

KHẢO SÁT KHẢ NĂNG CHỐNG CHỊU ĐIỀU KIỆN PH THẤP VÀ KHÁNG THUỐC KHÁNG SINH CỦA HỆ VI KHUẨN ACID LACTIC PHÂN LẬP TỪ SỮA DÊ VÀ CHẾ PHẨM SINH HỌC

Nguyễn Phước Hiền¹, Lê Diệp Thúy¹, Trần Trà My² và Nguyễn Hữu Hiệp²

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

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

Thông tin chung:

Ngày nhận: 20/06/2014

Ngày chấp nhận: 30/10/2014

Title:

The survey of tolerance to low pH condition and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from goat's milk and probiotics

Từ khóa:

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

Keywords:

Antibiotic resistance, *Enterococcus*, goat's milk, lactic acid bacteria, low pH, probiotic

ABSTRACT

Sixteen bacterial strains were isolated in MRS medium, including 13 isolates from goat's milk and 3 isolates from probiotics. Most colonies of them were round, opalescent white color to milky white, raised or convex elevation, lobulated or intact margin. Results of the survey of biological characteristics showed that 4 strains had rod shape (25.0%) and 12 strains had spherical shape (75.0%) and existed as single or double cells. All isolates were Gram-positive, unable to move and gave oxidase-negative test. Besides, 7 isolates had catalase-negative test. The results experienced that 7 strains belonging to lactic acid bacteria group were selected (43.8%). Surveyed results for the resistance to low pH environment illustrated that 6 strains had the resistance to pH 3 for 3 hours. Two strains Bio1.2 and G6.1 had the resistance to environmental condition of pH 2 for 2 hours with density of 9.01 log(CFU/ml). Strain Bio2.1 resisted to 4 types of antibiotic as Streptomycin, Cephalexin, Penicillin V (256 mg/l concentration) and Ampicillin (128 mg/l concentration). Three strains G1.1, G5.6 and G6.1 were resistant to 3 types of antibiotic as Streptomycin, Cephalexin (256 mg/l concentration) and Ampicillin (128 mg/l concentration). In addition, Probi strain had the resistance to 3 types of antibiotic as Streptomycin, Cephalexin and Tetracycline (256 mg/l concentration).

TÓM TẮT

Mười sáu dòng vi khuẩn được phân lập trên môi trường MRS, trong đó 13 dòng phân lập từ sữa dê và 3 dòng từ chế phẩm sinh học. Phần lớn các dòng vi khuẩn có khuẩn lạc tròn, màu sắc trắng đục đến trắng sữa, độ nổi dạng mô hay lồi, bìa nguyên hay chia thùy. Kết quả khảo sát các đặc tính sinh học cho thấy 4 dòng có hình que (tỷ lệ 25,0%) và 12 dòng hình cầu (tỷ lệ 75,0%) tồn tại ở trạng thái đơn hay kết đôi. Tất cả các dòng vi khuẩn phân lập đều Gram dương, không di động và thử nghiệm oxidase âm tính; bên cạnh 7 dòng có thử nghiệm catalase âm tính. Kết quả tuyển chọn được 7 dòng thuộc nhóm vi khuẩn lactic (tỷ lệ 43,8%). Kết quả khảo sát trong môi trường pH thấp cho thấy 6 dòng có khả năng chống chịu môi trường pH 3 trong 3 giờ. Đặc biệt, dòng Bio1.2 và G6.1 có khả năng tồn tại trong điều kiện môi trường pH 2 trong 2 giờ với mật số 9,01 log(CFU/ml). Dòng Bio2.1 kháng được 4 loại kháng sinh Streptomycin, Cephalexin và Penicillin V (256 mg/l) và Ampicillin (128 mg/l). Ba dòng G1.1, G5.6 và G6.1 phân lập từ sữa dê kháng được 3 loại kháng sinh Streptomycin, Cephalexin (256 mg/l) và Ampicillin (128 mg/l). Ngoài ra, dòng Probi có khả năng kháng 3 loại kháng sinh Streptomycin, Cephalexin và Tetracycline (256 mg/l).

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, các bệnh truyền nhiễm là một trong những vấn đề được quan tâm hàng đầu trên thế giới và mỗi năm các bệnh nhiễm trùng đường tiêu hóa là nguyên nhân chính gây ra bệnh tật và tử vong trên toàn thế giới (Culligan *et al.*, 2009). Bên cạnh đó, quá trình điều trị bệnh bằng thuốc kháng sinh đã tiêu diệt phần lớn quần thể vi sinh vật một cách không chọn lọc, dẫn đến sự mất cân bằng hệ vi sinh vật và có thể gây ra những rối loạn vùng ruột như bệnh tiêu chảy liên quan đến kháng sinh (Tambekar và Bhutada, 2010). Đồng thời, khả năng kháng thuốc kháng sinh của các loài vi sinh vật gây bệnh hiện nay là rất cao, đặc biệt là đối với các kháng sinh Streptomycin và Oxytetracycline (Dung *et al.*, 2008). Nhiều nghiên cứu cho rằng probiotic có lợi trong điều trị các bệnh do rối loạn tiêu hóa như tiêu chảy, kiết lỵ, thương hàn... do vi khuẩn gây bệnh đường ruột gây ra. Bổ sung probiotic được xem là một hoạt động hiệu quả trong việc cải thiện tình trạng sức khỏe của con người (Fuller, 1989). Sự gia tăng hoạt động kháng vi sinh vật gây bệnh của vi khuẩn probiotic đã mở ra hướng ứng dụng trong phòng và điều trị bệnh, cũng như là một lựa chọn mới để thay thế thuốc kháng sinh (Ahmed, 2003). Hơn nữa, sữa động vật (bao gồm sữa người, sữa bò, sữa dê...) được xem là một trong những nguồn vi khuẩn lactic có tiềm năng probiotic nhưng chưa được nghiên cứu sâu.

Vi khuẩn probiotic có vai trò và tiềm năng vô cùng to lớn. Tuy nhiên, những nghiên cứu và khai thác ứng dụng những tiềm năng này vẫn còn nhiều hạn chế ở Việt Nam và trên thế giới. Bên cạnh việc ứng dụng các tiềm năng probiotic của vi khuẩn lactic hiện nay chưa thật sự phổ biến và mang lại hiệu quả cao, đặc biệt là trên người. Khả năng chống chịu môi trường pH thấp và kháng với các loại kháng sinh là các đặc tính rất quan trọng để vi khuẩn probiotic có thể tồn tại mà không bị tiêu diệt nhằm phục hồi hệ vi sinh vật có lợi ở đường ruột (Tambekar và Bhutada, 2010). Trước thực trạng trên, nghiên cứu này được thực hiện nhằm tuyển chọn ra các dòng vi khuẩn probiotic từ sữa dê có khả năng chống chịu được môi trường pH thấp và kháng các loại kháng sinh phổ biến hiện nay ở nồng độ cao. Kết quả của đề tài là tiền đề cho những nghiên cứu chuyên sâu tiếp theo về probiotic, sản xuất các chế phẩm sinh học và ứng dụng trong bảo vệ và nâng cao sức khỏe con người trước vấn đề về dịch bệnh.

2 PHƯƠNG TIỆN NGHIÊN CỨU

Nguồn mẫu được sử dụng bao gồm mẫu sữa dê và các mẫu chế phẩm sinh học Probio và Bioacimin. Các loại kháng sinh được sử dụng trong nghiên cứu ở dạng bột được bán ở các hiệu thuốc trên địa bàn thành phố Cần Thơ. Trong đó, Streptomycin do Trung Quốc sản xuất, 4 loại còn lại là Penicillin V, Cephalixin, Ampicillin và Tetracycline do các Công ty Dược ở Việt Nam sản xuất dựa trên nguồn nguyên liệu nhập khẩu. Môi trường nuôi cấy, phân lập và khảo sát bao gồm: môi trường MRS (De Man, Rogosa and Sharpe), dung dịch đệm PBS (Phosphate buffer saline), môi trường nước muối peptone SPW (Saline peptone water). Các hóa chất dùng để phân tích và chuẩn độ: CaCO₃, NaOH, HCl... và các phương tiện cần thiết khác trong phòng thí nghiệm.

3 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1 Thu thập và xử lý mẫu

Đối với mẫu sữa dê, 10 mẫu sữa được thu thập từ 10 con dê cái đang cho con bú trong vòng 3 tháng đầu sau khi sinh được thu ở huyện Chợ Lách, tỉnh Bến Tre. Mỗi mẫu sữa được chứa trong các túi nylon vô trùng và trữ lạnh để mang về phòng thí nghiệm. Mẫu chế phẩm Probio và Bioacimin được mua tại các cửa hàng thuốc trên địa bàn Thành phố Cần Thơ. Đồng thời, tiến hành đo pH các mẫu sữa dê.

3.2 Phân lập vi khuẩn lactic từ sữa dê và chế phẩm men tiêu hóa

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

3.3 Khảo sát các đặc tính sinh học và sinh hóa

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

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

3.3.2 Kiểm tra các đặc tính sinh hóa

Các thử nghiệm sinh hóa bao gồm khả năng tổng hợp các enzyme catalase, oxidase và khả năng phân giải CaCO₃. Từ kết quả khảo sát các đặc tính sinh học và thử nghiệm sinh hóa sơ bộ chọn ra các dòng vi khuẩn lactic để thực hiện thí nghiệm đánh giá khả năng chống chịu môi trường pH thấp và kháng thuốc kháng sinh.

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

3.4.1 Môi trường pH 3

Các dòng vi khuẩn lactic được chủng vào 2 ml môi trường MRS lỏng, vô trùng để nuôi cấy sinh trong điều kiện kỵ khí ở 37°C trong 24 giờ. Sau đó, thu lấy sinh khối vi khuẩn bằng cách ly tâm 5.000 vòng/phút ở 4°C trong 10 phút. Rửa sinh khối thu được hai lần với dung dịch PBS ở pH 7,2. Chuyển dịch huyền phù vi khuẩn vào ống nghiệm chứa môi trường PBS pH 3. Sau mỗi thời điểm 0, 1, 2 và 3 giờ, hút 100 µl dung dịch trong mỗi ống chuyển sang môi trường MRS lỏng, ủ ở 37°C trong 24 giờ. Sau đó, tiến hành đếm mật số vi khuẩn ở mỗi thời điểm khảo sát bằng phương pháp pha loãng mẫu và phương pháp đếm sống (Cao Ngọc Điệp và Nguyễn Hữu Hiệp, 2009). Các dòng vi khuẩn lactic cũng được khảo sát đồng thời trong môi trường pH 6,4 để đánh giá sự phát triển trong môi trường pH thích hợp.

3.4.2 Môi trường pH 2

Các dòng vi khuẩn lactic có khả năng chống chịu điều kiện pH 3 trong 3 giờ được chọn để tiếp tục khảo sát trong điều kiện môi trường pH 2. Thí nghiệm được tiến hành theo phương pháp tương tự như trong điều kiện môi trường pH 3.

3.4.3 Môi trường pH 1

Tương tự như vậy, tiếp tục khảo sát trong điều kiện pH 1 đối với các dòng có khả năng chống chịu

pH 2 sau 3 giờ với quy trình thực hiện như khảo sát trong môi trường pH 3.

3.5 Khảo sát khả năng kháng thuốc kháng sinh

3.5.1 Phương pháp tiến hành

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

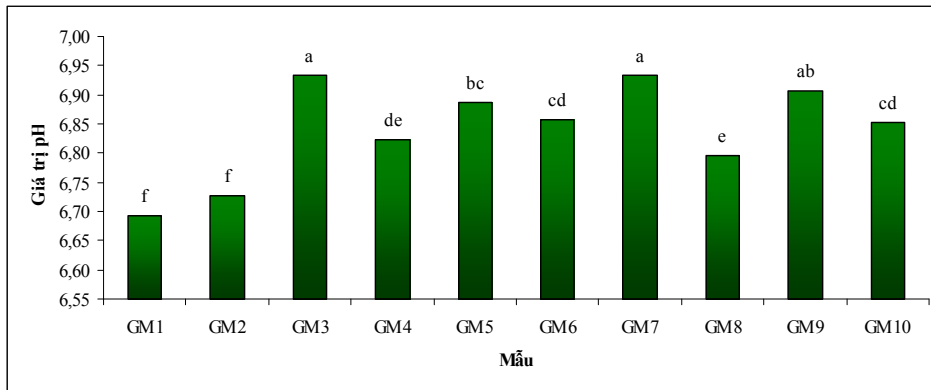
3.5.2 Phân tích kết quả

Khả năng kháng kháng sinh được đánh giá theo 3 mức độ dựa vào đường kính vòng ức chế sinh trưởng như sau: Kháng mạnh (K): ≤ 13mm, Kháng trung bình (TB): 14-16mm, Nhạy cảm (N): ≥ 17mm. (Nguồn: White *et al.*, 2003)

4 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

4.1 Giá trị pH các mẫu sữa dê

Mười mẫu sữa dê được ký hiệu mẫu từ GM1 đến GM10. Kết quả cho thấy giá trị pH mẫu dao động từ 6,69-6,93. Giá trị pH thấp trong nhóm ở mẫu GM1 (6,69) khác biệt không có ý nghĩa với mẫu GM2 (6,73) và khác biệt có ý nghĩa thống kê với các mẫu còn lại. Mẫu GM3 và GM7 có giá trị pH khá cao (6,93) và khác biệt có ý nghĩa thống kê với các mẫu còn lại. Tuy nhiên, tất cả giá trị pH các mẫu đều nằm trong khoảng trung tính và phù hợp với khả năng tiêu hóa của dê con trong giai đoạn đầu sau khi sinh.



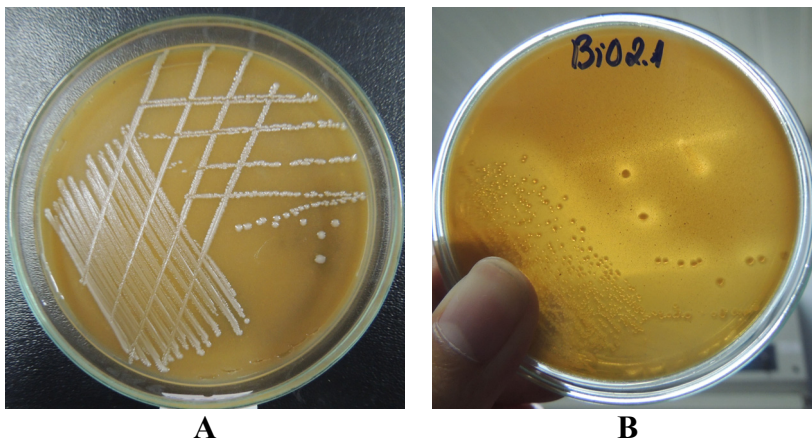
Hình 1: Sự biến động của giá trị pH các mẫu sữa dê

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

4.2 Kết quả phân lập vi khuẩn lactic từ sữa dê và men tiêu hóa

Mười sáu dòng vi khuẩn được phân lập từ 10 mẫu sữa dê và 2 loại chế phẩm Bioacimin và Probio. Trong đó, có 13 dòng được phân lập từ 10 mẫu sữa dê (chiếm 81,3%) và 03 dòng phân lập từ 2 chế phẩm Bioacimin và Probio (chiếm 18,7%). Phần lớn các dòng vi khuẩn phân lập được có dạng khuẩn lạc hình tròn; màu trắng đục hoặc trắng sữa; độ nổi dạng mô hay lái; bìa nguyên hay chia thùy. Ngoài ra, hầu hết các dòng đều có khả năng sinh acid mạnh tạo vòng sáng xung quanh khuẩn lạc

trên môi trường MRS agar có bổ sung 1,5% CaCO₃ (Hình 2). Kết quả khảo sát các đặc tính sinh học cho thấy có 4/16 dòng có dạng hình que (chiếm tỷ lệ 25,0%) và 12/16 dòng có dạng hình cầu (chiếm tỷ lệ 75,0%) tồn tại ở trạng thái đơn hoặc kết đôi. Tất cả các dòng vi khuẩn đều Gram dương và không di động. Kết quả thử nghiệm sinh hóa cho thấy tất cả các dòng đều có thử nghiệm oxidase âm tính và 7/16 dòng có thử nghiệm catalase âm tính (chiếm tỷ lệ 43,8%). Kết quả tuyển chọn được 7 dòng thuộc nhóm vi khuẩn lactic dựa vào hình thái khuẩn lạc, hình dạng tế bào, đặc điểm Gram và các thử nghiệm sinh hóa (Bảng 1).



Hình 2: Hình dạng khuẩn lạc các dòng vi khuẩn phân lập từ sữa dê và chế phẩm sinh học: G6.1 (A) và Bio2.1 (B)

Bảng 1: Đặc tính sinh học các dòng vi khuẩn lactic phân lập từ sữa dê và chế phẩm sinh học

Dòng vi khuẩn	Nguồn phân lập	Hình thái khuẩn lạc	Hình dạng tế bào	Thử nghiệm catalase	Thử nghiệm oxidase
Bio1.2	Bioacimin	Tròn, bìa nguyên, nổi mô, trắng sữa	Que ngắn	–	–
Bio2.1	Bioacimin	Tròn, bìa nguyên, nổi mô, trắng sữa	Que ngắn	–	–
Probi	Probio	Tròn, chia thùy, lồi, trắng đục	Cầu đôi	–	–
G1.1	Sữa dê (mẫu GM1)	Tròn, bìa nguyên, nổi mô, trắng sữa	Cầu đôi	–	–
G5.1	Sữa dê (mẫu GM5)	Tròn nhỏ, bìa nguyên, nổi mô, trắng sữa	Cầu đôi	–	–
G5.6	Sữa dê (mẫu GM5)	Tròn, bìa nguyên, nổi mô, trắng sữa	Cầu đơn	–	–
G6.1	Sữa dê (mẫu GM6)	Tròn, bìa nguyên, nổi mô, trắng sữa	Cầu đôi	–	–

Ghi chú: (–): Âm tính

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

4.3.1 Môi trường pH 6,4

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

Đến thời điểm 3 giờ, mật số dao động trong khoảng 7,74-8,89 log(CFU/ml), thể hiện sự thay đổi rất ít hay gần như không thay đổi so với thời điểm ban đầu. Kết quả khảo sát chứng tỏ pH 6,4 là điều kiện pH thích hợp cho sự tồn tại và ổn định mật số của các dòng vi khuẩn phân lập.

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

Dòng vi khuẩn	Thời gian (giờ)				LSD	CV (%)
	0	1	2	3		
Bio1.2	8,87	8,87	8,86	8,87	ns	0,24
Bio2.1	8,91	8,90	8,88	8,89	ns	0,25
Probi	7,69	7,82	7,82	7,74	ns	2,81
G1.1	8,72	8,74	8,73	8,72	ns	0,22
G5.1	8,79	8,80	8,79	8,80	ns	0,37
G5.6	8,74	8,74	8,74	8,74	ns	0,30
G6.1	8,78	8,78	8,79	8,78	ns	0,28

Ghi chú: ns: khác biệt không có ý nghĩa

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

4.3.2 Môi trường pH 3

Kết quả khảo sát ở điều kiện pH 3 cho thấy mật số ban đầu tại thời điểm 0 giờ của các dòng vi khuẩn phân lập có sự khác nhau và dao động trong khoảng từ 7,93-9,10 log(CFU/ml). Dòng G5.1 không có khả năng chống chịu sau 1 giờ với mật số bằng 0 log(CFU/ml). Sáu dòng vi khuẩn còn lại (chiếm tỷ lệ 85,7%) đều có mật số giảm sau 3 giờ thí nghiệm và dao động trong khoảng từ 7,82-9,05 log(CFU/ml). Sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê cho thấy sự thay đổi đáng kể mật số các dòng vi khuẩn so với thời điểm ban đầu (Bảng 3). Tuy

nhiên, xét trong tiêu chí đánh giá khả năng chống chịu môi trường pH thấp, các kết quả khảo sát trên đã chứng minh phần lớn các dòng vi khuẩn lactic phân lập đều có khả năng chống chịu được điều kiện pH 3 trong 3 giờ. Môi trường pH dịch dạ dày của người có thể đạt pH 3 hoặc cao hơn khi chứa thực phẩm và các sản phẩm từ sữa (Matijasic và Rogelj, 2000). Kết quả khảo sát đã chứng minh hầu hết các dòng vi khuẩn lactic phân lập từ sữa dê và chế phẩm men tiêu hóa đều có khả năng chịu đựng được pH 3 trong 3 giờ. Nói cách khác, chúng có khả năng chống chịu với điều kiện acid của dạ dày để đi đến ruột non.

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

Dòng vi khuẩn	Thời gian (giờ)				CV (%)
	0	1	2	3	
Bio1.2	8,95 ^a	8,88 ^{ab}	8,81 ^c	8,82 ^{bc}	0,30
Bio2.1	8,81 ^a	8,80 ^a	8,78 ^a	8,76 ^a	0,45
Probi	7,93 ^a	7,89 ^a	7,86 ^a	7,82 ^a	1,26
G1.1	9,02 ^a	9,01 ^a	9,00 ^a	8,98 ^a	0,25
G5.1	8,95 ^a	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b	0,63
G5.6	9,04 ^a	9,04 ^a	9,03 ^a	9,03 ^a	0,22
G6.1	9,10 ^a	9,09 ^a	9,08 ^{ab}	9,05 ^b	0,15

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

4.3.3 Môi trường pH 2

Sáu dòng vi khuẩn có khả năng chống chịu môi trường pH 3 trong 3 giờ được tuyển chọn để khảo sát trong điều kiện pH 2. Khác với kết quả khảo sát trong điều kiện pH 6,4, trong môi trường pH 2 tất cả các dòng vi khuẩn đều có mật số giảm rõ rệt sau 3 giờ thí nghiệm. Sau 1 giờ khảo sát, tất cả các dòng vi khuẩn đều thể hiện khả năng chống chịu pH 2 với mật số thay đổi không đáng kể so với thời điểm 0 giờ. Ở thời điểm 2 giờ, vẫn còn 2 dòng vi khuẩn (chiếm tỷ lệ 33,3%) có khả năng chống chịu với điều kiện pH 2. Các dòng vi khuẩn có khả năng chống chịu bao gồm Bio1.2 và G6.1 với giá trị mật số 9,01 log(CFU/ml). Tuy nhiên, đến thời điểm 3

giờ, tất cả các dòng vi khuẩn không còn khả năng chống chịu với giá trị mật số bằng 0 (Bảng 4). Sự khác biệt về khả năng chống chịu điều kiện pH 2 của các dòng vi khuẩn có thể giải thích do đây là điều kiện pH rất thấp đối với sự tồn tại của nhiều nhóm vi sinh vật, trong đó có nhóm vi khuẩn lactic. Điều kiện pH này có ảnh hưởng rất lớn đến hoạt động của enzyme và sự trao đổi chất của vi sinh vật. Do đó, phần lớn các vi sinh vật không có khả năng tồn tại và phát triển trong điều kiện pH 2 đến thấp hơn (Cakir, 2003). Kết quả khảo sát chưa tuyển chọn được dòng chống chịu được môi trường pH 2 trong 3 giờ nên không tiến hành thí nghiệm ở điều kiện pH 1.

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

Dòng vi khuẩn	Thời gian (giờ)				CV (%)
	0	1	2	3	
Bio1.2	9,07 ^a	9,06 ^a	9,01 ^b	0,00 ^c	0,26
Bio2.1	9,06 ^a	8,90 ^b	0,00 ^c	0,00 ^c	0,22
Probi	8,05 ^a	7,50 ^b	0,00 ^c	0,00 ^c	2,31
G1.1	8,97 ^a	8,87 ^b	0,00 ^c	0,00 ^c	0,39
G5.6	9,07 ^a	9,02 ^b	0,00 ^c	0,00 ^c	0,22
G6.1	9,06 ^a	9,04 ^a	9,01 ^a	0,00 ^b	0,36

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

4.4 Kết quả khảo sát khả năng kháng thuốc kháng sinh

4.4.1 Kháng sinh Penicillin V

Nồng độ ức chế tối thiểu MIC (Minimum Inhibitory Concentration) là nồng độ thấp nhất của một loại kháng sinh có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn sau khoảng 24 giờ nuôi cấy (Dung *et al.*, 2008). Do đó, trong thí nghiệm này hiệu quả kháng kháng sinh của các dòng vi khuẩn phân lập được đánh giá dựa vào giá trị MIC khảo sát trên vi sinh vật gây bệnh. Penicillin V là loại kháng sinh thuộc nhóm ức chế tổng hợp vách tế bào vi khuẩn và có giá trị MIC thường nằm trong khoảng 0,01-0,1 mg/l.

Kết quả thí nghiệm cho thấy tất cả các dòng vi khuẩn lactic phân lập đều có khả năng kháng Penicillin V nồng độ từ 0,125-8 mg/l. Ở nồng độ từ 16-128 mg/l, có đến 5/6 dòng vi khuẩn (chiếm tỷ lệ 83,3%) biểu hiện kháng với Penicillin V; trong khi đó, dòng Probi biểu hiện nhạy cảm chỉ ở nồng độ 16 mg/l. Đến nồng độ 256 mg/l, dòng Bio2.1 vẫn còn biểu hiện kháng với Penicillin V (chiếm tỷ lệ 16,6%). Kết quả thí nghiệm đã chứng minh các dòng vi khuẩn phân lập có khả năng kháng Penicillin V ở nồng độ rất cao so với các nhóm vi khuẩn gây bệnh trên người và động vật khi so sánh với giá trị MIC.

Bảng 5: Khả năng kháng kháng sinh Penicillin V của một số dòng vi khuẩn lactic phân lập từ sữa dê và chế phẩm sinh học

STT	Dòng vi khuẩn	Nồng độ kháng sinh (mg/l)											
		0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
1	Bio1.2	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	TB
2	Bio2.1	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
3	Probi	K	K	K	K	K	K	K	N	N	N	N	N
4	G1.1	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	TB
5	G5.6	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	TB
6	G6.1	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	TB

Ghi chú: K: Kháng mạnh; TB: Kháng trung bình; N: Nhạy cảm

4.4.2 Kháng sinh Streptomycin và Cephalexin

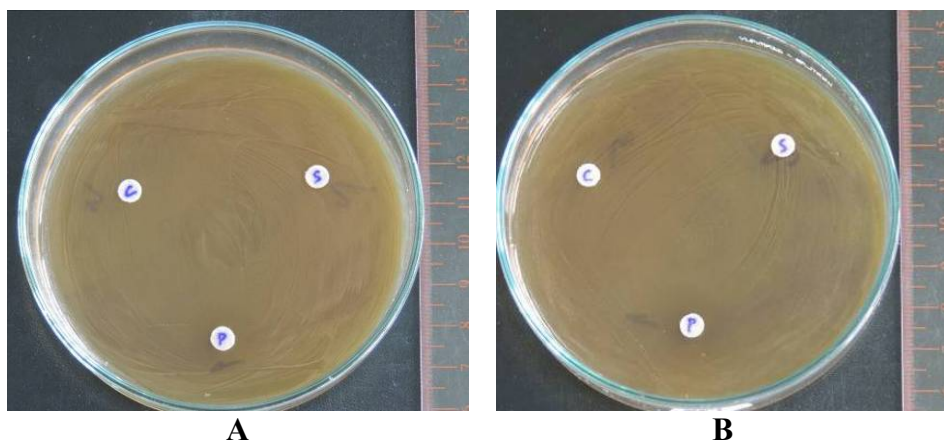
Streptomycin là kháng sinh thuộc nhóm ức chế tổng hợp protein của vi khuẩn. Theo Korhonen (2010), giá trị MIC của Streptomycin đối với phần lớn vi khuẩn lactic nằm trong khoảng 2-256 µg/ml. Ngoài ra, theo nghiên cứu của Dung *et al.* (2008), có đến 98,7% (trong tổng số 50 dòng vi khuẩn gây bệnh gan thận mũ trên cá tra) bị nhạy cảm với kháng sinh Cephalexin nồng độ 30 µg/ml. Hiệu quả cao của kháng sinh Cephalexin nhờ vào khả năng

ức chế tổng hợp vách tế bào vi khuẩn và bền vững với enzyme penicilinase. Kết quả thí nghiệm này cho thấy tất cả các dòng vi khuẩn lactic phân lập đều có khả năng kháng Streptomycin và Cephalexin ở nồng độ từ 0,125-256 mg/l (Bảng 6). Điều này chứng minh kháng sinh Streptomycin và Cephalexin ở giới hạn nồng độ khảo sát lên đến 256 mg/l vẫn chưa ảnh hưởng đến sự tồn tại và phát triển của các dòng vi khuẩn phân lập.

Bảng 6: Khả năng kháng kháng sinh Streptomycin và Cephalexin của một số dòng vi khuẩn lactic phân lập từ sữa dê và chế phẩm sinh học

STT	Dòng vi khuẩn	Nồng độ kháng sinh (mg/l)											
		0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
1	Bio1.2	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
2	Bio2.1	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
3	Probi	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
4	G1.1	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
5	G5.6	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
6	G6.1	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K

Ghi chú: K: Kháng mạnh; TB: Kháng trung bình; N: Nhạy cảm



Hình 3: Khả năng kháng kháng sinh Penicillin V (P), Streptomycin (S) và Cephalexin (C) ở nồng độ 256 mg/l của dòng vi khuẩn Bio2.1 (A) và G6.1 (B)

4.4.3 Kháng sinh Ampicillin

Ampicillin là loại kháng sinh phổ rộng thuộc nhóm beta-lactam có tác động chủ yếu vào quá trình nhân đôi của vi khuẩn, ức chế sự tổng hợp mucopeptide của màng tế bào vi khuẩn. Theo Dung et al. (2008), có đến 86% (trong tổng số 50 dòng vi khuẩn gây bệnh gan thận mù trên cá tra) nhạy cảm

với Ampicillin nồng độ 10 µg/ml. Kết quả khảo sát thể hiện, tất cả các dòng vi khuẩn phân lập kháng Ampicillin ở nồng độ từ 0,125-64 mg/l. Tuy nhiên, ở nồng độ 128 mg/l, vẫn còn 4/6 dòng vi khuẩn (chiếm tỷ lệ 66,6%) biểu hiện kháng (bao gồm các dòng Bio2.1, G1.1, G5.6 và G6.1). Đến nồng độ 256 mg/l, không có dòng vi khuẩn nào biểu hiện kháng với kháng sinh Ampicillin.

Bảng 7: Khả năng kháng kháng sinh Ampicillin của một số dòng vi khuẩn lactic phân lập từ sữa dê và chế phẩm sinh học

STT	Dòng vi khuẩn	Nồng độ kháng sinh (mg/l)											
		0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
1	Bio1.2	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	TB	TB
2	Bio2.1	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	TB
3	Probi	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	TB	N
4	G1.1	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	N
5	G5.6	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	N
6	G6.1	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	N

Ghi chú: K: Kháng mạnh; TB: Kháng trung bình; N: Nhạy cảm

4.4.4 Kháng sinh Tetracycline

Kết quả khảo sát cho thấy, tất cả các dòng vi khuẩn phân lập có khả năng kháng Tetracycline ở nồng độ từ 0,125-16 mg/l. Ở nồng độ 32 mg/l, có 5/6 dòng vi khuẩn (chiếm tỷ lệ 83,3%) biểu hiện kháng. Với nồng độ 64 mg/l, chỉ còn 3/6 dòng vi khuẩn (chiếm tỷ lệ 50,0%) biểu hiện kháng, các dòng còn lại thể hiện mức độ trung gian với Tetracycline ở nồng độ này. Đến nồng độ 128 mg/l và 256 mg/l, chỉ có dòng vi khuẩn Probi (chiếm tỷ lệ 16,6%) biểu hiện kháng với Tetracycline. Tetracycline ức chế sự tổng hợp protein của tế bào vi khuẩn bằng cách gắn vào phần 30S của ribosome, do đó ức chế gắn aminoacyl-tRNA mới vào vị trí tiếp nhận. Theo Dung et al. (2008) chỉ có khoảng 30% (trong tổng số 50 dòng vi khuẩn gây

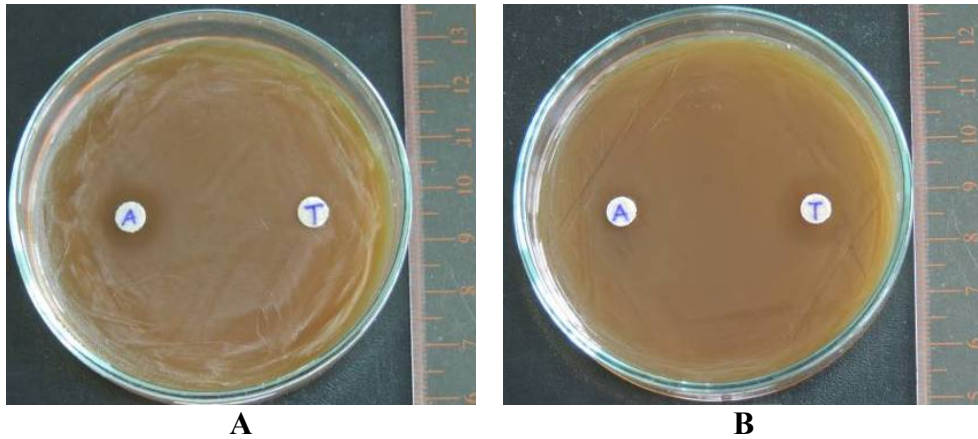
bệnh gan thận mù trên cá tra) nhạy cảm với Tetracycline nồng độ 30 µg/ml.

Các nghiên cứu hiện nay đã ủng hộ việc sử dụng probiotic để phòng ngừa bệnh tiêu chảy có liên quan đến kháng sinh. Hiệu quả kháng thuốc kháng sinh ở nồng độ cao chỉ ra rằng, nếu sử dụng các probiotic phân lập từ sữa động vật cho bệnh nhân điều trị bằng kháng sinh sẽ rất hữu ích trong việc phục hồi bệnh nhanh hơn bởi sự thiết lập hệ vi sinh vật có ích trong đường ruột một cách nhanh chóng. Khả năng kháng của vi khuẩn probiotic với một số kháng sinh có thể được sử dụng cho cả hai mục đích phòng ngừa và điều trị các bệnh nhiễm trùng đường ruột (EI-Naggar, 2004).

Bảng 8: Khả năng kháng kháng sinh Tetracycline của một số dòng vi khuẩn lactic phân lập từ sữa dê và chế phẩm sinh học

STT	Dòng vi khuẩn	Nồng độ kháng sinh (mg/l)											
		0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
1	Bio1.2	K	K	K	K	K	K	K	K	K	TB	N	N
2	Bio2.1	K	K	K	K	K	K	K	K	K	TB	TB	N
3	Probi	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
4	G1.1	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	TB	N
5	G5.6	K	K	K	K	K	K	K	K	K	TB	TB	N
6	G6.1	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	TB	N

Ghi chú: K: Kháng mạnh; TB: Kháng trung bình; N: Nhạy cảm



Hình 4: Khả năng kháng kháng sinh Ampicillin (A) và Tetracycline (T) ở nồng độ 64 mg/l của dòng vi khuẩn Probi (A) và G6.1 (B)

5 KẾT LUẬN

Mười sáu dòng vi khuẩn được phân lập trên môi trường MRS agar từ nguồn sữa dê và chế phẩm sinh học. Phần lớn các dòng vi khuẩn có dạng khuẩn lạc hình tròn, màu trắng đục đến trắng sữa, độ nổi dạng mô hoặc lài, bìa nguyên hay chia thùy; hình dạng chủ yếu có dạng que hoặc cầu tồn tại ở trạng thái đơn hay kết đôi. Tất cả các dòng vi khuẩn phân lập đều Gram dương, không di động và có thử nghiệm oxidase âm tính; bên cạnh đó, có 7/16 dòng cho kết quả thử nghiệm catalase âm tính. Từ các kết quả khảo sát tuyển chọn được 7 dòng thuộc nhóm vi khuẩn lactic. Trong 7 dòng được khảo sát, có đến 6 dòng có khả năng chống chịu môi trường pH 3 trong 3 giờ. Đặc biệt, dòng Bio1.2 và G6.1 có khả năng tồn tại trong điều kiện môi trường pH 2 trong 2 giờ. Dòng Bio2.1 có khả năng kháng 4 loại kháng sinh Streptomycin, Cephalixin và Penicillin V ở nồng độ 256 mg/l và Ampicillin ở nồng độ 128 mg/l. Ba dòng G1.1, G5.6 và G6.1 có khả năng kháng 3 loại kháng sinh Streptomycin, Cephalixin ở nồng độ 256 mg/l và Ampicillin ở nồng độ 128 mg/l. Ngoài ra, dòng Probi có khả năng kháng 3 loại kháng sinh Streptomycin, Cephalixin và Tetracycline ở nồng độ 256 mg/l.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Ban lãnh đạo Viện NC & PT Công nghệ Sinh học, các anh chị và các bạn ở Phòng thí nghiệm Vi sinh vật, Công nghệ Sinh học Thực phẩm và Sinh học phân tử Thực vật đã tận tình hỗ trợ rất nhiều từ quá trình thực hiện đến khi hoàn thành nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ahmed, F.E. 2003. Genetically modified probiotics in foods. *Trends Biotechnol*, 21: 491-497.
2. Cakir, I. 2003. *Determination of some probiotic properties on Lactobacilli and Bifidobacteria*. Ankara University Thesis of Ph.D.
3. Cao Ngọc Diệp và Nguyễn Hữu Hiệp. 2009. *Vi sinh học đại cương*. Nxb. Đại học Cần Thơ: trang 1-15.
4. Culligan, E.P., C. Hill and R.D. Sleator. 2009. Probiotics and gastrointestinal disease: successes, problems, and future prospects. *Gut pathogens*, 1(19): 1-12.
5. Dung, T.T., F. Haesebrouck, N.A. Tuan, P. Sorgeloos, M. Baelem and A. Decostere, 2008. Antimicrobial susceptibility pattern of *Edwardsiella ictaluri* isolate from natural outbreaks of bacillary necrosis of Pangasianodon hypophthalmus in Vietnam. *Microbial Drug Resistance*, 14(4): 311-316.
6. EI-Naggar MYM. (2004). Comparative study of probiotic cultures to control the growth of E. coli O157:H7 and *Salmonella typhimurium*. *Biotechnol*, 3: 173-180.
7. Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol*, 66: 65-78.
8. Korhonen, J. 2010. *Antibiotic Resistance of Lactic Acid Bacteria*. Dissertations in Forestry and Natural Sciences. University of Eastern Finland, pp.27-29.

9. Martin, R., M. Olivares, M.L. Marin, L. Fernandez, J. Xaus and J.M. Rodriguez. 2005. Probiotic potential of 3 *Lactobacilli* strains isolated from breast milk. *J Hum Lact*, 21(1): 8-17.
10. Matijasic, B.B., and I. Rogelj. 2000. *Lactobacillus K7 – a New Candidate for a Probiotic Strain*. Food Technol. Biotechnol., 38(2): 113-119.
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1997. *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests*. Approved standard M2-A6. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
12. Tambekar, D.H. and S.A. Bhutada. 2010. An evaluation of probiotic potential of *Lactobacillus* sp. from milk of domestic animals and commercial available probiotic preparations in prevention of enteric bacterial infections. *Recent Research in Science and Technology*, 2(10): 82-88.
13. White, D.G., P.F. McDermott and R.D. Walker. 2003. *Chapter 5: Antimicrobial Susceptibility Testing Methodologies*. Microbial food Safety in Animal Agriculture Current Topics. ME Torrence and RE Isaacson, eds. Iowa State Press, Iowa, USA.