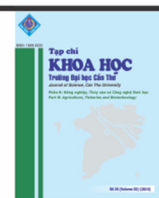




Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ
website: sj.ctu.edu.vn



ĐÁNH GIÁ TIỀM NĂNG PROBIOTIC VÀ NHẬN DIỆN VI KHUẨN ACID LACTIC PHÂN LẬP TỪ SỮA NGƯỜI VÀ CHẾ PHẨM MEN TIÊU HÓA

Nguyễn Phước Hiền¹ và Nguyễn Hữu Hiệp²

¹ Sinh viên ngành Công nghệ Sinh học Khóa 36, Trường Đại học Cần Thơ

² Viện Nghiên cứu & Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 10/02/2014

Ngày chấp nhận: 28/04/2014

Title:

Evaluation of probiotic potential and identification of lactic acid bacteria from human milk and lyophilized bacteria products

Từ khóa:

Enterococcus, kháng kháng sinh, pH thấp, probiotic, sữa người, vi khuẩn acid lactic

Keywords:

Antibiotic resistance, *Enterococcus*, human milk, lactic acid bacteria, low pH, probiotic

ABSTRACT

Twenty-six bacterial isolates were isolated on MRS medium, including 23 isolates from human milk and 3 isolates from lyophilized bacteria products. Most colonies of them were round, opalescent white color to milky white color, raised or convex elevation, lobulated or intact margin. Results of the survey of biological characteristics showed that 10 strains had rod shape (38,5%) and 27 strains had spherical shape (61,5%) existed as single or double cells. All isolates were positive Gram, unable to move and oxidase-negative test. The result of catalase test showed that 14 isolates had catalase-negative. From the surveyed results of the biological characteristics, 14 selected strains were lactic acid bacteria group (53,8%). Evaluated results for resistance to low pH environment illustrated that 14 strains had the resistance to pH 3 in 3 hours. Two strains H1.4 and H9.2 had the resistance to environmental condition of pH 2 for 3 hours with density as 8,93 log(CFU/ml) and 8,71 log(CFU/ml) respectively. In the 14 surveyed strains, 2 strains H1.4 and H3.4 had the resistance to 4 types of antibiotic such as Streptomycin, Cephalixin, Penicillin V at 256 mg/l concentrations and Ampicillin at 128 mg/l concentrations. Strain H9.2 was resistant to 3 types of antibiotic as Streptomycin, Tetracycline and Cephalixin 256 mg/l concentration. Identification of bacteria by DNA sequencing method showed that strains H1.4, H3.4 and H9.2 experienced the similarity to *Enterococcus durans* (99%), *Enterococcus faecium* (99%) and *Enterococcus faecalis* (98%) respectively.

TÓM TẮT

Hai mươi sáu dòng vi khuẩn được phân lập trên môi trường MRS, trong đó 23 dòng được phân lập từ sữa người và 3 dòng có nguồn gốc từ chế phẩm men tiêu hóa đông khô. Phần lớn các dòng vi khuẩn được phân lập có dạng khuẩn lạc tròn, màu sắc trắng đục đến trắng sữa, độ nổi dạng mô hay lồi, bờ nguyên hay chia thùy. Kết quả khảo sát các đặc tính sinh học cho thấy có 10 dòng có dạng hình que (chiếm tỷ lệ 38,5%) và 16 dòng có dạng hình cầu (chiếm tỷ lệ 61,5%) tồn tại ở trạng thái đơn hay kết đôi. Tất cả các dòng vi khuẩn phân lập đều Gram dương, không di động và có thử nghiệm oxidase âm tính. Kết quả thử nghiệm catalase có 18 dòng biểu hiện âm tính. Từ kết quả khảo sát các đặc tính sinh học, tuyển chọn được 14 dòng thuộc nhóm vi khuẩn lactic (chiếm tỷ lệ 53,8%). Kết quả đánh giá khả năng chống chịu môi trường pH thấp cho thấy có 14 dòng chống chịu được môi trường pH 3 trong 3 giờ. Hai dòng H1.4 và H9.2 có khả năng tồn tại trong điều kiện môi trường pH 2 trong 3 giờ với mật số lần lượt là 8,93 log(CFU/ml) và 8,71 log(CFU/ml). Trong 14 dòng được khảo sát, có 2 dòng vi khuẩn H1.4 và H3.4 có khả năng kháng 4 loại kháng sinh Streptomycin, Cephalixin và Penicillin V ở nồng độ 256 mg/l và Ampicillin ở nồng độ 128 mg/l. Dòng H9.2 có khả năng kháng 3 loại kháng sinh Streptomycin, Cephalixin và Tetracycline ở nồng độ 256 mg/l. Sử dụng phương pháp giải trình tự DNA, kết quả cho thấy dòng H1.4, H3.4 và H9.2 lần lượt đồng hình loài *Enterococcus durans* (tỷ lệ 99%), *Enterococcus faecium* (tỷ lệ 99%) và *Enterococcus faecalis* (tỷ lệ 98%).

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong thời đại hiện nay, bảo vệ và nâng cao sức khỏe con người là một vấn đề cực kỳ quan trọng, vì nó quyết định sự sống còn của con người trước nguy cơ dịch bệnh hiểm nghèo, cũng như luôn duy trì sức khỏe tốt là một điều không dễ dàng. Các bệnh truyền nhiễm là vấn đề lớn trên thế giới và mỗi năm các bệnh nhiễm trùng đường tiêu hóa là nguyên nhân chính gây bệnh tật và tử vong trên toàn thế giới (Culligan *et al.*, 2009). Nhiều nghiên cứu cho thấy, probiotic có lợi trong điều trị các bệnh do rối loạn tiêu hóa như tiêu chảy, kiết lỵ, thương hàn... do vi khuẩn gây bệnh đường ruột gây ra. Bổ sung probiotic được xem là hiệu quả trong việc cải thiện tình trạng sức khỏe của con người (Fuller, 1989). Sự gia tăng hoạt động kháng vi sinh vật gây bệnh của vi khuẩn probiotic đã đánh thức cộng đồng các nhà khoa học sử dụng probiotic trong phòng và điều trị bệnh, cũng như là một lựa chọn mới để thay thế thuốc kháng sinh (Ahmed, 2003). Bên cạnh đó, probiotic còn đóng một vai trò quan trọng trong việc thúc đẩy và phát triển bền vững ngành chăn nuôi, thủy sản. Đặc biệt là hạn chế việc sử dụng hóa chất và kháng sinh trong quá trình sản xuất nhằm góp phần bảo vệ môi trường. Hơn nữa, sữa mẹ được xem là một trong những nguồn vi khuẩn lactic có tiềm năng probiotic. Theo Martin *et al.* (2005), sữa mẹ là một yếu tố quan trọng trong việc khởi đầu và phát triển hệ vi sinh vật đường ruột của trẻ trong vài tháng đầu sau khi sinh.

Vi khuẩn probiotic có vai trò và tiềm năng vô cùng to lớn. Tuy nhiên, những nghiên cứu và ứng dụng những tiềm năng này vẫn còn nhiều hạn chế trên thế giới và đặc biệt là ở Việt Nam. Việc ứng dụng các tiềm năng của vi khuẩn probiotic hiện nay chưa thật sự phổ biến và mang lại hiệu quả cao, đặc biệt là trên người. Đứng trước thực trạng trên, nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá và tuyển chọn ra các dòng vi khuẩn lactic có tiềm năng probiotic từ sữa người. Kết quả của đề tài là tiền đề cho những nghiên cứu chuyên sâu tiếp theo về probiotic, sản xuất các chế phẩm sinh học và ứng dụng trong bảo vệ và nâng cao sức khỏe con người trước vấn đề về bệnh tật.

2 PHƯƠNG TIỆN NGHIÊN CỨU

Nguồn mẫu được sử dụng cho thí nghiệm phân lập bao gồm mẫu sữa người và các chế phẩm men tiêu hóa đông khô Probio và Bioacimin. Các loại kháng sinh được sử dụng trong nghiên cứu ở dạng bột được bán ở các hiệu thuốc trên địa bàn thành phố Cần Thơ. Trong đó, loại Streptomycin do Trung Quốc sản xuất, 4 loại còn lại là Penicillin V, Cephalexin, Ampicillin và Tetracycline do các

Công ty Dược ở Việt Nam sản xuất dựa trên nguồn nguyên liệu nhập khẩu. Môi trường nuôi cấy, phân lập và khảo sát bao gồm: môi trường MRS (De Man, Rogosa and Sharpe), dung dịch đệm PBS (Phosphate buffer saline), môi trường nước muối peptone SPW (Saline peptone water)... và các hóa chất cần thiết khác.

3 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1 Thu thập mẫu

Đối với mẫu sữa người, 10 mẫu sữa từ các bà mẹ cho con bú trong vòng 3 tháng đầu sau sinh được thu tại Bệnh viện đa khoa Thành phố Cần Thơ. Mỗi mẫu sữa được chứa trong các túi nylon vô trùng và trữ lạnh ở khoảng 4°C trong bình trữ đá để mang về phòng thí nghiệm. Mẫu chế phẩm men tiêu hóa Probio và Bioacimin được mua tại các cửa hàng thuốc trên địa bàn Thành phố Cần Thơ.

3.2 Phân lập vi khuẩn lactic từ sữa người và men tiêu hóa

Các mẫu sữa người được trộn đều và cho vào môi trường MRS lỏng vô trùng với tỷ lệ 1 ml mẫu/4 ml môi trường để hoạt hóa trong 24 giờ dưới điều kiện kỵ khí ở 37°C. Điều kiện kỵ khí này được tạo bằng cách đặt một ngọn nến đang cháy vào trong một bình thủy tinh đầy kính chứa môi trường nuôi cấy vi khuẩn, khi ngọn nến cháy hết có thể tạo được điều kiện kỵ khí. Đối với các chế phẩm men tiêu hóa, tiến hành hòa tan vào 100 ml môi trường MRS lỏng vô trùng để hoạt hóa trong 24 giờ dưới điều kiện kỵ khí ở 37°C. Sau khi hoạt hóa, dung dịch mẫu chứa vi khuẩn được pha loãng và trải trên môi trường MRS agar để tạo các khuẩn lạc rời rạc. Sau đó, tiến hành phân lập các dòng vi khuẩn trên môi trường MRS agar đến khi đạt độ rỗng nhất định khi quan sát dưới kính hiển vi quang học.

3.3 Khảo sát các đặc tính sinh học và sinh hóa

3.3.1 Quan sát hình thái khuẩn lạc, tế bào và khả năng chuyển động

Quan sát hình dạng, màu sắc, độ nổi khuẩn lạc sau 48 giờ ủ trong điều kiện kỵ khí ở 37°C. Hình dạng tế bào và khả năng di động của vi khuẩn được quan sát và ghi nhận dưới kính hiển vi quang học. Sau đó, tiến hành nhuộm Gram tế bào.

3.3.2 Kiểm tra các đặc tính sinh hóa

Các thử nghiệm sinh hóa bao gồm khả năng tổng hợp các enzyme catalase, oxidase và khả năng phân giải CaCO_3 . Từ kết quả khảo sát các đặc tính sinh học và thử nghiệm sinh hóa sơ bộ chọn ra các dòng thuộc nhóm vi khuẩn lactic để thực hiện thí nghiệm đánh giá khả năng chống chịu môi trường pH thấp và kháng thuốc kháng sinh.

3.4 So sánh và đánh giá khả năng chống chịu môi trường pH thấp

Các dòng vi khuẩn lactic được chủng vào 2 ml môi trường MRS lỏng, vô trùng để tăng sinh trong điều kiện kỵ khí ở 37°C trong 24 giờ. Sau đó, thu lấy sinh khối vi khuẩn bằng cách ly tâm 5.000 vòng/phút ở 4°C trong 10 phút. Rửa sinh khối thu được 2 lần với dung dịch PBS ở pH 7,2. Chuyển dịch huyền phù vi khuẩn vào ống nghiệm chứa môi trường PBS pH 3. Sau mỗi thời điểm 0, 1, 2 và 3 giờ, hút 100 µl dung dịch trong mỗi ống chuyển sang môi trường MRS lỏng, ủ ở 37°C trong 24 giờ. Sau đó, tiến hành đo mật độ quang (OD) ở bước sóng 600 nm và đếm mật số vi khuẩn ở mỗi thời điểm khảo sát. Mật số vi khuẩn được khảo sát bằng phương pháp pha loãng mẫu và phương pháp đếm sống (Cao Ngọc Diệp và Nguyễn Hữu Hiệp, 2009). Các dòng vi khuẩn lactic trên cũng được khảo sát đồng thời trong môi trường pH 6,4 để đánh giá sự phát triển trong môi trường pH tối ưu. Các dòng vi khuẩn lactic có khả năng chống chịu điều kiện pH 3 trong 3 giờ được chọn để khảo sát trong điều kiện pH 2. Tương tự như vậy, các dòng vi khuẩn có khả năng chống chịu pH 2 trong 3 giờ được chọn để tiếp tục khảo sát trong điều kiện pH 1.

3.5 Khảo sát khả năng kháng thuốc kháng sinh

3.5.1 Phương pháp tiến hành

Thí nghiệm được tiến hành khảo sát đối với 5 loại kháng sinh Penicillin V, Streptomycin, Cephalaxin, Ampicillin và Tetracycline, dựa trên phương pháp khuếch tán đĩa của NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) (1997) có thay đổi và bổ sung cho phù hợp với điều kiện và yêu cầu của thí nghiệm như sau: Tiến hành trải dung dịch chứa vi khuẩn đã nuôi tăng sinh trong môi trường MRS lỏng trong 24 giờ ở 37°C trên đĩa petri. Đồng thời, pha mỗi loại kháng sinh thành dãy gồm 12 nồng độ giảm dần từ 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125 mg/l theo phương pháp pha loãng bậc hai từ nồng độ gốc 256 mg/l đã lọc bằng bộ lọc vi khuẩn (Dung *et al.*, 2008). Mỗi nồng độ của các loại kháng sinh được chứa riêng biệt trong các lọ thủy tinh vô trùng. Sau đó, dùng thủ thuật vô trùng đặt các đĩa giấy đã tẩm dung dịch kháng sinh lên đĩa petri. Ủ các đĩa thí nghiệm trong điều kiện kỵ khí ở 37°C trong 48 giờ. Sau thời gian ủ, đo đường kính vòng ức chế sinh trưởng và so sánh với các giá trị tiêu chuẩn về mức độ nhạy cảm với kháng sinh.

3.5.2 Phân tích kết quả

Khả năng kháng kháng sinh được đánh giá theo 3 mức độ dựa vào đường kính vòng ức chế sinh trưởng như sau:

- Kháng mạnh (K): ≤ 13 mm
- Kháng trung bình (T): 14-16 mm
- Nhạy cảm (N): ≥ 17 mm

(Nguồn: White *et al.*, 2003)

3.6 Nhận diện loài bằng kỹ thuật sinh học phân tử

Các dòng vi khuẩn lactic có nguồn gốc từ sữa động vật có khả năng chống chịu điều kiện môi trường pH thấp và kháng được các loại kháng sinh ở nồng độ cao được tuyển chọn để trích DNA và khuếch đại DNA bằng máy PCR. Mẫu DNA vi khuẩn sau khi ly trích sẽ tiến hành phản ứng PCR với cặp mồi gene 16S rRNA (Lane *et al.*, 1991): 27F làm mồi xuôi và 1492R làm mồi ngược có trình tự như sau:

27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC-3'
1492R 5'-TACGTTACCTTGTACGACT-3'

Giải trình tự gene vi khuẩn và so sánh với ngân hàng dữ liệu gene của NCBI bằng chương trình Nucleotide BLAST.

3.7 Xử lý số liệu

Các số liệu thí nghiệm được xử lý thống kê và vẽ biểu đồ bằng hai phần mềm MiniTab Version 16.0 và Excel Version 2003.

4 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

4.1 Kết quả phân lập vi khuẩn lactic từ sữa người và chế phẩm men tiêu hóa

Hai mươi sáu dòng vi khuẩn được phân lập từ 10 mẫu sữa người và 2 loại chế phẩm Bioacimin và Probio. Trong đó, có 23/26 dòng được phân lập từ 10 mẫu sữa người (chiếm 88,5%) và 03/26 dòng phân lập từ 2 chế phẩm Bioacimin và Probio (chiếm 11,5%). Phần lớn các dòng vi khuẩn phân lập được có dạng khuẩn lạc hình tròn, màu trắng đục hoặc trắng sữa, độ nổi dạng mô hay lồi, bìa nguyên hay chia thùy. Mười dòng vi khuẩn có dạng hình que (chiếm tỷ lệ 38,5%) và 16 dòng có dạng hình cầu (chiếm tỷ lệ 61,5%) tồn tại ở trạng thái đơn, kết đôi. Tất cả các dòng vi khuẩn đều Gram dương và không di động. Kết quả thử nghiệm sinh hóa cho thấy tất cả các dòng đều có thử nghiệm oxidase âm tính và 14/26 dòng có thử nghiệm catalase âm tính (chiếm tỷ lệ 53,8%). Kết quả tuyển chọn được 14 dòng thuộc nhóm vi khuẩn lactic dựa vào hình thái khuẩn lạc, hình dạng tế bào, đặc điểm Gram và các thử nghiệm sinh hóa (Bảng 1).

Bảng 1: Đặc tính sinh học các dòng vi khuẩn lactic phân lập từ sữa người và men tiêu hóa

Dòng vi khuẩn	Nguồn phân lập	Hình thái khuẩn lạc	Hình dạng tế bào	Thử nghiệm catalase	Thử nghiệm oxydase
Bio1.2	Bioacimin	Tròn, bìa nguyên, nổi mô, trắng sữa	Que ngắn	—	—
Bio2.1	Bioacimin	Tròn, bìa nguyên, nổi mô, trắng sữa	Que ngắn	—	—
Probi	Probio	Tròn, chia thủy, lồi, trắng đục	Cầu đôi	—	—
H1.4	Sữa người	Tròn, bìa nguyên, nổi mô, trắng sữa	Cầu đôi	—	—
H3.4	Sữa người	Tròn, bìa nguyên, nổi mô, trắng sữa	Cầu đôi	—	—
H6.3	Sữa người	Tròn, bìa nguyên, nổi mô, trắng sữa	Que ngắn	—	—
H7.1	Sữa người	Tròn nhỏ, chia thủy, lồi, trắng đục	Que dài	—	—
H9.1	Sữa người	Tròn nhỏ, bìa nguyên, lồi, trắng sữa	Cầu đôi	—	—
H9.2	Sữa người	Tròn nhỏ, bìa nguyên, nổi mô, trắng sữa	Cầu đôi	—	—
H9.3	Sữa người	Tròn nhỏ, bìa nguyên, nổi mô, trắng sữa	Cầu đôi	—	—
H9.4	Sữa người	Tròn nhỏ, bìa nguyên, lồi, trắng sữa	Que ngắn đôi	—	—
H9.5	Sữa người	Tròn, bìa nguyên, nổi mô, trắng sữa	Que ngắn đôi	—	—
H9.6	Sữa người	Tròn nhỏ, bìa nguyên, nổi mô, trắng sữa	Que ngắn đôi	—	—
H10.2	Sữa người	Tròn nhỏ, bìa nguyên, nổi mô, trắng sữa	Que ngắn	—	—

Ghi chú: (—): Âm tính

4.2 Kết quả so sánh và đánh giá khả năng chống chịu môi trường pH thấp

4.2.1 Môi trường pH 6,4

Ở pH 6,4, mật số ban đầu vào thời điểm 0 giờ của các dòng vi khuẩn phân lập có sự khác nhau và dao động trong khoảng từ 7,69-8,91 log(CFU/ml).

Đến thời điểm 3 giờ, mật số dao động trong khoảng 7,66-8,89 log(CFU/ml), thể hiện sự thay đổi rất ít hay gần như không thay đổi so với thời điểm ban đầu. Kết quả khảo sát chứng tỏ pH 6,4 là điều kiện pH thích hợp cho sự phát triển của các dòng vi khuẩn phân lập.

Bảng 2: Mật số (logCFU/ml) các dòng vi khuẩn lactic trong môi trường pH 6,4

Dòng vi khuẩn	Thời gian (giờ)				LSD	CV (%)
	0	1	2	3		
Bio1.2	8,87	8,87	8,86	8,87	ns	0,24
Bio2.1	8,91	8,90	8,88	8,89	ns	0,25
Probi	7,69	7,82	7,82	7,74	ns	2,81
H1.4	8,80	8,80	8,80	8,80	ns	0,41
H3.4	8,81	8,81	8,80	8,81	ns	0,31
H6.3	8,83	8,83	8,82	8,83	ns	0,34
H7.1	7,72	7,66	7,72	7,66	ns	1,32
H9.1	8,77	8,76	8,77	8,76	ns	0,43
H9.2	8,80	8,80	8,79	8,79	ns	0,31
H9.3	8,80	8,81	8,80	8,81	ns	0,36
H9.4	8,79	8,79	8,79	8,79	ns	0,24
H9.5	8,82	8,81	8,81	8,81	ns	0,38
H9.6	8,81	8,81	8,81	8,80	ns	0,33
H10.2	8,81	8,81	8,82	8,81	ns	0,32

Ghi chú: ns: khác biệt không có ý nghĩa

Số liệu là kết quả trung bình của 3 lần lặp lại. Trong cùng một hàng, các giá trị trung bình thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%

4.2.2 Môi trường pH 3

Môi trường pH 3 được chọn để khảo sát và tuyển chọn các dòng vi khuẩn lactic có tiềm năng probiotic vì lý do khả năng chống chịu pH 3 trong ít nhất 3 giờ là điều kiện cần thiết đối với các dòng

vi khuẩn probiotic ứng dụng trên người (Matijasic *et al.*, 2000). Bên cạnh đó, môi trường pH của dịch dạ dày của người có thể đạt pH 3 hoặc cao hơn khi chứa thực phẩm và các sản phẩm từ sữa (Matijasic và Rogelj, 2000). Kết quả khảo sát ở điều kiện pH

3 cho thấy, mật số ban đầu tại thời điểm 0 giờ của các dòng vi khuẩn phân lập có sự khác nhau và dao động trong khoảng từ 7,93-9,05 log(CFU/ml). Nhìn chung, tất cả các dòng vi khuẩn phân lập đều có mật số giảm sau 3 giờ thí nghiệm và dao động trong khoảng từ 7,79-9,01 log(CFU/ml). Sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê cho thấy sự thay

đổi đáng kể mật số các dòng vi khuẩn so với thời điểm ban đầu (Bảng 3). Tuy nhiên, xét trong tiêu chí đánh giá khả năng chống chịu môi trường pH thấp, các kết quả khảo sát trên đã chứng minh phần lớn các dòng vi khuẩn lactic phân lập đều có khả năng chống chịu được điều kiện pH 3 trong 3 giờ.

Bảng 3: Mật số (logCFU/ml) các dòng vi khuẩn lactic trong môi trường pH 3

Dòng vi khuẩn	Thời gian (giờ)				CV (%)
	0	1	2	3	
Bio1.2	8,95 ^a	8,88 ^{ab}	8,81 ^c	8,82 ^{bc}	0,30
Bio2.1	8,81 ^a	8,80 ^a	8,78 ^a	8,76 ^a	0,45
Probi	7,93 ^a	7,89 ^a	7,86 ^a	7,82 ^a	1,26
H1.4	9,03 ^a	8,91 ^b	8,89 ^{bc}	8,83 ^c	0,32
H3.4	9,01 ^a	8,86 ^b	8,84 ^b	8,84 ^b	0,49
H6.3	8,99 ^a	8,99 ^a	8,98 ^a	8,93 ^a	0,26
H7.1	7,94 ^a	7,89 ^a	7,86 ^a	7,79 ^a	1,56
H9.1	9,05 ^a	9,00 ^b	8,97 ^b	8,91 ^c	0,25
H9.2	8,93 ^a	8,87 ^b	8,84 ^b	8,82 ^b	0,20
H9.3	9,03 ^a	9,03 ^a	9,01 ^a	8,99 ^a	0,34
H9.4	9,03 ^a	9,03 ^a	9,02 ^a	9,01 ^a	0,23
H9.5	9,05 ^a	9,04 ^{ab}	9,03 ^{ab}	8,98 ^b	0,26
H9.6	9,04 ^a	9,04 ^a	9,04 ^a	9,01 ^a	0,29
H10.2	8,90 ^a	8,88 ^{ab}	8,83 ^b	8,82 ^b	0,27

Ghi chú: Số liệu là kết quả trung bình của 3 lần lặp lại. Trong cùng một hàng, các giá trị trung bình có cùng chữ cái thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%

4.2.3 Môi trường pH 2

Khác với kết quả khảo sát trong điều kiện pH 6,4, trong môi trường pH 2 tất cả các dòng vi khuẩn đều có mật số giảm rõ rệt sau 3 giờ thí nghiệm. Sau 1 giờ khảo sát, 13/14 dòng vi khuẩn thể hiện khả năng chống chịu pH 2 với mật số thay đổi không đáng kể so với thời điểm 0 giờ (chiếm tỷ lệ 92,8%). Ở thời điểm 2 giờ, có 06/14 dòng vi khuẩn (chiếm tỷ lệ 42,8%) có khả năng chống chịu với điều kiện pH này (bao gồm các dòng H3.4,

H6.3, H10.2 và Bio1.2). Đến thời điểm 3 giờ, phần lớn các dòng không có khả năng tồn tại với giá mật số bằng 0. Tuy nhiên, trong số 14 dòng được khảo sát, 2 dòng vi khuẩn H1.4 và H9.2 biểu hiện khả năng chống chịu trong 3 giờ ở điều kiện pH 2 với giá trị mật số lần lượt là 8,90 và 8,71 log(CFU/ml) (chiếm tỷ lệ 14,3%). Khả năng chống chịu của 2 dòng vi khuẩn này vượt qua các dòng vi khuẩn Probi, Bio1.2 và Bio2.1 được phân lập từ các chế phẩm men tiêu hóa được sử dụng phổ biến trên thị trường (Bảng 4).

Bảng 4: Mật số (logCFU/ml) các dòng vi khuẩn lactic trong môi trường pH 2

Dòng vi khuẩn	Thời gian (giờ)				CV (%)
	0	1	2	3	
Bio1.2	9,07 ^a	9,06 ^a	9,01 ^b	0,00 ^c	0,26
H1.4	9,10 ^a	9,09 ^a	8,91 ^b	8,90 ^b	0,19
H3.4	9,08 ^a	9,05 ^a	9,04 ^a	0,00 ^b	0,26
H6.3	9,09 ^a	9,04 ^a	8,87 ^b	0,00 ^c	0,33
H9.2	8,89 ^a	8,80 ^b	8,81 ^b	8,71 ^c	0,24
H10.2	9,01 ^a	8,98 ^{ab}	8,93 ^b	0,00 ^c	0,42

Ghi chú: Số liệu là kết quả trung bình của 3 lần lặp lại. Trong cùng một hàng, các giá trị trung bình có cùng chữ cái thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%

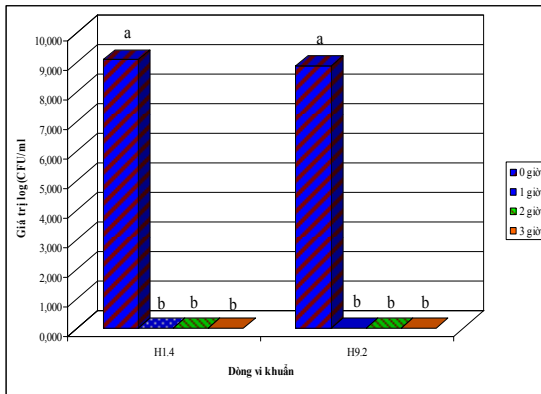
4.2.4 Môi trường pH 1

Hai dòng vi khuẩn H1.4 và H9.2 thể hiện khả năng chống chịu điều kiện pH 2 trong 3 giờ được

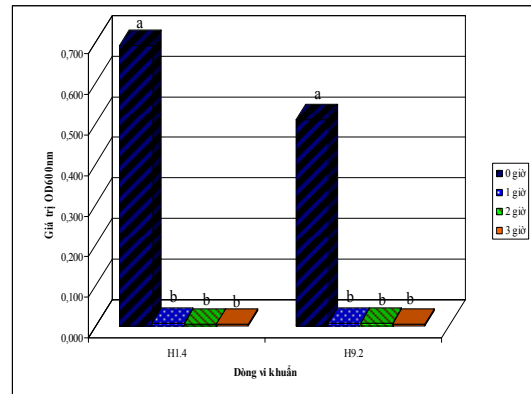
chọn lọc để tiếp tục khảo sát trong môi trường pH 1. Đây là môi trường rất acid và ảnh hưởng rất lớn đến sự tồn tại của nhiều loài vi sinh vật. Kết quả

khảo sát cho thấy, hai dòng H1.4 và H9.2 không thể chống chịu được đến 1 giờ. Tương tự như sự thay đổi của giá trị mật số, kết quả giá trị

OD_{600nm} cũng thể hiện hai dòng vi khuẩn khảo sát không có khả năng chống chịu điều kiện pH 1 sau 1 giờ (Hình 1).



A



B

Hình 1: Sự thay đổi giá trị mật số (logCFU/ml) (A) và OD_{600nm} (B) của dòng vi khuẩn H1.4 và H9.2 trong môi trường pH 1

Ghi chú: Số liệu là trung bình của 3 lần lặp lại. Ở mỗi dòng vi khuẩn, các giá trị trung bình có cùng chữ cái thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%

4.3 Kết quả khảo sát và đánh giá khả năng kháng thuốc kháng sinh

4.3.1 Kháng sinh Penicillin V

Penicillin V là loại kháng sinh thuộc nhóm ức chế tổng hợp vách tế bào vi khuẩn. Giá trị MIC (Minimum Inhibitory Concentration) thường nằm

trong khoảng 0,01-0,1 mg/l. Trong thí nghiệm này, tất cả các dòng vi khuẩn lactic đều có khả năng kháng Penicillin V nồng độ từ 0,125-8 mg/l. Đến nồng độ 256 mg/l, vẫn còn 03/14 dòng vi khuẩn (chiếm tỷ lệ 21,4%) biểu hiện kháng với Penicillin V (bao gồm các dòng Bio2.1, H1.4, H3.4).

Bảng 5: Khả năng kháng kháng sinh Penicillin V của một số dòng vi khuẩn lactic phân lập từ sữa người và men tiêu hóa

STT	Dòng vi khuẩn	Nồng độ kháng sinh (mg/l)											
		0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
1	Bio1.2	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	T
2	Bio2.1	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
3	Probi	K	K	K	K	K	K	K	N	N	N	N	N
4	H1.4	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
5	H3.4	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
6	H9.2	K	K	K	K	K	K	K	K	K	T	N	N

Ghi chú: K: Kháng mạnh; T: Kháng trung gian; N: Nhạy cảm

4.3.2 Kháng sinh Streptomycin và Cephalixin

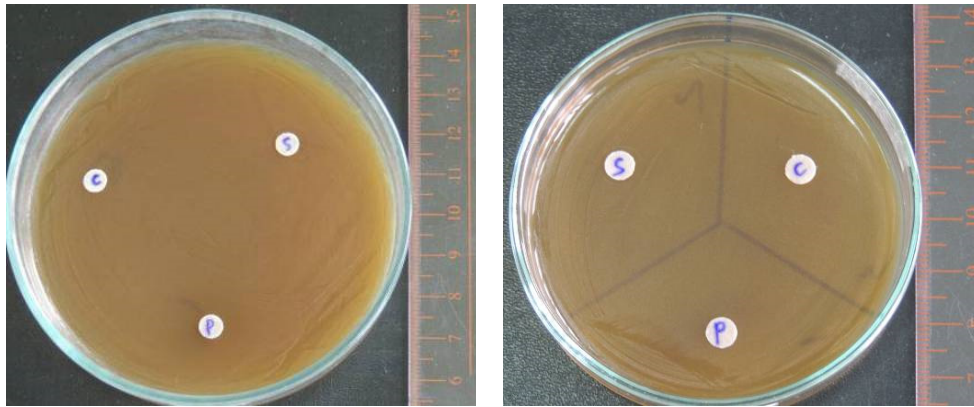
Streptomycin là loại kháng sinh thuộc nhóm ức chế tổng hợp protein của vi khuẩn. Trong khi đó, Cephalixin có tác dụng ức chế tổng hợp vách tế bào vi khuẩn, bền vững với penicilinase. Theo Korhonen (2010), giá trị MIC của Streptomycin đối với phần lớn vi khuẩn lactic nằm trong khoảng 2-256 µg/ml. Ngoài ra, theo nghiên cứu của Dung *et al.* (2008), có đến 98,7% (trong tổng số 50 dòng vi khuẩn gây bệnh gan thận mủ trên cá tra) bị nhạy

cảm với kháng sinh Cephalixin nồng độ 30 µg/ml. Hiệu quả cao của kháng sinh Cephalixin nhờ vào khả năng ức chế tổng hợp vách tế bào vi khuẩn và bền vững với enzyme penicilinase. Kết quả thí nghiệm này cho thấy tất cả các dòng vi khuẩn lactic phân lập đều có khả năng kháng Streptomycin và Cephalixin ở nồng độ từ 0,125-256 mg/l. Điều này chứng minh kháng sinh Streptomycin và Cephalixin không ảnh hưởng đến sự phát triển của các dòng vi khuẩn phân lập.

Bảng 6: Khả năng kháng kháng sinh Streptomycin và Cephalaxin của một số dòng vi khuẩn lactic phân lập từ sữa người và men tiêu hóa

STT	Dòng vi khuẩn	Nồng độ kháng sinh (mg/l)											
		0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
1	Bio1.2	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
2	Bio2.1	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
3	Probi	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
4	H1.4	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
5	H3.4	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
6	H9.2	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K

Ghi chú: K: Kháng mạnh; T: Kháng trung gian; N: Nhạy cảm



A

B

Hình 2: Khả năng kháng kháng sinh Penicillin V (P), Streptomycin (S) và Cephalaxin (C) ở nồng độ 256 mg/l của dòng vi khuẩn H1.4 (A) và H3.4 (B)

4.3.3 Kháng sinh Ampicillin

Ampicillin là loại kháng sinh phổ rộng thuộc nhóm beta-lactam có tác chủ yếu vào quá trình nhân lên của vi khuẩn, ức chế sự tổng hợp mucopeptide của màng tế bào vi khuẩn. Theo Dung *et al.* (2008), có đến 86% (trong tổng số 50 dòng vi khuẩn gây bệnh gan thận mủ trên cá tra) nhạy cảm với Ampicillin nồng độ 10 µg/ml. Kết quả khảo sát

thể hiện, tất cả các dòng vi khuẩn phân lập kháng Ampicillin ở nồng độ từ 0,125-16 mg/l. Tuy nhiên, ở nồng độ 128 mg/l, vẫn còn 04/14 dòng vi khuẩn (chiếm tỷ lệ 28,6%) biểu hiện kháng (bao gồm các dòng Bio2.1, H1.4, H3.4 và H10.2). Đến nồng độ 256 mg/l, không có dòng vi khuẩn nào biểu hiện kháng với kháng sinh Ampicillin.

Bảng 7: Khả năng kháng kháng sinh Ampicillin của một số dòng vi khuẩn lactic phân lập từ sữa người và men tiêu hóa

STT	Dòng vi khuẩn	Nồng độ kháng sinh (mg/l)											
		0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
1	Bio1.2	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	T	T
2	Bio2.1	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	T
3	Probi	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	T	N
4	H1.4	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	T
5	H3.4	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	T
6	H9.2	K	K	K	K	K	K	K	K	K	T	N	N

Ghi chú: K: Kháng mạnh; T: Kháng trung gian; N: Nhạy cảm

4.3.4 Kháng sinh Tetracycline

Tetracycline ức chế sự tổng hợp protein của tế bào vi khuẩn bằng cách gắn vào phần 30S của

ribosome, do đó ức chế gắn aminoacyl-tRNA mới vào vị trí tiếp nhận. Tuy nhiên, theo Dung *et al.* (2008), chỉ có khoảng 30% (trong tổng số 50 dòng

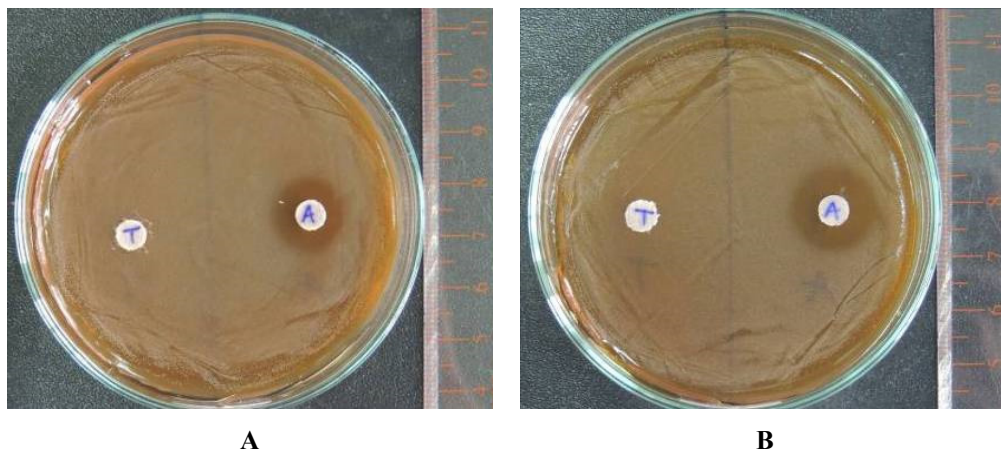
vi khuẩn gây bệnh gan thận mũ trên cá tra) nhạy cảm với Tetracycline nồng độ 30 µg/ml. Kết quả khảo sát cho thấy, tất cả các dòng vi khuẩn phân lập có khả năng kháng Tetracycline ở nồng độ từ 0,125-16 mg/l. Đến nồng độ 128 mg/l và 256 mg/l, có đến 07/14 dòng vi khuẩn (chiếm tỷ lệ 50,0%) biểu hiện kháng với Tetracycline (bao gồm các dòng Probi, H9.1, H9.2, H9.3, H9.4, H9.5 và H9.6). Các nghiên cứu hiện nay đã ủng hộ việc sử dụng probiotic để phòng ngừa bệnh tiêu chảy có liên quan đến kháng sinh. Hiệu quả kháng thuốc

kháng sinh ở nồng độ cao chỉ ra rằng, nếu sử dụng các probiotic phân lập từ sữa động vật cho bệnh nhân điều trị bằng kháng sinh sẽ rất hữu ích trong việc phục hồi bệnh nhanh hơn bởi sự thiết lập hệ vi sinh vật có ích trong đường ruột một cách nhanh chóng. Khả năng kháng của vi khuẩn probiotic với một số kháng sinh có thể được sử dụng cho cả hai mục đích phòng ngừa và điều trị các bệnh nhiễm trùng đường ruột (El-Naggar, 2004).

Bảng 8: Khả năng kháng kháng sinh Tetracycline của một số dòng vi khuẩn lactic phân lập từ sữa người và men tiêu hóa

STT	Dòng vi khuẩn	Nồng độ kháng sinh (mg/l)											
		0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
1	Bio1.2	K	K	K	K	K	K	K	K	K	T	N	N
2	Bio2.1	K	K	K	K	K	K	K	K	T	T	N	N
3	Probi	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
4	H1.4	K	K	K	K	K	K	K	K	K	T	N	N
5	H3.4	K	K	K	K	K	K	K	K	K	T	N	N
6	H9.2	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K

Ghi chú: K: Kháng mạnh; T: Kháng trung gian; N: Nhạy cảm



Hình 3: Khả năng kháng kháng sinh Ampicillin (A) và Tetracycline (T) ở nồng độ 128 mg/l của dòng vi khuẩn Probi (A) và H9.2 (B)

4.4 Kết quả nhận diện loài bằng kỹ thuật sinh học phân tử

Kết quả trình tự gene 16S rRNA của dòng H1.4 như sau:

CTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCC
TGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAACTC
AAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCG
GTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACG
CGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTT
TGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCCTTC
GGGGGCAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTT

GTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGT
TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATTG
TTAGTTGAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTG
CCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGAT
GACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCT
GGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTA
CAACGAGTTGCGAAGTCGCGAGGCTAAGC
TAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATT
GCAGGCTGCAATCGCCTGCATGAAGCCGG
AATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCAGCCG
CGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACA
CCGCCCGTCAACACGAGAGTTTGTAAACC

CCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTTGGAG
CCAGCCGCCTAAGGTGGTTTTAGACAAGG
AGGCAGCCGGAGGTTTTGGGTTGAATAACC
AGCTCAGGGGTGGCGCCCGGAATCTTGGG
GACTGGCGGCTCCGAGGATGTGCGGGGGG
GGCGTAGGCGAACTCAAGATAAGGTCCCT

GCGAGGAAGAGGGGTACCGTGTGCAAAGT
AAACTAGAAAAGTAGTCACTGGGCCCAA
AGTCGGGTCGATGATTGCATGCACGCTTCC
CCCAGATTTTAAAAAGGCGGGGCTATATAG
ACGGATTTTGGGACGCTTTGAACA

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Enterococcus durans strain 075 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1085	1085	69%	0.0	99%	JN560931.1
Streptococcus agalactiae strain VITVS5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1079	1079	69%	0.0	98%	KF186620.1
Uncultured Enterococcus sp. clone HLB-89 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1079	1079	69%	0.0	98%	KF135685.1
Enterococcus faecium Aus0085, complete genome	1079	6449	69%	0.0	98%	CP006620.1
Enterococcus faecium strain R-10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1079	1079	69%	0.0	98%	KF318400.1
Enterococcus faecium strain S4-18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1079	1079	69%	0.0	98%	KC478513.1

Hình 4: Kết quả so sánh trình tự dòng vi khuẩn H1.4

Dòng H1.4 có tổng số nucleotide được giải là 883 nucleotide, cho kết quả đồng hình với trình tự DNA của loài *Enterococcus durans* với tỷ lệ 99%.

Kết quả trình tự gene 16S rRNA của dòng H3.4 như sau:

TGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGAT
AACACTTGAAACAGGTGCTAATACCGTAT
AACAAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGA
AAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGA
CCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTA
ACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCC
GACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGG
ACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGA
GGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGA
CGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGA
GTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCT
GTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTA
ACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAG
AAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGC

CGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTC
CGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAG
GCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCC
CGGCTCAACCGGGGAGGGTTCATTGGAAC
TGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGT
GGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
GATATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGG
CGGCTCTCTGGTCTGTAACAGCGTGAGG
CTCGAAAGCGTGGGGAGCAACACAGGATTA
GATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGAT
GAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCT
TCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTC
CGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAA
ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACA
AGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGC
AACCGGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACAT
CCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCC
CTTCGGGGGCAAAGTGACAAGTTGGTGCAT
GGTTGTCCTCAGCTCGTGTGATGAAATGTT
GGGTTAAGTCCGCAACCAACCGCAAT

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Uncultured organism clone ELU0019-T101-S-NIPCRAMqANA_000113 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1807	1807	99%	0.0	99%	HQ745301.1
Enterococcus faecium strain BAB-1371 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1801	1801	99%	0.0	99%	KF535138.1
Enterococcus faecium strain 3 (C2F1) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1801	1801	99%	0.0	99%	KF254550.1
Enterococcus faecium strain 175B (C1S1) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1801	1801	99%	0.0	99%	KF254549.1
Enterococcus faecium strain 132A (C4S1) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1801	1801	99%	0.0	99%	KF254547.1
Enterococcus faecium strain 111B (C2S1) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1801	1801	99%	0.0	99%	KF254546.1

Hình 5: Kết quả so sánh trình tự dòng vi khuẩn H3.4

Dòng H3.4 có tổng số nucleotide được giải là 1000 nucleotide, cho kết quả đồng hình với trình tự DNA của loài *Enterococcus faecium* với tỷ lệ 99%.

Kết quả trình tự gene 16S rRNA của dòng H9.2 như sau:

TGGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGAT
AACACTTGAAACAGGTGCTAATACCGCAT
AACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGA
AAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGG
ACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGT
AACGGCTACCAAGGCCACGATGCATAGC
CGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGG
GACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGG
AGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGG
ACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTG
AGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTC
TGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTA
ACTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCAG
AAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGC
CGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTC

CGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAG
GCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCC
CGGCTCAACCGGGGAGGGTTCATTGGAAC
TGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGT
GGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
GATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGG
CGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGG
CTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA
GATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGAT
GAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCT
TCAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTC
CGCCTGGGGGAGTACGACCGCAAGGGTTG
AAACTCAAAGGAATTTGACGGGGGGCCCG
CACAAGCGGGTGGAGCATGTGGTTTTAATT
TCGAAGCAACGCGAAAGAACCTTTACCAG
GTCCTTGACATCCTTTTGACCACTCTAGAA
GATAGAGCTTTTCCCTTCGGGGAACAAAGT
GACAAGGTGGTGCATGGTTTGTCTGCCACC
TCGTGGCCGTGAGAATGTTGGGGTTAAGTC
CCCACAACGAACCGCAACCCTTTATTGTTA
GTTTGCCATCATTTAGT

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Enterococcus faecalis strain BWNRKU3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1773	1773	100%	0.0	98%	KC890839.1
Bacterium NLAE-21-H299 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1773	1773	100%	0.0	98%	JX006515.1
Uncultured organism clone ELU0150-T457-S-NIPCRAMoNA_000349 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1773	1773	100%	0.0	98%	HQ802135.1
Uncultured bacterium clone nbv694a05c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1773	1773	100%	0.0	98%	HM848177.1
Enterococcus faecalis strain YZ65 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1773	1773	100%	0.0	98%	HM776210.1
Enterococcus faecalis strain YY71 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1773	1773	100%	0.0	98%	HM776203.1
Enterococcus faecalis strain YY60 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1773	1773	100%	0.0	98%	HM776202.1

Hình 6: Kết quả so sánh trình tự dòng vi khuẩn H9.2

Dòng H9.2 có tổng số nucleotide được giải là 1050 nucleotide, cho kết quả đồng hình với trình tự DNA của loài *Enterococcus faecalis* với tỷ lệ 98%.

Các loài vi khuẩn thuộc giống *Enterococcus* như *E. durans*, *E. faecium* và *E. faecalis* từ lâu đã được xem là các vi khuẩn probiotic được thương mại hóa và sử dụng phổ biến trên người và động vật (Musikasang *et al.*, 2009). Ngoài ra, kết quả nghiên cứu của Axelsson (2004) cho thấy, giống vi khuẩn *Enterococcus* có thể phát triển ở pH thấp và nồng độ muối cao... Các loài vi khuẩn thuộc giống *Enterococcus* còn có khả năng sinh enterocin và được ứng dụng trong bảo quản thực phẩm như: *E. faecium*, *E. faecalis* và *E. durans*.

5 KẾT LUẬN

Hai mươi sáu dòng vi khuẩn được phân lập trên môi trường MRS agar. Trong đó, 23 dòng được phân lập từ sữa người, 2 dòng có nguồn gốc từ chế phẩm Bioacimin và 1 dòng từ chế phẩm Probio. Phần lớn các dòng vi khuẩn phân lập được có dạng khuẩn lạc hình tròn, màu sắc trắng đục đến trắng sữa, độ nổi dạng mô hay lồi, bìa nguyên hay chia thùy. Kết quả khảo sát các đặc tính sinh học cho thấy phần lớn các dòng vi khuẩn có dạng hình cầu và hình que tồn tại ở trạng thái đơn hoặc kết đôi. Tất cả các dòng phân lập đều Gram dương, không di động và có kết quả thử nghiệm oxidase âm tính. Kết quả thử nghiệm catalase có 14 dòng biểu hiện

âm tính. Từ kết quả khảo sát các đặc tính sinh học tuyển chọn được 14 dòng thuộc nhóm vi khuẩn lactic. Trong 14 dòng được khảo sát, tất cả đều có khả năng chống chịu môi trường pH 3 trong 3 giờ. Đặc biệt, 2 dòng H1.4 và H9.2 có khả năng tồn tại trong điều kiện môi trường pH 2 trong 3 giờ với mật số lần lượt là 8,93 log(CFU/ml) và 8,71 log(CFU/ml). Hai dòng H1.4 và H3.4 có khả năng kháng 4 loại kháng sinh Streptomycin, Cephalixin và Penicillin V ở nồng độ 256 mg/l và Ampicillin ở nồng độ 128 mg/l. Dòng H9.2 có khả năng kháng 3 loại kháng sinh Streptomycin, Cephalixin và Tetracycline ở nồng độ 256 mg/l. Dòng H1.4, H3.4 và H9.2 lần lượt đồng hình với trình tự DNA của loài *E. durans* (tỷ lệ 99%), *E. faecium* (tỷ lệ 99%) và *E. faecalis* (tỷ lệ 98%).

LỜI CẢM ƠN

Tác giả xin chân thành bày tỏ lòng biết ơn đến Ban lãnh đạo Viện Nghiên cứu & Phát triển Công nghệ Sinh học, PGS.TS. Nguyễn Hữu Hiệp, các anh chị và các bạn ở Phòng thí nghiệm Vi sinh vật Viện Nghiên cứu & Phát triển Công nghệ Sinh học đã tận tình hướng dẫn và giúp đỡ rất nhiều từ quá trình thực hiện đến khi hoàn thành nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ahmed, F.E. 2003. Genetically modified probiotics in foods. Trends Biotechnol, 21: 491–497.
- Axelsson, L. 2004. Acid lactic Bacteria: Classification and Physiology. Acid lactic Bacteria microbiological and Functional Aspects. Third Edition. Revised and Expanded MATFORSK, Norwegian Food Research Institute, Norway, pp.19-67.
- Cao Ngọc Diệp và Nguyễn Hữu Hiệp. 2009. Vi sinh học đại cương. Nxb. Đại học Cần Thơ: trang 1-15.
- Culligan, E.P., C. Hill and R.D. Sleator. 2009. Probiotics and gastrointestinal disease: successes, problems, and future prospects. Gut pathogens, 1(19): 1-12.
- Dung, T.T., F. Haesebrouck, N.A. Tuan, P. Sorgeloos, M. Baelem and A. Decostere, 2008. Antimicrobial susceptibility pattern of *Edwardsiella ictaluri* isolate from natural outbreaks of bacillary necrosis of *Pangasianodon hypophthalmus* in Vietnam. Microbial Drug Resistance, 14(4): 311-316.
- EI-Naggar MYM. (2004). Comparative study of probiotic cultures to control the growth of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium*. Biotechnol, 3: 173-180.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. J Appl Bacteriol, 66: 65-78.
- Korhonen, J. 2010. Antibiotic Resistance of Lactic Acid Bacteria. Dissertations in Forestry and Natural Sciences. University of Eastern Finland, pp.27-29.
- Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Stackebrandt, E., and Goodfellow, M., eds., John Wiley and Sons, New York, NY, pp.115-175.
- Martin, R., M. Olivares, M.L. Marin, L. Fernandez, J. Xaus and J.M. Rodriguez. 2005. Probiotic potential of 3 *Lactobacilli* strains isolated from breast milk. J Hum Lact, 21(1): 8-17.
- Matijasic, B.B., and I. Rogelj. 2000. *Lactobacillus* K7 – a New Candidate for a Probiotic Strain. Food Technol. Biotechnol., 38(2), pp. 113-119.
- Musikasang, H., A. Tani, A. H-kittikun and S. Maneerat. 2009. Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from chicken gastrointestinal digestive tract. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 25(8): 1337-1345.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1997. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard M2-A6. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
- White, D.G., P.F. McDermott and R.D. Walker. 2003. Chapter 5: Antimicrobial Susceptibility Testing Methodologies. Microbial food Safety in Animal Agriculture Current Topics. ME Torrence and RE Isaacson, eds. Iowa State Press, Iowa, USA.