

KHẢO SÁT ĐẶC TÍNH PROBIOTIC CÁC CHỦNG VI KHUẨN *Bacillus subtilis* PHÂN LẬP TẠI CÁC TỈNH ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

Lê Thị Hải Yến¹ và Nguyễn Đức Hiền²

¹Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Vemedim

²Chi cục Thú y Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 05/08/2016

Ngày chấp nhận: 25/10/2016

Title:

Evaluation of the probiotic properties of *Bacillus subtilis* strains isolated from the Mekong Delta

Từ khóa:

Bacillus subtilis, enzyme, đối kháng, kháng sinh, probiotic

Keywords:

Antagonistic, antibiotic, *Bacillus subtilis*, enzyme, probiotic

ABSTRACT

This study aimed to examine probiotic properties of 21 *Bacillus subtilis* strains isolated from soil and feces on chicken farms in the Mekong Delta. Parameters consisted of the ability to produce extracellular enzymes and antagonistic activity. The results showed that all *B.subtilis* strains were sensitive to 5 kinds of antibiotics (Enrofloxacin, Doxycycline, Norfloxacin, Sulfadimidin – trimethoprim), and the lowest sensitivity level was recorded for Colistin (5%). Ten of 21 strains could produce three extracellular enzymes namely amylase, protease and lipase. In addition, the AG27, AG60, VL05, VL28 strains exhibited the antimicrobial activities against bacteria such as *E.coli*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus spp.*, and *Streptococcus spp.* The primary results suggest that four strains of AG27, AG60, VL05, VL28 have the potential to be used as probiotic in poultry.

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm khảo sát đặc tính probiotic của 21 chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* phân lập từ đất và phân trại gà tại các tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL). Các chỉ tiêu khảo sát bao gồm: thử nghiệm khả năng nhạy cảm đối với kháng sinh, khả năng sinh enzyme ngoại bào, và khả năng đối kháng với vi khuẩn gây bệnh. Kết quả cho thấy, 100% các chủng nhạy với 5 loại kháng sinh trong 9 loại thử nghiệm, tỷ lệ nhạy với kháng sinh Colistin là thấp nhất (5%). Mười chủng trong tổng số 21 chủng *B.subtilis* có khả năng sinh cả 3 loại enzyme ngoại bào amylase, protease và lipase. Khi khảo sát tính đối kháng với vi khuẩn gây bệnh đường ruột, các chủng AG27, AG60, VL05, VL28 có khả năng ức chế sự phát triển của *E.coli*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus spp.*, và *Streptococcus spp.* Kết quả bước đầu cho thấy, 4 chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* AG27, AG60, VL05, VL28 có tiềm năng ứng dụng làm probiotic trong chăn nuôi gia cầm.

Trích dẫn: Lê Thị Hải Yến và Nguyễn Đức Hiền, 2016. Khảo sát đặc tính probiotic các chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* phân lập tại các tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. Số chuyên đề: Nông nghiệp (Tập 2): 26-32.

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngày nay, trước tình hình lạm dụng kháng sinh trong chăn nuôi, chế phẩm probiotic đang được đánh giá như một giải pháp thay thế hiệu quả, và

cung cấp một phương thức an toàn bền vững đối với người nuôi và tiêu dùng. Thực tế, sử dụng chế phẩm probiotic mang lại rất nhiều lợi ích cho người chăn nuôi như hỗ trợ tiêu hóa thức ăn, cân bằng hệ vi sinh đường ruột bằng cách cạnh tranh với vi

khả năng gây bệnh (Kabir, 2009), từ đó giảm chi phí trong phòng bệnh và tăng năng suất cho vật nuôi (Reuter, 2001).

Tại Việt Nam, *Bacillus* là nhóm vi khuẩn được sử dụng phổ biến làm probiotic vì *Bacillus* có khả năng cạnh tranh với các vi khuẩn gây bệnh qua cơ chế ngăn cản miễn dịch, cạnh tranh vị trí bám dính và sản sinh ra chất kháng khuẩn (bacteriocins). Hơn nữa, *Bacillus* còn được ưa chuộng do các thuận lợi như: giá thành rẻ, dễ pha trộn, chịu được tác động trong quá trình sản xuất (ép viên, nhiệt...), dễ bảo quản, hạn sử dụng dài (Barbosa *et al.*, 2005). Do đó, bào tử *Bacillus* đã được sử dụng rộng rãi làm probiotic cho vật nuôi cũng như cho con người.

Nghiên cứu này được tiến hành nhằm đánh giá đặc tính probiotic (bao gồm: khả năng nhạy với kháng sinh, khả năng sinh enzyme ngoại bào, khả năng đối kháng với chủng vi khuẩn gây bệnh) của các chủng *Bacillus subtilis* phân lập tại một số tỉnh thuộc Đồng bằng sông Cửu Long nhằm ứng dụng các chủng vi khuẩn này như nguồn cung cấp probiotic phục vụ cho chăn nuôi.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Thời gian và địa điểm

- Thời gian : Từ tháng 11/2015 đến 6/2016.
- Địa điểm lấy mẫu: Kiên Giang, An Giang, Sóc Trăng, Hậu Giang, Vĩnh Long, Đồng Tháp và thành phố Cần Thơ.
- Địa điểm thực hiện thí nghiệm: phòng thí nghiệm sinh học, Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Vemedim.

2.2 Vật liệu nghiên cứu

- Vi khuẩn thử nghiệm: 21 chủng *Bacillus subtilis* được tuyển chọn từ 296 chủng vi khuẩn phân lập từ 70 mẫu đất và 70 mẫu phân tại các trại gà ở 6 tỉnh và thành phố Cần Thơ, mỗi địa điểm lấy 10 mẫu đất và 10 mẫu phân theo kết quả nghiên cứu của Lê Thị Hải Yến đã được báo cáo trong hội nghị Châu Á về Thú y (Lê Thị Hải Yến và Nguyễn Đức Hiền, 2016).

- Vi khuẩn gây bệnh: 4 chủng *E. coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. do phòng vi sinh Chi Cục Thú y Cần Thơ phân lập từ gà bệnh cung cấp.

2.3 Phương pháp

2.3.1 Tính nhạy cảm kháng sinh của vi khuẩn

Tính nhạy cảm kháng sinh của vi khuẩn được xác định bằng phương pháp đĩa khuếch tán theo hướng dẫn của Hội đồng quốc gia Hoa kỳ về các

tiêu chuẩn lâm sàng phòng thí nghiệm (Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI, 2012). Dịch vi khuẩn *B. subtilis* sau khi nuôi cấy 18 giờ có mật số tương đương 10^8 CFU/ mL. Sau đó, bơm 100 μ L dung dịch vi khuẩn phân tán đều trên bề mặt môi trường Muller hinton agar (MHA, Meck). Đĩa kháng sinh (Oxoid, England) được đặt lên mặt thạch và ủ ở 37°C trong 24 giờ. Đường kính vòng vô trùng được đo bằng mm, chủng vi khuẩn trên đĩa MHA tương ứng sẽ được xác định là kháng (≤ 14 mm), nhạy (≥ 20 mm) hoặc trung gian (15-19mm) với kháng sinh thử nghiệm theo tiêu chuẩn của CLSI (2012). Các loại kháng sinh thử nghiệm là: Erythromycin 5 μ g (ERY), Gentamycin 10 μ g (GEN), Neomycin 30 μ g (NEO), Oxytetracycline 30 μ g (OCT), Doxycycline 30 μ g (DOX), Colistin 10 μ g (COL), Sulfadimidin – trimethoprim 5 μ g (SXT), Norfloxacin 10 μ g (NOR), Enrofloxacin 15 μ g (ENR). Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần và lấy giá trị trung bình.

2.3.2 Khảo sát khả năng sinh enzyme ngoại bào

Khả năng sinh enzyme ngoại bào được khảo sát theo phương pháp của Harley *et al.* (2001) có cải tiến như sau: Tế bào của các chủng *Bacillus subtilis* được nuôi cấy trong môi trường TSB (Trypto-casein soy broth) ở 37°C trong 24 giờ. Lấy tằm bông vô trùng chấm dịch nuôi cấy lên đĩa môi trường TSA (Trypto – casein soy agar) có bổ sung 1% tinh bột cho phản ứng khảo sát khả năng sinh enzyme amylase, 1% gelatin cho phản ứng khảo sát khả năng sinh enzyme protease; bổ sung 1% Tween 20 và 0,01% CaCl₂ đối với khảo sát lipase. Đọc kết quả bằng cách nhỏ thuốc thử Lugol đối với amylase, trichloroacetic acid (TCA) 25% đối với protease, quan sát các vòng đục xung quanh khuẩn lạc (lipase). Mỗi phản ứng lặp lại 3 lần để có kết quả chính xác.

2.3.3 Khả năng đối kháng với các chủng vi khuẩn gây bệnh

Thử nghiệm khả năng đối kháng theo phương pháp vạch thẳng vuông góc

Khảo sát khả năng đối kháng của các chủng *B. subtilis* trên môi trường Starch agar (SA) bao gồm: tinh bột 10g/l, peptone 5g/l, NaCl 0,5g/l, agar: 15g/l (Moore *et al.*, 2013). Các bước tiến hành theo phương pháp của Sertaç *et al.* (2014) có cải tiến như sau: cấy vi khuẩn *B. subtilis* dọc theo một đường thẳng trên đĩa thạch, ủ ở 37°C trong 24 giờ, tiến hành cấy vi khuẩn gây bệnh theo các vạch ngang vuông góc với vạch vi khuẩn đã mọc, tiếp tục ủ ở 37°C trong 24 giờ. Khả năng kháng khuẩn được xác định bằng cách đo khoảng cách vùng kháng khuẩn theo đơn vị mm dựa theo Hutt *et al.* (2006). Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Thử nghiệm khả năng đối kháng theo phương pháp đối kháng trực tiếp

Thực hiện theo phương pháp của Moore *et al.* (2013) có điều chỉnh như sau: Vi khuẩn gây bệnh và vi khuẩn *B. subtilis* được hoạt hóa trong môi trường TSB và ủ ở nhiệt độ thích hợp trong 24 giờ. Huyền phù vi khuẩn *B. subtilis* được điều chỉnh sao cho mật số đạt 10⁵ CFU/ mL, 10⁶ CFU/ mL và 10⁷ CFU/ mL để tiến hành thử khả năng đối kháng tương ứng với nồng độ vi khuẩn gây bệnh là 10⁶ CFU/ mL. Tiến hành bơm 100 µL huyền phù vi khuẩn gây bệnh lên các đĩa thạch và dùng que tran trải đều; sau đó, bơm 10 µL dịch vi khuẩn *B. subtilis* tương ứng với các nồng độ khảo sát lên bề mặt thạch đã được trải vi khuẩn gây bệnh, và đem ủ ở 37°C trong 24 giờ. Khả năng đối kháng được đo bằng đường kính vòng ức chế vi khuẩn gây bệnh theo đơn vị mm. Đánh giá khả năng đối kháng theo Sumathi and Reetha (2012). Mỗi thử nghiệm được lặp lại 3 lần.

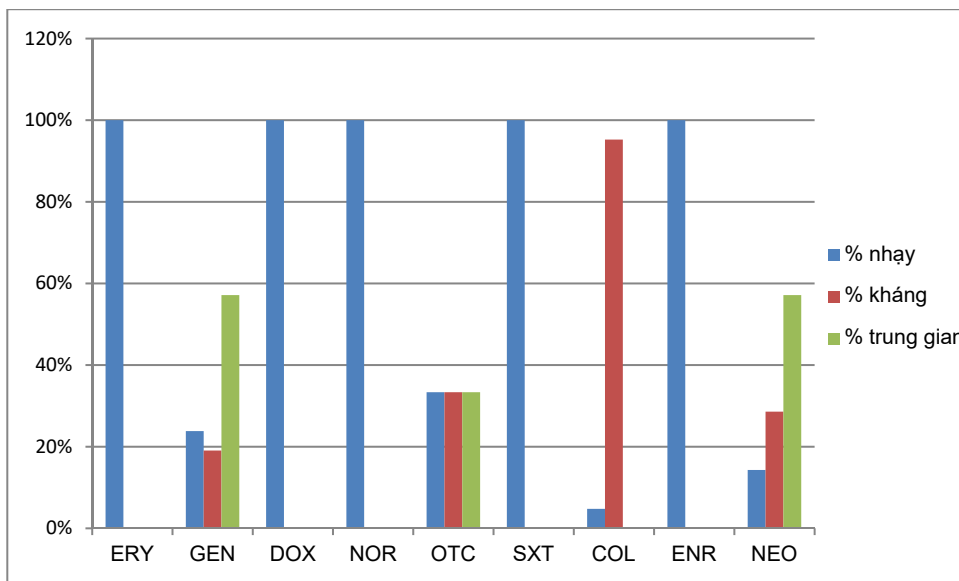
2.3.4 Phân tích thống kê

Xử lý thống kê theo phân tích phương sai một chiều (one-way ANOVA) bởi phần mềm Minitab 16 ver 16.2.0.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Khả năng nhạy cảm với kháng sinh

Khả năng nhạy cảm với kháng sinh của vi khuẩn probiotic thường được quan tâm, vì nếu vi khuẩn probiotic còn nhạy với kháng sinh thì nó sẽ an toàn về mặt sinh học, nó sẽ không chứa plasmid hoặc các gene kháng kháng sinh của các kháng sinh được sử dụng. Hình 1 cho thấy 21 chủng *Bacillus subtilis* đều nhạy với hầu hết các loại kháng sinh với tỷ lệ khá cao từ 100% các chủng nhạy với enrofloxacin, doxycycline, norfloxacin, sulfadimidin - trimethoprim, đến gentamycin (24% nhạy, 57% trung gian, 19% kháng), oxytetracycline (33% nhạy, 33% trung gian, 33% kháng), neomycin (14% nhạy, 57% trung gian, 29% kháng), thấp nhất là colistin chỉ có 5% nhạy. Điều này có thể do colistin là kháng sinh được sử dụng rất phổ biến trong điều trị các bệnh nhiễm khuẩn đường tiêu hóa. Nghiên cứu trước đây của Sampa *et al.* (2012) khi khảo sát khả năng nhạy cảm kháng sinh đối với các chủng vi khuẩn phân lập từ nội tạng gà đã cho thấy tất cả các chủng trong đó có *Bacillus spp.* đều kháng với Colistin



Hình 1: Tỷ lệ phần trăm khả năng nhạy với kháng sinh của các chủng vi khuẩn *B.subtilis*

Kết quả từ Bảng 1 cho thấy, trong 21 chủng *Bacillus subtilis* được khảo sát thì có 5 chủng còn nhạy với đa số kháng sinh (78% nhạy) là AG19, AG27, AG60, VL05, VL28. Tuy nhiên, khả năng nhạy với kháng sinh của các chủng còn lại cũng trên 50%. Như vậy, 5 chủng vi khuẩn *Bacillus*

subtilis trong khảo sát của chúng tôi còn nhạy với nhiều kháng sinh hơn kết quả của Sampa *et al.* (2012) khi khảo sát 4 chủng *Bacillus spp.* phân lập từ nội tạng gà thì nhạy với 4/8 loại kháng sinh thử nghiệm (chiếm tỷ lệ 50%).

Bảng 1: Khả năng nhạy cảm với kháng sinh của 21 chủng khảo sát

STT	Chủng VK	Khả năng nhạy với kháng sinh		Khả năng nhạy với kháng sinh		Khả năng nhạy với kháng sinh	
		Số kháng sinh nhạy	%	Số kháng sinh trung gian	%	Số kháng sinh kháng	%
1	CT11	6	67%	1	17%	2	22%
2	AG07	5	56%	2	33%	2	22%
3	AG17	5	56%	2	33%	2	22%
4	AG19	7	78%	-	-	2	22%
5	AG27	7	78%	1	17%	1	11%
6	AG49	6	67%	1	17%	2	22%
7	AG60	7	78%	1	17%	1	11%
8	VL05	7	78%	1	17%	1	11%
9	VL16	6	67%	1	17%	2	22%
10	VL28	7	78%	1	17%	1	11%
11	VL41	5	56%	3	50%	1	11%
12	ST06	6	67%	2	33%	1	11%
13	ST08	5	56%	2	33%	2	22%
14	ST10	5	56%	-	-	4	44%
15	DT29	5	56%	3	50%	1	11%
16	DT30	5	56%	1	17%	2	22%
17	KG09	5	56%	3	50%	1	11%
18	KG12	5	56%	3	50%	1	11%
19	KG22	6	67%	1	17%	2	22%
20	KG29	5	56%	1	17%	3	33%
21	KG36	5	56%	1	17%	3	33%

Ghi chú: Vòng kháng khuẩn ≥ 20 mm : Nhạy
 Vòng kháng khuẩn từ 15-19 mm: Trung gian
 Vòng kháng khuẩn ≤ 14 mm : Kháng

3.2 Khả năng sinh enzyme ngoại bào

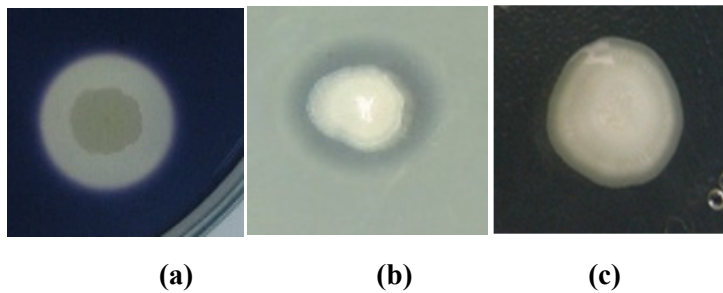
Các enzyme ngoại bào đóng vai trò quan trọng trong việc hỗ trợ tiêu hóa thức ăn, giúp thức ăn dễ hấp thu, và vật nuôi tăng trọng tốt. Do đó, khả năng sinh enzyme ngoại bào là một tiêu chí quan trọng khi chọn lọc các chủng vi khuẩn làm probiotic.

Kết quả từ Bảng 2 cho thấy, 21 chủng *B. subtilis* đều có khả năng sinh amylase và protease, riêng chỉ có 10 chủng AG27, AG60, VL05, VL28, VL41, DT29, KG09, KG12, KG22, KG36 có khả năng sinh lipase, đây là các chủng vi khuẩn có khả năng sinh enzyme ngoại bào tốt, sẽ được tiếp tục khảo sát khả năng đối kháng với vi khuẩn gây bệnh. Kết quả nghiên cứu của Okorie and Olasupo (2013) khi khảo sát trên 7 chủng *B. Subtilis* cho thấy chỉ có duy nhất chủng Bs2 phân lập từ sản phẩm lên men “Ugba” thể hiện đầy đủ hoạt tính thủy phân tinh bột, gelatin và chất béo trong sữa, các chủng còn lại chỉ thể hiện khả năng phân hủy protein và tinh bột. Theo một nghiên cứu khác của Ngô Tự Thành và Bùi Thị Việt Hà (2009) trên 236 chủng *Bacillus* phân lập từ mẫu đất và nước thải, chỉ có 2 chủng T20 và M27 thể hiện đầy đủ các hoạt tính như phân hủy cả amylase, gelatine và chất béo trong sữa, các chủng còn lại chỉ thể hiện tính năng phân hủy protein và tinh bột.

Bảng 2: Khả năng sinh enzyme ngoại bào của các chủng *B.subtilis*

Stt	Vi khuẩn	Amylase	Protease	Lipase
1	CT11	+	+	-
2	AG07	+	+	-
3	AG17	+	+	-
4	AG19	+	+	-
5	AG27	+	+	+
6	AG49	+	+	-
7	AG60	+	+	+
8	VL05	+	+	+
9	VL16	+	+	-
10	VL28	+	+	+
11	VL41	+	+	+
12	ST06	+	+	-
13	ST08	+	+	-
14	ST10	+	+	-
15	DT29	+	+	+
16	DT30	+	+	-
17	KG09	+	+	+
18	KG12	+	+	+
19	KG22	+	+	+
20	KG29	+	+	-
21	KG36	+	+	+

Ghi chú : (+): Có khả năng sinh enzyme, (-): không có khả năng sinh enzyme



Hình 2: Thử nghiệm khả năng sinh enzyme ngoại bào của chủng *B.subtilis* AG27 : amylase (a), protease (b) và lipase (c)

3.3 Khả năng đối kháng với các chủng vi sinh vật gây bệnh

Hiệu quả của một sản phẩm probiotic là khi đưa vào đường tiêu hóa sẽ giúp gia tăng sự chuyển hóa thức ăn, tăng khả năng miễn dịch, ngoài ra còn có tác dụng ức chế sự phát triển của vi sinh vật gây bệnh, giúp cân bằng hệ vi sinh đường ruột, và hạn chế các bệnh đường tiêu hóa.

Mùi chủng vi khuẩn *B. subtilis* có khả năng sinh cả 3 loại enzyme amylase, protease và lipase được khảo sát khả năng đối kháng với vi khuẩn gây bệnh *E.coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp. và *Streptococcus* spp. bằng phương pháp kẻ vạch vuông góc. Kết quả hoạt tính kháng khuẩn của các chủng *B.subtilis* được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3: Vùng kháng khuẩn của các chủng *B. subtilis* bằng phương pháp vạch kẻ vuông góc

Vi khuẩn	Vùng kháng khuẩn (mm)			
	<i>E.coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Streptococcus</i>
AG27	8±0.5 ^b	12±0.3 ^a	10±0.3 ^a	10±0.5 ^b
AG60	6±0.2 ^c	6±0.4 ^c	7±0.5 ^{b,c}	4±0.2 ^d
VL05	6±0.5 ^c	10±0.5 ^b	8±0.3 ^b	6±0.2 ^c
VL28	10±0.6 ^a	13±0.5 ^a	10±0.9 ^a	12±0.6 ^a
VL41	6±0.2 ^c	10±0.5 ^b	10±0.5 ^a	-
DT29	-	-	8±0.5 ^b	-
KG09	6±0.5 ^c	10±0.5 ^b	-	-
KG12	-	9±0.9 ^b	10±0.6 ^a	4±0.5 ^d
KG22	4±1 ^d	6±0.5 ^c	6±0.5 ^c	-
KG36	-	9±0.6 ^b	6±0.5 ^c	-

Ghi chú : ^{a,b,c,d} Các giá trị trong cùng một cột mang chữ số mũ khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0.01$)

Kết quả cho thấy, các chủng *B. subtilis* khảo sát đều có hoạt tính kháng khuẩn ở những mức độ khác nhau, 4 chủng AG27, AG60, VL05 và VL28 có hoạt tính kháng khuẩn ức chế được sự phát triển của cả 4 vi khuẩn gây bệnh *E.coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp. và *Streptococcus* spp. Trong đó, chủng VL 28 có đường kính vùng kháng khuẩn lớn đối với cả 4 vi khuẩn gây bệnh *E.coli* đạt trung bình 10 mm, *Salmonella* đạt trung bình 13 mm, *Staphylococcus* đạt trung bình 10 mm, *Streptococcus* đạt trung bình 12 mm, kể đến là chủng AG27, VL05 rồi đến AG60. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Marahiel *et al.* (1993)

khi chứng minh các chủng *Bacillus subtilis* có thể sinh ra các chất kháng khuẩn phổ rộng như subtilin, bacilysin, macobacillin để tiêu diệt vi khuẩn gây bệnh. Trong một nghiên cứu khảo sát tính kháng khuẩn của các chủng *B. subtilis* trên nhiều loại môi trường khác nhau, Moore *et al.* (2013) cũng cho thấy được hoạt tính kháng khuẩn của *B. subtilis* trên môi trường SA. Bốn chủng vi khuẩn AG27, AG60, VL05 và VL28 sẽ được tiếp tục khảo sát khả năng đối kháng trực tiếp với vi khuẩn bệnh theo các nồng độ 10^5 , 10^6 và 10^7 CFU/mL với nồng độ của vi khuẩn gây bệnh là 10^6 CFU/mL. Kết quả được trình bày ở Bảng 4.

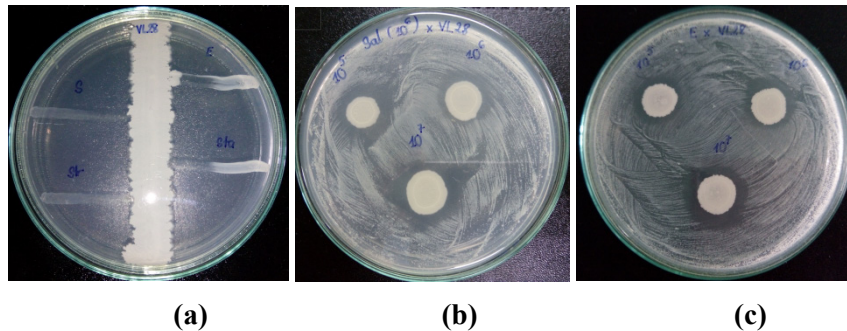
Bảng 4: Hoạt tính kháng khuẩn của AG27, AG60, VL05, VL28 bằng phương pháp đối kháng trực tiếp

Vi khuẩn		<i>E.coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Streptococcus</i>
AG27	10 ⁵	14±0.2 ^d	20±0.3 ^{b,c}	15±0.4 ^f	15±0.2 ^d
	10 ⁶	16±0.1 ^c	21±0.7 ^b	18±0.8 ^{d,e}	19±0.5 ^{b,c}
	10 ⁷	16±0.3 ^c	25±0.4 ^a	19±0.4 ^d	21±0.5 ^a
AG60	10 ⁵	11±0.2 ^g	16±0.8 ^{f,g}	18±0.1 ^{d,e}	18±0.2 ^c
	10 ⁶	12±0.5 ^f	17±0.4 ^{e,f}	18±0.2 ^{d,e}	18±0.8 ^c
	10 ⁷	14±0.4 ^d	21±0.6 ^b	21±0.1 ^c	21±0.1 ^a
VL05	10 ⁵	13±0.4 ^c	15±0.1 ^g	15±0.2 ^f	16±0.7 ^d
	10 ⁶	14±0.2 ^d	18±0.3 ^{d,e}	17±0.7 ^c	18±0.3 ^c
	10 ⁷	16±0.2 ^c	20±0.6 ^{b,c}	19±0.2 ^d	20±0.5 ^{a,b}
VL28	10 ⁵	14±0.3 ^d	19±0.2 ^{c,d}	26±0.4 ^b	18±0.3 ^c
	10 ⁶	17±0.3 ^b	20±0.6 ^{b,c}	27±0.5 ^b	18±0.3 ^c
	10 ⁷	19±0.4 ^a	24±0.7 ^a	30±0.2 ^a	20±0.6 ^{a,b}

Ghi chú : ^{a,b,c,d,e,f} Các giá trị trong cùng một cột mang chữ số mũ khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa thống kê ($P < 0.01$)

Kết quả này một lần nữa đã khẳng định lại hoạt tính kháng khuẩn khá cao của 4 chủng AG27, AG60, VL05 và VL28. Điều đáng ghi nhận là dù ở mật số thấp, tương đương hay cao hơn mật số vi khuẩn bệnh thì 4 chủng *B. subtilis* đều có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn gây bệnh. Tuy nhiên, khi mật số *B. subtilis* càng tăng thì đường kính vùng kháng khuẩn càng cao. Kết quả khảo sát

tính kháng khuẩn của Jianhua *et al.* (2009) cho thấy, *B. subtilis* LFB112 có khả năng đối kháng đồng thời với cả 2 nhóm vi khuẩn Gram dương và Gram âm (*E.coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp. và *Streptococcus* spp.); và trong một nghiên cứu của Hồ Lê Quỳnh Châu và *ctv.* (2010) cũng cho thấy chủng *B. subtilis* LII4 có khả năng đối kháng được với vi khuẩn *E. coli* ở mật số 10⁶CFU/ mL.



Hình 3: Hoạt tính kháng *E.coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp. và *Streptococcus* spp. của *B.subtilis* VL28 (a): đối kháng theo vạch thẳng vuông góc. (b): đối kháng trực tiếp với *Salmonella*. (c): đối kháng trực tiếp với *E.coli*

4 KẾT LUẬN

Sau khi tiến hành thử nghiệm các đặc tính nhạy cảm với kháng sinh, khả năng sinh enzyme ngoại bào, và khả năng kháng khuẩn của 21 chủng vi khuẩn *B. subtilis*, kết quả nghiên cứu cho thấy các chủng *B.subtilis* AG27, AG60, VL05 và VL28 đều có các đặc tính để làm nguồn nguyên liệu sản xuất probiotic.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Barbosa T.M., Cláudia R. Serra, Roberto M. La Ragione, Martin J. Woodward, and Adriano O. Henriques., 2005. Screening for Bacillus isolates in the broiler gastrointestinal tract. Applied and environmental microbiology. 71(2): 968-978.

Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI, 2012. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 9th ed. Approved Standard M7-A9.Vol.32 No.2
 Harley J. P. and L. M. Prescott, 2001. Laboratory exercises in microbiology.
 Hồ Lê Quỳnh Châu, Hồ Trung Thông, Nguyễn Khánh Quỳnh, 2010. Đánh giá khả năng bám dính và kháng khuẩn ở mức độ in vitro của một số chủng vi sinh vật có tiềm năng sử dụng làm probiotics. Tạp chí Khoa học Đại học Huế, số 57.
 Hutt P, Shchetova J, Loivukene K, Kullisaar T, Mikelsaar M, 2006. Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against entero- and uropathogens. Journal of Applied Microbiology 100: 1324–1332.

- Jianhua Xie, Rijun Zhang, Changjiang Shang, Yaoqi Guo, 2009. Isolation and characterization of a bacteriocin produced by an isolated *Bacillus subtilis* LFB112 that exhibits antimicrobial activity against domestic animal pathogens. *Journal of Biotechnology* 8: 5611-5619.
- Kabir S. M., 2009. The Role of Probiotics in the Poultry Industry. *Int J Mol Sci.* 10(8): 3531–3546.
- Lê Thị Hải Yến, Nguyễn Đức Hiền, 2016. Isolation and identification of *Bacillus subtilis* isolated from soil and feces on chicken farms in the Mekong Delta, Viet Nam. The 19th federation of Asian veterinary associations congress.
- Marahiel M. A., Nakano M. M., 1993. Regulation of peptide antibiotic production in *Bacillus*. *Molecular Microbiology*, 7(5): 631-6.
- Moore T., Globa L., Barbaree J., Vodyanoy V., Sorokulova I., 2013. Antagonistic Activity of *Bacillus* Bacteria against Food-Borne Pathogens. *Prob Health* 1: 110.
- Ngô Tự Thành, Bùi Thị Việt Hà, 2009. Nghiên cứu hoạt tính enzyme ngoại bào của một số chủng *Bacillus* mới phân lập và khả năng ứng dụng chúng trong xử lý nước thải. *Tạp chí Khoa học Đại học Quốc gia Hà Nội, Khoa Tự nhiên và Công nghệ* 25: 101-106.
- Okorie P.C and Olasupo N.A, 2013. Growth and extracellular enzyme production by microorganisms isolated from Ugba - an indigenous Nigerian fermented condiment. *African Journal of Biotechnology* 12(26): 4158-4167.
- Reuter G., 2001. Probiotics—possibilities and limitations of their application in food, animal feed, and in pharmaceutical preparations for men and animals. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 114:410–419.
- Sampa R.R, Bahanur R., Jayedul H., Nazmul H.N, 2012, Isolation and identification of bacterial flora from internal organs of broilers and their antibiogram studies. *Microbes and Health* 1(2): 72-75.
- Sertaç Argun Kıvanç, Murat Takım, Merih Kıvanç , Gülay Güllülü, 2014. *Bacillus* spp. isolated from the conjunctiva and their potential antimicrobial activity against other eye pathogens. *African Health Sciences* 14(2): 364-371.
- Sumathi V. and Reetha D., 2012. Screening of Lactic Acid Bacteria for Their Antimicrobial Activity against Pathogenic Bacteria. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*; 3(4):802-808.