

TUYỂN CHỌN VÀ NGHIÊN CỨU ĐẶC TÍNH PROBIOTIC CỦA MỘT SỐ CHỦNG VI KHUẨN LACTIC PHÂN LẬP TỪ VỊT

Nguyễn Xuân Cảnh¹, Phạm Thị Thu Huyền¹, Trần Văn Mầu¹

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu phân lập và tuyển chọn được các chủng vi khuẩn có hoạt tính probiotic ứng dụng cho vịt. Đã phân lập được 22 chủng vi khuẩn có khả năng phân giải CaCO_3 trên môi trường MRS từ các mẫu ruột vịt thu thập được. Nghiên cứu đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào cũng như một số đặc tính sinh hóa bao gồm nhuộm gram, kiểm tra khả năng sinh catalase, kết quả cho thấy cả 22 chủng phân lập được tương đồng với vi khuẩn *Lactobacillus*. Các chủng này còn có khả năng chịu acid và muối mật cao, trong đó 02 chủng R2.3 và R3.3 có khả năng chịu cao nhất và ổn định nhất. Ngoài ra, 02 chủng R2.3 và R3.3 có khả năng đối kháng với một số vi khuẩn gây bệnh đường ruột. Khi thử nghiệm trên vịt cho thấy chủng R2.3 và R3.3 có thể duy trì trong hệ thống đường ruột của vịt tối thiểu là 07 ngày. Các kết quả thu được cho thấy, hai chủng vi khuẩn được tuyển chọn có thể được sử dụng cho các nghiên cứu, ứng dụng tiếp theo.

Từ khóa: *Lactobacillus*, probiotic, vịt

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Probiotic là chất bổ sung vi sinh vật sống vào thức ăn giúp cải thiện cân bằng của hệ vi sinh vật đường tiêu hóa theo hướng có lợi cho vật chủ (Fuller, 1989) hoặc là các vi sinh vật sống khi đưa vào cơ thể theo đường tiêu hóa với một số lượng đủ sẽ đem lại sức khỏe tốt cho vật chủ (FAO/WHO, 2002). Bằng cơ chế hoạt động cạnh tranh loại trừ, các vi sinh vật có hoạt tính probiotic tạo nên hàng rào vật lý ngăn cản sự tấn công của các sinh vật gây bệnh (Steiner, 2006). Qua đó, probiotic giúp cải thiện cân bằng hệ vi sinh đường ruột hay đường tiêu hóa của người và động vật, đặc biệt đối với gia cầm, sự sinh trưởng và phát triển của nhóm vi sinh vật này có tác động tích cực trong việc làm tăng cường khả năng miễn dịch, hiệu quả tiêu hóa và hấp thu các chất dinh dưỡng. Ngoài ra, probiotic còn rất an toàn với động vật, thân thiện với môi trường và không tạo ra các chất tồn dư có hại cho sức khỏe người tiêu dùng trong các sản phẩm chăn nuôi (Patterson and Burkholder, 2003). Các chủng vi sinh vật phổ biến trong probiotic là nhóm vi khuẩn lactic, chúng được quan tâm nghiên cứu khá nhiều nhờ khả năng lên men sinh lactic acid và được xem là an toàn và có giá trị dinh dưỡng đối với người và động vật. Nhóm vi khuẩn lactic chủ yếu thuộc vào hai chi vi khuẩn *Lactobacillus* và *Bifidobacterium*, ngoài ra một số vi sinh vật khác như *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecium*, *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces cerevisiae* cũng có vai trò như vi khuẩn lactic. Một trong những tính chất quan trọng của vi khuẩn lactic là khả năng chuyển hóa nguồn carbon thành acid, các chất có tính kháng khuẩn, do đó có tiềm năng rất lớn trong ứng dụng sản xuất chế phẩm probiotic

(Nguyễn Thế Trang và Trần Đình Mẫn, 2008), chi *Lactobacillus* được sử dụng như nguồn probiotic nhiều hơn cả.

Rất nhiều các chế phẩm probiotic đã được nghiên cứu sản xuất và ứng dụng trên các đối tượng khác nhau như người, lợn, gà, cá... Sự thành công của một chế phẩm probiotic là làm sao tìm được chủng có hoạt tính cao, và đáp ứng đầy đủ mọi đặc tính của vi khuẩn probiotic bao gồm khả năng chịu acid, không sinh catalase, khả năng chịu muối mật cũng như tính bám dính cao (Trần Quốc Việt và *ctv.*, 2009). Nghiên cứu này được thực hiện nhằm tìm ra các chủng vi khuẩn probiotic có tiềm năng ứng dụng trên vịt.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Nghiên cứu sử dụng các chủng vi khuẩn lactic được phân lập từ ruột của vịt thu thập tại các lò mổ khác nhau trên khu vực huyện Gia Lâm, Hà Nội. Các chủng vi sinh vật kiểm định như *Staphylococcus ssp.*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* được cung cấp từ Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp phân lập vi khuẩn lactic từ ruột vịt

Chuẩn bị môi trường MRS rắn với thành phần: Glucose 20 g/l, cao thịt 10 g/l, cao nấm men 5 g/l, pepton 10 g/l, CH_3COONa 5 g/l, $(\text{NH}_4)_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 2 g/l, K_2HPO_4 2 g/l, MgSO_4 0,1 g/l, MnSO_4 0,05 g/l, thạch 20g/l, tween 80 1ml/l, pH = 6,5 ± 0,2 sau đó bổ sung 3% CaCO_3 . Hút 1 ml dịch có trong ruột vịt đã thu thập hòa với 10 ml nước cất vô trùng trong ống

¹ Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

nghiệm vô trùng và tiếp tục pha loãng theo hệ số 10 đến nồng độ 10^{-2} - 10^{-7} . Tại mỗi độ pha loãng, hút 100 μ l dịch nhỏ lên trải đều trên bề mặt môi trường phân lập. Nuôi ở 30°C trong 2 ngày sau đó quan sát khuẩn lạc. Thu nhận các khuẩn lạc có vòng phân giải CaCO_3 lớn và nuôi cấy trên thạch nghiêng chứa môi trường MRS.

2.2.2. Phương pháp xác định đặc điểm hình thái và sinh hóa của các chủng vi khuẩn phân lập

Các chủng vi khuẩn sau khi được phân lập sẽ tiến hành quan sát hình thái khuẩn lạc và tế bào. Sau đó xác định một số đặc điểm sinh hóa như khả năng bắt màu nhuộm Gram, khả năng di động, khả năng sinh catalase, khả năng sinh bào tử... các phương pháp này được thực hiện dựa vào các phương pháp nghiên cứu vi sinh vật truyền thống.

2.2.3. Xác định khả năng chịu acid của các chủng vi khuẩn tuyển chọn

Nuôi cấy các chủng đã chọn lọc vi khuẩn trên môi trường MRS lỏng ở các giá trị pH khác nhau (1, 2, 3 và 4), sau đó đánh giá khả năng chịu acid của chúng nhờ vào đo độ đục của dịch nuôi cấy ở bước sóng 620 nm sau khi ủ 30^o ở 0 h, 3 h. Nếu $\Delta\text{OD} > 0$ ở cả bốn giá trị pH thì chủng đó có khả năng chịu acid. Điều chỉnh pH môi trường lỏng bằng HCl 5%. $\Delta\text{OD} = \text{OD}_{3\text{h}} - \text{OD}_{0\text{h}}$ tại mỗi pH.

2.2.4. Xác định khả năng chịu muối mật của các chủng vi khuẩn tuyển chọn

Khảo sát khả năng chịu muối mật của các chủng vi khuẩn lactic trong môi trường MRS lỏng có bổ sung 0,3% muối mật (Gilliland and Walker, 1990). Nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường MRS lỏng có bổ sung muối mật 0,3% ở 37°C trong 4 giờ. Mật độ tế bào trong mẫu được xác định bằng cách xác định mật độ quang ở bước sóng 620 nm. Mức độ chịu muối mật được xác định bằng thời gian để tăng $\text{OD}_{620\text{nm}}$ sau khi nuôi 4 giờ so với ban đầu lên 0,3 đơn vị. $\Delta\text{OD} = \text{OD}_{4\text{h}} - \text{OD}_{0\text{h}}$.

2.2.5. Xác định khả năng kháng vi sinh vật do sinh chất kháng khuẩn không phải là acid

Chủng nghiên cứu được nuôi trong môi trường MRS lỏng ở 30°C, từ 18 - 20 h, sau đó ly tâm thu dịch nổi và chỉnh pH về trung tính (6,7 - 6,8). Chủng kiểm định được nuôi qua đêm trong môi trường LB (Luria - Bertani) lỏng ở 30°C trong 24 h, sau đó bổ sung vào môi trường đặc với tỷ lệ 0,5%, lắc đều môi trường với chủng kiểm định, đổ ra đĩa petri và khoan lỗ thạch. Nhỏ dịch ly tâm được chỉnh pH vào các lỗ thạch và giữ ở nhiệt độ 4°C/4 h, sau đó ủ ở 30°C/24

h. Căn cứ vào việc xuất hiện vòng ức chế vi sinh vật kiểm định để xác định chủng có khả năng kháng vi sinh vật (Schillinger and Lücke, 1989).

Hoạt tính kháng khuẩn của các vi sinh vật tuyển chọn được tính bằng đường kính vòng kháng khuẩn ΔD :

$$\Delta D = D - d \text{ (mm)}$$

Trong đó D là đường kính vòng kháng khuẩn (mm); d là đường kính lỗ thạch (mm).

2.2.6. Xác định khả năng bám dính của các chủng vi khuẩn tuyển chọn

Chủng vi khuẩn probiotic được chọn nuôi lỏng để thu sinh khối. Chọn hai con vịt 12 - 15 tuần tuổi khỏe mạnh, được nuôi tách riêng, cho ăn 100 g gạo và uống 100 ml nước 1 ngày, bổ sung chủng vi khuẩn probiotic đã nuôi lỏng vào nước uống của vịt với tỷ lệ 50 : 50. Theo dõi thu phân vịt sau 1, 3, 5 và 7 ngày sau đó tiến hành phân lập vi khuẩn trên môi trường MRS rắn có bổ sung 3% CaCO_3 để theo dõi sự xuất hiện của khuẩn lạc vi khuẩn lactic.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện tại phòng thí nghiệm Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam từ tháng 1/2016 đến tháng 1/2017.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

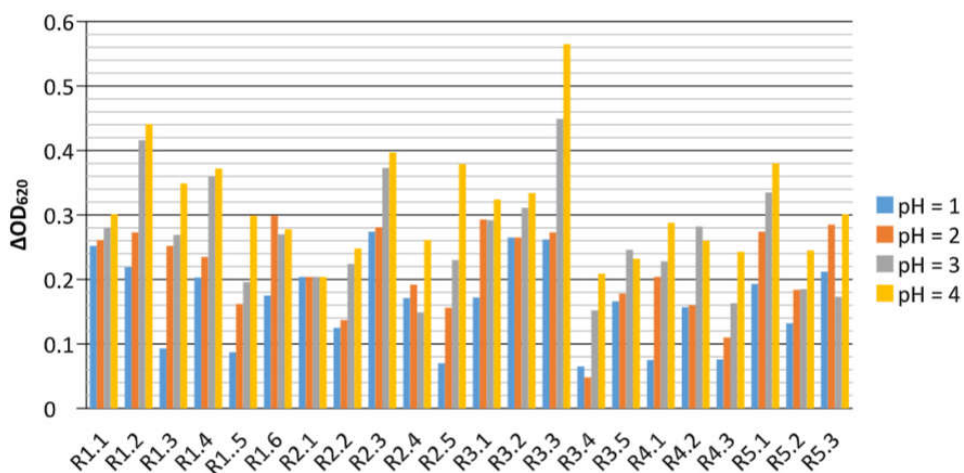
3.1. Phân lập và xác định vi khuẩn lactic từ ruột vịt

Từ các mẫu ruột vịt đã thu được từ những cơ sở giết mổ khác nhau tiến hành phân lập vi khuẩn trên môi trường MRS có bổ sung CaCO_3 ở nhiệt độ 30°C, sau hai ngày nuôi cấy chọn những khuẩn lạc có vòng sáng phân giải CaCO_3 cấy chuyển sang môi trường mới để làm thuần. Căn cứ vào các đặc điểm của vi khuẩn lactic như vi khuẩn thường hình que, gram dương, không sinh bào tử và không sinh enzym catalase để chọn lọc các chủng vi khuẩn tiềm năng. Kết quả đã thu được 22 chủng vi khuẩn khác nhau, các chủng này thường tạo ra khuẩn lạc có màu trắng và màu vàng, bề mặt khuẩn lạc từ trơn, tròn, bóng lồi đến tròn, nhẵn, bóng đẹp. Tất cả đều bắt màu nhuộm gram dương và không sinh nội bào tử, ngoài ra cả 22 chủng đều không sinh catalase. Căn cứ vào các đặc điểm hình thái cũng như các đặc điểm sinh hóa có thể kết luận 22 chủng vi khuẩn đã chọn lọc có khả năng là vi khuẩn lactic và chúng đều mang các đặc điểm của chi *Lactobacillus*. Các chủng này tiếp tục được sử dụng để nghiên cứu các đặc điểm đặc trưng cho vi khuẩn probiotic nhằm thu nhận những chủng có hoạt tính cao.

3.2. Xác định khả năng chịu acid của các chủng phân lập

Một trong những đặc điểm thường được khảo sát đầu tiên đối với vi khuẩn probiotic là kiểm tra khả năng chịu acid, do trong dạ dày động vật thường có pH thấp. Tiến hành nuôi cấy các chủng đã lựa chọn trong môi trường lỏng tại những giá trị pH khác nhau từ 1 - 4 sau đó xác định giá trị OD₆₂₀ của dịch nuôi cấy. Kết quả cho thấy cả 22 chủng vi khuẩn chọn lọc đều có khả năng chịu acid. Trong số này có một số chủng vi khuẩn lactic có khả năng

chịu acid khá cao như R1.2, R1.4, R3.5 (tăng trên 0,2 đơn vị ở pH = 1) đặc biệt hai chủng R2.3 và R3.3 tăng gần 0,3 đơn vị ở pH = 1 (hình 1). Độ pH trong ruột non của vịt thường từ 2 - 3 nên các chủng vi sinh vật sinh trưởng và phát triển trong ruột vịt có khả năng chịu pH thấp vì thế kết quả hoàn toàn logic. Ngoài ra kết quả này cũng tương đồng với một số nghiên cứu trước đây về vi khuẩn probiotic (Trần Quốc Việt và *ctv.*, 2009; Nguyễn Thế Trang và Trần Đình Mấn, 2008).

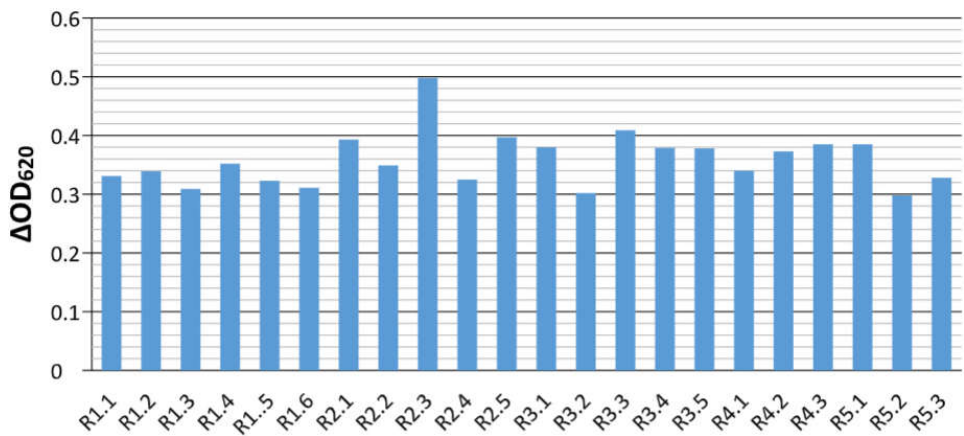


Hình 1. Khả năng chịu acid của 22 chủng vi khuẩn phân lập được

3.3. Xác định khả năng chịu muối mật

Khả năng chịu muối mật của các chủng vi khuẩn chọn lọc được thực hiện trên môi trường MRS bổ sung 0,3% muối mật. Kết quả nghiên cứu cho thấy các chủng vi khuẩn lactic này đều có khả năng chịu chịu muối mật ở những mức độ khác nhau. Trong đó, có 2 chủng sau 4 h ΔOD đo ở bước sóng 620 nm đạt

trên 0,4 đó là R3.3 (0,409) và R2.3 (0,498), 3 chủng sau 4 h ΔOD ở bước sóng 620 nm đạt trên 0,38 đó là R2.1 (0,393), R2.5 (0,397), R4.3 (0,385) (Hình 2). Hai chủng vi khuẩn R2.3 và R3.3 có khả năng chịu acid và muối mật cao và ổn định nhất, nên hai chủng này được tuyển chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

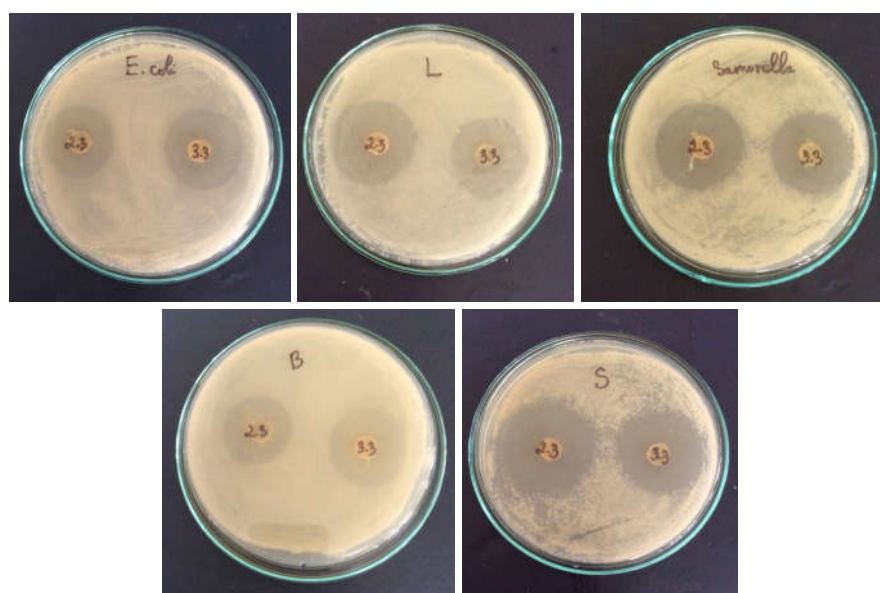


Hình 2. Khả năng chịu muối mật (nồng độ 0,3%) của 22 chủng vi khuẩn chọn lọc

3.4. Khả năng kháng vi sinh vật do sinh chất kháng khuẩn không phải là acid

Sau khi tuyển chọn được hai chủng vi khuẩn lactic có khả năng chịu được acid và muối mật cao, hai chủng này tiếp tục được nghiên cứu và xác định một số đặc điểm probiotic khác bao gồm khả năng kháng một số vi sinh vật và tính bám dính. Năm chủng vi sinh vật kiểm định được sử dụng trong

nghiên cứu là các chủng vi khuẩn có khả năng gây bệnh đường ruột ở động vật trong đó có vịt (Savage, 1987). Kết quả cho thấy hai chủng R2.3 và R3.3 đều có hoạt tính kháng với các chủng vi khuẩn kiểm định gồm *E. coli*, *Salmonella*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus* và *Listeria monocytogenes* (Hình 3). Như vậy, hai chủng này rất có tiềm năng trong sản xuất chế phẩm probiotic.

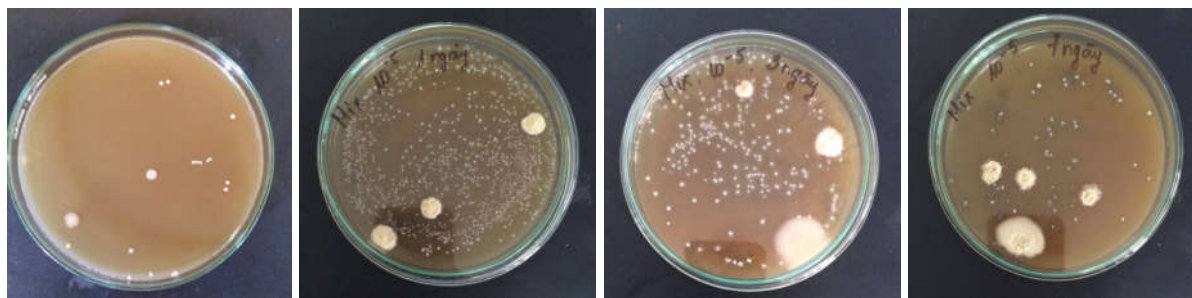


Hình 3. Khả năng kháng một số vi khuẩn của hai chủng R2.3 và R3.3

3.5. Khả năng bám dính

Hai chủng vi khuẩn R2.3 và R3.3 tiếp tục được sử dụng để nghiên cứu xác định khả năng bám dính trên ruột của vịt. Hai chủng này được nuôi lactic trong môi trường dịch lỏng trong một ngày, dịch nuôi cấy được rửa để loại bỏ các thành phần môi trường. Sau đó tế bào được trộn vào thức ăn cho vịt và thử nghiệm như đã mô tả trong nội dung phương pháp. Sau 7 ngày, số vịt thí nghiệm đều khỏe mạnh tương tự như lô đối chứng điều này cho thấy hai chủng vi khuẩn không tác động xấu đến vịt. Kết quả phân lập sau 1, 3, 5, 7 ngày thử nghiệm trong các mẫu phân

vịt đều phân lập được vi khuẩn có đặc điểm hình thái giống chủng R2.3 và R3.3, trong khi đó mẫu đối chứng không bổ sung vi sinh vật thì không phát hiện vi khuẩn (Hình 4). Tuy nhiên, kết quả kiểm tra mật độ tế bào thông qua việc pha loãng mẫu và nuôi cấy trên môi trường MRS cho thấy số lượng vi khuẩn giảm dần sau mỗi lần kiểm tra. Sau 7 ngày mật độ vi khuẩn lactic kiểm tra được trong phân vịt khoảng 3.10^3 tế bào/g. Từ các kết quả này cho thấy, hai chủng R2.3 và R3.3 có khả năng bám dính vào ruột của vịt thí nghiệm, khả năng này duy trì tối thiểu sau 7 ngày.



Hình 4. Kết quả phân lập thử tính bám dính của chủng R3.3

IV. KẾT LUẬN

Đã phân lập 22 chủng vi khuẩn lactic từ các mẫu ruột vịt thu thập trên địa bàn Gia Lâm, Hà Nội. Các chủng đã phân lập có đặc điểm hình thái và một số đặc điểm sinh hóa giống với vi khuẩn *Lactobacillus*. Trong số 22 chủng phân lập này đã tuyển chọn được 02 chủng là R2.3 và R3.3 mang các đặc điểm điển hình cho vi khuẩn probiotic bao gồm khả năng chịu acid cao, có khả năng kháng với một số vi khuẩn gây bệnh đường ruột, chịu được nồng độ muối mật cao và có tính bám dính tốt. Như vậy 02 chủng vi khuẩn R2.3 và R3.3 hoàn toàn có tiềm năng sử dụng để sản xuất chế phẩm probiotic cho vịt.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Nguyễn Thế Trang, Trần Đình Mẫn, 2008. Một số đặc điểm phân loại 2 chủng vi khuẩn lactic NH11 và NH34 sinh tổng hợp L (+) – lactic phân lập tại Việt Nam. *Tạp chí Công nghệ sinh học*; 6(4) 505 - 511.

Trần Quốc Việt, Bùi Thu Huyền, Dương Văn Hợp, Vũ Thành Lâm, 2009. Phân lập, tuyển chọn và đánh giá các đặc tính probiotic của một số chủng vi sinh vật hữu ích để sản xuất các chế phẩm probiotic

dùng trong chăn nuôi. *Tạp chí khoa học công nghệ chăn nuôi*.

- Fuller. R.**, 1989. Probiotic in man and animals. *J Appl Bacteriol*, 66, pp.65-87.
- Gilliland S.E., Walker D.K.**, 1990. Factors to consider when selecting a culture of *L. acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypercholesterolemic effect in humans. *Journal of Dairy Science*, 73: 905-909.
- Joint FAO/WHO Working Group**, 2002. *Guidelines for the evaluation of probiotics in food*. London: World Health Organization, ON, Canada: Food and Agriculture Organization.
- Patterson J.A., Burkholder K.M.**, 2003. Application of prebiotics and probiotics in poultry production, *J. Animal Science*, 82, pp. 627-631.
- Savage. D.C.**, 1987. Factors influencing biocontrol of bacterial pathogens in the intestine. *Food Technol*, 41, pp. 82-97.
- Schillinger U., Lücke F.K.**, 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, pp.1901-1906.
- Steiner. T.**, 2006. *Managing Gut Health*. *Nottingham University Press*, pp. 45-56.

Screening and evaluation of probiotic properties of Lactobacillales isolated from duck

Nguyễn Xuân Canh, Phạm Thị Thu Huyền, Trần Văn Mậu

Abstract

This research was performed to isolate and screen the lactobacillales with probiotic activities in ducks. Twenty two bacteria strains were isolated from duck-gut samples which were able to dissolved CaCO_3 on MRS medium. Studies on cell and colony morphology as well as biochemical characteristics including gram staining, catalase test, showed that all 22 isolates were similar to *Lactobacillus*. These isolates showed high tolerance to low pH and high bile salt concentration, but two strains R2.3 and R3.3 had the highest tolerance and stability. Moreover, R2.3 and R3.3 strains were resistant to some intestinal bacteria such as *E. coli*, *Salmonella*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus* and *Listeria monocytogenes*. Finally, R2.3 and R3.3 strain can be maintained in the duck's gut system for a minimum of 7 days. The results showed that the two selected bacteria strains could be used for subsequent studies.

Keywords: Duck, *Lactobacillus*, probiotic

Ngày nhận bài: 10/7/2018

Ngày phản biện: 16/7/2018

Người phản biện: PGS. TS. Nguyễn Thanh Hải

Ngày duyệt đăng: 15/10/2018