

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN CÁC CHỦNG VI KHUẨN LACTIC CÓ KHẢ NĂNG ĐỐI KHÁNG VỚI MỘT SỐ VI KHUẨN GÂY BỆNH THƯỜNG GẶP TRÊN VẬT NUÔI

Nguyễn Văn Thắng, Phạm Thuỳ Linh, Hoàng Minh Đức,
Trần Thị Khánh Hoà, Nguyễn Thị Lan, Cam Thị Thu Hà, Hoàng Minh Sơn *

Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

*Tác giả liên hệ: hson@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 24.11.2024

Ngày chấp nhận đăng: 18.04.2025

TÓM TẮT

Probiotic là giải pháp thay thế kháng sinh tiềm năng để cải thiện năng suất và kiểm soát các bệnh truyền nhiễm trên vật nuôi. Nghiên cứu được thực hiện nhằm mục đích phân lập các chủng vi khuẩn lactic (LAB) có khả năng đối kháng mạnh với một số vi khuẩn gây bệnh phổ biến trong chăn nuôi. Tổng cộng 33 chủng LAB đã được phân lập từ 100 mẫu ruột gà và ruột lợn. Trong đó, 5 chủng phân lập thể hiện hoạt tính đối kháng mạnh nhất với 5 mầm bệnh được kiểm tra (*S. Typhimurium*, *S. Gallinarum*, *E. coli* K88, *S. aureus* và *C. perfringens*) được xác định thuộc các loài *Pediococcus pentosaceus*, *Levilactobacillus brevis*, *Lactiplantibacillus plantarum* dựa trên kỹ thuật khối phổ MALDI TOF. Các chủng LAB được lựa chọn không gây dung huyết, không sản sinh enzyme DNase, có tính đề kháng cao với acid và muối mật. Tỷ lệ tự kết dính của các chủng LAB phân lập đều trên 40% và mức độ đồng kết dính của chúng với các mầm bệnh dao động trong khoảng 24,39% đến 45,17%. Đặc biệt, tất cả các chủng LAB phân lập đều được xác định là các chủng đa kháng, với tỷ lệ kháng cao nhất đối với ampicillin, erythromycin và tetracycline. Nhìn chung, 5 chủng LAB được tuyển chọn trong nghiên cứu này là những chủng tiềm năng để sản xuất chế phẩm sinh học phòng bệnh cho vật nuôi.

Từ khóa: Vi khuẩn lactic, đối kháng, prebiotic, mầm bệnh.

Isolation and Selection of Lactic Acid Bacteria Antagonistic to Common Pathogenic Bacteria in Livestock

ABSTRACT

Probiotics are known as a promising alternative to antibiotics in improving productivity and controlling infectious diseases in livestock. The study was conducted to isolate lactic acid bacteria (LAB) with strong antagonism against some common pathogenic bacteria in livestock. A total of 33 LAB strains were isolated from 100 chicken and pig intestine samples. Among them, 5 isolates showing strong antagonistic activity against 5 pathogenic bacteria tested (*S. Typhimurium*, *S. Gallinarum*, *E. coli* K88, *S. aureus*, and *C. perfringens*) were identified as *Pediococcus pentosaceus*, *Levilactobacillus brevis*, *Lactiplantibacillus plantarum* using MALDI TOF. The LAB isolates in this study were non-hemolytic, negative for DNase production, and highly resistant to acid and bile salt. The auto-aggregation rates of the LAB isolates were all over 40% and the rates of co-aggregation of them to the pathogens ranged from 24.39% to 45.17%. In particular, all LAB isolates were determined as multi-resistant with the highest resistant rates to ampicillin, erythromycin, and tetracycline. Overall, the 5 selected LAB isolates are potential strains for the production of probiotics for preventing diseases of home animals.

Keywords: Lactic acid bacteria, antagonism, probiotics, pathogens.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Kháng sinh được sử dụng thường xuyên trong chăn nuôi với mục đích kích thích sinh

trưởng và phòng bệnh dẫn đến sự gia tăng vi khuẩn kháng kháng sinh, tạo ra thách thức lớn đối với ngành chăn nuôi (Malik & cs., 2023). Trong đó, các loại vi khuẩn gây bệnh phổ biến

trên vật nuôi như *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Gallinarum*, *Escherichia coli* K88, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* dần trở nên đa kháng, dẫn đến tình trạng khó khăn trong việc lựa chọn kháng sinh điều trị và gây thiệt hại kinh tế đáng kể (Xu & cs., 2022). Bên cạnh đó, các quy định nhằm hạn chế sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi đã được ban hành và thực hiện ở nhiều quốc gia (García-Vela & cs., 2023). Chính vì vậy, việc tìm kiếm giải pháp thay thế kháng sinh phòng bệnh trên vật nuôi đang được quan tâm trong bối cảnh hiện nay.

Sử dụng chế phẩm sinh học thay thế kháng sinh nhằm tăng năng suất và kiểm soát mầm bệnh đang là xu hướng của nền chăn nuôi hiện đại (Arsène & cs., 2021). Trong đó, nhóm probiotic phổ biến nhất là vi khuẩn lactic (Lactic acid bacteria - LAB), thuộc hệ vi sinh vật đường tiêu hóa và thường được ứng dụng trong sản xuất chế phẩm sinh học. LAB đại diện cho nhóm vi khuẩn Gram dương, không sinh bào tử, sản phẩm chính của quá trình trao đổi chất là acid lactic. Tùy thuộc vào chi và loài, vi khuẩn lactic lên men đường chỉ tạo ra acid lactic hoặc acid lactic và các chất khác (Jackson, 2014). Bên cạnh đó, LAB còn sản xuất bacteriocin (peptide kháng khuẩn) có tác dụng ức chế nhiều mầm bệnh. Các chi của LAB phổ biến nhất bao gồm *Lactobacillus*, *Pediococcus*..., phần lớn được công nhận an toàn và thường xuyên được tìm thấy trong đường tiêu hóa của động vật (Mozzi, 2016). Các nghiên cứu trước đây đã cho thấy đặc tính probiotic của các chủng LAB phân lập từ ruột gà và lợn. Nghiên cứu của Balasingham & cs. (2017) cho rằng các chủng LAB phân lập từ ruột lợn có khả năng thích nghi tốt trong điều kiện đường tiêu hóa, tăng cường sức đề kháng và sinh trưởng ở đàn lợn. Theo Li & cs. (2024), trong số 44 chủng LAB phân lập từ ruột gà thì 3 chủng thể hiện hoạt tính đối kháng mạnh với *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* và *Salmonella cholerae*; được chứng minh là ứng cử viên probiotic đầy hứa hẹn sử dụng làm phụ gia thức ăn để tăng năng suất và kiểm soát mầm bệnh ở gia cầm. LAB đóng vai trò kiểm soát mầm bệnh và cải

thiện sức khỏe đường ruột ở vật nuôi. Do đó, LAB được coi là chủng tiềm năng trong sản xuất chế phẩm sinh học, đóng góp tích cực vào sự phát triển của ngành chăn nuôi. Mặc dù vậy, tại Việt Nam có rất ít nghiên cứu về khả năng kiểm soát các mầm bệnh của LAB trên vật nuôi.

Xuất phát từ thực tiễn trên, nghiên cứu được tiến hành với mục đích phân lập và tuyển chọn các chủng LAB từ ruột gà và ruột lợn có khả năng đối kháng với mầm bệnh nhằm ứng dụng trong sản xuất chế phẩm sinh học thay thế kháng sinh phòng và điều trị bệnh cho vật nuôi.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

- Mẫu nghiên cứu: 50 mẫu ruột gà và 50 mẫu ruột lợn thu thập tại các chợ thuộc huyện Gia Lâm, Hà Nội.

- Môi trường, hóa chất: De Man-Rogosa-Sharpe (MRS) agar, MRS broth, Blood agar, Deoxyribonuclease (DNase) agar, Mueller Hinton Broth (MHB), Mueller Hinton agar (MHA), Brain Heart Infusion (BHI) broth, Tryptose Sulfite Cycloserine (TSC) agar, Bột agar, thuốc nhuộm Gram, muối mật, NaOH, HCl, H₂O₂, kháng sinh bột.

- Các chủng vi khuẩn: *S. Typhimurium*, *S. Gallinarum*, *E. coli* K88, *S. aureus*, *C. perfringens* đã được phân lập và giữ giống tại phòng nghiên cứu.

- Địa điểm: Mẫu được phân tích tại Phòng Nghiên cứu Vi sinh vật Thú y, Trung tâm Nghiên cứu Xuất sắc và Đổi mới sáng tạo, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

- Thời gian: Từ tháng 1 đến tháng 9 năm 2024.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thu thập mẫu

Các mẫu ruột (phần ruột non) được thu thập theo TCVN 5522:1991. Cụ thể, 50 mẫu ruột gà và 50 mẫu ruột lợn được thu thập ngẫu nhiên tại các chợ thuộc huyện Gia Lâm, Hà Nội. Mẫu được đựng trong túi chuyên dụng vô trùng,

Phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn lactic có khả năng đối kháng với một số vi khuẩn gây bệnh thường gặp trên vật nuôi

bảo quản lạnh và được vận chuyển về phòng thí nghiệm để tiến hành phân tích trong vòng 24h.

2.2.2. Phân lập vi khuẩn lactic

Mẫu ruột (25g) được đồng nhất với canh thang MRS (225ml) bằng máy đập mẫu với tốc độ 230rpm trong 2 phút và ria cấy lên môi trường thạch MRS, ủ ở 37°C trong 24-48h. Khuẩn lạc điển hình của LAB trên thạch MRS có hình thái tròn, gợn, màu trắng sữa hoặc màu kem được lựa chọn để nhuộm Gram và kiểm tra đặc tính sinh hóa. Các chủng có hình thái khuẩn lạc điển hình trên thạch MRS, Gram dương, tế bào hình gậy hoặc hình cầu, không sinh bào tử, catalase âm tính được coi là LAB giả định, sau đó được bảo quản trong glycerol 20% ở -70°C.

2.2.3. Đánh giá khả năng đối kháng của LAB

Hoạt tính kháng khuẩn của LAB được xác định bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch dựa trên mô tả của Kumar & Kumar (2015) có hiệu chỉnh: canh khuẩn LAB được ly tâm (6.000 × g, 4°C, 20 phút) và lọc qua màng lọc 0,22µm để thu dịch nổi không tế bào (cell free supernatant - CFS). Một phần dịch CFS được trung hòa đến pH 6,5 bằng dung dịch NaOH 0,1N (nCFS). Canh khuẩn của *S. Typhimurium*, *S. Gallinarum*, *E. coli* K88, *S. aureus* (10⁷ CFU/ml) được trộn với thạch mềm BHI 0,8% agar và đổ đều lên bề mặt đĩa thạch MHA. Đối với canh khuẩn *C. perfringens* (10⁷ CFU/ml) sử dụng 2 lớp thạch TSC để đảm bảo điều kiện yếm khí. Sau 6h ủ ở 37°C, tiến hành đục các ô giếng với đường kính 5mm trên bề mặt đĩa thạch để nhỏ dịch nổi CFS và nCFS (50 µl/giếng) của các chủng LAB. Đĩa được giữ lạnh ở 4°C trong 2-3h để các hoạt chất khuếch tán vào thạch, sau đó ủ ở 37°C trong 18h. Mức độ đối kháng của LAB với mầm bệnh được phân loại dựa trên kích thước đường kính vòng vô khuẩn: 6-8mm (+), 10-12mm (++), > 12mm (+++) hoặc không tạo vòng vô khuẩn (-). Các chủng có khả năng đối kháng mạnh với 5 loại mầm bệnh được lựa chọn và định danh bằng kỹ thuật khối phổ MALDI TOF.

2.2.4. Kiểm tra mức độ an toàn của LAB

Tính an toàn của các chủng LAB được đánh giá thông qua khả năng gây dung huyết và sản sinh enzyme Dnase theo phương pháp mô tả bởi Bazireh & cs. (2020) và Shuhadha & cs. (2017). Các chủng LAB được ria cấy lên thạch máu (chứa 5% hồng cầu cừu) và thạch DNase, ủ ở 37°C trong 24h. Kết quả được xác định dựa trên sự xuất hiện quầng hoặc không xuất hiện quầng xung quanh khuẩn lạc tương ứng với đặc tính gây dung huyết (α -hemolysis, β -hemolysis) hoặc không gây dung huyết (γ -hemolysis) của LAB. Kết quả dương tính với DNase khi quan sát thấy vùng màu hồng nhạt hoặc trong suốt xung quanh khuẩn lạc.

2.2.5. Đánh giá tính ổn định của LAB

Tính ổn định của các chủng LAB được đánh giá thông qua khả năng tồn tại trong môi trường bổ sung muối mật và acid theo phương pháp mô tả bởi Ramos & cs. (2013): cấy chuyển canh khuẩn LAB lần lượt vào các ống chứa môi trường Phosphate Buffered Saline (PBS) bổ sung muối mật 0,3% và PBS được điều chỉnh đến giá trị pH 3,0. Tiến hành định lượng LAB có trong hỗn dịch trước và sau khi ủ 3h trên thạch MRS. Tỷ lệ sống sót của trong môi trường muối mật và pH được xác định như sau:

Tỷ lệ sống sót (%) = (Số lượng LAB sau khi ủ 3h/Số lượng LAB trước khi ủ) × 100.

2.2.6. Đánh giá khả năng kết dính của LAB

Khả năng tự kết dính và đồng kết dính của các chủng LAB được đánh giá phương pháp mô tả bởi Yadav & cs. (2016) thông qua giá trị OD (Optical Density) của canh khuẩn bằng máy quang phổ định lượng vi khuẩn IMPLN OD600 DiluPhotomete.

Phương pháp đánh giá khả năng tự kết dính: Canh khuẩn LAB được ly tâm (6.000 × g, 4°C, 20 phút) bỏ dịch nổi và giữ lại các tế bào vi khuẩn, sau đó được rửa và tái huyền phù trong môi trường đệm PBS, điều chỉnh đến OD₆₀₀ = 0,5 (OD ban đầu). Sau 1h ủ ở 37°C, 1ml dịch nổi phía trên được đo giá trị OD₆₀₀ (OD cuối).

Phương pháp đánh giá khả năng đồng kết dính: Canh khuẩn của vi khuẩn gây bệnh được ly tâm bỏ dịch nổi, rửa và tái huyền phù với

dung dịch đệm PBS, điều chỉnh đến $OD_{600} = 0,5$ (OD ban đầu). Đồng nhất huyền phù của các chủng LAB (1ml) và huyền phù vi khuẩn gây bệnh (1ml) với tỷ lệ 1:1 và ủ ở $37^{\circ}C$ trong 1h. Sau ủ, 1ml dịch nổi phía trên được đo giá trị OD_{600} (OD cuối).

Tỷ lệ tế bào kết dính (%) = $[(OD \text{ ban đầu} - OD \text{ cuối})/OD \text{ ban đầu}] \times 100$.

2.2.7. Kiểm tra tính miễn cảm với kháng sinh của LAB

Tính miễn cảm với kháng sinh của LAB được xác định bằng phương pháp pha loãng trong canh thang dựa trên sự phát triển của vi khuẩn trong môi trường MHB có chứa kháng sinh ở các nồng độ khác nhau. Các kháng sinh được lựa chọn (ampicillin, kanamycin, gentamicin, erythromycin, clindamycin, tetracycline, chloramphenicol) và giá trị điểm nhạy cảm giới hạn của vi khuẩn lactic theo hướng dẫn của Cơ quan An toàn thực phẩm châu Âu EFSA (2018).

2.2.8. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng kiểm định t trong phần mềm Microsoft Excel 2021 để đánh giá sự sai khác giữa các giá trị. Giá trị $P < 0,05$ được coi là sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập vi khuẩn lactic

Tổng cộng 33 chủng vi khuẩn lactic được phân lập từ 100 mẫu ruột, trong đó 18 chủng từ ruột lợn và 15 chủng từ ruột gà. Để tránh trùng lặp, với một mẫu dương tính chỉ giữ giống một chủng LAB. Tất cả các chủng LAB phân lập được có hình thái khuẩn lạc đặc trưng trên thạch MRS (Hình 1), Gram dương, hình cầu hoặc gậy (Hình 2) và âm tính với catalase (Hình 3). Kết quả nghiên cứu đã chứng minh ruột lợn và ruột gà có thể là nguồn chứa vi khuẩn lactic tiềm năng.

3.2. Khả năng đối kháng của các chủng LAB phân lập được với vi khuẩn gây bệnh

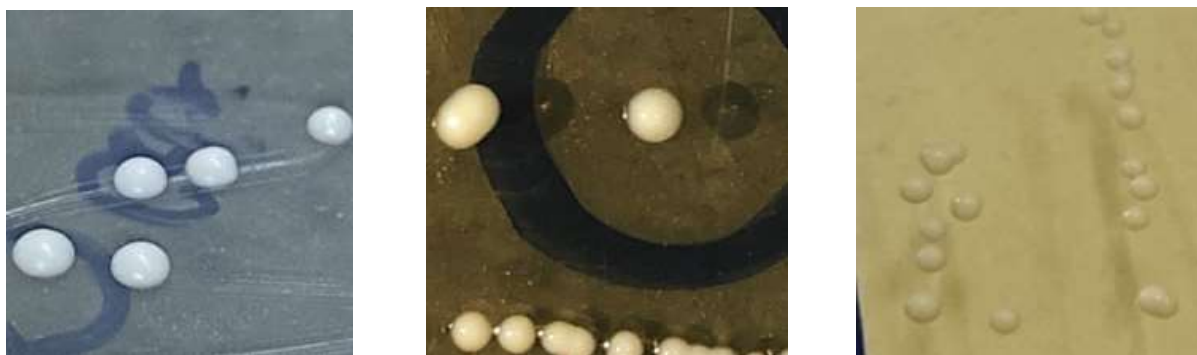
Kết quả ghi nhận 5/33 chủng LAB phân lập được có hoạt tính kháng khuẩn mạnh với 5

chủng vi khuẩn gây bệnh phổ biến trong chăn nuôi (*S. Typhimurium*, *S. Gallinarum*, *E. coli* K88, *S. aureus*, *C. perfringens*) (Bảng 2). Các chủng LAB này đều tạo vòng vô khuẩn với đường kính lớn hơn 12mm đối với vi khuẩn *S. aureus* và *C. perfringens*. Trong khi đó, 2 và 3 chủng LAB tạo ra vòng vô khuẩn tương ứng với $d > 12\text{mm}$ và $d = 10-12\text{mm}$ đối với vi khuẩn *S. Typhimurium*. Kết quả tương tự được ghi nhận khi kiểm tra tính đối kháng với vi khuẩn *E. coli*. Ngoài ra, 4/5 chủng LAB thể hiện tính đối kháng cao với *S. Gallinarum* ($d > 12\text{mm}$) và 1/5 chủng có tính đối kháng trung bình với đường kính vòng vô khuẩn từ 10-12mm. Tuy nhiên, khi dịch nổi CFS được trung hòa ở pH 6,5 (nCFS), hoạt tính đối kháng này giảm đáng kể; đặc biệt với *S. Typhimurium*, *S. Gallinarum* và *E. coli* K88. Điều này, cho thấy tác động kháng khuẩn rõ ràng của pH, cụ thể là acid hữu cơ. LAB sản xuất acid hữu cơ và làm giảm độ pH của môi trường thông qua quá trình lên men, có tác dụng ức chế sự phát triển của nhiều loài vi khuẩn gây bệnh. Acid hữu cơ do LAB tiết ra thấm qua thành tế bào vi khuẩn làm acid hóa tế bào chất, giảm pH nội bào và phá hủy các enzyme làm gián đoạn các chức năng của tế bào vi khuẩn, do cơ chế này mà phần lớn vi khuẩn gây bệnh không tồn tại được trong môi trường pH acid (Cervantes-Elizarrarás & cs., 2019). Bên cạnh đó, LAB sản xuất chất kháng khuẩn khác không phải acid như bacteriocin giúp tăng cường ức chế sự phát triển của mầm bệnh. Bacteriocin được coi như vũ khí sinh học với hoạt tính mạnh và ức chế hầu hết vi khuẩn Gram dương, tuy nhiên chỉ tác động đến một số vi khuẩn Gram âm (Chen & cs., 2022). Vì vậy, khả năng kháng khuẩn vẫn được duy trì sau khi dịch CFS được trung hòa, chứng minh hoạt động ức chế không chỉ phụ thuộc vào acid hữu cơ/pH mà còn liên quan đến các chất kháng khuẩn khác như bacteriocin (De Gianni & cs., 2019). Điều này lý giải dịch nổi nCFS của 5 chủng LAB vẫn thể hiện hoạt động đối kháng với vi khuẩn Gram dương (*S. aureus* và *C. perfringens*) trong nghiên cứu này. Đặc biệt, 3/5 và 1/5 mẫu nCFS lần lượt tạo vùng ức chế với đường kính 10-12mm đối với *S. aureus* và *C. perfringens*.

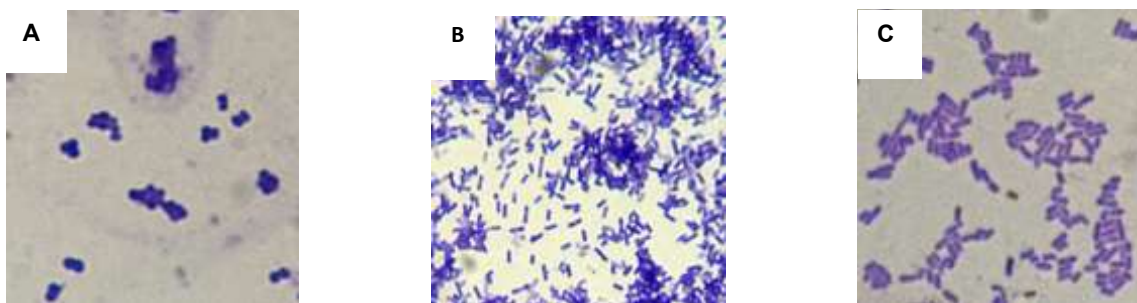
Phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn lactic có khả năng đối kháng với một số vi khuẩn gây bệnh thường gặp trên vật nuôi

Bảng 1. Các kháng sinh và giá trị điểm nhạy cảm giới hạn (mg/l)

Kháng sinh	Ký hiệu	<i>Pediococcus</i> spp.	<i>L. brevis</i>	<i>L. plantarum</i>
Ampicillin	AMP	4	2	2
Kanamycin	KAN	64	64	64
Gentamicin	GEN	16	16	16
Clindamycin	CLI	1	4	4
Erythromycin	ERY	1	1	1
Tetracycline	TET	8	8	32
Chloramphenicol	CHL	4	4	8



Hình 1. Hình thái khuẩn lạc của LAB phân lập trên thạch MRS



Hình 2. Hình thái của các chủng LAB dưới vật kính dầu 100X
(Vi khuẩn Gram dương bắt màu tím, hình cầu (A) hoặc hình que (B, C))

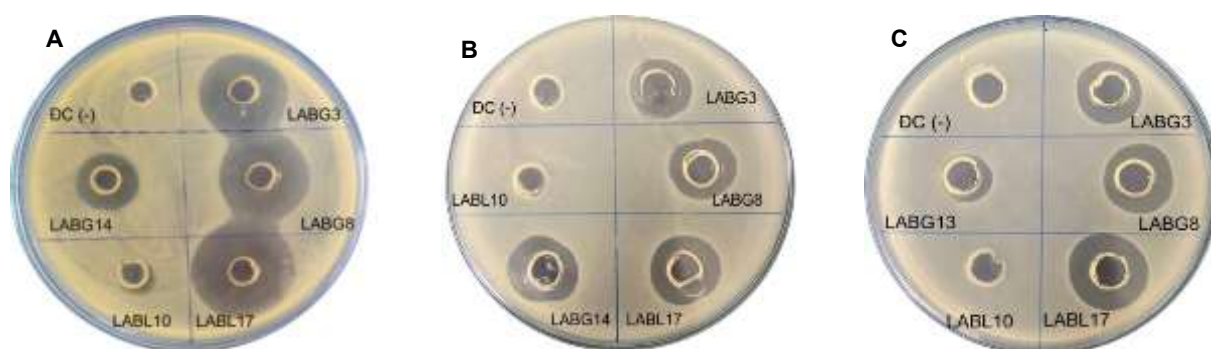


Hình 3. Phản ứng catalase của vi khuẩn lactic

Bảng 2. Khả năng đối kháng của các chủng LAB được chọn lọc

Chủng	Mẫu	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Gallinarum</i>	<i>E. coli</i> K88	<i>S. aureus</i>	<i>C. perfringens</i>
LABG3	CFS	++	+++	++	+++	+++
	nCFS	-	-	-	+	+
LABG8	CFS	++	+++	++	+++	+++
	nCFS	-	-	-	++	+
LABL9	CFS	+++	+++	+++	+++	+++
	nCFS	-	-	-	++	++
LABG14	CFS	++	++	++	+++	+++
	nCFS	-	-	-	+	+
LABL17	CFS	+++	+++	++	+++	+++
	nCFS	-	-	-	++	+

Ghi chú: Đường kính từ 6-8mm (+), 10-12mm (++) , > 12mm (+++) hoặc không tạo vòng vô khuẩn (-).



Hình 4. Kiểm tra tính đối kháng của các chủng LAB phân lập được với vi khuẩn *S. Gallinarum* (A), *S. Typhimurium* (B) và *E. coli* K88 (C)

Bảng 3. Các chủng LAB được lựa chọn để tiếp tục nghiên cứu

Chủng	Loài	Mẫu	Ký hiệu chủng
LABG3	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Ruột gà	PPG1
LABG8	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Ruột gà	PPG2
LABL9	<i>Levilactobacillus brevis</i>	Ruột lợn	LBL
LABG14	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	Ruột gà	LPG
LABL17	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	Ruột lợn	LPL

Nghiên cứu trước đây cũng chỉ ra rằng LAB làm giảm số lượng *E. coli*, *Salmonella* spp. trong đường ruột và giảm thiểu sự bám dính, xâm lấn của chúng vào các cơ quan khác của gà (Noohi & cs., 2016). Nghiên cứu của De Giani & cs. (2019) đã chứng minh LAB thể hiện hoạt động kháng khuẩn rộng chống lại nhiều loại vi khuẩn gây bệnh, như *S. aureus* và *E. coli* ngay cả khi dịch nổi CFS được trung hòa.

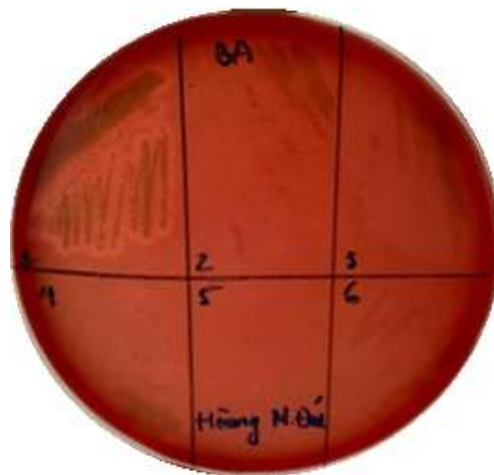
Các chủng LAB có đặc tính đối kháng mạnh với cả 5 mầm bệnh được lựa chọn để tiến hành định danh bằng kỹ thuật khối phổ MALDI TOF. Kết quả 5 chủng LAB được xác định thuộc các loài *Pediococcus pentosaceus* (*P. pentosaceus*), *Levilactobacillus brevis* (*L. brevis*), *Lactiplantibacillus plantarum* (*L. plantarum*).

Kết quả bảng 2 và 3 cho thấy 2 chủng *P. pentosaceus* phân lập từ ruột gà thể hiện khả

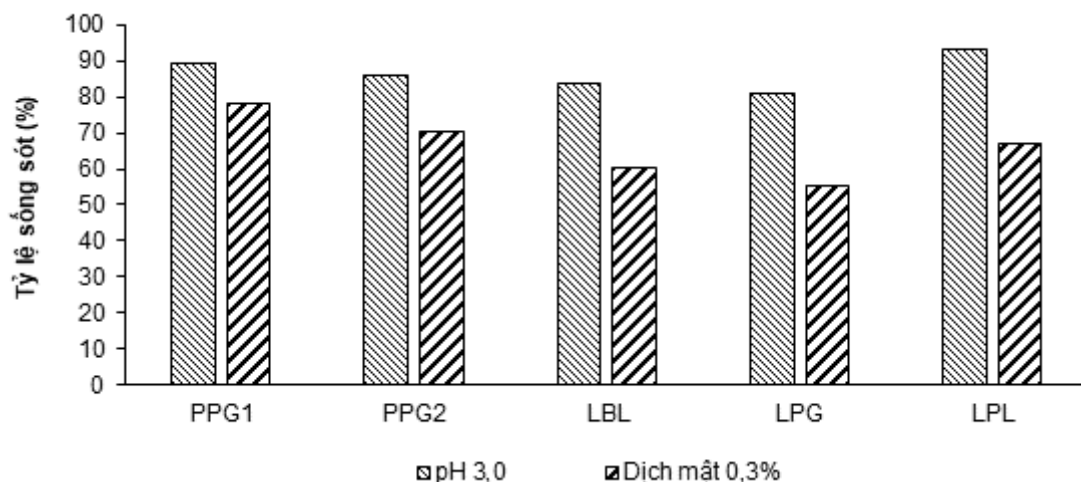
Phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn lactic có khả năng đối kháng với một số vi khuẩn gây bệnh thường gặp trên vật nuôi

năng đối kháng với 5 mầm bệnh có sự tương đồng. Tuy nhiên, đặc tính kháng khuẩn của 2 chủng *L. plantarum* cho thấy sự khác biệt, chủng LPG (nguồn gốc từ ruột gà) có khả năng ức chế *S. Gallinarum* yếu hơn chủng LPL (nguồn gốc từ ruột lợn). Đáng chú ý, chủng LBL thuộc loài *L. brevis* có khả năng đối kháng mạnh nhất đối với 5 mầm bệnh được thử nghiệm với hoạt tính được ghi nhận ở cả mẫu CFS và nCFS. Mặt khác, chủng LPG thuộc loài *L. plantarum* ức chế vi khuẩn Gram dương tốt hơn vi khuẩn Gram âm. Kết quả nghiên cứu tương đồng với các báo cáo trước đây. Theo Huỳnh Ngọc Tâm & cs. (2016), trong 4 chủng có đặc tính đối kháng cao nhất với mầm bệnh

(*E. coli*, *Salmonella enteritidis*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis*) phát hiện 1 chủng thuộc loài *L. plantarum*, 1 chủng thuộc loài *L. brevis*. Morante-Carriel & cs. (2023) chỉ ra rằng các chủng LAB thuộc chi *Lactobacillus* có khả năng ức chế với *Salmonella* spp. (58,33%) và *E. coli* (59%) ở mức cao. Arrijoja-Bretón & cs. (2020) báo cáo rằng *L. plantarum* ức chế hiệu quả sự phát triển của *S. Gallinarum*, *S. aureus*, *E. coli* với đường kính vòng vô khuẩn lần lượt là 24,89mm; 18,93-20,53mm và 20,23mm. Hoạt tính kháng khuẩn này vẫn được duy trì khi nồng độ pH được điều chỉnh đến 6,5 đối với hầu hết mẫu CFS, tương đồng với kết quả trong nghiên cứu này.



Hình 5. Kiểm tra mức độ an toàn của các chủng LAB trên thạch máu
(1: đối chứng dương gây dung huyết, 2-6: chủng LAB phân lập được không gây dung huyết)



Hình 6. Kết quả kiểm tra tính ổn định trong pH acid và muối mật của các chủng LAB

3.3. Mức độ an toàn của các chủng LAB được lựa chọn

LAB được Cục Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) công nhận an toàn (Generally Recognized as Safe - GRAS) và được phép sử dụng trong sản xuất chế phẩm sinh học trong nhiều thập kỷ qua. Tuy nhiên, không phải tất cả các chủng LAB đều được phân loại là GRAS. Do đó, các xét nghiệm về đặc tính gây dung huyết và sản sinh enzyme DNase đã được thực hiện để kiểm tra mức độ an toàn của các chủng LAB được lựa chọn trong nghiên cứu. Kết quả 5/5 chủng LAB đều không gây dung huyết và không sinh DNase.

3.4. Tính ổn định của các chủng LAB được lựa chọn

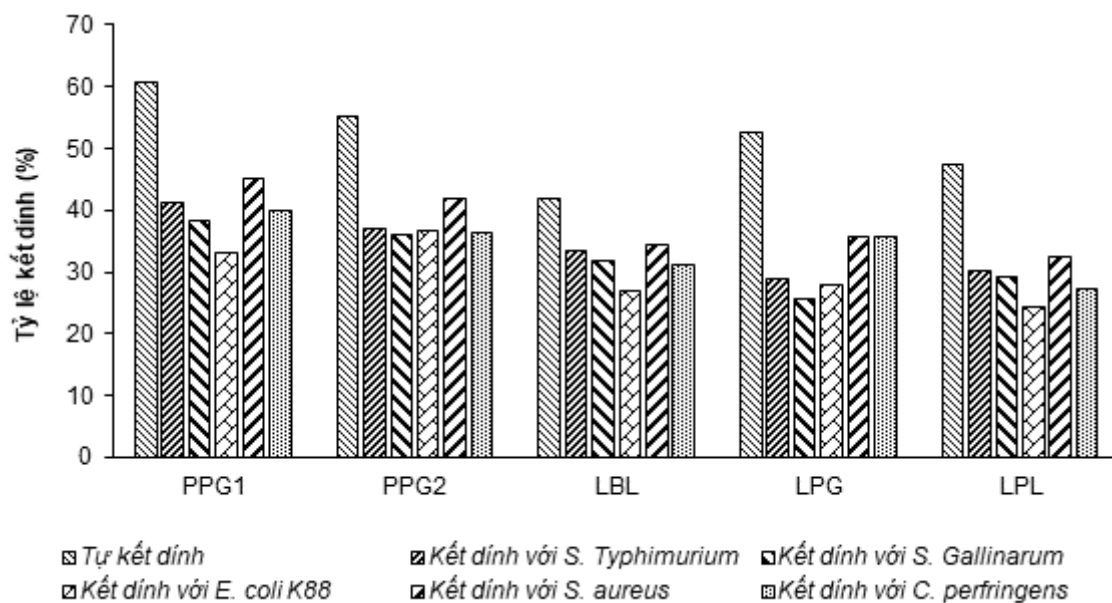
Khả năng tồn tại và phát triển trong môi trường pH acid và muối mật là điều kiện tiên quyết để ứng dụng LAB bổ sung vào thức ăn chăn nuôi. Các chủng LAB được kiểm tra tính ổn định ở nồng độ pH = 3,0 và muối mật 0,3% là nồng độ trung bình trong đường tiêu hóa, khoảng thời gian thử nghiệm 3h cũng dựa trên quá trình tiêu hóa thức ăn.

Nhìn chung, tất cả chủng LAB sống sót tốt trong môi trường pH acid và muối mật (Hình 6).

Đối với môi trường pH 3,0 thì tỷ lệ sống sót của LAB tương đối cao dao động trong khoảng 80,65-92,86%. Tuy nhiên, tỷ lệ sống sót của LAB trong môi trường muối mật 0,3% ở mức thấp hơn, dao động trong khoảng 55,26-78,26%. Chủng LPG có sức đề kháng yếu nhất với tỷ lệ sống sót trong muối mật và pH acid lần lượt là 55,26% và 80,65%. Trong số 5 chủng LAB được thử nghiệm thì chủng LPL, PPG1 có tính ổn định cao nhất trong môi trường pH 3 và muối mật 0,3%. Một số nghiên cứu khác cho thấy tính ổn định của LAB trong môi trường pH acid và muối mật khá cao. Kết quả nghiên cứu của Guo & cs. (2010) chỉ ra rằng tất cả LAB có nguồn gốc từ lợn đều thể hiện ổn định trong điều kiện muối mật 0,3% và pH 3 trong 3 giờ thử nghiệm. Tương tự, các chủng LAB phân lập từ gà có khả năng tồn tại trong môi trường pH 2,5 và muối mật 0,3% với tỷ lệ sống sót lên đến 82,13%.

3.5. Khả năng kết dính của các chủng LAB được lựa chọn

Tự kết dính và đồng kết dính vi khuẩn gây bệnh là một trong những đặc tính để đánh giá khả năng bám dính vào niêm mạc ruột của các chủng LAB (Makzum & cs., 2023). Kết quả kiểm tra khả năng kết dính của các chủng LAB trong nghiên cứu này được tổng hợp ở hình 7.



Hình 7. Kết quả kiểm tra khả năng kết dính của các chủng LAB

Phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn lactic có khả năng đối kháng với một số vi khuẩn gây bệnh thường gặp trên vật nuôi

Khả năng tự kết dính có sự chênh lệch giữa các loài vi khuẩn lactic, *P. pentosaceus* có tỷ lệ tự kết dính cao nhất (55,15-60,83%), tiếp theo là *L. plantarum* (47,28-52,67%), thấp nhất là *L. brevis* (41,96%). Sự tự kết dính ảnh hưởng đến thời gian tồn tại trong đường tiêu hóa, LAB được sử dụng trong sản xuất chế phẩm sinh học phải có mức độ tự kết dính trên 40% (Rajab & cs., 2020), do đó các chủng LAB được chọn lọc trong nghiên cứu đáp ứng tiêu chí này. Mức độ đồng kết dính với các mầm bệnh trong cùng một chủng và giữa các chủng LAB có sự khác biệt. Tất cả các chủng LAB được kiểm tra cho thấy tính kết dính cao với *S. aureus* (32,37-45,17%), ngược lại, đồng kết dính thấp với *E. coli* K88 (24,39-36,54%). Nhìn chung, tỷ lệ kết dính với 5 vi khuẩn gây bệnh cao nhất được ghi nhận ở các chủng LAB thuộc loài *P. pentosaceus*. Chủng PPG1 thể hiện khả năng kết dính mạnh nhất với 3 mầm bệnh, bao gồm *S. aureus* (45,17%), *S. Typhimurium* (41,09%), *C. perfringens* (39,98%), *S. Gallinarum* (38,42%). Kết quả nghiên cứu tương đồng với báo cáo của Li & cs. (2024), các chủng LAB phân lập được có tỷ lệ tự kết dính dao động trong khoảng từ $38,9 \pm 4,31\%$ đến $53,12 \pm 3,14\%$, trong khi mức độ đồng kết dính với *E. coli*, *S. aureus* thấp hơn với khoảng dao động lần lượt là 21,21-36,81% và 24,7-40,2%. Mặt khác, trong nghiên cứu của Zawistowska-Rojek & cs. (2022), các chủng *L. plantarum* có khả năng tự kết dính thấp nhất trong các chủng LAB được thử nghiệm, dao động từ 8,4-20,5% và tỷ lệ đồng kết dính mạnh hơn với *E. coli*, *S. Gallinarum*, *Enterococcus faecalis* với các giá trị dao động từ 37,7-38,6%. Trong khi đó, các chủng *L. plantarum* phân lập được trong nghiên cứu của chúng tôi có tỷ lệ tự kết dính cao (47,28-52,67%), tuy nhiên mức độ

kết dính với vi khuẩn gây bệnh lại thấp hơn (24,39-35,81%).

3.6. Khả năng miễn cảm với kháng sinh của các chủng LAB được lựa chọn

Kết quả kiểm tra tính miễn cảm với kháng sinh của các chủng LAB được tổng hợp ở bảng 4. Các chủng LAB thử nghiệm đều cho thấy khả năng kháng từ 3 loại kháng sinh trở lên. Trong đó, 3 loại kháng sinh bị kháng nhiều nhất là ampicillin, erythromycin, tetracycline (5/5 chủng). Đáng chú ý, chủng PPG1 và PPG2 thuộc loài *P. pentosaceus* có nguồn gốc từ ruột gà kháng 4/7 loại kháng sinh với cùng kiểu hình kháng, chủng LPG (từ ruột gà) và LPL (từ ruột lợn) thuộc loài *L. plantarum* cho thấy khả năng kháng có sự khác biệt lần lượt kháng 6 và 3 loại kháng sinh, chủng LBL thuộc loài *L. brevis* thể hiện tính kháng cao nhất (6/7 kháng sinh) với kiểu hình AMP-KAN-GEN-ERY-TET-CHL đã được ghi nhận.

Theo các báo cáo trước đây, tình trạng kháng kháng sinh ở vi khuẩn lactic không phổ biến, tuy nhiên kết quả nghiên cứu này đã cho thấy tất cả các chủng LAB có khả năng đa kháng, từ đó đưa ra cảnh báo và đề xuất theo dõi tình trạng kháng kháng sinh ở các chủng vi khuẩn lactic. Một số yếu tố nguy cơ về tình trạng kháng kháng sinh ở LAB liên quan đến việc chuyển gen kháng sang các tác nhân gây bệnh trên thực phẩm và khả năng phát tán thông qua chuỗi thức ăn và môi trường (Miranda & cs., 2021). Do đó, cần nghiên cứu sâu hơn về đặc tính kháng kháng sinh của các chủng LAB trong nghiên cứu này nhằm đảm bảo an toàn cho sức khỏe vật nuôi.

Bảng 4. Kết quả kiểm tra tính miễn cảm với kháng sinh của các chủng LAB

Ký hiệu chủng	Loài	Nguồn gốc	Kiểu hình kháng
PPG1	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Ruột gà	AMP-ERY-TET-CHL
PPG2	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Ruột gà	AMP-ERY-TET-CHL
LBL	<i>Levilactobacillus brevis</i>	Ruột lợn	AMP-KAN-GEN-ERY-TET-CHL
LPG	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	Ruột gà	AMP-KAN-GEN-ERY-TET-CHL
LPL	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	Ruột lợn	AMP-ERY-TET

Ghi chú: Amp: Ampicillin; Kan: Kanamycin; Gen: Gentamicin; Cli: Clindamycin; Ery: Erythromycin; Tet: Tetracycline; Chl: Chloramphenicol.

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, 5 chủng LAB được phân lập từ ruột gà và ruột lợn thể hiện hoạt tính đối kháng mạnh với 5 mầm bệnh phổ biến trong chăn nuôi (*S. Typhimurium*, *S. Gallinarum*, *E. coli* K88, *S. aureus*, *C. perfringens*) thuộc các loài *P. pentosaceus*, *L. brevis*, *L. plantarum*. Bên cạnh đó, các chủng LAB còn cho thấy tính ổn định trong môi trường pH thấp và muối mật, khả năng tự kết dính và đồng kết dính cao với mầm bệnh. Vì vậy, 5 chủng LAB được tuyển chọn, đặc biệt chủng PPG1 và PPG2 có thể là chủng lợi khuẩn tiềm năng trong sản xuất chế phẩm sinh học kiểm soát vi khuẩn gây bệnh trong chăn nuôi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Arrijoa-Bretón D., Mani-López E., Palou E. & López-Malo A. (2020). Antimicrobial activity and storage stability of cell-free supernatants from lactic acid bacteria and their applications with fresh beef. *Food Control*. 115(1): 107286.
- Arsène M.M.J., Davares A.K.L., Andreevna S.L., Vladimirovich E.A., Carime B.Z., Marouf R. & Khelifi I. (2021). The use of probiotics in animal feeding for safe production and as potential alternatives to antibiotics. *Veterinary World*. 14(2): 319.
- Balasingham K., Valli C., Radhakrishnan L. & Balasuramanyam D. (2017). Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from swine intestine. *Veterinary World*. 10(7).
- Bazireh H., Shariati P., Azimzadeh Jamalkandi S., Ahmadi A. & Boroumand M.A. (2020). Isolation of Novel Probiotic *Lactobacillus* and *Enterococcus* Strains From Human Salivary and Fecal Sources. *Frontiers in Microbiology*. 11.
- Cervantes-Elizarrarás A., Cruz-Cansino N. del S., Ramírez-Moreno E., Vega-Sánchez V., Velázquez-Guadarrama N., Zafra-Rojas Q.Y. & Piloni-Martini J. (2019). *In vitro* probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from aguamiel and pulque and antibacterial activity against pathogens. *Applied Sciences (Switzerland)*. 9(3).
- Chen J., Pang H., Wang L., Ma C., Wu G., Liu Y., Guan Y., Zhang M., Qin G. & Tan Z. (2022). Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria Strains with Antimicrobial Activity Screened from Bamei Pig Feces. *Foods*. 11(5).
- De Giani A., Bovio F., Forcella M., Fusi P., Sello G. & Di Gennaro P. (2019). Identification of a bacteriocin-like compound from *Lactobacillus plantarum* with antimicrobial activity and effects on normal and cancerogenic human intestinal cells. *AMB Express*. 9(1).
- Efsa Feedap Panel, Rychen G., Aquilina G., Azimonti G., Bampidis V., Bastos M. de L., Bories G., Chesson A., Cocconcelli P.S., Flachowsky G., Gropp J., Kolar B., Kouba M., López-Alonso M., López Puente S., Mantovani A., Mayo B., Ramos F., Saarela M., Villa R.E., Wallace R.J., Wester P., Glandorf B., Herman L., Kärenlampi S., Aguilera J., Anguita M., Brozzi R. & Galobart J. (2018). Guidance on the characterisation of microorganisms used as feed additives or as production organisms. *EFSA Journal*. 16(3).
- García-Vela S., Ben Said L., Soltani S., Guerbaa R., Fernández-Fernández R., Ben Yahia H., Ben Slama K., Torres C. & Fliss I. (2023). Targeting Enterococci with Antimicrobial Activity against *Clostridium perfringens* from Poultry. *Antibiotics*. 12(2).
- Guo X.H., Kim J.M., Nam H.M., Park S.Y. & Kim J.M. (2010). Screening lactic acid bacteria from swine origins for multistrain probiotics based on *in vitro* functional properties. *Anaerobe*. 16(4).
- Huỳnh Ngọc Tâm, Trần Thanh Trúc, Nguyễn Văn Mười & Hà Thanh Toàn (2016). Phân lập và tuyển chọn dòng vi khuẩn lactic có khả năng kháng khuẩn từ dưa lê non (*Cucumis melo* L.) muối chua. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. 1: 18-24.
- Jackson R.S. (2014). 7 - Fermentation. In R.S. Jackson (Ed.): *Wine Science (Fourth Edition)*. Academic Press. pp. 427-534.
- Kumar A. & Kumar D. (2015). Characterization of *Lactobacillus* isolated from dairy samples for probiotic properties. *Anaerobe*. 33: 117-123.
- Li X., Li W., Zhao L., Li Y., He W., Ding K. & Cao P. (2024). Characterization and Assessment of Native Lactic Acid Bacteria from Broiler Intestines for Potential Probiotic Properties. *Microorganisms*. 12(4): 749.
- Makzum S., Ghadam P. & Ramezani M. (2023). Isolation, functional evaluation of probiotic properties and molecular identification of strains isolated from Iranian poultry's gut. *Iranian Journal of Microbiology*. 15(2).
- Malik H., Singh R., Kaur S., Dhaka P., Bedi J.S., Gill J.P.S. & Gongal G. (2023). Review of antibiotic use and resistance in food animal production in WHO South-East Asia Region. *Journal of Infection and Public Health*. 16: 172-182.
- Miranda C., Contente D., Igrejas G., Câmara S.P.A., Dapkevicius M. de L.E. & Poeta P. (2021). Role of exposure to lactic acid bacteria from foods of

- animal origin in human health. In *Foods*. 10(9): 2029.
- Morante-Cariel L., Abasolo F., Bastidas-Caldes C., Paz E.A., Huaquipán R., Díaz R., Valdes M., Cancino D., Sepúlveda N. & Quiñones J. (2023). Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteria from Cocoa Mucilage and Meat: Exploring Their Potential as Biopreservatives for Beef. *Microbiology Research*. 14(3): 1150-1167.
- Mozzi F. (2016). Lactic Acid Bacteria. In B. Caballero, P. M. Finglas & F. Toldrá (Eds.): *Encyclopedia of Food and Health*. Academic Press. pp. 501-508.
- Noohi N., Ebrahimipour G., Rohani M., Talebi M. & Pourshafie M.R. (2016). Evaluation of potential probiotic characteristics and antibacterial effects of strains of *Pediococcus* species isolated from broiler chickens. *British Poultry Science*. 57(3): 317-323.
- Rajab S., Tabandeh F., Shahraky M.K. & Alahyaribeik S. (2020). The effect of *Lactobacillus* cell size on its probiotic characteristics. *Anaerobe*. 62: 102103.
- Ramos C.L., Thorsen L., Schwan R.F., & Jespersen L. (2013). Strain-specific probiotics properties of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis* isolates from Brazilian food products. *Food Microbiology*. 36(1): 22-29.
- Shuhadha M.F.F., Panagoda G.J., Madhujith T. & Jayawardana N.W.I.A. (2017). Evaluation of probiotic attributes of *Lactobacillus* sp. isolated from cow and buffalo curd samples collected from Kandy. *Ceylon Medical Journal*.
- Stiles M.E. & Hastings J.W. (1991). Bacteriocin production by lactic acid bacteria: potential for use in meat preservation. *Trends in Food Science and Technology*. 2(C): 247-251.
- Ủy ban Khoa học Nhà nước (1991). Tiêu chuẩn quốc gia TCVN 5522:1991 về sản phẩm thực phẩm - phương pháp xác định số vi khuẩn chủng *Lactobacillus* (2008).
- Xu C., Kong L., Gao H., Cheng X. & Wang X. (2022). A Review of Current Bacterial Resistance to Antibiotics in Food Animals. In *Frontiers in Microbiology*. Vol. 13.
- Yadav R., Puniya A.K. & Shukla P. (2016). Probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* RYPR1 from an indigenous fermented beverage Raabadi. *Frontiers in Microbiology*. 7: 1683.
- Zawistowska-Rojek A., Kośmider A., Stępień K. & Tyski S. (2022). Adhesion and aggregation properties of *Lactobacillaceae* strains as protection ways against enteropathogenic bacteria. *Archives of Microbiology*. 204(5): 285.