

ĐẶC ĐIỂM CHỦNG VI KHUẨN LACTIC DÙNG TRONG CHẾ PHẨM PROBIOTIC PHÒNG VÀ TRỊ BỆNH ĐƯỜNG RUỘT CHO HEO

Trần Thị Mỹ Trang¹

LACTIC ACID BACTERIA CHARACTERISTICS IN PROBIOTIC FOR PREVENTING AND TREATING PIG DIGESTIVE DISORDER

Tran Thi My Trang¹

Tóm tắt – Từ bộ sưu tập giống vi khuẩn của Phòng Thí nghiệm Vi sinh – Trường Đại học Sư phạm Thành phố Hồ Chí Minh, chúng tôi tuyển chọn được ba chủng vi khuẩn lactic: *Lactobacillus agilis* (B), *Lactobacillus salivarius* (N₄), *Lactobacillus acidophilus* (L₂). Các chủng vi khuẩn này có đặc tính phù hợp yêu cầu sản xuất chế phẩm probiotic như có khả năng sinh axit lactic cao, có hoạt tính đối kháng mạnh, phổ kháng khuẩn rộng với các vi sinh vật kiểm định (gây bệnh đường ruột), đặc biệt là các vi khuẩn gây bệnh tiêu chảy cho heo như *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella choleraesuis*, có khả năng đề kháng tốt với các chất kháng sinh (trị đường ruột) như Neomycin (Ne), Nalidixic acid (Ng), Kanamicin (Kn), Gentamicin (Ge). Chúng tôi đã xác định được các điều kiện tối ưu cho sự tạo thành sinh khối của ba chủng: môi trường nước chiết cà chua, nhiệt độ từ 30°C – 40°C, pH ban

đầu là 5,5 – 6,5, nồng độ cao nấm men là 1,0 – 2,0%, nồng độ saccharose là 1,0 – 2,0%, thời điểm tốt nhất cho việc thu sinh khối là 24 – 36 giờ. Trên cơ sở này, chúng tôi đã nghiên cứu và sử dụng sinh khối của một số chủng vi khuẩn lactic để tạo chế phẩm probiotic giúp phòng và điều trị bệnh đường ruột cho heo.

Từ khóa: axit lactic, chế phẩm probiotic, phổ kháng khuẩn, vi khuẩn lactic.

Abstract – From the strains of lactic acid bacterium in the Laboratory of Microbiology, Ho Chi Minh City University of Education, 03 of those strains with activated probiotic have been chosen: *Lactobacillus agillis* (B), *Lactobacillus salivarius* (N₄), *Lactobacillus acidophilus* (L₂). These strains of bacteria have high lactic acid production capacity, strong antagonistic activity, and wide antibacterial spectrum. Specially, they have strong resistance to two bacterial strains causing digestive disorder in pigs such as *E. coli* and *Samonella choleraesuis* which resist the four important types of antibiotics including Neomycin (Ne), Nalidixid acid

¹Khoa Sư phạm, Trường Cao đẳng Cộng đồng Sóc Trăng
Ngày nhận bài: 09/10/2020; Ngày nhận kết quả bình
duyet: 13/11/2020; Ngày chấp nhận đăng: 25/12/2020
Email: trangtm@sttc.edu.vn

¹School of Education, Soc Trang Community College,
Soc Trang Province

Received date: 09th October 2020; Revised date: 13th
November 2020; Accepted date: 25th December 2020

(Ng), *Kanamycin (Kn) and Gentamycin (Ge)*. The optimal conditions for their receiving biomass are: Tomato medium with temperature: 30 - 40°C; Initial pH: 5,5 - 6,5; Yeast extract: 1,0 - 2,0%; Saccaroza: 1,0 - 2,0%; The optimal time for receiving biomass is from 24 - 36 hours. On this basis, the biomass of three lactic bacterial strains were studied and used to produce probiotic products for preventing and treating the digestive disorder in pigs.

Keywords: Lactic bacterial, Acid lactic, Antibacterial, Probiotic.

I. GIỚI THIỆU

Vi khuẩn lactic được biết đến từ lâu với vai trò quan trọng đối với sức khỏe con người cũng như các vật nuôi. Chúng có tác dụng cạnh tranh và đối kháng với các vi sinh vật gây bệnh, giúp cân bằng hệ vi sinh vật tự nhiên trong đường ruột, tiết các enzym tiêu hoá giúp tăng cường chuyển hoá thức ăn.

Hiện nay, rất nhiều chế phẩm sinh học ra đời để phục vụ cho chăn nuôi, gây chú ý nhiều là các chế phẩm probiotic. Khi đưa probiotic vào đường tiêu hoá của gia súc, gia cầm, các vi sinh vật có lợi sẽ nhanh chóng phát triển và nhân nhanh số lượng, tạo môi trường axit ở ruột non và ruột già, tiết ra các chất kháng sinh làm ức chế và tiêu diệt các vi sinh vật có hại, không cho chúng phát triển. Từ đó, làm giảm các bệnh về đường tiêu hoá như tiêu chảy, rối loạn tiêu hoá, hoại thư, táo bón. Ngoài ra, chúng còn tiết ra các axit hữu cơ và các enzym tiêu hoá như protease, pectinase, làm tăng hệ số chuyển hoá thức ăn ở gia súc, gia cầm.

Probiotic là chế phẩm sinh học, thức ăn bổ sung có chứa tế bào vi khuẩn sống

hoặc những phần tử của vi khuẩn mà nó ảnh hưởng có lợi cho sức khỏe của vật chủ [1, tr.35-37]. Những vi khuẩn lactic có lợi thường được sử dụng trong các chế phẩm probiotic như *L. acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subs*, *Lactobacillus casei*, *L. plantarum*, *L. bulgaricus*, *Bifidobacterium breve*, *Enterococcus faecium*.

Các vi khuẩn lactic trong chế phẩm probiotic có khả năng bám chặt vào màng nhầy của ruột, ức chế sự bám của vi sinh vật gây bệnh. Chúng sản xuất các axit lactic làm giảm pH đường ruột, tạo môi trường không thuận lợi cho vi sinh vật có hại phát triển. Ngoài ra, chúng còn sản xuất chất kháng sinh, sinh H₂O₂, sản xuất các enzym tiêu hoá (amylase, cellulase, lipase, protease), các vitamin (B1, B2, B6, B12), khử độc tố trong đường ruột. Khi cung cấp thường xuyên các vi sinh vật có lợi dưới dạng sữa lên men hoặc dạng đông khô cho người và động vật với liều lượng thích hợp (1,2 tỉ CFU/kg thức ăn/ngày), chúng sẽ phát triển, chiếm ưu thế và cạnh tranh với các vi sinh vật có hại về vị trí bám, về hấp thu chất dinh dưỡng, về khối lượng các chất sinh ra bởi vi sinh vật.

Việt Nam đã có nhiều công trình nghiên cứu về lĩnh vực này như chế phẩm Biolactyl [2, tr.45-46]; chế phẩm BioI phòng trị bệnh đường ruột cho heo [3, tr.14-20]. Các nghiên cứu đều khẳng định kết quả phòng trị bệnh đường ruột ở heo và tác dụng điều tiết kích thích sinh trưởng của chế phẩm probiotic.

Theo Fialho et al. [4, tr.622-623], để kiểm tra sự bài thải của vi khuẩn *E. coli* Q157 trên heo con, họ đã trộn các vi khuẩn *L. acidophilus* (lô 1), *Streptococcus faecium* (lô 2) hoặc phối hợp giữa *L. acidophilus* với *S. faecium* (lô 3) hoặc giữa *L. acidophilus* với *S. faecium*, *Lactobacillus*

casei, *L. fermentum* và *L. plantarum* (lô 4) với liều 6×10^6 CFU/kg thức ăn liên tục trong 07 tuần. Kết quả cho thấy lô 4 có sự bài thải vi khuẩn *E. coli* trong phân thấp hơn các lô khác. Khác biệt này hoàn toàn có ý nghĩa so với lô đối chứng không dùng probiotic.

Các nghiên cứu khác cho thấy, dùng vi khuẩn probiotic như *Lactobacillus GG*, *L. johnsonii*, *L. rhamnosus* để cạnh tranh vị trí bám dính trên niêm mạc ruột với vi khuẩn *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*. Kết quả *Lactobacillus GG*, *L. johnsonii* và *L. rhamnosus* làm giảm sự bám dính của *E. coli* 90 - 91% ; riêng *S. typhimurium* bị giảm khả năng bám dính đến 77% bởi *L. johnsonii* và 83% bởi *L. casei* [5, tr.56-64].

Tóm lại, các công trình nghiên cứu trên đã sử dụng các chế phẩm probiotic cho gia súc, gia cầm để ức chế vi sinh vật gây bệnh, phòng ngừa và điều trị tiêu chảy, cải thiện tăng trọng và hệ số tiêu tổn thức ăn. Tuy các công trình nghiên cứu những khía cạnh khác nhau, sử dụng các chế phẩm có thành phần khác nhau nhưng kết quả cho thấy probiotic ảnh hưởng có lợi trên vật nuôi.

II. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

A. Nguyên liệu và phương pháp thí nghiệm

Nguyên liệu

- Bộ sưu tập giống vi khuẩn của Phòng Thí nghiệm Vi sinh – Trường Đại học Sư phạm Thành phố Hồ Chí Minh.

- Các chủng vi khuẩn kiểm định: *Streptococcus*, *Bacillus subtilis*, *B. pimentilis*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Klebsiella sp*; *Escherichia coli* (EPEC), *Salmonella choleraesuis* do Viện Pasteur Thành phố Hồ Chí Minh cung cấp.

- Các loại đĩa giấy kháng sinh: Neomycin (Ne), Nalidixic acid (Ng), Kanamycin (Kn), Gentamycin (Ge), Ampicillin (Am), Tetracycline (Te), Chloramphenicol (Cl), Ceftazidime (Cz).

- Các loại môi trường: Môi trường GYP dùng để phân lập các vi khuẩn lactic, môi trường MRS dùng để nuôi cấy và nghiên cứu các đặc điểm sinh lí, sinh hóa của các chủng vi khuẩn lactic, môi trường MPA dùng để nuôi cấy các vi khuẩn kiểm định.

Phương pháp

Định lượng axit lactic bằng phương pháp chuẩn độ Therner. Lấy 10 ml dịch lên men, bổ sung 20 ml nước cất và một hoặc hai giọt phenolphthalein 1% trong cồn. Chuẩn độ bằng NaOH 0,1 N cho đến khi màu hồng xuất hiện bền trong 30 giây thì dừng lại. Đọc số ml NaOH 0,1 N đã chuẩn rồi ghi lại. Tính độ axit bằng công thức: $^{\circ}T = \text{số ml NaOH} \times 10$, % axit lactic = $^{\circ}T \times 0,009$ ($^{\circ}T$: độ Therner, 1 độ Therner tương ứng với 9 mg axit lactic).

Xác định khả năng đối kháng của các chủng vi khuẩn lactic đối với các vi khuẩn kiểm định bằng phương pháp khoan lỗ thạch. Dựa vào sự khuếch tán của chất ức chế trong dịch nuôi cấy vào môi trường thạch, chỗ nào có chất ức chế khuếch tán, nơi đó vi sinh vật kiểm định không mọc được và tạo thành vòng vô khuẩn.

Khảo sát sự sinh trưởng và các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng của vi khuẩn lactic bằng phương pháp đo mật độ quang ở bước sóng 600 nm trên máy quang phổ UV. 1601 PC. Nhân giống: bổ sung 1% (v/v) giống vào các ống nghiệm chứa 10 ml môi trường MRS dịch thể, nuôi cấy ở nhiệt độ thích hợp cho từng chủng trong 24 giờ; bổ sung 1% (v/v) dịch nhân giống vào các ống nghiệm chứa các loại môi trường nuôi cấy cần khảo sát. Nuôi

cấy ở nhiệt độ phòng. Tiến hành đo OD₆₀₀ tại các thời điểm: 0, 1, 2, 3, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 và 48 giờ. Tiến hành đo lặp lại ba lần ở ba ống nghiệm khác nhau, sau đó lấy giá trị trung bình của ba lần đo.

Bảo quản vi khuẩn lactic bằng phương pháp đông khô trên máy đông khô. Các chủng vi khuẩn lactic được nuôi trên môi trường MRS dịch thể với những điều kiện tối ưu tới pha cân bằng (18 đến 24 giờ), li tâm với tốc độ 3500 vòng/15 phút để thu sinh khối. Cho sinh khối tế bào của từng chủng vào từng ống đông khô chuyên dùng có sẵn 2 ml môi trường bảo quản (sữa gầy 10% + glutamat 1%), để các ống đông khô vào tủ lạnh (5°C) khoảng 12 giờ cho môi trường thật đông (không để mẫu trong tủ lạnh quá lâu vì nó sẽ ảnh hưởng đến khả năng sống sót của các chủng vi khuẩn sau đông khô). Sau khi môi trường bảo quản đông lại, chuyển các ống đông khô vào máy đông khô, điều chỉnh các thông số: nhiệt độ từ -45°C đến -50°C, áp suất chân không 20 mBar, thời gian đông khô từ 24 đến 27 giờ.

Kiểm tra khả năng sống sót bằng phương pháp đếm số lượng khuẩn lạc mọc trên môi trường thạch. Pha loãng mẫu đến nồng độ cần thiết. Dùng pipet vô trùng hút 0,1 ml mẫu nhỏ vào giữa đĩa petri có chứa môi trường MRS agar. Dùng que gạt vô trùng dàn đều khắp mặt thạch. Mỗi độ pha loãng cấy ba đĩa. Sau đó, úp ngược petri, bao gói cẩn thận và nuôi ở nhiệt độ phòng. Sau 2 – 3 ngày, đếm số lượng khuẩn lạc trên mỗi đĩa, từ đó tính số lượng tế bào vi khuẩn lactic trong mỗi gram mẫu hay mililit mẫu theo phương pháp đếm Colonies Forming Unit (CFU). Đếm ba đĩa của mỗi độ pha loãng. Tính trung bình cộng của ba lần đếm.

B. Kết quả các thí nghiệm

Tuyển chọn các chủng vi khuẩn lactic có các đặc tính phù hợp với yêu cầu tạo chế phẩm probiotic

Các tiêu chuẩn để chọn chủng vi khuẩn probiotic: vi khuẩn hiện diện bình thường trong đường ruột của heo; tạo axit lactic cao, chịu pH axit của môi trường; có khả năng lên men lactic ức chế sự phát triển của các vi khuẩn gây bệnh, gây thối; đề kháng được các chất kháng sinh; làm tăng khả năng tiêu hoá thức ăn và hấp thu các chất dinh dưỡng.

Kết quả thí nghiệm cho thấy, cả ba chủng *Lactobacillus agilis* (chủng B), *Lactobacillus salivarius* (chủng N₄) và *Lactobacillus acidophilus* (chủng L₂) có kích thước vòng phân giải CaCO₃ rất lớn ($D - d \geq 20$ mm), tương ứng với hàm lượng axit lactic cao $\geq 1,40$ g/l, khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh đường ruột khá mạnh (vòng vô khuẩn, $D - d \geq 12 - 29$ mm), có phổ kháng khuẩn khá rộng (ức chế cả vi khuẩn G⁻ lẫn VK G⁺).

Đặc biệt, cả ba chủng đều có khả năng ức chế mạnh đối với các vi khuẩn gây bệnh thương hàn và tiêu chảy cho heo như *Salmonella typhimurium*, *Salmonella choleraesuis* (vòng vô khuẩn $D - d \geq 22 - 27$ mm); ức chế rất mạnh đối với *Shigella flexneri* ($D - d \geq 28 - 35$ mm), đây là trực khuẩn lỵ có tỉ lệ kháng kháng sinh rất cao. Chúng ức chế khá mạnh với *E. coli* ($D - d \geq 12 - 14$ mm).

Hoạt tính đề kháng với các chất kháng sinh

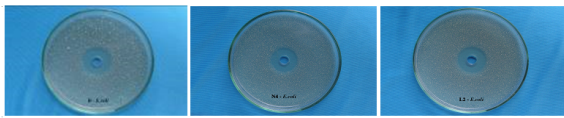
Tiến hành xác định hoạt tính đề kháng với các chất kháng sinh của các chủng *Lactobacillus agilis*, *Lactobacillus salivarius* và *Lactobacillus acidophilus* bằng phương pháp dùng đĩa giấy kháng sinh chuẩn. Kết quả được mô tả trong Bảng 3.

Bảng 1: Khả năng sinh axit lactic của các chủng vi khuẩn lactic

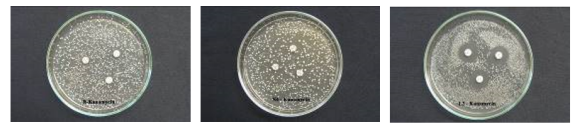
STT	Kí hiệu chủng	Vòng phân giải CaCO ₃ (D – d, mm)	Phản ứng với thuốc thử uphenmen	Hàm lượng axit lactic (g/l)
1	<i>Lactobacillus agilis</i>	22	+	1,46
2	<i>Lactobacillus salivarius</i>	20	+	1,44
3	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	20	+	1,42

Bảng 2: Hoạt tính đối kháng của vi khuẩn lactic đối với vi khuẩn kiểm định (D-d, mm)

Vi khuẩn kiểm định	Kí hiệu chủng	Khả năng gây bệnh	Tính chất Gram	Khả năng đối kháng của vi khuẩn lactic với vi khuẩn kiểm định (D – d, mm)		
				<i>Lactobacillus agilis</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>E. coli</i>		Viêm ruột, tiêu chảy	G ⁻	14	12	13
<i>S. typhimurium</i>		Sốt thương hàn ở người và động vật	G ⁻	22	28	29
<i>S. choleraesuis</i>			G ⁻	27	25	22
<i>Klebsiella sp.</i>		Trực khuẩn gây bệnh đường ruột	G ⁻	23	17	17
<i>Serratia sp.</i>			G ⁻	16	15	17
<i>Shigella flexneri</i>		Trực khuẩn lỵ	G ⁻	28	35	32



Hình 1: Hoạt tính đối kháng với *E. coli* của chủng *Lactobacillus agilis* (chủng B), *Lactobacillus salivarius* (chủng N₄) và *Lactobacillus acidophilus* (chủng L₂)



Hình 2: Hoạt tính kháng Kanamicin của chủng *Lactobacillus agilis* (chủng B), *Lactobacillus salivarius* (chủng N₄) và *Lactobacillus acidophilus* (chủng L₂)

Bảng 3: Hoạt tính đề kháng với các chất kháng sinh của các chủng vi khuẩn

Chủng vi khuẩn	Hoạt tính đề kháng với các chất kháng sinh							
	Ge	Ne	Ng	Kn	Am	Te	Clo	Ce
<i>Lactobacillus agilis</i>	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Lactobacillus salivarius</i>	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	+	+	+	+	-	-	-	-

(Ghi chú : - : không kháng; + : kháng)

Như vậy, cả ba chủng đều có khả năng đề kháng được với các chất kháng sinh như Neomicin (Ne), Nalidixic axit (Ng),

Kanamicin (Kn) và Gentamicin (Ge). Tuy nhiên, chúng không đề kháng được Ampicilin, Tetracycline, Cloramphenicol, Cef-tazidime.

Đặc điểm hình thái, sinh lí, sinh hoá

Kết quả nghiên cứu các đặc điểm hình thái, sinh lí, sinh hoá của ba chủng vi khuẩn, phối hợp kết quả định danh đến loài của Trung tâm Công nghệ Sinh học – Đại học Quốc gia Hà Nội.

Động thái quá trình tạo sinh khối tế bào của các chủng vi khuẩn lactic trong điều kiện tối ưu

Bảng 4: Tổng hợp các đặc điểm hình thái, sinh lí, sinh hoá

Đặc điểm hình thái, sinh lí, sinh hoá	Chi <i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus agilis</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
1. Tế bào Hình dạng Sắp xếp tế bào Nhuộm Gram	Hình que 1,2, chuỗi ngắn G ⁺	Hình que ngắn 1,2, chuỗi ngắn G ⁺	Hình que ngắn 1,2, chuỗi ngắn G ⁺	Hình que dài 1,2, chuỗi ngắn G ⁺
2. Khuẩn lạc Hình dạng Màu sắc Kích thước	Tròn, lồi Trắng sữa Tùy loài	Tròn lớn, lồi, mép tròn Trắng sữa 2 – 3,0 mm	Tròn lớn, lồi, mép tròn Trắng sữa 2 – 3,0 mm	Tròn nhỏ, lồi, mép tròn Trắng sữa 1 – 1,8 mm
3. Quan hệ với oxy	Kị khí không bắt buộc	Kị khí không bắt buộc	Kị khí không bắt buộc	Kị khí không bắt buộc
4. Khả năng sinh bào tử	–	–	–	–
5. Hoạt tính catalase	–	–	–	–
6. Hoạt tính protease	–	–	–	–
7. Hoạt tính amylase	–	–	–	–
8. Khả năng sinh khí	–	–	–	–
9. Khả năng di động	–	–	–	–
10. Sinh trưởng 15 °C 50°C pH = 3,5 pH = 9,5 NaCl = 6,5%	+ + + Tùy loài Tùy loài	+ + + + +	+ + + + +	+ + + - -
11. Lên men đường Glucose L-Arabinose Raffinose D-Ribose Maltose Mannitol Saccharose Lactose Galactose Sorbitol Dextrin	+ Tùy loài – Tùy loài + Tùy loài Tùy loài + + + Tùy loài +	+ + – +/- + + + + + + + +	+ – – + + + + + + + + +	+ – – – – – + + + + – +

(Ghi chú: – : âm tính; + : dương tính; +/- : mơ hồ yếu)

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện môi trường nuôi cấy đến khả năng tạo sinh khối đã xác định được các điều kiện tối ưu cho sự tạo thành sinh khối của ba chủng:

- Môi trường nước chiết cà chua;
- Nhiệt độ 30°C – 35°C (*Lactobacillus agilis* và *Lactobacillus salivarius*), 35°C –

40°C (*Lactobacillus acidophilus*);

- pH ban đầu là 6 – 6,5 (*Lactobacillus agilis* và *Lactobacillus salivarius*), 5,5 – 6,0 (*Lactobacillus acidophilus*);

- Nồng độ cao nấm men là 1,0 – 1,5% (*Lactobacillus agilis* và *Lactobacillus salivarius*), 1,0 – 2,0% (*Lactobacillus acidophilus*);

- Nồng độ saccharose là 1,0 – 1,5% (*Lactobacillus agilis* và *Lactobacillus salivarius*), 1,0 – 2,0% (*Lactobacillus acidophilus*).

Tiến hành nuôi cấy tĩnh ba chủng *Lactobacillus agilis* (chủng B), *Lactobacillus salivarius* (chủng N₄) và *Lactobacillus acidophilus* (chủng L₂) trên môi trường nước chiết cà chua với các điều kiện tối ưu cho từng chủng. Xác định giá trị OD₆₀₀, hàm lượng axit tổng, sự thay đổi độ pH tại các thời điểm từ 0 – 48 giờ. Kết quả được mô tả trong Bảng 5.

* Nhận xét:

Các kết quả trên cho thấy, tại thời điểm từ 06 – 24 giờ, hàm lượng axit lactic tăng rõ nhất 0,441 – 1,341 g/l, tương ứng với sự giảm dần độ pH từ 4,332 đến 3,431, trong khi mật độ tế bào đạt mức cao nhất với OD₆₀₀ khoảng 1,517 – 2,422. Như vậy, mật độ tế bào tăng tỉ lệ thuận với hàm lượng axit lactic và tỉ lệ nghịch với độ pH theo thời gian.

Thời điểm tốt nhất cho việc thu sinh khối của chủng B, N₄ và L₂ là khoảng thời gian 24 – 36 giờ. Đây là giai đoạn chuyển từ pha logarit sang pha phát triển ổn định trong quá trình sinh trưởng. Vì vậy, thu sinh khối ở giai đoạn này là tốt nhất. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với kết quả nghiên cứu của Võ Thanh Thứ [2, tr.45-46]. Kết quả nghiên cứu được mô tả trong Bảng 6.

Khả năng sống sót của các chủng vi khuẩn lactic sau khi đông khô

Mục đích đông khô các chủng vi sinh vật là phương pháp bảo quản giống lâu dài và làm nguồn nguyên liệu để tạo chế phẩm probiotic. Để đảm bảo chất lượng chế phẩm, chúng tôi tiến hành khảo sát khả năng sống sót các chủng sau quá trình đông khô.

Kiểm tra khả năng sống sót của các chủng bằng phương pháp đếm khuẩn lạc (kiểm tra ngẫu nhiên vài ống đông khô của ba chủng B, N₄ và L₂). Mẫu đông khô có thể bảo quản ở nhiệt độ phòng hoặc trong tủ lạnh. Kết quả được trình bày trong Bảng 7.

* Nhận xét:

Tỉ lệ sống sót sau 15 ngày đông khô của ba chủng B, N₄ và L₂ đều đạt trên 90% (10¹⁰ tế bào/1 g mẫu); tỉ lệ sống sót sau 30 ngày đều trên 80% (10¹⁰ tế bào/1 g mẫu); sau ba tháng số lượng tế bào của các chủng B, N₄ và L₂ có giảm đi nhưng vẫn ở mức cho phép (10⁹ tế bào/1 g mẫu). Điều này chứng tỏ tỉ lệ sống sót sau đông khô của ba chủng rất cao so với mức cho phép (10⁹ tế bào/1 g mẫu). Đặc điểm này rất thuận lợi cho việc tạo chế phẩm probiotic. Khả năng sống sót cao sau quá trình đông khô chứng tỏ chúng không ảnh hưởng đến chất lượng của chế phẩm sau một thời gian bảo quản.

III. KẾT LUẬN

Cả ba chủng *Lactobacillus agilis* (chủng B), *Lactobacillus salivarius* (chủng N₄) và *Lactobacillus acidophilus* (chủng L₂) đều có đặc tính phù hợp yêu cầu sản xuất chế phẩm probiotic:

- Có khả năng sinh axit lactic cao;
- Có hoạt tính đối kháng mạnh, phổ kháng khuẩn rộng với các vi sinh vật kiểm định (gây bệnh đường ruột), đặc biệt là các vi khuẩn gây bệnh tiêu chảy cho heo như *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella choleraesuis*;
- Có khả năng đề kháng tốt với các chất kháng sinh (trị đường ruột) như Neomicin (Ne), Nalidixic axit (Ng), Kanamicin (Kn), Gentamicin (Ge).

Bảng 5: Động thái quá trình tạo sinh khối, sinh axit lactic và độ pH của ba chủng vi khuẩn lactic

Thời gian (giờ)	Các giá trị								
	<i>Lactobacillus agilis</i>			<i>Lactobacillus salivarius</i>			<i>Lactobacillus acidophilus</i>		
	OD ₆₀₀	pH	H. lượng a. lactic (g/l)	OD ₆₀₀	pH	H. lượng a. lactic (g/l)	OD ₆₀₀	pH	H. lượng a. lactic (g/l)
0	0,149	6,019	0,198	0,157	6,011	0,207	0,131	5,360	0,288
6	1,517	4,332	0,441	1,635	4,252	0,459	0,586	4,568	0,414
12	2,214	3,577	1,062	2,157	3,539	1,053	1,005	3,685	0,981
18	2,370	3,490	1,224	2,242	3,463	1,260	1,430	3,606	1,134
24	2,422	3,431	1,341	2,346	3,413	1,314	1,827	3,585	1,179
30	2,466	3,426	1,395	2,395	3,411	1,359	1,974	3,563	1,224
36	2,482	3,401	1,431	2,395	3,406	1,404	2,016	3,517	1,242
42	2,482	3,390	1,449	2,395	3,401	1,422	2,054	3,502	1,278
48	2,515	3,386	1,467	2,482	3,389	1,440	2,121	3,476	1,332

Bảng 6: Tổng hợp các điều kiện tối ưu để thu sinh khối của ba chủng vi khuẩn lactic

Điều kiện tối ưu	<i>Lactobacillus agilis</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Môi trường thay thế	Nước chiết cà chua	Nước chiết cà chua	Nước chiết cà chua
Thời gian thu sinh khối (h)	18 – 30	18 – 30	24 – 36
pH ban đầu	6,0 – 6,5	6,0 – 6,5	5,5 – 6,0
Nhiệt độ (°C)	30 – 35	30 – 35	35 – 40
Nồng độ cao nấm men (%)	1 – 1,5	1 – 1,5	1 – 2
Nồng độ saccharose (%)	1 – 1,5	1 – 1,5	1 – 2

Bảng 7: Sự biến động số lượng tế bào của ba chủng vi khuẩn lactic theo thời gian bảo quản

Thời gian (ngày)	Số lượng tế bào/1 g mẫu									
	(*)	15 ngày	%	30 ngày	%	60 ngày	%	90 ngày	%	
B	2,76x10 ¹⁰	2,51x10 ¹⁰	90,94	2,26x10 ¹⁰	81,88	9,2x10 ⁹	33,33	6,2x10 ⁹	22,46	
N ₄	3,44x10 ¹⁰	3,16x10 ¹⁰	91,86	2,91x10 ¹⁰	84,59	9,7x10 ⁹	28,19	7,8x10 ⁹	22,67	
L ₂	3,37x10 ⁹	3,02x10 ⁹	89,61	2,66x10 ⁹	78,93	9,4x10 ⁸	27,89	6,8x10 ⁸	20,17	

(Ghi chú: (*) số lượng tế bào trước khi đông khô)

Nghiên cứu đã xác định được các điều kiện tối ưu cho sự tạo thành sinh khối của ba chủng:

- Môi trường nước chiết cà chua;
- Nhiệt độ từ 30°C đến 35°C (*Lactobacillus agilis* và *Lactobacillus salivarius*), 35°C – 40°C (*Lactobacillus acidophilus*);

- pH ban đầu là 6 – 6,5 (*Lactobacillus agilis* và *Lactobacillus salivarius*), 5,5 – 6,0 (*Lactobacillus acidophilus*);

- Nồng độ cao nấm men là 1,0 – 1,5% (*Lactobacillus agilis* và *Lactobacillus salivarius*); 1,0 – 2,0% (*Lactobacillus acidophilus*);

- Nồng độ saccharose là 1,0 – 1,5% (*Lactobacillus agilis* và *Lactobacillus*

salivarius), 1,0 – 2,0% (*Lactobacillus acidophilus*);

- Thời điểm tốt nhất cho việc thu sinh khối: 24 – 36 giờ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Yuan Kun Lee, Koji Nomoto, Seppo Salmi-
nen, Sherwood L. Gorbach. *Handbook of Probiotics*. John Wiley & Sons, Inc; 1999.
- [2] Võ Thanh Thứ. Nghiên cứu sản xuất BIO-
LACTOVIN để phòng và chống bệnh tiêu
chảy, rối loạn tiêu hoá, bệnh hoại thư, bệnh
táo bón. *Tạp chí Sinh học*. 1992; 14(4):45–
46.
- [3] Nguyễn Như Pho, Trần Thị Thu Thủy. Tác
dụng của probiotic đến bệnh tiêu chảy trên
heo con. Trong *Hội nghị khoa học chuyên
ngành Chăn nuôi thú y*. Trường Đại học
Nông Lâm TP. HCM. 2003:14–20.
- [4] Fialho. E.T, Vassalo. M, Lima. J.A.F,
Bertechine. A.G. Probiotics utilization for
piglets from 10 to 30 kg (performance and
metabolism assay). In: *Proceedings Con-
tributed Papers - The 8th. World Conference
on Animal Production*. Seoul National Uni-
versity, Seoul, Korea. 1998; 1:622–623.
- [5] Tuomola EM, Ouwehand AC, Salminen
SJ. *Handbook of probiotics*. John Wiley &
Sons, Inc. 1999.