

Conjugated Linoleic acid in fresh milk from dairy cattle with different diets in Ho Chi Minh City

Chung Anh Dung, Ho Que Anh,
Nguyen Dac Thanh, Hoang Ngoc Minh

Abstract

Fresh milk has been become more important for human health, so fresh milk consumption has been rapidly increased. One of important nutritive components of fresh milk is fatty acid (FA), especially Conjugated Linoleic Acid (CLA *cis9, trans11*). Many researches had proven CLA is very important for human health because of inhibition of carcinogenesis; prevention of cholesterol-induced atherosclerosis; reduction of body fat accumulation; enhancement of the immune response; ability to promote growth; improvement of diabetes and bone metabolism. In this study, one hundred of fresh milk samples were collected from three dairy cattle groups with different popular diets, such as low grass level (≤ 10 kg/head/day), high grass level (≥ 30 kg/head/day) and maize silage in Hoc Mon and Cu Chi district, Ho Chi Minh city. CLA (*c9, t11*) concentration in fresh milk was determined by AOAC 996.06 (GC/MS) method. The result showed that CLA (*c9, t11*) average concentration was 5.56 mg/gMF, fluctuating between 3.15 - 7.53 mg/gMF; concentration of CLA (*c9, t11*) was higher in dairy cows which were fed 25 - 30 kg green grass/head/day. It is the first time, the study provide average concentration of CLA (*c9, t11*) in dairy cattle milk and type of best diet for producing high CLA (*c9, t11*) concentration in milk in Ho Chi Minh city.

Keywords: Conjugated Linoleic Acid (*cis9, trans11*), dairy cattle, milk fat (MF), diet

Ngày nhận bài: 29/6/2018

Ngày phản biện: 6/7/2018

Người phản biện: GS. TS. Vũ Duy Giảng

Ngày duyệt đăng: 16/7/2018

ĐÁNH GIÁ ĐẶC TÍNH PROBIOTIC VÀ XÁC ĐỊNH MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM CỦA CÁC CHỦNG VI KHUẨN LACTIC PHÂN LẬP TỪ RUỘT GÀ RI

Nguyễn Thị Lâm Đoàn¹, Nguyễn Thị Thanh Thủy¹

TÓM TẮT

Nghiên cứu này tiến hành đánh giá tiềm năng probiotic của các chủng vi khuẩn lactic trong điều kiện *in vitro* nhằm sản xuất chế phẩm ứng dụng trong chăn nuôi gia cầm. Đặc tính probiotic của các chủng được đánh giá thông qua khả năng chịu pH thấp, chịu muối mật, sinh enzyme ngoại bào, kháng khuẩn gây bệnh, bám dính trên biểu mô ruột gà. Kết quả cho thấy từ 126 chủng vi khuẩn lactic được phân lập từ ruột gà ri đã tuyển chọn được 04 chủng vi khuẩn lactic (RG2.1, RG2.2, RG6.1, RG8.1) có tiềm năng probiotic tốt với các đặc điểm như: chịu pH thấp từ 1,0 đến 4,0 sau 3h nuôi cấy, chịu muối mật 0,3% sau 4h nuôi cấy ($\Delta OD_{620nm} > 0,496$), sinh amylase và protease ngoại bào cao với vòng phân giải cơ chất 10 - 21 mm, kháng 02 vi khuẩn gây bệnh *Salmonella* Typhimurium và *Escherichia coli* với đường kính vòng kháng 5 - 11 mm, bám dính tốt trên biểu mô ruột gà. Bốn chủng này tiếp tục được nghiên cứu đặc điểm hình thái tế bào và điều kiện nuôi cấy (nhiệt độ, pH) để làm tiền đề cho các nghiên cứu tạo chế phẩm tiếp theo. Kết quả thí nghiệm thu được trực khuẩn RG8.1 và 03 cầu khuẩn RG2.1, RG2.2, RG6.1. Cả 04 chủng đều sinh trưởng và phát triển tốt ở nhiệt độ 37°C; pH 6,0.

Từ khóa: Probiotic, vi khuẩn lactic, kháng, khuẩn gây bệnh, gà Ri

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sản phẩm của ngành chăn nuôi trong những năm gần đây có những bước phát triển mạnh nhờ được áp dụng tiến bộ kỹ thuật về thức ăn, quy trình nuôi và chăm sóc. Tuy nhiên, cùng với sự phát triển này, một số loại dịch bệnh ở vật nuôi cũng phát sinh, làm giảm năng suất, tăng tỷ lệ chết. Việc lạm dụng thuốc kháng sinh trong chăn nuôi đã tạo ra tính kháng thuốc của vi sinh vật gây bệnh, tăng dư lượng thuốc

kháng sinh trong thực phẩm,... (Newman, 2002). Chăn nuôi theo hướng “an toàn sinh học” hiện rất được chú trọng nhằm đảm bảo an toàn dịch bệnh, chất lượng thịt và sức khỏe của người tiêu dùng. Việc phòng và trị bệnh bằng chế phẩm probiotic nhằm tăng cường khả năng tự đề kháng bệnh cho vật nuôi thay thế kháng sinh là cách làm có hiệu quả lâu dài. Đây cũng chính là vấn đề mà nhà nghiên cứu, người chăn nuôi đang hết sức quan tâm.

¹ Khoa Công nghệ thực phẩm, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Các vi sinh vật được coi là probiotic khi chúng thỏa mãn một số điều kiện: (i) có sức sống cao; (ii) tồn tại trong môi trường tiêu hóa (có khả năng bám dính vào niêm mạc tiêu hóa, chịu pH thấp và muối mật); (iii) phát triển và cạnh tranh được với các vi sinh vật trong đường ruột, có khả năng sinh chất kháng khuẩn bacteriocin và hoặc enzyme tiêu hóa; (v) có khả năng làm tăng đáp ứng miễn dịch (Trần Quốc Việt và *ctv.*, 2009). Đa số chúng thuộc về nhóm vi khuẩn lactic, *Bacillus subtilis*, *B. clausi*...

Để ứng dụng probiotic cho gia cầm thì tốt nhất là tìm được những khu hệ vi sinh vật có lợi đã quen thuộc với các động vật này. Mead (1997) đã phân lập được nhiều chủng vi khuẩn lactic trong ruột non và ruột già của gà. Kizerwetter và Binek (2009) chứng minh *Lactobacillus salivarius* 3d đã làm giảm lượng *Salmonella enteritidis* và *Clostridium* ở gà. Lan và cộng tác viên (2004) đã chỉ ra Lactobacilli được sử dụng như probiotic đã làm cân bằng và duy trì sự ổn định hệ vi sinh vật tự nhiên trong đường tiêu hóa của gia cầm khi ở điều kiện stress nhiệt.

Dựa trên ngân hàng chủng vi khuẩn lactic phân lập được từ ruột gà ri của Khoa Công nghệ thực phẩm, Học viện Nông nghiệp Việt Nam, việc sàng lọc chúng có một số hoạt tính probiotic và đặc điểm, điều kiện sinh trưởng của các chủng này được thực hiện nhằm xây dựng ngân hàng chủng vi sinh vật có lợi, tạo chế phẩm probiotic sử dụng cho chăn nuôi, đặc biệt cho gia cầm.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

2.1.1. Các chủng vi khuẩn

- Vi khuẩn lactic gồm 126 chủng phân lập từ ruột gà ri và kí hiệu là RG.

- Vi khuẩn kiểm định: *Escherichia coli* ATCC 25922 và *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 được cung cấp từ Viện Công nghệ sinh học thuộc Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.2.2. Môi trường nghiên cứu

Môi trường MRS dịch thể dùng để nuôi cấy và hoạt hóa các chủng vi khuẩn lactic (g/l): Glucose - 20,0; Na_2HPO_4 - 2,0; CH_3COONa - 5,0; Cao thịt - 10,0; Triamoni xitrat - 2,0; Pepton - 10,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,1; Cao nấm men - 5,0; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 0,05; Tween 80 - 1 ml; Nước cất vừa đủ - 1lít; pH 6,5; khử trùng 121°C/15 phút.

Môi trường nuôi vi sinh vật kiểm định LB (g/l): Cao nấm men - 5,0; Pepton - 10; NaCl - 10; pH 7,0; khử trùng 121°C/15 phút.

Môi trường chứa tinh bột, môi trường casein (g/l) dùng để xác định khả năng sinh amylase và protease: Thạch 17 g/l, tinh bột hoặc casein 1 (g/l); Nước cất vừa đủ 1lít; pH 7,0; khử trùng 121°C/15 phút.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp khảo sát hoạt tính probiotic của vi khuẩn lactic

a) Khả năng chịu pH thấp

Khả năng chịu pH thấp của vi khuẩn được đánh giá qua lượng tế bào sống sót ở môi trường có độ pH khác theo phương pháp của Dương Thu Hương và Phạm Kim Đăng (2015) có điều chỉnh ngưỡng pH (1,0; 2,0; 3,0; 4,0) và thời gian nuôi cấy 3 h. Chuẩn bị môi trường MRS lỏng, điều chỉnh pH (1,0; 2,0; 3,0; 4,0) bằng HCl 1N và NaOH 1N. Nhỏ 1% dịch giống vi khuẩn đã nuôi cấy dịch thể qua 24 giờ vào các ống nghiệm trên nuôi cấy 37°C. Đánh giá khả năng chịu pH bằng cách đo OD ở bước sóng 620 nm của dịch nuôi cấy ở 0 h và 3 h. Khả năng chịu được acid được xác định dựa vào giá trị ΔOD là giá trị hiệu số của giá trị OD đo tại thời điểm 3 h và giá trị OD đo tại thời điểm 0 h, ở mỗi nồng độ pH).

b) Khả năng chịu muối mật

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 dựa trên phương pháp của Gilliland và 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 đo mật độ quang ở bước sóng 620 nm. Mức độ chịu muối mật được xác định dựa vào giá trị $\text{OD}_{620\text{nm}}$ sau khi nuôi 4 giờ so với ban đầu nếu tăng lên 0,3 đơn vị thì chủng đó có khả năng chịu muối mật.

c) Khả năng sinh một số enzyme ngoại bào

Xác định khả năng sinh enzyme ngoại bào amylase và protease được sử dụng phương pháp đục lỗ thạch trên môi trường có bổ sung cơ chất tương ứng tinh bột và casein theo phương pháp của Nguyễn Lân Dũng và cộng tác viên (1976). Các chủng vi khuẩn lactic được hoạt hóa trong môi trường MRS lỏng. Sau 48 giờ nuôi ở 37°C, lấy dịch nuôi vi khuẩn lactic đem ly tâm với tốc độ 6000 vòng/phút trong 30 phút, ở 4°C, thu lấy dịch ly tâm. Dùng nút khoan có đường kính 5mm, đục lỗ thạch trên đĩa petri của môi trường có cơ chất tinh bột, casein. Với mỗi chủng vi khuẩn lactic tiến hành nhỏ 0,1 ml dịch ly tâm đã thu vào lỗ thạch. Sau khi nhỏ dịch để đĩa thạch trong tủ lạnh ở 4°C khoảng 2 h nhằm mục đích để dịch ly tâm khuếch tán đều vào trong thạch. Để đĩa thạch vào

tủ ấm 37°C trong 48 h để lượng dịch trong lỗ thạch thủy phân cơ chất. Hoạt tính của enzyme được đo bằng đường kính vòng phân giải cơ chất xung quanh lỗ thạch, tức D - d. Trong đó: D là đường kính vòng phân giải (mm), d là đường kính lỗ thạch (5 mm).

d) Khả năng kháng một số vi khuẩn gây bệnh

Sử dụng phương pháp khuếch tán thạch của Herrerros và cộng tác viên (2005) với các vi khuẩn kiểm định là *Escherichia coli* ATCC 25922 và *S. typhimurium* ATCC 13311.

Các chủng vi khuẩn lactic (tuyển chọn ở các thí nghiệm trước) được nuôi cấy trong môi trường MRS lỏng ở 37°C trong 18 h - 20 h, sau đó ly tâm 6000 vòng/phút trong 20 phút thu dịch nổi và chỉnh pH về trung tính (6,7 - 7,0) bằng NaOH 1N để loại yếu tố hạn chế vi khuẩn kiểm định do sinh axit.

Đối với các chủng vi khuẩn kiểm định được nuôi qua đêm trong môi trường LB lỏng ở 37°C trong 24 h. Lấy 30 µl dung dịch mỗi chủng vi khuẩn kiểm định cấy gạt lên đĩa petri chứa môi trường LB agar, đục lỗ thạch thạch bằng nút khoan có kích thước (d = 5 mm).

Nhỏ 80 µl dịch ly tâm của các chủng vi khuẩn lactic đã được chỉnh pH vào các lỗ thạch và giữ ở nhiệt độ 4°C trong 4h, sau đó giữ ở 37°C trong 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. Hoạt tính được đánh giá bằng hiệu số D - d (mm), D là đường kính vòng kháng khuẩn (mm), d là đường kính lỗ thạch (5 mm). Hiệu số này càng lớn, thì khả năng kháng khuẩn càng cao.

e) Khả năng bám dính

Khả năng bám dính của vi khuẩn lactic tuyển chọn được xác định theo phương pháp của Trần Quốc Việt và cộng tác viên (2009). Vi khuẩn lactic được nuôi trong môi trường MRS ở 37°C trong 24 h. Chuẩn bị mẫu ruột gà tươi: Rửa các đoạn ruột non 03 lần với đệm PBS sao cho tất cả các vi sinh vật không còn trên bề mặt niêm mạc ruột. Rửa 01 lần với môi trường MRS lỏng. Tiến hành thử bám dính: Phủ dịch tế bào đã chuẩn bị ở trên lên trên bề mặt niêm mạc ruột. Ủ 1 giờ ở 37°C. Rửa mẫu ruột bằng đệm PBS (pH 7,2) để loại ra các tế bào không bám dính. Thu lấy phần tế bào biểu mô ruột. Khả năng bám dính của mỗi chủng vi khuẩn lactic được đánh giá thông qua cấy trải và đếm số lượng vi khuẩn lactic trên đĩa thạch của phần tế bào biểu mô ruột đó.

2.2.2. Xác định một số đặc điểm của chủng probiotic đã tuyển chọn

a) Hình thái tế bào

Hình thái tế bào và loại vi khuẩn được xác định thông qua soi kính hiển vi sau khi đã nhuộm Gram Nguyễn Lâm Dũng (1976).

b) Ảnh hưởng của nhiệt độ lên sinh trưởng của các chủng vi khuẩn lactic tuyển chọn

Vi khuẩn lactic được nuôi cấy trên môi trường dịch thể MRS có pH 6,5 tại nhiệt độ: 30°C, 37°C, 45°C. Sau 24 h nuôi cấy đo OD_{620nm} (Trần Quốc Việt và ctv., 2009). Xác định nhiệt độ nuôi cấy thích hợp nhất cho các chủng.

c) Ảnh hưởng của pH lên sinh trưởng của các chủng vi khuẩn lactic tuyển chọn

Vi khuẩn lactic được nuôi cấy trên môi trường dịch thể MRS có pH khác nhau (2; 3; 4; 5; 6; 7). Sau 24 h nuôi cấy trong tủ ấm ở nhiệt độ tối ưu của thí nghiệm trên tiến hành đo OD_{620nm} (Trần Quốc Việt và ctv., 2009). Xác định pH môi trường thích hợp nhất cho các chủng.

2.2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Sử dụng phần mềm Excel để tính các giá trị trung bình. Dùng ANOVA trong Excel để xử lý số liệu thống kê mô tả.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 6 đến tháng 12 năm 2017 tại Khoa Công nghệ thực phẩm - Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả khảo sát hoạt tính probiotic của các chủng vi khuẩn lactic

3.1.1. Khả năng chịu pH thấp

Khả năng chịu pH thấp là một tiêu chí quan trọng để đánh giá xem chủng đó có phải là probiotic hay không. Một số nghiên cứu trước đã chỉ ra rằng giới hạn pH 2,0 và pH 3,0 và trong thời gian 3 giờ là giới hạn quyết định sàng lọc các chủng vi sinh vật có tiềm năng probiotic (Nguyễn Thị Diễm Hương và Đỗ Thị Bích Thủy, 2012). Kết quả khảo sát khả năng chịu pH thấp của 126 chủng vi khuẩn lactic được phân lập từ ruột gà ri tại các pH 1,0; 2,0; 3,0 và 4,0 cho thấy: 126/126 chủng vi khuẩn lactic có đều có khả năng chịu được pH 4,0; 103/126 chủng chịu được pH 3,0; 66/126 chủng chịu được pH 2,0; 25/126 chủng chịu được pH 1,0. Trong 25 chủng có khả năng chịu được pH 1,0; khả năng sinh trưởng tốt nhất thuộc về 05

chủng RG2.1, RG2.2, RG6.1, RG6.3, RG8.1, đây là những chủng có ΔOD sau 3 giờ là tăng trên 0,2 đơn vị (Bảng 1). Hầu hết các chủng đều có xu hướng giảm tỉ lệ sống khi hạ thấp pH.

Kết quả nghiên cứu này tương đối phù hợp với kết quả nghiên cứu về vi khuẩn probiotic của Hoàng Quốc Khánh và Phạm Thị Lan Thanh (2011), trong đó cho thấy 15 chủng *Lactobacillus* đều có khả năng chịu được pH 3,0 trong 3 h tuy nhiên không có chủng

nào chịu được pH 1,0 trong 3 giờ. Theo nghiên cứu của Kim và cộng tác viên (2007), khi xử lý bằng dịch dạ dày pH 2,5, 3/7 chủng vi khuẩn có khả năng chịu được môi trường này.

Mặc dù có 05 chủng vi khuẩn sinh trưởng tốt tại pH 1 trong vòng 3 h nhưng tổng số chủng chịu được pH 1 là 25. Như vậy, 25 chủng này tiếp tục được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

Bảng 1. Khả năng chịu pH của 05 chủng vi khuẩn sinh trưởng tốt tại pH 1,0

TT	Kí hiệu chủng	Giá trị OD ban đầu (0h)	Giá trị OD sau 3h				Giá trị ΔOD			
			pH 1,0	pH 2,0	pH 3,0	pH 4,0	pH 1,0	pH 2,0	pH 3,0	pH 4,0
1	RG2.1	0,491	0,785	0,794	0,805	0,889	0,294	0,303	0,314	0,398
2	RG 2.2	0,259	0,488	0,493	0,502	0,566	0,229	0,234	0,243	0,307
3	RG 6.1	0,558	0,787	0,807	0,852	0,890	0,229	0,249	0,294	0,332
4	RG6.3	0,281	0,542	0,564	0,634	0,652	0,261	0,283	0,353	0,371
5	RG8.1	0,12	0,368	0,398	0,432	0,461	0,243	0,273	0,307	0,336

3.1.2. Khả năng chịu muối mật

Nghiên cứu của Dương Thu Hương và Phạm Kim Đăng (2015) đã cho thấy các chủng có hoạt tính probiotic chỉ phát huy tác dụng được trong đường tiêu hóa của loài vật nuôi khi chúng chịu được muối mật trong ruột non.

Theo Gillilan và cộng tác viên (1990), 0,3% được xem là nồng độ quyết định để sàng lọc các chủng vi sinh vật có khả năng chịu muối mật. Thông thường thời gian thức ăn được lưu trữ trong ruột khoảng 4 giờ (Dương Thu Hương và Phạm Kim Đăng, 2015). Chính vì vậy 25 chủng vi khuẩn lactic có khả năng chịu được pH thấp là kết quả của thí nghiệm trên sẽ được tiếp tục kiểm tra khả năng chịu muối mật.

Kết quả cho thấy có 21/25 chủng vi khuẩn lactic có khả năng sinh trưởng ở nồng độ muối mật 0,3%, trong đó có 17/25 chủng sau 4 giờ $\Delta OD_{620nm} > 0,3$, đặc biệt có 09 chủng ΔOD_{620nm} đạt $> 0,4$ (Bảng 2). Mota và cộng tác viên (2006) cũng đã tiến hành nghiên cứu khả năng kháng muối mật của 03 chủng (*Lb. acidophilus* 2M14E, *Lb. acidophilus* 2G14E và *Lb. acidophilus* 5C14E) tại nồng độ 0,3% sau 4 giờ cho kết quả *Lb. acidophilus* 2M14E ΔOD_{620nm} chỉ tăng được khoảng 0,2 đơn vị, *Lb. acidophilus* 2G14E ΔOD_{620nm} tăng 0,4 và *Lb. acidophilus* 5C14E ΔOD_{620nm} tăng 0,5. Như vậy, 17 chủng sau 4 h có $\Delta OD_{620nm} > 0,3$ được coi là có khả năng chịu muối mật và sẽ sử dụng cho nghiên cứu tiếp theo.

Bảng 2. Khả năng chịu muối mật của 17 chủng vi khuẩn lactic

TT	Kí hiệu chủng	Giá trị OD tại		ΔOD
		0 h	4 h	
1	RG1.2	1,215	1,634	0,419
2	RG1.3	1,355	1,727	0,372
3	RG1.4	1,45	1,859	0,409
4	RG1.6	1,396	1,82	0,424
5	RG1.7	1,467	1,878	0,411
6	RG1.10	1,401	1,725	0,324
7	RG2.1	1,278	1,832	0,554
8	RG2.2	1,305	1,856	0,551
9	RG2.8	1,502	1,811	0,309
10	RG4.4	1,316	1,637	0,321
11	RG6.1	1,300	1,796	0,496
12	RG6.2	1,501	1,895	0,394
13	RG6.3	1,395	1,805	0,41
14	RG7.6	1,431	1,802	0,371
15	RG7.9	1,455	1,784	0,329
16	RG8.1	1,305	1,839	0,534
17	RG8.5	1,289	1,636	0,347

3.1.3. Khả năng sinh một số enzyme ngoại bào

Trong số 17 chủng đã tuyển chọn, tiến hành kiểm tra khả năng sinh enzyme ngoại bào amylase và protease với 02 cơ chất tinh bột và casein bằng phương pháp đục lỗ thạch.

Bảng 3. Khả năng sinh enzyme ngoại bào của các chủng tuyển chọn

TT	Tên chủng	Đường kính vòng phân giải (D - d) mm	
		Amylase	Protease
1	RG1.2	15	11
2	RG1.4	8	15
3	RG2.1	15	14
4	RG2.2	21	13
5	RG4.4	10	10
6	RG6.1	15	16
7	RG6.2	8	5
8	RG6.3	6	7
9	RG8.1	10	10

Ghi chú: D - d là đường kính vòng phân giải, d = 5 mm.

Có 09 chủng trong tổng số 17 chủng vi khuẩn lactic có khả năng sinh cả enzyme amylase và protease (Bảng 3), khả năng sinh amylase của các chủng cao hơn so với khả năng sinh protease thể hiện đường kính vòng phân giải cơ chất tinh bột (6 - 21 mm) cao hơn so đường kính vòng phân giải casein (4 - 16 mm). Theo nghiên cứu của Đào Thị Lương và cộng tác viên (2010), khả năng sinh enzyme của các chủng vi khuẩn lactic cụ thể amylase có đường kính vòng phân giải cơ chất từ 7 - 13 mm, protease với đường kính vòng phân giải cơ chất là 5 - 12 mm. Khả năng sinh các enzyme ngoại bào phân giải các cơ chất của 09 chủng này cao hơn nghiên cứu của Đào Thị Lương và cộng tác viên (2010) do nguồn phân lập vi khuẩn lactic của hai nghiên cứu khác nhau.

3.1.4. Khả năng kháng một số vi khuẩn gây bệnh

Kiểm tra hoạt tính kháng khuẩn của 09 chủng có khả năng sinh cả hai enzyme bằng phương pháp đục lỗ thạch với 02 chủng vi khuẩn kiểm định *Salmonella Typhimurium* và *Escherichia coli* là những chủng vi khuẩn gây bệnh đường ruột ở vật nuôi.

Trong số 09 chủng được thử tính kháng vi khuẩn kiểm định có 04 chủng có khả năng kháng *S. Typhimurium*, trong đó có 02 chủng (RG2.1 và RG8.1) với vòng kháng khuẩn đạt 10 mm. Đối với vi khuẩn *E. coli* có 06 chủng kháng, hoạt tính kháng khuẩn mạnh thuộc về 03 chủng (RG2.1, RG6.1 và RG8.1) với vòng kháng khuẩn mạnh ≥ 10 mm. Kết quả nghiên cứu này cũng tương tự với kết quả nghiên cứu của Dương Thu Hương và Phạm Kim Đăng (2015) là chủng có hoạt tính kháng khuẩn tốt đối với *S. Typhimurium* và có đường kính vòng kháng khuẩn 8 - 14 mm, đối với *E.coli* > 10 mm. Các chủng kháng được nhiều vi khuẩn kiểm định và có

đường kính vòng kháng khuẩn càng lớn thì có khả năng kháng khuẩn càng mạnh. Do vậy 04 chủng có khả năng kháng được cả 02 loại vi khuẩn kiểm định đó là RG2.1, RG2.2, RG6.1, RG8.1 được sử dụng cho nghiên cứu tiếp theo.

Bảng 4. Khả năng kháng vi khuẩn kiểm định của các chủng vi khuẩn lactic được tuyển chọn

TT	Tên chủng	Hoạt tính kháng khuẩn (D - d) mm	
		<i>S. Typhimurium</i>	<i>E.coli</i>
1	RG1.2	-	5
2	RG1.4	-	7
3	RG2.1	10	11
4	RG2.2	5	9
5	RG4.4	-	-
6	RG6.1	9	10
7	RG6.2	-	-
8	RG6.3	-	-
9	RG8.1	10	11

Ghi chú: D - d là đường kính vòng kháng khuẩn, d = 5 mm.

3.1.5. Khả năng bám dính

Khả năng bám dính biểu mô và dịch nhày ruột non nơi có tốc độ dòng lưu chuyển hỗn dịch thức ăn cao là một tiêu chí quan trọng tuyển chọn các chủng vi khuẩn probiotic. Sự bám dính của hệ vi sinh vật có lợi giúp cạnh tranh sự bám dính của các tác nhân gây bệnh. Các vi khuẩn probiotics có thể sinh sống một thời gian nhất định, cạnh tranh dinh dưỡng và tiết ra một số chất ức chế (Arthur *et al.*, 2003).

Bảng 5. Khả năng bám dính của các chủng vi khuẩn lactic trên biểu mô ruột gà

TT	Kí hiệu chủng	Nồng độ ban đầu (CFU/ml)	Khả năng bám dính (CFU/gam ruột)
1	RG 2.1	$4,65 \times 10^9$	$3,75 \times 10^7$
2	RG2.2	$4,94 \times 10^9$	$2,63 \times 10^8$
3	RG 6.1	$6,23 \times 10^9$	$3,24 \times 10^8$
4	RG 8.1	$5,36 \times 10^9$	$1,52 \times 10^8$

Kết quả bảng 5 cho thấy, các chủng vi khuẩn đều bám dính tốt vào niêm mạc ruột nhưng mức độ không giống nhau. Chủng RG 6.1 có khả năng bám dính cao hơn so với các chủng vi khuẩn còn lại. Kết quả này tương tự với chủng NC1 và NC2 để sản xuất chế phẩm probiotic trong chăn nuôi của nhóm tác giả Trần Quốc Việt và cộng tác viên công bố năm 2009. Điều này rất thích hợp khi phát triển các chế phẩm probiotic sau này.

3.2. Một số đặc điểm của các chủng có hoạt tính probiotic đã tuyển chọn

Đặc điểm chính của các chủng có hoạt tính probiotic được tuyển chọn đã được xác định bao gồm các đặc điểm về hình dạng tế bào, khả năng sinh trưởng ở các nhiệt độ và pH khác nhau. Kết quả được thể hiện trong các phần dưới đây.

3.2.1. Hình dạng tế bào

Tiến hành nhuộm Gram 04 chủng theo phương pháp của Nguyễn Lâm Dũng, 1976.

Hình thái tế bào chủng RG8.1 trực khuẩn, các chủng RG2.1, RG2.2 và RG6.1 thuộc cầu khuẩn, tất cả các chủng đều là Gram dương.

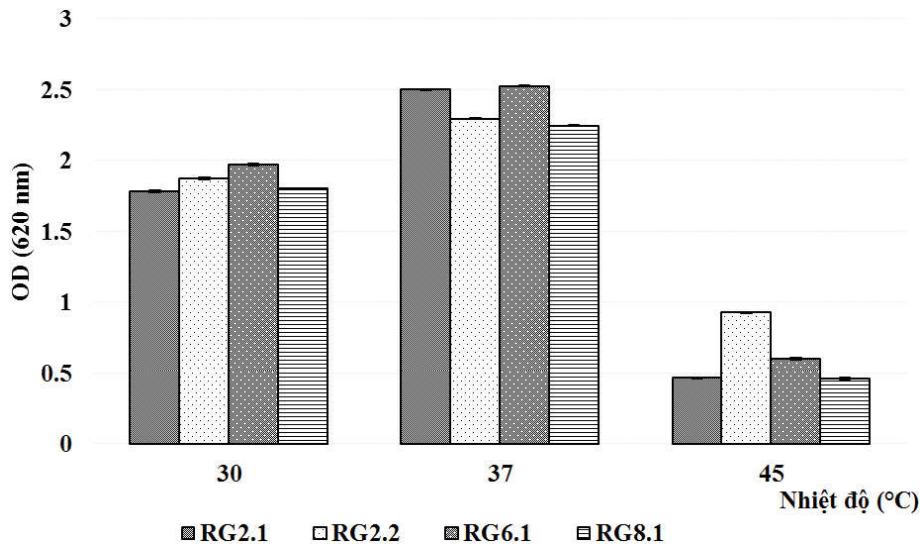
Bảng 6. Đặc điểm hình thái tế bào và kết quả nhuộm Gram của các chủng vi khuẩn lactic

TT	Tên chủng	Đặc điểm hình thái	Gram
1	RG2.1	Hình cầu, xếp chuỗi	+
2	RG2.2	Hình cầu, xếp chuỗi	+
3	RG6.1	Hình cầu, xếp chuỗi	+
4	RG8.1	Hình que đơn dài	+

3.3.2. Đánh giá khả năng sinh trưởng của các chủng có hoạt tính probiotic đã được tuyển chọn ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau

Nhiệt độ nuôi cấy quá cao hay quá thấp đều ảnh hưởng đến quá trình sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn. Vì vậy, để tìm ra giá trị nhiệt độ thích hợp cho sự phát triển các chủng có hoạt tính probiotic đã tuyển chọn, tiến đánh giá ảnh hưởng của các nhiệt độ 30, 37 và 45°C theo như một số nghiên cứu trước đó của Trần Quốc Việt và cộng tác viên (2009).

Kết quả tất cả 04 chủng phát triển tốt ở phạm vi nhiệt độ 30 - 37°C (Hình 1). Khi nuôi cấy ở nhiệt độ 45°C sinh khối giảm thông qua chỉ số OD_{620nm} thấp hơn so chỉ số OD_{620nm} ở nhiệt độ 30, 37°C. Nghiên cứu của Phạm Ngọc Lan và Lê Thanh Bình (2003) đã cho thấy 02 chủng vi khuẩn lactic (CH₁₂₃ và CH₁₅₆) có các đặc tính probiotic và 02 chủng đều sinh trưởng ở khung nhiệt độ 15 - 45°C và cũng sinh trưởng tốt ở nhiệt độ 30 - 37°C.



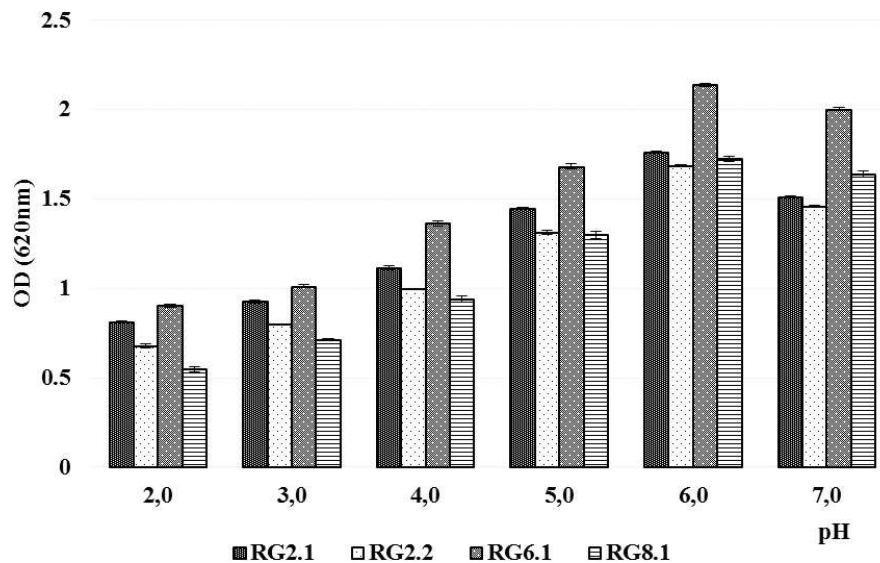
Hình 1. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến khả năng sinh trưởng của chủng vi khuẩn lactic

3.3.3. Đánh giá khả năng sinh trưởng của các chủng có hoạt tính probiotic đã được tuyển chọn trong môi trường có pH khác nhau

Tương tự như nhiệt độ, pH cũng ảnh hưởng trực tiếp đến quá trình sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn lactic, pH quá cao hoặc quá thấp cũng sẽ ức chế sự sinh trưởng hoặc có thể gây chết. Thí nghiệm được tiến hành ở các pH từ 2,0 đến 7,0.

Kết quả hình 2 cho thấy: pH từ 2,0 đến 7,0 đáp

ứng về sinh trưởng của các chủng vi khuẩn lactic này. Các chủng có sinh khối cao nhất tương ứng giá trị OD_{620nm} ở môi trường có pH 6,0 đặc biệt là chủng RG6.1. Ở môi trường có pH cao hơn (từ 6,0 trở lên) giá trị OD_{620nm} giảm dần. Theo nghiên cứu trước đây của Trần Quốc Việt và cộng tác viên (2009), cũng đã chỉ ra rằng các chủng vi khuẩn lactic có hoạt tính probiotic có thể sinh trưởng trong môi trường pH 2,0 đến 7,0; nhưng ở môi trường pH 7,0 mật độ của chủng giảm.



Hình 2. Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy đến khả năng sinh trưởng của các chủng vi khuẩn lactic

IV. KẾT LUẬN

Trong 126 chủng vi khuẩn lactic được phân lập từ ruột gà ri đã chọn được 04 chủng có đặc tính probiotic tốt: khả năng chịu pH thấp từ 1,0 đến 4,0; chịu được nồng độ muối mật 0,3%, sinh cả 02 enzyme ngoại bào cao amylase và protease kháng cả 02 vi khuẩn kiểm định *Salmonella* Typhimurium và *Escherichia coli*, khả năng bám dính trên biểu mô ruột gà tốt. Nghiên cứu đã xác định hình thái tế bào chủng RG8.1 là trực khuẩn, các chủng RG2.1, RG2.2, RG6.1 thuộc cầu khuẩn. Các chủng này đều phát triển tốt ở 37°C, pH 6,0. Đây là cơ sở để nghiên cứu tạo chế phẩm probiotic từ các chủng này và ứng dụng chế phẩm vào chăn nuôi gia cầm.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này có sử dụng trang thiết bị của Phòng thí nghiệm Khoa học và Công nghệ thực phẩm - Khoa Công nghệ thực phẩm - Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Nguyễn Lâm Dũng, Đoàn Xuân Mượu, Nguyễn Phùng Tiến, Đặng Đức Trạch và Phạm Văn Ty, 1976. *Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học, tập 2*. NXB Khoa học Kỹ thuật. Hà Nội.
- Dương Thu Hương và Phạm Kim Đăng, 2015. Phân lập và tuyển chọn một số chủng vi khuẩn lactic có đặc tính probiotic từ ruột gà. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật chăn nuôi*, 12: 78-86.
- Nguyễn Thị Diễm Hương và Đỗ Thị Bích Thủy, 2012. Xác định và khảo sát một số tính chất có lợi của

chủng *Lactobacillus fermentum* DC phân lập từ sản phẩm dưa cải Huế. *Tạp chí Khoa học, Đại học Huế*, 71 (2), 177-187.

Nguyễn Thị Huyền, Nguyễn Thị Thu Hương, Trịnh Thị Thùy Linh, Nhữ Thị Hà, Trịnh Thị Hào, Nguyễn Thành 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 Khoa học và Phát triển*, 12 (1): 65-72.

Hoàng Quốc Khánh và Phạm Thị Lan Thanh, 2011. Phân lập, định danh và xác định chủng *Lactobacillus* có tiềm năng probiotic từ con người. *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ*, 14 (6): 62- 76.

Phạm Thị Ngọc Lan và Lê Thanh Bình, 2003. Đặc điểm phân loại chủng *Lactobacillus* probiotic CHI23 và CH 126 phân lập từ đường ruột của gà. *Tuyển tập báo cáo tại Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc*, 101-105.

Đào Thị Lương, Nguyễn Thị Anh Đào, Nguyễn Thị Kim Quy, Trần Thị Lệ Quyên, Dương Văn Hợp, Trần Quốc Việt, Ninh Thị Len và Bùi Thị Thu Huyền, 2010. Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn lactic dùng trong chế biến và bảo quản thức ăn thô xanh và phụ phẩm nông nghiệp cho gia súc nhai lại. *Di truyền học và ứng dụng - Chuyên san Công nghệ sinh học*, 6: 1-6.

Trần Quốc Việt, Bùi Thu Huyền, Dương Văn Hợp và 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*, 16 : 521- 537.

- Arthur C. O. and Salminen S.**, 2003. In vitro adhesion assays for probiotics and their in vivo relevance: a review. *Microbial Ecology in Health and Disease* ,15 (4): 175-184.
- Gilliland S.E. and Walker D.K.**, 1990. Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypercholesterolemic effect in humans. *Journal of Dairy Science* , 73 (4): 905-909.
- Herreros M. A., Sandoval H., Gonzalez L., Castro J. M., Fresno J. M. and Tornadijo M. E.**, 2005. Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). *Food Microbiol*, 22 (5): 455-459.
- Kim P.I., Jung M.Y., Chang Y.H., Kim S., Kim S.J. and Park Y.H.**, 2007. Probiotic properties of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains isolated from porcine gastrointestinal tract. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74 (5): 1103-1111.
- Kizerwetter-Swida M. and Binek M.**, 2009. Protecivo effect of potentially probiotic *Lactobacillus* strain on infection with pathogenic bacteria in chickens. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 12 (1): 15-20.
- Lan P.T.N., Sakamolo M and Benno Y.**, 2004. Effects of two probiotic *Lactobacillus* strains on jejunal and cecal microbiota of broiler chicken under acute heat stress condition as revealed by molecular analysis of 16S rRNA genes. *Microbiology and Immunology*, 48 (12): 917-929.
- Mead C. C.**, 1997. Bacteria in the gastrointestinal tract of birds. In: Mackie R.J., White S.A. and Isaacson R.E.(eds). *Gastrointestinal Microbiology*, Chapman and Hall, New York, 216-240.
- Mota R M., Moreira J. L. S., Souza M. R. M., Horta F., Teixeira S. M., Neumann E., Nicoli J. R., and Nunes A. C.**, 2006. Genetic transformation of novel isolates of chicken *Lactobacillus* bearing probiotic features for expression of heterologous proteins: a tool to develop live oral vaccines. *BMC Biotechnol* 6(2) 1-11.
- Newman M.G.**, 2002. Antibiotics resistance is a reality: novel techniques for overcoming antibiotic resistance when using new growth promoters. Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries. *Proceedings of Alltech's 18th Annual Symposium*, Nottingham University Press, 98-106.

Evaluation of probiotic properties and determination of characteristics of lactic acid bacteria strains isolated from “Ri” chicken intestine

Nguyen Thi Lam Doan, Nguyen Thi Thanh Thuy

Abstract

This study was conducted to evaluate the probiotic potential of lactic acid bacteria (LAB) in vitro for producing probiotic preparation in poultry production. The selected strains were evaluated on their probiotic properties such as resistance to acid and bile salts, the production of some extracellular enzymes, resistance to gastrointestinal pathogens, adhesion ability on chicken intestinal epithelium. A collection of 126 lactic acid bacteria that was isolated from “Ri” chicken intestines and was used to screen for the best probiotic properties. Results showed that four probiotic LAB strains (RG2.1, RG2.2, RG6.1, RG8.1) were selected with probiotic potential such as: low pH tolerance (pH 1, 2, 3, 4) after 3h culturing; bile salt tolerance of 0,3% after 4h culturing ($\Delta OD_{620\text{ nm}} > 0,496$); the production of some extracellular enzymes with diameter of substrate hydrolysis from 10 to 21 mm, resistance to some gastrointestinal pathogens with diameter of inhibition zone from 5 to 11 mm; good adhesion ability on chicken intestinal epithelium. Four strains with the best probiotic characteristics were selected for further investigation of the culture condition effects such as cultural temperature, cultural medium pH on their growth. This study indicated that incubation temperature at 37°C and pH 6 were the best for growth of these strains. These results can be used for further study on production of probiotic preparation in poultry farming.

Keywords: Probiotic, lactic acid bacteria, resistance, bacterial pathogens, “Ri” chicken

Ngày nhận bài: 9/6/2018
Ngày phản biện: 25/6/2018

Người phản biện: TS. Nguyễn Thị Tuyết Lê
Ngày duyệt đăng: 16/7/2018

TIỀM NĂNG SỬ DỤNG CHỦNG *Edwardsiella ictaluri* ĐỘT BIẾN GEN *wzz* LÀM VACCINE PHÒNG NGỪA BỆNH GAN THẬN MỦ CHO CÁ TRA GIỐNG

Bùi Thị Thanh Tịnh¹, Trần Hạnh Triết¹, Trần Văn Hương¹,
Vũ Thị Thanh Hương¹, Dương Hoa Xô¹, Nguyễn Quốc Bình¹

TÓM TẮT

Bệnh gan thận mủ trên cá Tra (*Pangasionodon hypophthalmus*) do vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây ra đã và đang gây nhiều tổn thất lớn cho ngành nuôi và xuất khẩu cá Tra vì tỷ lệ gây chết cá lên đến 60 - 80% và tần suất xuất hiện cao. Sử dụng vaccine là vấn đề cấp bách vì kháng sinh gây kháng thuốc và là rào cản cho xuất khẩu. Tuy nhiên, loại vaccine, phương pháp chủng ngừa và việc sử dụng vaccine vào giai đoạn phát triển nào của cá Tra vẫn đang là vấn đề cần nghiên cứu. Trung tâm Công nghệ sinh học TP. Hồ Chí Minh đã tiến hành các nghiên cứu về chủng *E. ictaluri* đột biến nhược độc có tiềm năng làm vaccine phòng bệnh gan thận mủ và chủng *E. ictaluri* đột biến gen *wzz* (O- antigen chain length determinant gene) được tạo ra bằng phương pháp knockout gen là chủng cho hiệu quả bảo vệ tốt nhất (Bằng độc quyền sáng chế số 14407 cấp ngày 04/8/2015). Các thử nghiệm ở quy mô phòng thí nghiệm cho thấy, chủng vi khuẩn nhược độc này an toàn cho cá khi ngâm ở mật độ 10^7 CFU ml⁻¹ và có hiệu quả bảo vệ (RPS) khi ngâm một lần ở giai đoạn cá bột là 30% và giai đoạn cá giống là 65%, đồng thời cho RPS cao nhất (94%) khi ngâm hai lần ở giai đoạn cá bột và cá giống. Đây là chủng *E. ictaluri* nhược độc có tiềm năng làm vaccine ngâm để phòng ngừa bệnh gan thận mủ cho cá Tra giống.

Từ khoá: *Edwardsiella ictaluri*, vaccine sống nhược độc, cá Tra (*Pangasionodon hypophthalmus*), bệnh gan thận mủ

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nuôi trồng thủy sản là một ngành kinh tế mũi nhọn của Việt Nam, trong đó nghề nuôi cá Tra đóng góp rất lớn cho kim ngạch xuất khẩu của cả nước. Theo Tổng cục Thủy sản Việt Nam, tổng giá trị xuất khẩu năm 2017 đạt 1,78 tỷ USD, tăng 4,3% so với năm 2016. Tuy nhiên, nghề nuôi cá Tra hiện nay đang gặp khó khăn do chưa kiểm soát được dịch bệnh. Một trong những bệnh gây thiệt hại lớn cho người nuôi phải kể đến là bệnh gan thận mủ, bệnh nhiễm trùng huyết (bệnh đốm đỏ), khi bùng phát có thể gây chết cá từ 60 - 80% (Crumlish *et al.*, 2002). Để đối phó với bệnh, người nông dân sử dụng nhiều loại kháng sinh, tuy nhiên việc sử dụng kháng sinh một cách bừa bãi như hiện nay sẽ gây nhiều tác hại như dư lượng kháng sinh trong sản phẩm, vi khuẩn kháng thuốc và nhiều tác hại tới môi trường. Vì vậy, cùng với sự lớn mạnh của ngành nuôi trồng thủy sản Việt Nam, việc sử dụng vaccine để hạn chế dịch bệnh là vấn đề hết sức cấp thiết.

Các nghiên cứu cho thấy *E. ictaluri* là tác nhân gây bệnh sơ cấp. Vi khuẩn này có thể xâm nhập vào cá theo hai con đường: cơ quan khứu giác (Miyazaki and Plumb, 1985; Waltman *et al.*, 1986) và đường tiêu hóa (Waltman *et al.*, 1986). Đa số các nghiên cứu khác đã xác nhận vi khuẩn *E. ictaluri* là nguyên nhân gây bệnh gan thận mủ ở cá Tra (Hawke *et al.*, 1981; Yuasa *et al.*, 2003; Đồng Thanh Hà và Đỗ Thị Hòa, 2008; Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh

Phương, 2009). Cá có biểu hiện bệnh sau 3 - 4 ngày nhiễm bệnh với tốc độ lây lan nhanh chóng. Trong ao nuôi, cá được phát hiện nhiễm bệnh gan thận mủ chủ yếu từ giai đoạn cá hương (3 tuần tuổi) đến giai đoạn cá giống với tỷ lệ chết rất cao và rải rác đến giai đoạn cá thịt (Tùng Thanh Dung và *ctv.*, 2004). Vì vậy, để giảm thiệt hại do tỷ lệ cá chết cao gây ra, việc xử lý vaccine sớm từ giai đoạn cá bột và tập trung từ giai đoạn cá bột đến giai đoạn cá giống là cần thiết.

Vaccine sống nhược độc là một trong những hướng nghiên cứu đang được sử dụng để ngăn ngừa bệnh gan thận mủ trên cá Tra. Trong đó, knockout gen là phương pháp rất hữu hiệu được sử dụng để bất hoạt các gen độc lực hoặc các gen cần thiết cho quá trình sinh dưỡng của vi khuẩn trong vật chủ. Các chủng này vẫn có thể kích thích hệ thống miễn dịch của vật chủ theo con đường gây bệnh của chủng hoang dại nhưng độc lực không đủ mạnh để gây chết vật chủ. Theo Bastin và cộng tác viên (1993), gen *wzz* điều hòa sự hình thành chiều dài đặc trưng của chuỗi O antigen. Các nghiên cứu khác cho thấy chủng đột biến gen *wzz* ở các loài vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica* có độc lực thấp hơn so với chủng hoang dại (Burrows *et al.*, 1997; Najdenski *et al.*, 2003). Dựa trên những nghiên cứu này, chủng vi khuẩn *E. ictaluri* đột biến gen *wzz* nhược độc (WzM) an toàn cho cá và có hiệu quả bảo vệ cao ở quy mô phòng thí nghiệm (> 60%) đã được tạo ra và được cấp bằng độc quyền sáng

¹ Phòng Công nghệ Sinh học Thủy sản, Trung tâm Công nghệ Sinh học TP. Hồ Chí Minh