lactobacillus* đường tiêu hóa gà**

*Lactobacillus* spp. được phân lập theo Hoque và cs. (2010). Pha loãng mẫu phân trong LB broth. Hút 100  $\mu$ L mẫu cấy

trải lên đĩa thạch MRS vô trùng (pH = 6,5), ủ 24 - 72 giờ ở 37°C trong điều kiện yếm khí. Những khuẩn lạc có màu trắng đục hoặc kem, rìa tròn hoặc chia thùy, khuẩn lạc nằm trên đường cấy chuyển và không lẫn với những khuẩn lạc có hình thái và màu sắc lạ được quan sát và chọn lọc, sau đó tiến hành cấy chuyển vi khuẩn trên môi trường thạch MRS có bổ sung 1% CaCO<sub>3</sub>. Chọn những khuẩn lạc có vòng tan CaCO<sub>3</sub> xung quanh, thực hiện cấy chuyển nhiều lần đến khi độ thuần vi khuẩn được xác định. Tiến hành xác định đặc điểm sinh học: nhuộm Gram, hình thái tế bào và phản ứng Catalase theo quy trình tiêu chuẩn.

Chủng phân lập có phân giải CaCO<sub>3</sub> hiển thị Gram dương (+), Catalase (-) âm tính được coi là *Lactobacillus*. Các chủng *Lactobacillus* phân lập được tăng sinh trong MRS lỏng và bảo quản mẫu trong Glycerol 50% theo tỷ lệ 1:1.

##### **Xác định đặc điểm sinh học của các chủng *Lactobacillus***

##### **Đánh giá khả năng sinh enzyme ngoại bào**

Khả năng sinh enzyme ngoại bào của các dòng vi khuẩn được đánh giá bằng phương pháp đục lỗ thạch (Taheri và cs., 2012). Các chủng *Lactobacillus* spp. tăng sinh trong MRS đến 10<sup>8</sup> CFU/ml. Dịch nuôi được ly tâm 10.000 vòng/phút trong 15 phút để thu phần dịch lỏng bên trên tế bào, nhỏ 10  $\mu$ L dịch chứa enzyme ngoại bào vào giếng thạch trên môi trường MRS được bổ sung 1% tinh bột cho phản ứng khảo sát khả năng sinh enzyme amylase và 1% gelatin cho phản ứng khảo sát khả năng sinh enzyme protease, lỗ chính giữa nhỏ nước muối sinh lý làm đối chứng; quan sát khả năng tạo vòng phân giải cơ chất sau 24h. Thuốc thử Lugol được sử dụng để đánh giá

đối với amylase dựa vào vòng phân giải cơ chất có màu xanh tím nhạt và trichloroacetic acid 25% (TCA) đối với protease dựa vào vòng phân giải cơ chất có màu trắng trong.

**Thử nghiệm khả năng đề kháng kháng sinh**

Các dòng vi khuẩn đã phân lập được nuôi tăng sinh tới  $10^8$  CFU/ml. Sau đó cấy trải 100  $\mu$ L dung dịch lên đĩa thạch MH, đặt khoanh giấy kháng sinh sau khi bề mặt thạch khô sau đó đĩa được ủ ở 37°C trong 24 giờ. Tiến hành đo đường kính vòng vô khuẩn của các chủng lợi khuẩn *Lactobacillus*. Đọc kết quả kháng kháng sinh theo hướng dẫn của CLSI (CLSI, 2021).

**Thử nghiệm lợi khuẩn kháng vi khuẩn gây bệnh ở đường tiêu hóa trên gà**

Các dòng vi khuẩn gây bệnh gồm *E. coli* ATCC 25922 và *Salmonella* ATCC 25923 được nuôi tăng sinh tới  $10^8$  CFU/ml. Sau đó cấy trải 100  $\mu$ L dung dịch vi khuẩn gây bệnh trên lên đĩa thạch MRS. Tiến hành đục lỗ, nhỏ 10  $\mu$ L dịch vi khuẩn *Lactobacillus* có nồng độ  $10^8$  CFU/ml vào lỗ thạch, lỗ chính giữa nhỏ nước muối sinh lý để đối chứng. Kích thước vòng vô khuẩn được dùng để xác định khả năng đối kháng vi khuẩn gây bệnh của các chủng lợi khuẩn *Lactobacillus*.

**2.3. Phương pháp quản lý và xử lý số liệu**

Số liệu được nhập và xử lý thống kê mô tả trên phần mềm Excel (2020). So sánh các tỷ lệ bằng phương pháp Chi-square. Các tỷ lệ được cho là sai khác có ý nghĩa thống kê khi giá trị  $p < 0,05$ .

**3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**3.1. Kết quả phân lập *Lactobacillus* spp. từ mẫu phân**

Từ các mẫu phân gà thu thập từ một số nông hộ trên địa bàn tỉnh Thừa Thiên - Huế đã phân lập được 28 chủng vi khuẩn trên môi trường thạch MRS. Qua quan sát hình thái khuẩn lạc của 28 chủng vi khuẩn trên môi trường MRSA sau 48 giờ ủ ở 37°C cho thấy: cả 28 chủng đều có khuẩn lạc hình tròn, bìa nguyên, nhô cao, bóng ướt, trong đó 25 chủng có khuẩn lạc màu trắng ngà (89,29%) và 3 chủng còn lại khuẩn lạc có màu trắng đục (10,71%), đường kính khuẩn lạc dao động từ 0,2 mm – 2,6 mm. Các chủng đều có dạng hình que (trực khuẩn), hai đầu tròn, đứng riêng lẻ hoặc chuỗi ngắn khi quan sát dưới kính hiển vi quang học. Kết quả quan sát đặc điểm khuẩn lạc và hình thái tế bào của các chủng vi khuẩn được thể hiện ở bảng 3.1 sau:

**Bảng 1.** Đặc điểm hình thái và sinh hóa của các chủng vi khuẩn phân lập được

	Đặc điểm	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Đặc điểm khuẩn lạc	Hình tròn, bìa nguyên, nhô cao, bóng ướt	28	100,00
	Màu trắng ngà	25	89,29
	Màu trắng đục	3	10,71
Hình dạng tế bào	Hình que	28	100,00
	Phân giải CaCO <sub>3</sub>	28	100,00
Đặc điểm sinh hóa	Gram dương	28	100,00
	Phản ứng Catalase (âm tính)	28	100,00

### 3.2. Đặc tính sinh học của các chủng *Lactobacillus* phân lập được

#### 3.2.1. Khả năng kháng kháng sinh của *Lactobacillus* spp.

Để tiến hành xác định mức độ kháng kháng sinh của các chủng *Lactobacillus* spp., 5 loại kháng sinh thường được sử dụng

**Bảng 2.** Tính mẫn cảm kháng sinh của các chủng *Lactobacillus* spp. phân lập được đối với một số loại thuốc kháng sinh

Kháng sinh	Đề kháng (R)		Trung gian (I)		Mẫn cảm (S)	
	n	Tỷ lệ %	n	Tỷ lệ %	n	Tỷ lệ %
Enrofloxacin	28	100,00	0	0,00	0	0,00
Ertapenem	3	10,71	3	10,71	22	78,57
Doxycycline	1	3,57	2	7,14	25	89,29
Linezolid	4	14,29	0	61,29	24	85,71
Streptomycin	28	100,00	0	0,00	0	0,00

Mức độ nhạy cảm, trung bình và kháng kháng sinh của các chủng vi khuẩn *Lactobacillus* spp. được đánh giá theo tiêu chuẩn CLSI (2021).

Dựa vào tiêu chuẩn của CLSI (2021), kết quả xác định tính mẫn cảm của vi khuẩn *Lactobacillus* spp. trên 5 loại kháng sinh (bảng 2) cho thấy tất cả các chủng vi khuẩn *Lactobacillus* spp. phân lập được đều kháng 2/5 loại kháng sinh (enrofloxacin và streptomycin). Bên cạnh đó, phần lớn các chủng vi khuẩn ở mức mẫn cảm với 3 loại kháng sinh còn lại là ertapenem, doxycycline và linezolid.

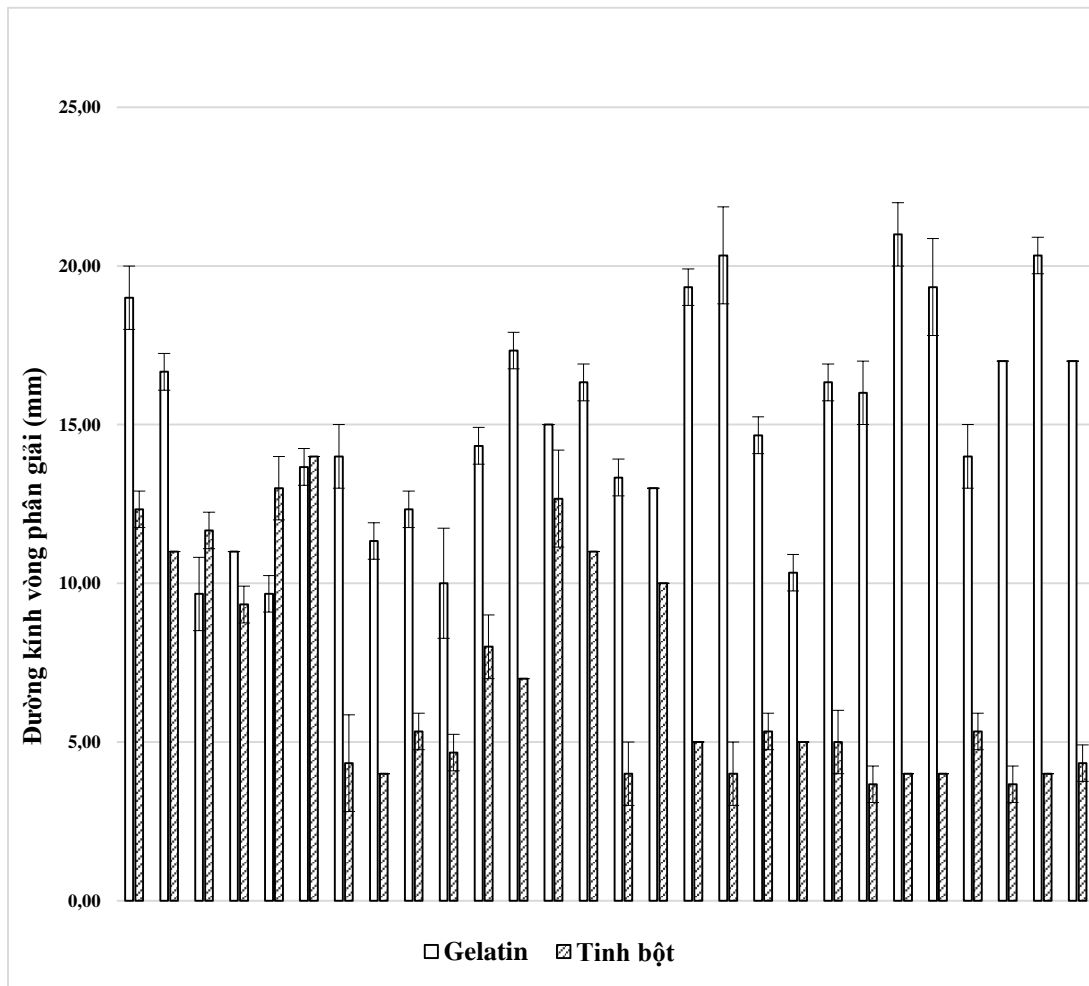
Tương tự, kết quả đánh giá sự mẫn cảm với kháng sinh của 88 chủng *Lactobacillus* có nguồn gốc từ gà của Dec và cs. (2017) ghi nhận hơn 70% các chủng đều kháng lại tiamulin, tetracycline và lincomycin. Báo cáo trước đó của Cauwerts và cs. (2006) cũng cho thấy hơn 89% các chủng *Lactobacillus* phân lập từ lỗ huyết gà kháng 1 trong 2 hoặc cả 2 loại kháng sinh thử nghiệm. Casarotti và cs. (2017) đã báo cáo rằng tất cả *L. delbrueckii* nhạy cảm với vancomycin và gentamicin, trong khi các chủng khác thuộc loài *L. rhamnosus*, *L.*

phổ biến trong điều trị bệnh tiêu chảy ở gia cầm được sử dụng để thực hiện kháng sinh đồ, bao gồm: enrofloxacin (5 µg/ml), ertapenem (10 µg/ml), doxycycline (30 µg/ml), linezolid (30 µg/ml), streptomycin (10 µg/ml). Kết quả được trình bày ở Bảng 2.

*casei* và *L. fermentum* lại kháng thuốc. Liên quan đến khả năng kháng kháng sinh của *Lactobacillus* có thể chuyển những gen đề kháng sang cho các loại vi khuẩn gây bệnh khác trong đường tiêu hóa, theo một số tác giả, khả năng kháng vancomycin của *Lactobacillus* sẽ không được truyền sang vi khuẩn gây bệnh vì đây là một đặc điểm nội tại, được mã hóa bởi các gen nhiễm sắc thể (Divya và cs., 2012) và sự thay thế đầu cuối D-alanine bằng D-lactate hoặc D-serine trong muramyl-pentapeptide ngăn chặn sự gắn kết của vancomycin (Gueimonde và cs., 2013).

#### 3.2.2. Khả năng sinh enzyme ngoại bào của *Lactobacillus* spp. phân lập được

Khả năng sinh enzyme ngoại bào của các chủng *Lactobacillus* có vai trò rất quan trọng, như một đặc điểm mong muốn đặc biệt trong các chất bổ sung dành cho động vật nhằm hỗ trợ tiêu hóa thức ăn, giảm phát thải từ phân (Lee và cs., 2001). Từ 28 chủng *Lactobacillus* spp. đã phân lập được, khảo sát khả năng sinh enzyme ngoại bào (amylase – phân giải tinh bột, protease – phân giải protein) đã thu được kết quả ở Biểu đồ 1.



**Biểu đồ 1.** Đường kính vòng phân giải của các chủng *Lactobacillus* spp. phân lập được đối với tinh bột và gelatin (mm)

Qua Biểu đồ 1 cho thấy đường kính vòng phân giải của enzyme protease dao động từ 10 - 21 mm, trong đó chủng LB23 có khả năng sinh enzyme protease lớn nhất (21mm) và các chủng LB3, LB5, LB10, LB20 có khả năng sinh enzyme protease thấp nhất (10mm). Đường kính vòng phân giải của enzyme amylase dao động từ 4 – 14mm, trong đó chủng LB6 có khả năng sinh enzyme amylase cao nhất (14mm) và có 11 chủng có khả năng sinh enzyme thấp (LB7, LB8, LB15, LB18, LB22, LB23, LB24, LB26, LB27, LB28) (4 mm). Như vậy, tất cả các chủng *Lactobacillus* spp. phân lập được đều có khả năng sinh enzyme protease và amylase. Khả năng sinh 2 loại

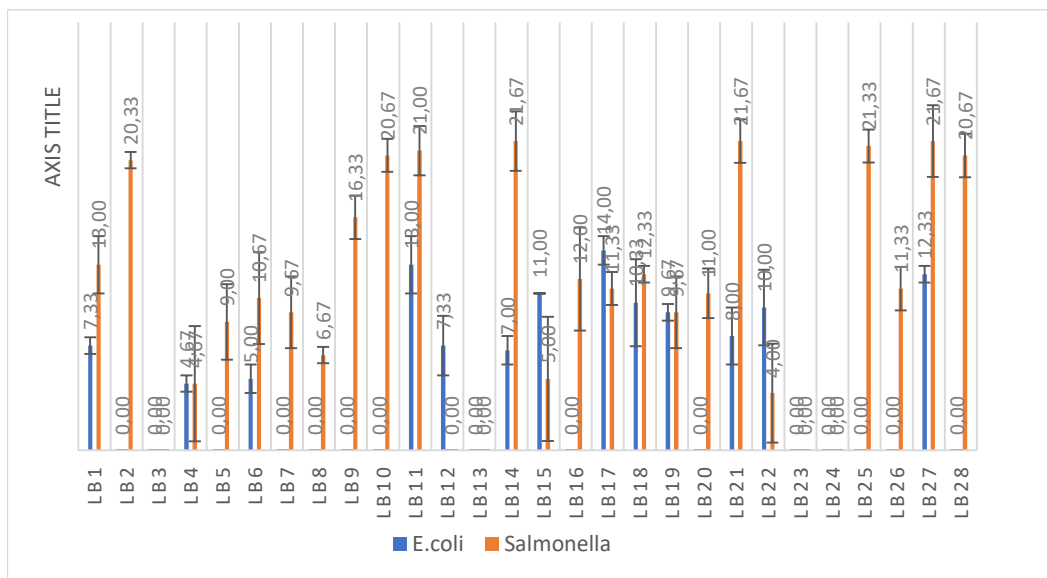
enzyme này của vi khuẩn không giống nhau, hầu hết các chủng đều có khả năng sinh enzyme protease tốt hơn so với enzyme amylase.

Kết quả nghiên cứu này tương đồng với kết quả thí nghiệm khảo sát khả năng sinh enzyme của các chủng *Lactobacillus* spp. phân lập từ manh tràng gà của Lee và cs. (2008) cho thấy các chủng vi khuẩn đều khả năng sinh enzyme protease và amylase. Kết quả đã công bố trong nghiên cứu của Nguyễn Thị Hồng Nhung và cs., (2019) cũng chỉ ra rằng: chủng LT7 là *Lactobacillus plantarum* có đường kính vòng phân giải cơ chất của protease cao hơn so với amylase.

### 3.2.3 Khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh của các chủng *Lactobacillus spp.* được phân lập

Hoạt tính kháng khuẩn chống lại mầm bệnh là một tính năng tiềm năng quan trọng khác được xem xét trong việc lựa chọn các chủng lợi khuẩn tiềm năng để duy trì sự cân

bằng vi khuẩn lành mạnh trong đường tiêu hóa. Từ 28 chủng phân lập được, tuyển chọn những chủng có hoạt tính kháng mạnh với 2 chủng vi khuẩn chỉ thị gồm *E. coli* và *Salmonella*. Kết quả nghiên cứu thu được thể hiện ở Biểu đồ 2.



**Biểu đồ 2.** Đường kính vòng vô khuẩn (mm) của các chủng *Lactobacillus spp.* phân lập được đối với các vi khuẩn gây bệnh

Hầu hết các chủng *Lactobacillus spp.* phân lập được đều có khả năng kháng các vi sinh vật gây bệnh trên đường ruột (24/28, chiếm 85,7%), trong đó chỉ có 11/24 chủng có khả năng kháng cả 2 loại vi khuẩn gây bệnh (LB1, LB4, LB6, LB11, LB14, LB15, LB17, LB18, LB19, LB21, LB22, LB27), hầu hết các chủng này có đường kính vòng kháng khuẩn với *Salmonella* (4 - 22mm) lớn hơn vòng kháng khuẩn với *E. coli* (5-15 mm). Bốn chủng còn lại (LB3, LB13, LB23 và LB24) không có khả năng kháng lại các vi khuẩn gây bệnh này.

Có 13/28 chủng kháng vi khuẩn *E. coli* và có tới 23/28 chủng có khả năng kháng lại vi khuẩn *Salmonella*. Trong đó các chủng LB14, LB21, LB27 có khả năng kháng *Salmonella* mạnh nhất (22mm) và chủng LB17 có khả năng kháng lại *E. coli* mạnh nhất (15mm).

Nhiều nghiên cứu đã báo cáo rằng, có nhiều loài trong chi *Lactobacillus* có khả năng tạo ra các loại protein có khả năng diệt khuẩn tốt (Verschuere, 2000). Theo Mokoena (2017), vi khuẩn *Lactobacillus* có trong chế phẩm sẽ tạo ra các chất kháng khuẩn như bacteriocin, các acid hữu cơ như acid lactic, acid acetic.... Các chất này làm giảm môi trường pH trong đường ruột, kích thích hoạt hóa kháng khuẩn chống lại những vi khuẩn gây hại nghiêm trọng với vật nuôi như *E. coli*, *S. typhi*, *Klebsiella sp.* Ngoài ra, pH thấp còn gây cản trở việc hấp thu NH<sub>3</sub> từ ruột vào mô và thúc đẩy bài tiết NH<sub>3</sub> từ máu vào ruột. Jin và cs. (1998) cho biết 12 chủng *Lactobacillus* phân lập từ đường ruột gà có khả năng ức chế 5 chủng *Salmonella*. Nghiên cứu trong điều kiện *in vitro* của Bhatia và cs. (1989) đã cho thấy việc sản xuất axit lactic bởi *Lactobacillus acidophilus* đã làm ức chế mầm bệnh đường tiêu hóa.



Trong nghiên cứu *in vivo* về ảnh hưởng của *Lactobacillus plantarum* LGFCP4 được phân lập trong phòng thí nghiệm từ đường tiêu hóa của gà Guinea đến quần thể vi sinh đường tiêu hóa ở gà thịt, Vineetha và cs. (2017) nhận thấy số lượng *E. coli* và *Salmonella* giảm đáng kể ở các nhóm gà bổ sung *L. acidophilus* và bổ sung *L. plantarum* LGFCP4.

#### 4. KẾT LUẬN

Tổng số 28 chủng vi khuẩn có đặc tính hình thái, sinh hóa điển hình của *Lactobacillus* đã được phân lập từ phân gà lông màu nuôi thả vườn tại Thừa Thiên Huế. Toàn bộ các chủng *Lactobacillus* đều đề kháng với 2 loại kháng sinh là Enrofloxacin và Streptomycin.

Cả 28 chủng phân lập được đều có khả năng sinh enzyme ngoại bào. Trong đó chủng vi khuẩn LB23 có khả năng sinh enzyme protease lớn nhất (21mm) và các chủng LB3, LB5, LB10, LB20 có khả năng sinh enzyme protease thấp nhất (10mm). LB6 có khả năng sinh enzyme amylase cao nhất (14mm) và có 11 chủng có khả năng sinh enzyme amylase thấp (LB7, LB8, LB10, LB15, LB18, LB22, LB23, LB24, LB26, LB27, LB28) (4 mm).

Có 24/28 chủng vi khuẩn có khả năng kháng lại vi khuẩn gây bệnh đường ruột trong đó LB14, LB21, LB27 có khả năng kháng *Salmonella* mạnh nhất (22mm) và chủng LB17 có khả năng kháng lại *E. coli* mạnh nhất (15mm).

Nghiên cứu đã phân lập được 24 chủng *Lactobacillus* tiềm năng cho các nghiên cứu chế phẩm sinh học thay thế kháng sinh dùng phòng chống bệnh tiêu chảy trên gia cầm.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

##### 1. Tài liệu tiếng Việt

Trịnh Hùng Cường. (2011). *Phân lập vi khuẩn Lactobacillus sp. trên tôm sú nuôi công nghiệp 50 Tạp chí nghề cá sông Cửu Long - số 14 - tháng 10/2019 Viện nghiên cứu nuôi trồng thủy sản II có khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh Vibrio sp.*, Luận văn Cao học. Đại học Cần Thơ.

Nguyễn Thị Trúc Linh. (2018). *Tuyển chọn vi khuẩn lactic kháng với vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (Vibrio parahaemolyticus) trên tôm thẻ chân trắng (Penaeus vannamei)*. Luận án Tiến sĩ, Đại học Cần Thơ.

Nguyễn Thị Hồng Nhung, Lê Thị Thương, Nguyễn Thị Thu Hằng và Nguyễn Thị Huyền. (2019). *Tuyển chọn chủng vi khuẩn lactic có tiềm năng ứng dụng tạo chế phẩm sinh học (probiotic) bổ sung vào thức ăn chăn nuôi. Tạp chí Khoa Học Công Nghệ Lâm nghiệp, Trường Đại học Lâm nghiệp, 2, 18-27.*

##### 2. Tài liệu tiếng nước ngoài

Bhatia, S. J., Kochar, N., Abraham, P., Nair, N. G., & Mehta, A. P. (1989). *Lactobacillus acidophilus* inhibits growth of *Campylobacter pylori* in vitro. *Journal of Clinical Microbiology*, 27(10), 2328-2330

Dec, M., Urban-Chmiel, R., Stępień-Pyśniak, D., & Wernicki, A. (2017). Assessment of antibiotic susceptibility in *Lactobacillus* isolates from chickens. *Gut pathogens*, 9(1), 1-16

Dunne, C. (2001). Adaptation of bacteria to the intestinal niche: probiotics and gut disorder. *Inflammatory Bowel Diseases*, 7(2), 136-145.

Divya, J. B., Varsha, K. K., & Nampoothiri, K. M. (2012). Newly isolated lactic acid bacteria with probiotic features for potential application in food industry. *Applied biochemistry and biotechnology*, 167, 1314-1324.

Casarotti, S. N., Carneiro, B. M., Todorov, S. D., Nero, L. A., Rahal, P., & Penna, A. L. B. (2017). In vitro assessment of safety and probiotic potential characteristics of *Lactobacillus* strains isolated from water buffalo mozzarella cheese. *Annals of microbiology*, 67, 289-301.

Cauwerts, K., Pasmans, F., Devriese, L. A., Martel, A., Haesebrouck, F., & Decostere A., (2006). Cloacal *Lactobacillus* isolates from broilers show high prevalence of resistance towards macrolide and lincosamide antibiotics. *Avian Pathology*, 35, 160-164.

Colum Dunne. (2001). Adaptation of Bacteria to the Intestinal Niche: Probiotics and Gut Disorder, *Journal article*, 7(2), 136-145.

CLSI, (2021). M100: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.

Gueimonde, M., Sánchez, B., de los Reyes-Gavilán, C. G., & Margolles, A. (2013).



- Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 4(202), 1-6.
- Hoque, M., Z., Akter, F., Hossain, K. M., Rahman, M. S. M., Billah, M. M., & Isolation, K. D. (2010). Identification and Analysis of Probiotic Properties of Lactobacillus Spp. From Selective Regional Yoghurts. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 5(1), 39-46, ISSN 1817-308X
- Lee, H. S., Gilliland, S. E., & Carter, S., (2001). Amyolytic Cultures of Lactobacillus acidophilus : Potential Probiotics to Improve Dietary Starch Utilization, *Food Science*, 66(2), 338-344.
- Lee, N. K., Yun, C. W., Kim, S. W., Chang, H. I., Kang, C. W., & Paik, H. D., (2008). Screening of lactobacilli derived from chicken feces and partial characterization of Lactobacillus acidophilus A12 as animal probiotics. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(2), 338-342.
- Kizerwetter-Swida, M., & Binek, M., (2009). Protective effect of potentially probiotic Lactobacillus strain on infection with pathogenic bacteria in chickens. *Polish Journal of Veterinary Science*, 12, 15-20.
- Miguel, G., Borja, S., Clara, G., & Abelardo, M., (2013). Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy*, 18, 132-135.
- Mokoena, M. P. (2017) Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini-review. *Molecules*, 22(8).
- Jin, L. Z., Ho, Y. W., Abdullah, N., & Jalaludin, S., (1998). Acid and bile tolerance of Lactobacillus isolated from chicken intestine. *Letters in Applied Microbiology*, 27, 183-185.
- Senok, A. C., Ismaeel, A. Y., & Butta, C. A., (2005), "Probiotics: facts and myths", *Clinical Microbiology and Infection*, 11, pp.958- 966.
- Schrezenmeir, J., & de Vrese, M. (2001) Probiotics, prebiotics, and synbiotics – approaching a definition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, supply, 361S–364S.
- Sabrina, N. C., Bruno, M. C., Svetoslav, D. T., Luis, A. N., Paula, R., & Ana, L. B. P., (2017). In vitro assessment of safety and probiotic potential characteristics of Lactobacillus strains isolated from water buffalo mozzarella cheese, *Annals of Microbiology*, 67, 289-301.
- Jayakumar, B. D., & Kesavan, M. N. (2012). Newly Isolated Lactic Acid Bacteria with Probiotic Features for Potential Application in Food Industry, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167, 1314-1324.
- FAO, (2016). Antimicrobial Resistance (AMR) Addressing Antimicrobial Usage in Livestock Production Industry.
- Reid Gregor. (2006). Safe and efficacious probiotics: what are they? *Trends in Microbiology*, 14, 348-352.
- Sharma, K., Sharma, N., & Sharma, R. (2016). Identification and Evaluation of In vitro Probiotic Attributes of Novel and Potential Strains of Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Dairy Products of North-West Himalayas. *Journal of Clinical Microbiology and Biochemical Technology*, 2, 018-025
- Taheri, A., Robinson, S., Isobel, P., Margaret, G., (2012). Revised Selection Criteria for Candidate Restriction Enzymes in Genome Walking. *PLoS one*, 7, e35117.
- Timmerman, H. M., Veldman, A., E, V. E., Rombouts, F. M., & Beynen, A. C., (2006). Mortality and Growth Performance of Broilers Given Drinking Water Supplemented with Chicken-Specific Probiotics, *Poultry Science*, 85(8), 1383-1388.
- Turner, J. L., Dritz, S. S., & Minton, J. E., (2001). Review: Alternatives to Conventional Antimicrobials in Swine Diets I Contribution 01-488-J from the Kansas Agricultural Experiment Station. *The Professional Animal Scientist*, 17, 217-226.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W., (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, 655-671.
- Vineetha, P. G., Tomar, S., Saxena, V. K., Kapgate, M., Suvarna, A., & Adil, K., (2017). Effect of laboratory-isolated Lactobacillus plantarum LGFCP4 from gastrointestinal tract of guinea fowl on growth performance, carcass traits, intestinal histomorphometry and gastrointestinal microflora population in broiler chicken. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition (Berl)*, 101, e362-e37.