

**TUYỂN CHỌN VÀ TỒN TRỮ VI KHUẨN *LACTOBACILLUS* CÓ TIỀM NĂNG PROBIOTIC ỨNG DỤNG TRONG CHĂN NUÔI GÀ**Trần Văn Bé Năm<sup>1</sup>, Nguyễn Bá Phúc<sup>1</sup>, Trang Thành Giã<sup>1</sup>, Lê Thị Hội<sup>2</sup>,  
Nguyễn Vũ Trung<sup>1</sup> và Nguyễn Trọng Ngù<sup>1\*</sup>

Ngày nhận bài báo: 28/09/2019 - Ngày nhận bài phản biện: 19/10/2019

Ngày bài báo được chấp nhận đăng: 31/10/2019

**TÓM TẮT**

Sử dụng probiotic nhằm nâng cao hiệu quả phòng bệnh cho vật nuôi là vấn đề được quan tâm hiện nay. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm tìm ra các dòng vi khuẩn *Lactobacillus* có tiềm năng probiotic để dùng trong chăn nuôi gia cầm. Từ 75 mẫu ruột gà và thực phẩm lên men, có 11 dòng *Lactobacillus* được phân lập. Kết quả có 7 dòng thích nghi được với điều kiện pH 1,5 và muối mật 0,3% và 3 dòng có khả năng kháng kháng sinh tetracycline (30 µg/ml) và ampicillin (10 µg/ml). Trong đó dòng LIN3 có mật số cao ở pH 2,0 (6,32 log cfu/ml) và tăng được mật số khi ủ với muối mật 0,3% trong 3 giờ. Kết quả giải trình tự định danh dòng này là *Lactobacillus plantarum*. Thử nghiệm tồn trữ dòng vi khuẩn *L. plantarum* cho thấy cơ chất gồm 50% gạo và 50% bột mì là phù hợp, vi khuẩn giữ được mật số 4,80 log cfu/ml đến 60 ngày khảo sát trong điều kiện nhiệt độ phòng.

**Từ khóa:** Kháng khuẩn, *Lactobacillus*, muối mật, probiotic.

**ABSTRACT****Selection and storage of probiotic potential of *Lactobacillus* applied for chicken production**

The application of probiotics to improve the effectiveness of animal disease prevention is of concern nowadays. The current study was conducted to isolate the probiotic potential of *Lactobacillus* strains for using in poultry production. From 75 samples of chicken intestines and fermented foods, 11 strains of *Lactobacillus* were isolated. Seven strains were found to adapt to pH 1.5 and 0.3% bile salts and three isolates were resistant to tetracycline (30 µg/ml) and ampicillin (10 µg/ml). In particular, LIN3 strain had a high density at pH 2.0 (6.32 log cfu/ml) and increased the density when incubated with 0.3% bile salt for 3 hours. This strain was sequenced and identified as *Lactobacillus plantarum*. Additionally, the combination of 50% rice and 50% wheat flour were appropriate where the density of *L. plantarum* remained stable (4.80 log cfu/ml) after 60-day storage at room temperature.

**Keywords:** Antibacterial activity, *Lactobacillus*, bile salt, probiotics.

**1. ĐẶT VẤN ĐỀ**

Hiện nay, ngành chăn nuôi là một trong những ngành kinh tế mũi nhọn và quan trọng ở Việt Nam. Theo Tổng Cục Thống kê (2018), trong những năm gần đây, số lượng đàn gia súc, gia cầm ngày một thay đổi rõ rệt. Đặc biệt dồi với gia cầm, số lượng tăng từ 361,7 triệu con năm 2016 lên 385,4 triệu con vào năm 2017 và 408,9 triệu con vào năm 2018. Qui

mô chăn nuôi với số lượng lớn và tăng nhanh liên tục đòi hỏi việc kích thích sinh trưởng, phòng bệnh và điều trị là công tác hết sức cần thiết. Do đó, kháng sinh được sử dụng rộng rãi trong chăn nuôi để đáp ứng mục đích này là không thể tránh khỏi (Nguyễn Đăng Vang, 2015).

Từ khi Việt Nam gia nhập WTO, các qui định về sử dụng kháng sinh trên vật nuôi ngày càng chặt chẽ hơn và một số kháng sinh bị cấm sử dụng. Mặc dù hầu hết các trường hợp phát hiện dư lượng của các kháng sinh được phép sử dụng và nằm trong giới hạn cho phép. Tuy nhiên, vẫn có nhiều trường hợp dư lượng kháng sinh vượt quá giới hạn. Một

<sup>1</sup> Trường Đại học Cần Thơ<sup>2</sup> Bệnh viện Bệnh nhiệt đới Trung ương<sup>3</sup> Trường Đại học Y Hà Nội

\* Tác giả liên hệ: PGS.TS. Nguyễn Trọng Ngù, Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ. Điện thoại: 0989828295; Email: ntrung@ctu.edu.vn

nghiên cứu đã cho thấy *Campylobacter* phân lập từ gà thịt cũng có mức kháng cao: 90% kháng với nalidixic acid, 89% với tetracycline và 82% với ciprofloxacin (Nguyễn Văn Kinh, 2010). Hơn nữa, tình hình sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi chưa hợp lý. Việc lựa chọn kháng sinh và liều dùng được quyết định chủ yếu dựa trên kinh nghiệm của chu hộ (44%), 33% theo hướng dẫn của bác sỹ thú y, 17% theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Nguyễn Văn Kinh, 2010). Do đó, cần nhanh chóng tìm ra giải pháp hiệu quả để thay thế kháng sinh chống lại các tác nhân gây bệnh hoặc kích thích sinh trưởng.

Hiện nay axit hữu cơ, probiotic, prebiotic, phytogetic và zeolit là những lựa chọn hữu hiệu cho việc thay thế kháng sinh (Papatsiros và ctv, 2013). Đặc biệt là probiotic vì đây là phương pháp an toàn và đem lại hiệu quả cao để phòng bệnh và nâng cao sức đề kháng cho vật nuôi. Trên thị trường Việt Nam hiện nay có nhiều loại chế phẩm probiotic được lưu hành nhằm bổ sung vào thức ăn chăn nuôi. Tuy vậy, nguyên liệu cho sản xuất probiotic chủ yếu đều lấy từ nước ngoài, hơn nữa hiệu quả đem lại chưa thật sự ổn định và giá thành còn cao (Hồ Trung Thông và Hồ Lê Quỳnh Châu, 2009). Do đó, việc nghiên cứu sử dụng các vi sinh vật, đặc biệt nhóm vi khuẩn *Lactobacillus* có tiềm năng để tạo chế phẩm probiotic nhằm khắc phục tình trạng trên là việc làm hết sức cần thiết.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Thu mẫu và xử lý mẫu

Mẫu được thu từ ruột gà (ruột non và ruột già), thực phẩm lên men (dưa cải, cà pháo và dưa leo) tại tỉnh Vĩnh Long, Sóc Trăng và Hậu Giang.

Đối với ruột gà, mỗi tỉnh tiến hành thu 5 mẫu từ 5 cá thể gà Nòi trong giai đoạn sinh sản thuộc 5 trại khác nhau. Dùng ống tiêm hút 1ml dịch ruột, sau đó cho dịch hút vào ống tuýp vô trùng. Mẫu được ghi ký hiệu và trữ lạnh trong quá trình vận chuyển về phòng thí nghiệm.

Các mẫu dưa cải, cà pháo, dưa leo đã lên men. Dùng ống tiêm hút 1ml dịch lỏng từ sản phẩm (gồm cả pháo, dưa cải và dưa leo lên men), sau đó cho dịch hút vào ống eppendorf vô trùng. Ghi ký hiệu và cho vào thùng đá trữ lạnh khoảng 4°C đem về phòng thí nghiệm nuôi cấy phân lập.

### 2.2. Phương pháp

#### 2.2.1. Phân lập vi khuẩn

Mẫu được pha loãng đến nồng độ  $10^4$  và được trải trên đĩa Petri chứa môi trường MRS. Đĩa được để khô tự nhiên và ủ ở 37°C trong 24-48 giờ. Các khuẩn lạc xuất hiện trong đĩa được cấy sang đĩa mới để thu được khuẩn lạc rời rạc, các khuẩn lạc được tách riêng trên đĩa petri chứa môi trường MRS agar mới. Các dòng vi khuẩn được giữ trong ống tuýp chứa môi trường NB ở -80°C cho các thí nghiệm tiếp theo.

#### 2.2.2. Đánh giá khả năng chịu pH thấp

Thí nghiệm được tiến hành theo phương pháp đánh giá chịu pH thấp của Erkkila và Petaja (2000). Thí nghiệm được bố trí 3 nghiệm thức (NT) với mức pH khác nhau: 2,5; 2,0; 1,5, 3 lần lặp lại. Chỉ tiêu theo dõi là mật số vi khuẩn sống được trên môi trường nuôi cấy.

#### 2.2.3. Đánh giá khả năng chịu muối mặn

Các dòng có khả năng chịu pH tốt được tuyển chọn cho thí nghiệm đánh giá khả năng chịu muối mặn theo phương pháp của Gilliland và ctv (1984). Thí nghiệm được bố trí 2 NT: NT các dòng vi khuẩn được ủ trong môi trường NB có bổ sung 0,3% muối mặn và NT đối chứng (ĐC) được tiến hành tương tự, nhưng không chủng vi khuẩn và nấm men vào môi trường NB có bổ sung 0,3% muối mặn. Thí nghiệm được thực hiện với 3 lần lặp lại. Chỉ tiêu theo dõi là mật số vi khuẩn sống được trên môi trường nuôi cấy.

#### 2.2.4. Định danh dòng vi khuẩn và nấm men

*Trich ADN của vi khuẩn:* Quy trình trích ADN thực hiện theo Breugelmaris và Uyttebroek (2004). Sau khi tinh sạch ADN, phản ứng PCR được thực hiện với cặp mồi 16S ARN được thiết kế theo Lane (1985) trình

tự sau: 27F: 5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3'; 1492R: 5' GGT TAC CTT GTT ACC ACT T 3'. Các sản phẩm PCR có vạch đậm và rõ trên gel agarose được gửi giải mã trình tự ADN tại công ty Macrogen (Hàn Quốc). Từ kết quả giải trình tự, các trình tự này được so sánh với các trình tự có trong ngân hàng gene NCBI sử dụng công cụ BLAST. Kết hợp các đặc điểm hình thái khuẩn lạc, tế bào để xác định tên loài của dòng vi khuẩn có tiềm năng probiotic cao nhất.

### 2.2.5. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian tồn trữ đến mật số vi khuẩn trong chế phẩm probiotic

Dòng vi khuẩn LIN3 được nuôi trong môi trường NB đạt mật số 9 log cfu/ml, sau đó phối trộn với cơ chất lên men trong 48h, dịch lên men được phối trộn với chất mang theo tỷ lệ 1:1 (thể tích/khối lượng). Hỗn hợp được đông khô và đánh nhuyễn thành chế phẩm dạng bột. Chế phẩm được đóng gói 5 g/gói và tiến hành đánh giá mật số sau 0, 15, 30, 45, 60 ngày. Hai NT phối trộn bao gồm 100% bột gạo và 50% bột gạo + 50% bột mì. Lấy 1g chế phẩm hòa với 9ml nước, sau đó rút 0,2ml trải đều trên đĩa đếm mật số.

### 2.3. Xử lý số liệu

Số liệu được tổng hợp và xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2013 và Minitab 16.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Phân lập các dòng vi khuẩn

Từ 75 mẫu thu ban đầu, qua quá trình phân lập và định danh sơ bộ bằng các phương pháp nuôi cấy, quan sát hình thái khuẩn lạc và nhuộm Gram, thu được 11 dòng vi khuẩn *Lactobacillus* (15%) được dùng trong các thử nghiệm tiếp theo. Các dòng vi khuẩn phân lập được ký hiệu như sau: chữ cái đầu tiên là chữ cái đầu tiên trong tên của vi khuẩn (*L* - *Lactobacillus*); số thứ tự La Mã là địa điểm thu mẫu (I: Vinh Long, II: Sóc Trăng, III: Hậu Giang); hai chữ cái tiếp theo là tên mẫu phân lập (N: ruột non; G: ruột già; DC: dưa cải, CP: cà pháo, DL: dưa leo); số thứ tự 1, 2, 3 là số thứ tự mẫu thu được.

### 3.2. Đặc điểm probiotic của các dòng vi khuẩn được phân lập

#### 3.2.1. Khả năng chịu pH thấp

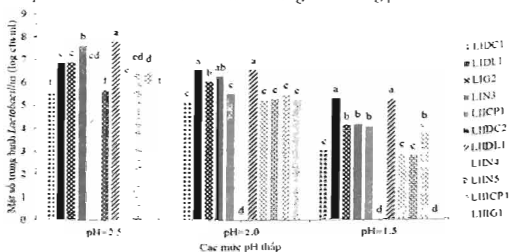
Những đặc tính quan trọng và cần thiết trong việc lựa chọn các dòng vi sinh vật sản xuất chế phẩm probiotic là khả năng sống sót của vi khuẩn dưới tác dụng của pH thấp ở dạ dày. Tại đây, ở các loài gia cầm, pH chỉ khoảng 2,0-3,5 (Nguyễn Đức Hưng, 2006). Chính vì vậy mà những dòng vi khuẩn được chọn làm vi sinh vật có tiềm năng probiotic được khảo sát khả năng chịu pH thấp với mức pH: 2,5; 2; 1,5. Kết quả thí nghiệm đánh giá khả năng chịu pH thấp của những dòng vi khuẩn *Lactobacillus* trình bày ở Hình 1.

Qua kết quả đánh giá khả năng chịu pH ở điều kiện pH=2,5 cho thấy mật số của các dòng vi khuẩn phân lập có sự khác nhau và dao động trong khoảng từ 5,63-7,82 log cfu/ml. Dòng LIIDL1 có khả năng chịu pH tốt, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các dòng còn lại với mật số cao nhất là 7,82 cfu/ml. Các dòng LIIIIG1, LIIDC2 và LIDC1 có mật số thấp nhất (5,71; 5,71 và 5,63 log cfu/ml), khác biệt có ý nghĩa thống kê với các dòng còn lại ( $P<0,001$ ). Đối với mức pH 2,0 và 1,5 thì các dòng LIDL1 và LIIDL1 có mật số cao nhất (tương ứng pH 2,0 là 6,58; 6,59 log cfu/ml và pH 1,5 là 5,34; 5,29 log cfu/ml).

Kết quả trên cũng tương tự với nghiên cứu của Nguyễn Thị Huyền và ctv (2014), nhóm tác giả đã chỉ ra rằng 54 dòng vi khuẩn probiotic đều thể hiện sự chống chịu cao khi được ủ trong dịch mô phỏng axit dạ dày (pH 2,0). Ngoài ra, theo nghiên cứu của Trần Quốc Việt và ctv (2009), các dòng vi khuẩn Lactic và nấm men được lựa chọn đều có khả năng sống trong môi trường pH thay đổi từ rất thấp (pH 2,0) đến trung tính. Kết quả trên cũng tương tự với nghiên cứu gần đây của Nguyễn Mạnh Tuấn và ctv (2014) cho rằng 4 dòng *Lactobacillus* LT4, NS1, BC và BB2 có khả năng sống và phát triển trong môi trường có pH thấp 2,0-8,0, trong đó dòng TL4 có khả năng chống chịu thấp tốt nhất lên đến 95% khi pH giảm còn 2,0. Nghiên cứu của Nguyễn Phước Hiến và Nguyễn Hữu

Hiệp (2014) đã chứng minh hầu hết các dòng vi khuẩn lactic phân lập từ sữa dê và chế phẩm men tiêu hóa đều có khả năng chịu đựng được pH 3,0. Kết quả trên cao hơn so với báo cáo

của Hoque và ctv (2010), theo đó các dòng vi khuẩn *Lactobacillus* phân lập từ *Bogra yoghurt* và *Khulna yoghurt* có tốc độ sinh trưởng chậm trong môi trường pH 2,2



Hình 1. Khả năng chịu pH thấp của những dòng *Lactobacillus*

### 3.2.2. Khả năng chịu muối mật

Bảng 1. Mật số vi khuẩn *Lactobacillus* (log cfu/ml) theo thời gian trong điều kiện có muối mật 0,3%

Các dòng <i>Lactobacillus</i>	Thời gian khảo sát			
	0 giờ (T0)	1 giờ (T1)	2 giờ (T2)	3 giờ (T3)
LIDC1	TB 7,43 <sup>±</sup> 0,01 % 100	7,53 <sup>±</sup> 0,02 101	8,47 <sup>±</sup> 0,02 114	7,82 <sup>±</sup> 0,08 105
LIDL1	TB 5,97 <sup>±</sup> 0,02 % 100	6,99 <sup>±</sup> 0,03 117	7,13 <sup>±</sup> 0,01 119	8,10 <sup>±</sup> 0,01 136
LIQ2	TB 6,82 <sup>±</sup> 0,02 % 100	7,71 <sup>±</sup> 0,03 113	8,68 <sup>±</sup> 0,04 127	8,02 <sup>±</sup> 0,02 118
LIN3	TB 6,69 <sup>±</sup> 0,03 % 100	7,11 <sup>±</sup> 0,02 106	7,15 <sup>±</sup> 0,01 107	8,10 <sup>±</sup> 0,02 121
LIICP1	TB 7,10 <sup>±</sup> 0,04 % 100	7,93 <sup>±</sup> 0,06 112	7,86 <sup>±</sup> 0,02 111	7,96 <sup>±</sup> 0,04 112
LIDL1	TB 5,90 <sup>±</sup> 0,01 % 100	6,88 <sup>±</sup> 0,05 117	7,08 <sup>±</sup> 0,02 120	7,88 <sup>±</sup> 0,04 133
LIN4	TB 7,78 <sup>±</sup> 0,04 % 100	6,99 <sup>±</sup> 0,03 89,9	6,35 <sup>±</sup> 0,02 81,6	6,07 <sup>±</sup> 0,01 78,1
LIN5	TB 6,95 <sup>±</sup> 0,06 % 100	6,99 <sup>±</sup> 0,02 101	5,90 <sup>±</sup> 0,06 84,9	6,00 <sup>±</sup> 0,04 86,2
LIICP4	TB 7,11 <sup>±</sup> 0,04 % 100	7,70 <sup>±</sup> 0,03 10	8,97 <sup>±</sup> 0,01 126	8,00 <sup>±</sup> 0,03 112
F	0,000	0,000	0,000	0,000

Ghi chú: Các giá trị trung bình trong cùng cột mang chữ a, b, c, d khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $P < 0,05$ )

Khả năng chịu muối mật được đánh giá dựa trên số lượng khuẩn lạc đếm được trên các đĩa petri sau khi ủ ở 37°C trong khoảng thời gian 0, 1, 2 và 3 giờ tương ứng với thời gian lưu thức ăn trong ruột non (Kumura và ctv, 2004). Zhou và ctv (2007) đã chỉ ra rằng vi sinh vật probiotic chỉ phát huy tác dụng có lợi lên vật chủ khi chúng định cư và tồn tại trong ruột non, đây là môi trường chứa thành phần muối mật là các yếu tố ức chế sinh trưởng của vi sinh vật. Theo Gilliland và ctv (1984), 0,3% được xem là nồng độ quyết định để sàng lọc các chủng vi sinh vật có khả năng chống chịu muối mật.

Kết quả Bảng 1 cho thấy dưới tác động của nồng độ muối mật 0,3% đã ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng, phát triển và làm giảm tỷ lệ sống của các dòng *Lactobacillus*. Tỷ lệ sống tăng từ thời điểm ban đầu đến T2 nhưng giảm sau đó đến thời điểm T3 cho các dòng sau: LIQ2, LIICP4 và LIDC1 với tỷ lệ sống lần lượt chỉ có 117, 112 và 105%. Hơn nữa, tỷ lệ sống giảm ở 2 dòng LIN5 và LIN4 tại thời điểm T1 cho đến thời điểm T3 với tỷ lệ sống ở T3 lần lượt chỉ còn 86,3 và 78,1%. Tuy nhiên, sau 3 giờ xử lý các dòng còn lại đều có tỷ lệ mật số vi khuẩn tăng lên, tỷ lệ tăng cao nhất là dòng LIDL1 (136%)

và thấp nhất là chủng LIICP1 (112%). Chủng LIDL1 cho thấy có sự thích nghi cao trong môi trường chứa muối mật. Đồng thời 2 dòng còn lại LIDL1 và LIN3 cũng cho thấy có khả năng thích nghi trong môi trường chứa muối mật với tỷ lệ mật số sau 3 giờ xử lý so với ban đầu là 133 và 121%.

Kết quả hiện tại tương tự với công bố của Quách Đức Tinh và ctv (2014) khi nghiên cứu về vi khuẩn *Lactobacillus*, theo đó trong 2 giờ đầu mật độ vi sinh vật tăng lên chậm vì đây là giai đoạn hệ vi sinh vật thích nghi với môi trường có muối mật, muối mật tác động đến các tế bào vi sinh vật làm hạn chế sự phát triển của chúng. Tuy nhiên, trong 2 giờ tiếp theo, tốc độ phát triển của các vi sinh vật tăng lên đáng kể nguyên nhân là do một số protein và enzyme trên màng tế bào vi khuẩn lactic có khả năng trung hòa tác động của muối mật bằng cách cắt đứt liên kết N-acyl giữa gốc steroid và chuỗi amino axit bên của axit mật. Theo Trần Quốc Việt và ctv (2009), các chủng vi sinh vật thử nghiệm đều có khả năng tồn tại trong môi trường chứa muối mật với nồng độ 0,3%. Kết quả nghiên cứu của Dương Nhật Linh và ctv (2011) ở nồng độ muối mật 0,3% sau 3 giờ hầu hết các chủng có tỷ lệ sống cao từ 90 đến 116%. Điều này có ý nghĩa rất quan trọng đối với các vi sinh vật probiotic vì muốn phát huy tác dụng có lợi lên vật chủ khi chúng định cư và tồn tại trong ruột non (Havenaar và Huis, 1992). Ngoài ra, kết quả trên cao hơn so với nghiên cứu của Nguyễn Mạnh Tuấn và ctv (2014), 2 dòng BC và BB2 khi ủ với muối mật 0,3% sau 3 giờ mật số đạt được tương ứng chỉ có 6,45 và 4,70 log cfu/ml. Theo Hoque và ctv (2010), các dòng vi khuẩn *Lactobacillus* phân lập từ Bogra yoghurt và Khulna yoghurt có tốc độ sinh trưởng chậm trong môi trường pH thấp 2,2 nhưng các dòng này có khả năng sinh trưởng và phát triển được trong môi trường có bổ sung 0,05-0,3% muối mật.

3.2.3. Khả năng kháng kháng sinh

Qua Bảng 2 cho thấy ở nhóm kháng sinh ức chế quá trình hình thành tế bào vi khuẩn (Ampicillin) thì chỉ có 3 dòng (LIDC1, LIDL1,

LIN3) có khả năng kháng lại chiếm tỷ lệ 42,9%, số còn lại cho kết quả nhạy cảm yếu. Ở nhóm kháng sinh ức chế quá trình dịch mã của vi khuẩn thì kháng sinh Kanamycin, Chloramphenicol cho cùng kết quả 100% nhạy cảm yếu, còn Gentamycin cho kết quả 100% nhạy cảm vừa. Riêng kháng sinh Tetracycline cho 2 dòng (LIG2, LIN3) kháng lại kháng sinh chiếm 28,6%, còn lại là số dòng cho kết quả nhạy cảm yếu. Do đó có thể sử dụng LIN3 cho gia cầm khi đang sử dụng 2 loại kháng sinh Ampicillin và Tetracycline trong chăn nuôi.

Bảng 2. Đường kính vòng vô khuẩn (mm) và tính nhạy cảm kháng sinh của các dòng *Lactobacillus*

Các dòng <i>Lactobacillus</i>	Kháng sinh			
	KM	GM	TC	AMP
LIDC1	10,67 (M5)	23,00 (S)	7,67 (M5)	6,33 (R)
LIDL1	12,00 (M5)	22,33 (S)	8,33 (M5)	6,33 (R)
LIG2	11,67 (M5)	22,67 (S)	6,67 (R)	7,00 (M5)
LIN3	9,67 (M5)	19,00 (S)	6,00 (R)	6,67 (R)
LIICP1	11,67 (M5)	22,33 (S)	7,67 (M5)	10,33 (M5)
LIDL1	10,00 (M5)	18,00 (S)	9,00 (M5)	10,67 (M5)
LIICP4	8,67 (M5)	18,67 (S)	10,33 (M5)	11,33 (M5)

KM: Kanamycin (30 µg/ml); GM: Gentamycin (10 µg/ml); TC: Tetracycline (30 µg/ml); AMP: Ampicillin (10 µg/ml). Theo tiêu chuẩn cho *Lactobacillus* của Georgieva và ctv (1966): Kháng R<7mm; Nhạy cảm yếu 7≤M5≤16mm; Nhạy cảm vừa 16<S≤25mm; Nhạy cảm mạnh 25mm<S5.

3.3. Định danh dòng vi khuẩn *Lactobacillus*

Dựa trên kết quả phân tích tiềm năng probiotic chọn ra được dòng *Lactobacillus* LIN3 có tiềm năng probiotic cao để thực hiện phản ứng PCR với cặp mồi 27F-1492R, khuếch đại vùng 16S rRNA của vi khuẩn. Sản phẩm PCR có kích thước khoảng 1.500bp, tiến hành giải trình tự gen và sử dụng phần mềm BlastN để so sánh với trình tự ADN của các dòng vi khuẩn có trong ngân hàng dữ liệu NCBI.

Kết quả cho thấy trình tự đoạn gene của dòng *Lactobacillus* LIN3 tương đồng với đoạn gene 16S rRNA của vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* với độ tương đồng là 99,88% và độ bao phủ 100% như được trình bày trong Hình 2. Do đó, dòng *Lactobacillus* LIN3 được định danh như loài *Lactobacillus plantarum*.



Hình 2. Kết quả định danh tên loài của dòng *Lactobacillus* LIN3 theo độ tương đồng đoạn gen 16S rRNA

Tính đến thời điểm hiện tại, trên cơ sở dữ liệu NCBI đã có hơn 106.262 trình tự nucleotid của vi khuẩn *L. plantarum*, trong đó có 3 trình tự bộ gen hoàn chỉnh với chiều dài 3.267.626bp của chủng *L. plantarum* 5N35N (Noda và ctv, 2018), 3.252.258 bp của chủng *L. plantarum* SRCM102022 và 3.388.033 của chủng *L. plantarum* JSA22 và hơn 990.000 trình tự gen 16S rRNA (NCBI, 2019).

### 3.4. Ảnh hưởng của thời gian tồn trữ đến mật số vi khuẩn trong chế phẩm probiotic

Bảng 3. Mật số vi khuẩn (log cfu/ml) của chế phẩm probiotic từ *L. Plantarum* theo thời gian tồn trữ

Cơ chất bảo quản	0 ngày	15 ngày	30 ngày	45 ngày	60 ngày
100% bột gạo	6,13 <sup>a</sup>	5,07 <sup>a</sup>	4,37 <sup>a</sup>	4,43 <sup>a</sup>	4,30 <sup>a</sup>
100% bột mì	4,05 <sup>a</sup>	3,93 <sup>a</sup>	3,70 <sup>a</sup>	3,61 <sup>a</sup>	3,65 <sup>a</sup>
50% bột gạo + 50% bột mì	4,90 <sup>a</sup>	4,53 <sup>a</sup>	4,60 <sup>a</sup>	4,53 <sup>a</sup>	4,80 <sup>a</sup>
SEM	0,028	0,043	0,023	0,049	0,162
P	0,000	0,000	0,000	0,000	0,007

Ghi chú: Các giá trị trung bình trong cùng một cột mang chữ cái a, b, c, d khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $P < 0,05$ )

Đôi với chế phẩm chứa *L. plantarum*, khi sử dụng 100% bột gạo làm chất mang, mật số sau tồn trữ vượt trội so với chế phẩm chứa 100% bột mì và chế phẩm chứa 50% gạo và 50% bột mì ở thời điểm 15 ngày. Tuy nhiên, khi khảo sát ở thời gian dài hơn (60 ngày), mật số trong chế phẩm 100% bột gạo và bột mì có sự sụt giảm rõ rệt trong khi chế phẩm phối hợp 50% bột gạo và 50% bột mì vẫn duy trì được mật số tế bào ổn định. Tại thời điểm cuối cùng của quá trình khảo sát, mật số *L. plantarum* trong chế phẩm 100% bột mì chỉ 3,65 log cfu/ml và chế phẩm chứa 100% bột gạo đạt 4,30 log cfu/ml. Trong khi đó, mật số ở chế phẩm phối trộn gạo và bột mì là (4,8 log cfu/ml) cao hơn so với chế phẩm chứa 100% bột gạo và bột mì. Mật số trong các chế phẩm có sự sụt giảm gần 30% khi so sánh với thời điểm ban đầu (6,13

Sau khi sản phẩm được đóng gói bảo quản, tại ngày đầu tiên, kiểm tra mật số vi khuẩn và sau đó 15 ngày kiểm tra lại cho đến khi kết thúc quá trình khảo sát. Kết quả Bảng 3 cho thấy, sau thời gian tồn trữ mật số vi khuẩn thay đổi theo thời gian và có sự khác biệt giữa 3 NT. Cụ thể, sau 15 ngày tồn trữ ở nhiệt độ phòng, mật số vi khuẩn trong chế phẩm phối trộn 100% bột gạo cao hơn so với NT 50% bột gạo và 50% bột mì cũng như 100% bột mì đối với *L. plantarum*.

log cfu/ml) và có sự khác biệt ý nghĩa thống kê với mức ý nghĩa  $P < 0,05$ . Mật số vi khuẩn *L. plantarum* trong nghiên cứu tương đối thấp hơn so với nghiên cứu của Võ Thị Thủy Huệ và ctv (2018) khi thử nghiệm các tỷ lệ phối trộn tại các NT bao gồm: 100% cám gạo; 95% cám bắp và 5% cám gạo; 90% cám bắp và 10% cám gạo; 85% cám bắp và 15% cám gạo đạt mật số 11,41 log cfu/ml. Nguyên nhân có thể là do trong các chất mang được phối trộn trên có thành phần dinh dưỡng tương đối phù hợp giúp vi khuẩn ổn định và phát triển trong thời gian bảo quản. Kết quả phù hợp với nghiên cứu của Trần Thị Mỹ Trang (2016) cho rằng, mật số khuẩn lạc trong hai tuần đầu và khác biệt không ý nghĩa ở mức 5% sau 3 tuần từ  $5,92.10^7$  cfu/g ở thời điểm ban đầu giảm còn  $3,95.10^7$  cfu/g. Như vậy, tỷ lệ và thành phần chất mang được phối

trộn có ảnh hưởng đến mật số vi khuẩn *L. Plantarum* trong quá trình nghiên cứu. Mặt khác, trong thí nghiệm này việc bổ sung bột mì trong thành phần chất mang cũng có ảnh hưởng tốt đến mật số vi khuẩn sau 60 ngày tồn trữ.

**4. KẾT LUẬN**

Từ 75 mẫu thu ban đầu, qua quá trình phân lập tuyển chọn, quan sát tế bào và kiểm tra đặc tính sinh hóa thu được 11 dòng vi khuẩn *Lactobacillus* có hoạt tính probiotic, trong đó có 5 dòng LIDL1, LIG2, LIN3, LILDL1, LILICP4 mang những đặc điểm của vi sinh vật probiotic. Tuy nhiên, chỉ có dòng LIN3 có tiềm năng cao nhất về chịu pH thấp, muối mật và khả năng kháng kháng sinh và kết quả dinh dưỡng dòng LIN3 với tên loài là *L. plantarum*. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của thời gian tồn trữ sản phẩm probiotic từ *L. plantarum* với tỷ lệ phối trộn 50% bột gạo và 50% bột mì cho thấy có sự gia tăng mật số sau 60 ngày tồn trữ ở điều kiện nhiệt độ thường. Chế phẩm này đang được sử dụng nhằm đánh giá hiệu quả trong phòng bệnh *Salmonella* gây ra trên gà.

**LỜI CẢM ƠN**

Đề tài này được tài trợ bởi Dự án Nâng cấp Trường Đại học Cần Thơ VN14-P6 bằng nguồn vốn vay ODA từ chính phủ Nhật Bản.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Gilliland S.E., T.E. Staley and L.J. Bush (1984) Importance in bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct | Dairy Sci., 67(12):3045-51.
2. Havenaar R. and V.M.J.H. Huis (1992). Probiotics: A general view. In: Lactic acid bacteria in health and disease (Ed., Wood, J.B.J.). Vol 1. Elsevier Applied Science Publishers, Amsterdam.
3. Nguyễn Phước Hiên và Nguyễn Hữu Hiệp (2014). Đánh giá tiềm năng probiotic và nhân diện vi khuẩn acid lactic phân lập từ sữa người và chế phẩm men tiêu hóa. Tạp chí KH. Đại học Cần Thơ. Phần B: NN, TS và CNSH: 31(2014): 21-31.
4. Hoque M.Z., F. Akter, K.M. Hossain, M.S.M. Rahman, M.M. Billah and K.M.D. Islam (2010). Isolation, identification and analysis of probiotic properties of *Lactobacillus* spp. from selective regional yoghurts. World J. Dairy & Food Sci., 5(1): 39-46.
5. Nguyễn Đức Hưng (2006) Chăn nuôi gia cầm. Nhà xuất bản Nông nghiệp Hà Nội, 271 trang.
6. Võ Thị Thuý Huế, Trần Thị Quỳnh Diệp và Nguyễn Minh Quang (2018). Phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn axit lactic và vi khuẩn axit acetic tham gia vào quá trình lên men hạt ca cao. Tạp chí KH-CN Việt Nam,

- 60(8): 55-59.
7. Nguyễn Thị Huyền, Nguyễn Thị Thu Hương, Trịnh Thị Thuý Linh, Nhữ Thị Hà, Trịnh Thị Hao, Nguyễn Thanh Linh và Đặng Xuân Nghiêm (2014) Khảo sát thành phần vi sinh và các đặc tính probiotic của các sản phẩm men tiêu hóa trên thị trường. Tạp chí KHPT, 12(1): 65-72.
8. Nguyễn Văn Kính (2010). Phân tích thực trạng sử dụng kháng sinh và kháng kháng sinh ở Việt Nam. Global Antibiotic Resistance Partnership, 10 14-35.
9. Kumura H., Y. Tanoue, M. Tsukahara, T. Tanaka and K. Shimazaki (2004). Screening of dairy yeast strains for probiotic applications. J. Dairy Sci., 87 4050-56.
10. Dương Nhật Linh, Nguyễn Văn Minh, Đan Duy Pháp, Vũ Thanh Thảo và Trần Cát Đông (2011). Phân lập và sàng lọc một số vi khuẩn lactic có tiềm năng làm probiotic. Nghiên cứu y học Tp. Hồ Chí Minh, 15, Phụ bản số 1.
11. NCBI (2019) Nucleotide sequences of *Lactobacillus plantarum* 16S rRNA, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/?term=Lactobacillus-plantarum+16S> (truy cập ngày 27/8/2019).
12. Noda M., M. Shiraga, T. Kumagai, N. Danshiitsoodol and M. Sugiyama (2018) Characterization of the SN35N strain-specific exopolysaccharide encoded in the whole circular genome of a plant-derived *Lactobacillus plantarum*. Bio. Pharm. Bull., 41(4): 536-45.
13. Papatsiros V.G., P.D. Katsoulos, K.C. Koutoulis, M. Karatzia, A. Dedousi and G. Christodouloupolous (2013). Alternatives to antibiotics for farm animals. CAB Reviews: Perspectives in Agr., Vet. Sci., Nut. Natural Resources, 8 1-15.
14. Trần Thị Mỹ Trang (2006). Nghiên cứu sử dụng vi khuẩn Lactic để sản xuất chế phẩm Probiotic phòng và trị bệnh đường ruột cho heo. Luận văn thạc sĩ sinh học trường đại học sư phạm thành phố Hồ Chí Minh.
15. Hồ Trung Thông và Hồ Lê Quỳnh Châu (2009). Nghiên cứu khả năng sống trong môi trường đường tiêu hóa của dòng vật của một số dòng vi sinh vật nhằm từng bước chọn lọc tạo nguyên liệu sản xuất probiotics. Tạp chí KH. Đại học Huế.
16. Quách Đức Tinh, Tống Thành Trung, Nguyễn Ngọc Duy và Nguyễn Thuý Hương (2014) Khảo sát một số hoạt tính probiotic của Kefir chanh dây truyền thống và Kefir chanh dây bổ sung *Lactobacillus casei* VTCC186. Tạp chí PTKHCN., 16(3): 40-47.
17. Nguyễn Mạnh Tuấn, Nguyễn Quang Tuấn, Phạm Thị Hương Lan và Đỗ Bích Diệp (2014). Kết quả khảo sát một số đặc tính probiotic của các chủng *Lactobacillus* spp. trong điều kiện in vitro. Tạp chí KHKT Chăn nuôi, 10: 48-56.
18. Nguyễn Đăng Vang (2015) Tổng quan chăn nuôi 2012-2014. Hội nghị KH-CN-TN toàn quốc, Đại học Cần Thơ 4 3-19
19. Trần Quốc Việt, Ninh Thị Len, Lê Văn Hùng, Bùi Thị Thuý Huyền và Nguyễn Thị Hằng (2009) Ảnh hưởng của việc bổ sung probiotic vào thức ăn và nước uống đến sinh trưởng và hiệu quả sử dụng thức ăn của gà thịt. Tạp chí KH-CN Chăn nuôi, 20: 32-35
20. Zhou X., Y. Pan, Y. Wang and W. Li (2007). In vitro assessment of gastrointestinal viability of two photosynthetic bacteria, *Rhodospirillum rubrum* and *Rhodobacter sphaeroides* | Zhejiang Univ. Sci. Bio., 8(9): 686-92.