

Probiotic potential and resistance to *Escherichia coli*, *Salmonella* of *Bacillus amyloliquefaciens*

Linh D. Nguyen*, Duong P. A. Nguyen, Nhi P. U. Le, Ngoc H. Le, Mai C. Duong, & Hien T. Le
Faculty of Animal Science and Veterinary Medicine, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

ARTICLE INFO

Research Paper

Received: September 10, 2024

Revised: November 01, 2024

Accepted: November 08, 2024

Keywords

Bacillus amyloliquefaciens

Bacteriocin

Escherichia coli

Probiotic

Salmonella

*Corresponding author

Nguyen Duy Linh

Email:

nguyenduylinh3036@gmail.com

ABSTRACT

Bacillus amyloliquefaciens is a Gram-positive spore-forming bacterium that has superior properties compared to other beneficial bacteria used in probiotic preparations. The purpose of this study was to determine the bacterial biological properties under harsh conditions such as high temperature, low pH, bile salts, artificial gastric juice and test the resistance to two types of gram-negative bacteria including *Escherichia coli* and *Salmonella*. The results showed that after 3 h of testing at 85°C, the bacterial density remained at 3.05 ± 0.06 log CFU/mL (corresponding to 35.58% of the initial density). Under pH = 2.5 condition and after 3 h, the bacterial density remained up to 5.34 ± 0.04 log CFU/mL (62.43%). With the bile salt concentration up to 0.6% after 3 h, the bacterial density remained at 5.24 ± 0.07 log CFU/mL (61.34%). Under the decomposition action of the enzyme pepsin and in the artificial gastric fluid environment of piglets (0.3% pepsin, pH = 4.5) at different levels, the bacterial density still remained at the level of 5.82 ± 0.15 log CFU/mL (63.66%), which was higher than that of the test of artificial stomach fluid of adult pigs (pepsin 0.3%, pH = 2.5) corresponding to 4.73 ± 0.04 log CFU/mL (55.21%) after 3 h of testing. In this study, *B. amyloliquefaciens* also showed resistance to gram-negative bacteria such as *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Salmonella* Enteritidis WHO 2014, *E. coli* with F4 factor, *E. coli* with F18+Stx2e factor, field *Salmonella* Typhimurium, and field *Salmonella* Enteritidis.

Cited as: Nguyen, L. D., Nguyen, D. P. A., Le, N. P. U., Le, N. H., Duong, M. C., & Le, H. T. (2025). Probiotic potential and resistance to *Escherichia coli*, *Salmonella* of *Bacillus amyloliquefaciens*. *The Journal of Agriculture and Development* 24(4), 54-65.

Tiềm năng probiotic và khả năng kháng *Escherichia coli*, *Salmonella* của vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens*

Nguyễn Duy Linh*, Nguyễn Phạm Ánh Dương, Lê Phương Uyên Nhi, Lê Hữu Ngọc, Đường Chi Mai & Lê Thanh Hiền

Khoa Chăn Nuôi Thú Y, Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

THÔNG TIN BÀI BÁO

Bài báo khoa học

Ngày nhận: 10/09/2024

Ngày chỉnh sửa: 01/11/2024

Ngày chấp nhận: 08/11/2024

Từ khóa

Bacillus amyloliquefaciens

Bacteriocin

Escherichia coli

Probiotic

Salmonella

***Tác giả liên hệ**

Nguyễn Duy Linh

Email:

nguyenduylinh3036@gmail.com

TÓM TẮT

Bacillus amyloliquefaciens là một vi khuẩn Gram dương sinh nội bào tử có khả năng vượt trội so với các lợi khuẩn khác được dùng trong các chế phẩm sinh học probiotic. Mục tiêu của nghiên cứu này là để đánh giá các đặc tính sinh học vi khuẩn này trong các điều kiện khắc nghiệt như nhiệt độ cao, pH thấp, muối mật, dịch dạ dày nhân tạo và kiểm tra khả năng kháng hai loại gây bệnh trên đường ruột: *Escherichia coli*, *Salmonella*. Kết quả thu được, sau 3 giờ thử nghiệm ở nhiệt độ 85°C, mật độ vi khuẩn còn duy trì là $3.05 \pm 0.06 \log \text{CFU/mL}$ (tương ứng 35,58% so với mật độ ban đầu). Trong điều kiện pH = 2.5 sau 3 giờ mật độ vi khuẩn duy trì lên đến $5.34 \pm 0.04 \log \text{CFU/mL}$ (62,43%). Với điều kiện nồng độ muối mật lên đến 0,6% sau 3 giờ mật độ vi khuẩn duy trì ở mức $5.24 \pm 0.07 \log \text{CFU/mL}$ (61,34%). Dưới sự tác động của enzyme phân hủy pepsin (0,3%), trong môi trường dịch dạ dày nhân tạo của heo con pH 4,5 ở các mức độ khác nhau, mật độ vi khuẩn vẫn duy trì ở mức $5.82 \pm 0.15 \log \text{CFU/mL}$ (63,66%) cao hơn thử nghiệm dịch dạ dày nhân tạo của heo trưởng thành (pepsin 0,3%, pH = 2.5) tương ứng $4.73 \pm 0.04 \log \text{CFU/mL}$ (55,21%) sau 3 giờ thí nghiệm. *B. amyloliquefaciens* còn cho thấy khả năng kháng lại các loại vi khuẩn gram âm trong nghiên cứu này như *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Salmonella* Enteritidis WHO 2014, *E.coli* thực địa có yếu tố bám F4, *E.coli* thực địa có yếu tố bám F18+Stx2e, *Samonella* Typhimurium thực địa và *Samonella* Enteritidis thực địa. Kết quả này phần nào cho thấy khả năng sử dụng vi khuẩn này trong chăn nuôi nhất là khi những quy định về hạn chế sử dụng kháng sinh tại Việt Nam.

1. Đặt Vấn Đề

Hiện nay, việc sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi để phòng và kiểm soát bệnh hoặc làm chất kích thích tăng trưởng đã làm gia tăng tình trạng kháng kháng sinh trên thú và ảnh hưởng sức khỏe cộng đồng. Liên minh châu Âu (EU) đã thực hiện các bước cấm sử dụng kháng sinh trong thức ăn chăn nuôi để kích thích tăng trưởng từ năm 2006 và tiến đến hạn chế sử dụng kháng sinh trong phòng bệnh (Dibner & Richards, 2005). Tại Hoa Kỳ, các hạn chế được thực hiện từ năm 2017 (Centner, 2016) và tại Trung Quốc vào năm 2020 (Hu & Cowling, 2020). Cũng theo xu hướng này, kể từ năm 2018, việc bổ sung kháng sinh vào thức ăn chăn nuôi với mục đích kích thích tăng trưởng đã bị cấm hoàn toàn ở Việt Nam. Trên lộ trình giảm thiểu sử dụng kháng sinh của Việt Nam, việc sử dụng kháng sinh phòng bệnh trong ngành chăn nuôi cũng bị cấm vào năm 2026 (GOV, 2023).

Với tình hình đó, các giải pháp thay thế kháng sinh theo hướng hỗ trợ tăng trưởng và kháng bệnh rất được quan tâm, trong đó chế phẩm sinh học dạng men sống (probiotic) được cho là là một lựa chọn rất có tiềm năng về tăng trưởng (Dayan, 1993), cũng như hạn chế đề kháng kháng sinh (Kasimanickam & ctv., 2021). Một nghiên cứu đã cho thấy khả năng sống sót qua dịch dạ dày nhân tạo của bào tử *Bacillus subtilis* P223 (pH = 2,5, pepsin 0,3% trong 3 giờ; muối mật 0,3% trong 24 giờ) (Jeon & ctv., 2017). Gần đây những nghiên cứu cho thấy *Bacillus amyloliquefaciens* (*B. amylo.*) có tiềm năng tốt để dùng như probiotic (Du & ctv., 2022). Tuy nhiên, thông tin này chưa được nghiên cứu nhiều trên những sản phẩm probiotic lưu hành tại Việt Nam. Với mục tiêu làm cơ sở cho đánh giá khả năng sử dụng *B. amylo.* làm probiotic trước khi thử nghiệm thực địa, chúng tôi tiến hành nghiên cứu tại phòng thí nghiệm chủng *B. amylo.* của một sản phẩm

thương mại về khả năng liên kháng một số loại vi khuẩn đường ruột, cũng như khả năng tồn tại trong các điều kiện mô phỏng môi trường dạ dày nhân tạo của heo từ đó làm rõ hơn về tác động của chúng trong đường ruột.

2. Vật Liệu và Phương Pháp Nghiên Cứu

2.1. Vật liệu

Chủng vi khuẩn *B. amylo.* được phân lập từ sản phẩm probiotic, làm thuần chủng và xác nhận chủng bằng các phản ứng sinh hoá (Bergey & ctv., 2000) để sử dụng trong nghiên cứu. Các vi khuẩn đường ruột được dùng thử khả năng kháng khuẩn bao gồm *Salmonella* (*Sal.*) Typhimurium ATCC 14028, *Sal. Enteritidis* WHO 2014, *Sal. Infantis* (ATCC 1675) được cung cấp bởi Viện Pasteur Thành phố Hồ Chí Minh. Các chủng vi khuẩn thực địa, bao gồm *Escherichia coli* có yếu tố bám mang gen F4, *Escherichia coli* mang gen F18 và độc tố Stx2e, *Sal. Typhimurium* thực địa và *Sal. Enteritidis*. Những chủng vi khuẩn này có nguồn gốc từ các mẫu sinh học thực địa, bao gồm mẫu phân từ heo và mẫu môi trường từ các trang trại chăn nuôi gà đã được phân lập, giải trình tự gen, lưu trữ bởi phòng thí nghiệm của Bộ môn Bệnh truyền nhiễm và Thú y cộng đồng, Khoa Chăn nuôi Thú y, Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM. Ngoài ra, thí nghiệm sử dụng các dụng cụ, hoá chất môi nuôi cấy vi sinh vật thường quy.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Chuẩn bị huyền phù vi khuẩn *B. amylo.*

Khuẩn lạc *B. amylo.* thuần được nuôi cấy tăng sinh trong 100 mL môi trường canh Tryptone Soya Broth (TSB) (Oxoid, CM 0129B), lắc ở 150 rpm, 37°C/ 24 giờ. Hút 10 mL huyền phù *B. amylo.* sau khi nuôi cấy tăng sinh ly tâm 6000 vòng/15 phút ở 4°C, thu phần cặn loại bỏ phần dịch. Thêm 10 mL dung dịch đệm PBS (8,0 g

NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na_2HPO_4 ; 0,24g KH_2PO_4 , pH = 7,4), sử dụng huyền phù này cho các thí nghiệm sau đó.

2.2.2. Khảo sát khả năng tồn tại trong điều kiện nhiệt độ, pH, dịch dạ dày nhân tạo và muối mật

Điều kiện nhiệt độ: Hút 2 mL huyền phù *B. amylo.* được chuẩn bị trước đó cho vào các ống nghiệm chứa 2 mL dung dịch đệm PBS, ủ ở các nhiệt độ 37°C, 45°C, 55°C, 65°C, 75°C, 85°C. Sau khi ủ 0, 1, 2 và 3 giờ, hút 10 μL dịch vi khuẩn kiểm tra mật độ vi khuẩn sống trong dịch ủ bằng phương pháp đếm nhỏ giọt trên môi trường thạch Tryptone Soya Agar (TSA) (Oxoid, CM0131).

Điều kiện pH: Thực hiện hút 2 mL huyền phù vào các ống nghiệm chứa 2 mL dung dịch PBS có pH = 2,5; pH = 3,5; pH = 4,5 và pH = 5,5 (Ioannis 2016). Ủ trong 0, 1, 2 và 3 giờ và kiểm tra mật độ vi khuẩn sống tương tự trên.

Trong điều kiện dịch dạ dày nhân tạo: Chuẩn bị các ống nghiệm chứa 2 mL dung dịch PBS có mức pH = 2.5 và pH = 4.5 bổ sung thêm pepsin lần lượt ở các nồng độ 0%; 0,2% và 0,3% ủ trong 0, 1, 2 và 3 giờ ở 37°C. Điều kiện muối mật: thực hiện như trên, hút 2 mL huyền phù cho các ống nghiệm chứa 2 mL dung dịch PBS bổ các nồng độ muối mật 0%, 0,3%, 0,6% ủ trong 0, 1, 2 và 3 giờ ở 37°C (Ioannis, 2016). Tất cả các điều kiện đều lặp lại 3 lần. Tương tự, kiểm tra mật độ vi khuẩn bằng phương pháp đếm nhỏ giọt.

2.2.3. Chuẩn bị dịch chiết canh khuẩn

Khuẩn lạc thuần chủng được pha loãng thành hỗn dịch 0,5 McFarland ($\sim 10^8$ CFU/mL) vi khuẩn trong dung dịch NaCl 0,9%. Hút 1 mL hỗn dịch vi khuẩn tăng sinh trong 100 mL môi trường canh Tryptone Soya Broth (TSB) (Oxoid,

CM 0129B), lắc ở 150 rpm, 37°C/48 giờ. Huyền phù sinh khối *B. amylo.* sau khi nuôi cấy được ly tâm 6000 vòng/15 phút ở 4°C, thu phần dịch lọc qua màng lọc cellulose 0,45 μm . Dịch chiết thu được tiến hành kiểm tra khả năng kháng khuẩn.

2.2.4. Khảo sát khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh

Cấy tăng sinh các vi khuẩn gồm *S. Typhimurium* ATCC 14028, *S. Enteritidis* WHO 2014, *S. Infantis* (ATCC 1675), *E. coli* thực địa có yếu tố bám mang gen F4, *E. coli* thực địa có yếu tố bám mang gen F18 và độc tố Stx2e, *S. Typhimurium* thực địa, *S. Enteritidis* thực địa trên môi trường thạch Tryptone Soya Agar (TSA) (Oxoid, CM 0129) ở 37°C/24 giờ. Tiến hành pha loãng các vi khuẩn này với nước muối sinh lý để đạt dịch khuẩn ở mức McFarland 0,5 tương đương với $1,5 \times 10^8$ CFU/mL. Tiếp tục lấy 100 μL dịch khuẩn này trải đều lên bề mặt môi trường Mueller Hinton Agar (MHA), đục lỗ thạch ($\phi = 6 - 8$ mm). Hút 100 μL dịch chiết *B. amylo.* trước đó cho vào lỗ thạch, hạn chế sự di chuyển để huyền dịch ngấm vào thạch. Sau 30 phút, các đĩa môi trường được ủ ở 37°C. Sau 24 giờ, đo đường kính vòng vô khuẩn (mm) để đánh giá khả năng kháng khuẩn (Lim & ctv., 2016). Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

3. Kết Quả và Thảo Luận

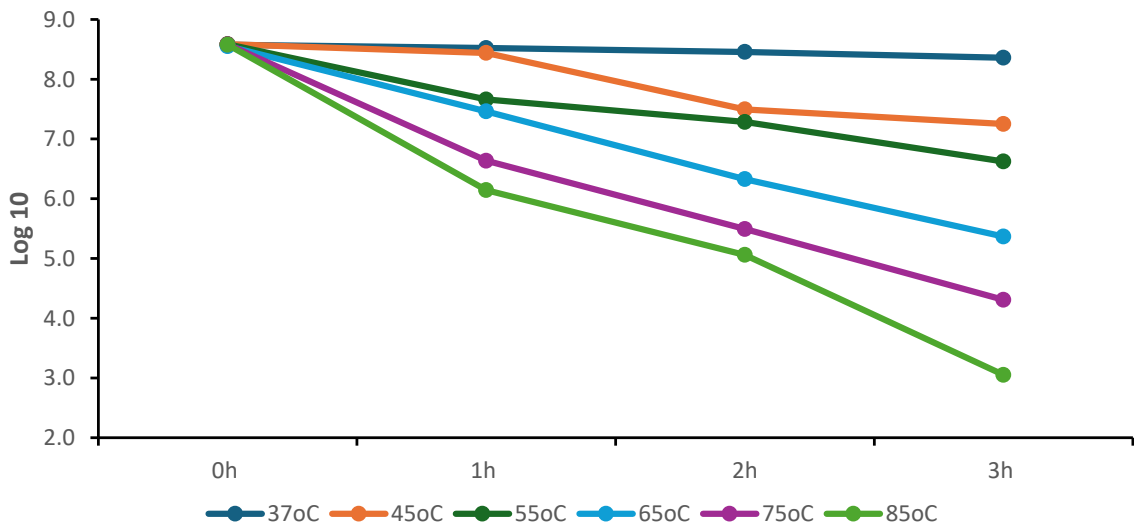
3.1. Tính ổn định ở nhiệt độ cao của *B. amylo.*

Bào tử vi khuẩn *Bacillus* chịu được nhiệt độ khá cao, *B. subtilis* cần phải được xử lý ở nhiệt độ lên đến 121 - 135°C trong thời gian dài mới có thể bất hoạt được bào tử vi khuẩn (Cho & Chung, 2020), tuy nhiên trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng tế bào sinh dưỡng để đánh giá khả năng chịu nhiệt của vi khuẩn. Mật độ vi khuẩn được theo dõi theo thời gian thử nhiệt được trình

bày ở Hình 1. Kết quả cho thấy mật độ vi khuẩn không có sự thay đổi đáng kể ở nhiệt độ 37°C với giá trị trung bình lần lượt là $8,36 \pm 0,05$ log CFU/mL (sau 3 giờ ủ, tương ứng với 97,47% so với mật độ vi khuẩn ban đầu $8,58 \pm 0,06$ log CFU/mL) và 45°C với giá trị trung bình $7,25 \pm 0,07$ log CFU/mL (xấp xỉ 84,45% so với mật độ vi khuẩn ban đầu $8,59 \pm 0,03$ log CFU/mL).

Ở nhiệt độ 55°C và 65°C, sau khi ủ nhiệt 1 giờ, mật độ vi khuẩn giảm nhanh còn lại lần lượt là $7,66 \pm 0,14$ log CFU/mL (89,24%) và $7,46 \pm 0,04$ log CFU/mL (87,23%), khi thời gian ủ nhiệt tăng lên 3 giờ, thu được giá trị thấp hơn là $6,62 \pm 0,07$ log CFU/mL (77,15%) và $5,37 \pm 0,04$ log CFU/

mL (62,74%). Quan sát thấy tỷ lệ tế bào vi khuẩn sống sót khi ủ nhiệt 75°C chỉ còn lại 50,18% (tương đương $4,31 \pm 0,03$ log CFU/mL) so với mật độ ban đầu sau 3 giờ ủ. Mật độ vi khuẩn sụt giảm nhanh khi ủ nhiệt ở 85°C, sau 1 giờ là $6,14 \pm 0,06$ log CFU/mL (71,61%), sau 2 giờ là $5,06 \pm 0,10$ log CFU/mL (58,99%), sau 3 giờ chỉ còn lại $3,05 \pm 0,06$ (35,58%). Tuy nhiên, có thể thấy vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* có thể chịu được nhiệt độ lên đến 85°C trong 3 giờ, thể hiện được khả năng chịu nhiệt độ cao. Trong thực tế sản xuất, nhiệt độ phối trộn và bảo quản thức ăn gia súc không thể vượt quá nhiệt độ này và kéo dài thời gian quá lâu. Điều đó cho thấy được khả năng bền của *B. amyloliquefaciens* đối với nhiệt.



Hình 1. Mật độ tế bào *Bacillus amyloliquefaciens* ở các nhiệt độ khác nhau theo thời gian.

3.2. *B. amyloliquefaciens* trong các môi trường có pH khác nhau

Heo sơ sinh có độ pH dạ dày khá cao (5 - 6), tuy nhiên, pH này chỉ duy trì sau vài giờ bú đầu tiên khi mới sinh, pH sẽ giảm xuống khoảng còn 4 và ổn định ở mức này cho đến khi cai sữa (Ioannis, 2016), tuy nhiên cũng tiềm ẩn nguy cơ cao các vi sinh vật có hại xâm nhập và nhanh chóng tăng số lượng gây bệnh cho vật chủ. Khi heo trưởng thành, pH dạ dày có thể thấp hơn

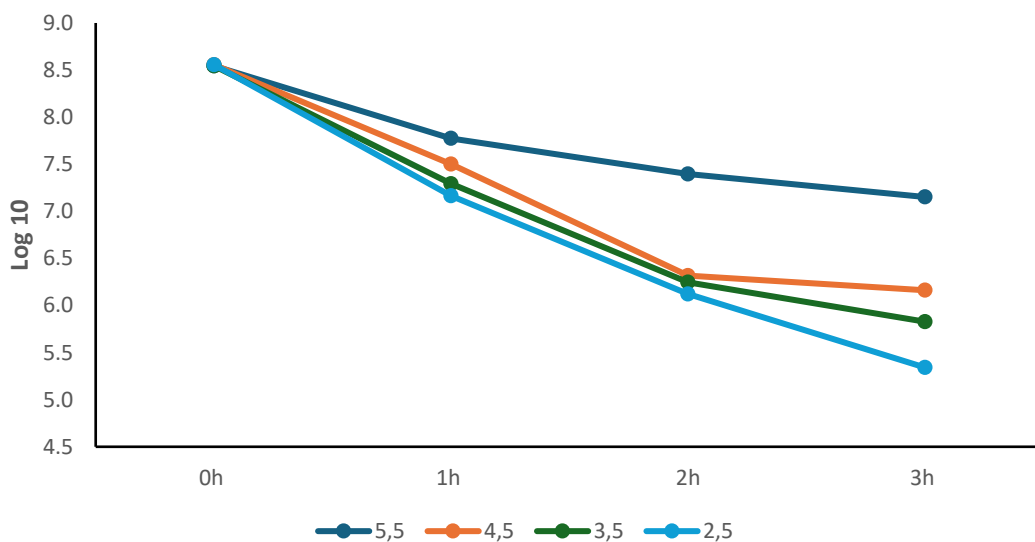
nửa khoảng 2 - 3 (Ioannis, 2016) thì nếu chủng *B. amyloliquefaciens* có khả năng sống sót trong điều kiện này sẽ là ưu điểm đáng kể cho chúng để được dùng như probiotic.

Mật độ tế bào sống sót sau 3 giờ ủ ở giá trị pH thấp duy trì ở mức 10^6 CFU/mL. Trong môi trường pH = 5,5, mật độ vi khuẩn vẫn duy trì ở mức $7,15 \pm 0,08$ log CFU/mL (tương ứng 83,71% so với ban đầu) sau 3 giờ. Tại giá trị pH = 4,5 tỉ lệ tế bào sống sót sau 1 giờ lên đến $7,50 \pm 0,03$ log

CFU/mL (tương ứng 87,66%). Sau 3 giờ ủ, tỉ lệ sống giảm xuống còn 72,02% (tương ứng mật độ vi khuẩn $6,16 \pm 0,08 \log \text{CFU/mL}$) (Hình 2). Do đó cho thấy điều kiện tương đối cao ($\text{pH} = 4,5$ và $\text{pH} = 5,5$), hoàn toàn không gây trở ngại cho hoạt động của vi khuẩn *B. amylo*.

Heo từ cai sữa đến trưởng thành pH sẽ giảm dần (còn khoảng từ 2 - 3) (Ioannis, 2016) do đó *B. amylo* cần phải sống sót qua điều kiện pH thấp ở dạ dày heo trưởng thành mới tiếp tục di chuyển đến ruột non và thể hiện vai trò có lợi của mình. Do vậy, ở giá trị $\text{pH} = 3,5$ tỉ lệ tế bào vi khuẩn sống sót có sự sụt giảm rõ rệt từ $7,29 \pm 0,05 \log \text{CFU/mL}$ (85,36%) sau 1 giờ ủ, còn $5,54 \pm 0,02$ (64,79%) sau 3 giờ ủ. Mật độ vi khuẩn *B. amylo*.

giảm đáng kể sau khi ủ trong môi trường có $\text{pH} = 2,5$, tỉ lệ tế bào vi khuẩn sống sót giảm sau 2 và 3 giờ ủ lần lượt là 71,55% và 62,43%, tương ứng với mật độ vi khuẩn $6,12 \pm 0,07 (\log \text{CFU/mL})$ $5,34 \pm 0,04 (\log \text{CFU/mL})$ (Hình 2). Vi khuẩn giảm mật độ rõ rệt khi gặp điều kiện pH thấp như trong dạ dày heo trưởng thành. Tuy nhiên mật độ này cũng còn khá cao, dĩ nhiên là còn tùy thuộc vào số lượng vi khuẩn ban đầu và các thành phần chất hữu cơ khác và thời gian thực tế mà thức ăn tồn tại ở dạ dày. Theo nghiên cứu của Guerin & ctv. (2001) thức ăn có thể tồn tại trong dạ dày heo khoảng 2 đến 4 giờ, cho nên kết quả này phần nào cũng khẳng định khả năng bền của *B. amylo* trong pH dạ dày của heo khi được dùng như probiotic.



Hình 2. Mật độ tế bào *B. amylo* trong môi trường ở các mức pH khác nhau theo thời gian.

3.3. Khả năng chống chịu môi trường dạ dày nhân tạo của *B. amylo*.

Dịch dạ dày nhân tạo của heo con có $\text{pH} = 4,5$, heo trưởng thành có $\text{pH} = 2,5$ với các nồng độ enzyme pepsin khác nhau: 0%, 0,2%, 0,3%.

Những điều kiện nồng độ pepsin khác nhau của thí nghiệm này thể hiện sự thay đổi dịch tiêu hoá của dạ dày tùy thuộc vào sự nguyên vẹn của tế bào phân tiết pepsin, sự điều hoà thần kinh thể dịch (Fimmel & Blum, 1984).

Bảng 1. Mật độ tế bào *B.amylo.* trong dịch dạ dày nhân tạo heo con (pH 4,5) ở các nồng độ pepsin khác nhau theo thời gian (n = 3)

Thời gian (giờ)	Pepsin 0%		Pepsin 0,2%		Pepsin 0,3%	
	Mật độ (log CFU/mL)	Tỷ lệ (%)	Mật độ (log CFU/mL)	Tỷ lệ (%)	Mật độ (log CFU/mL)	Tỷ lệ (%)
0	8,56 ± 0,06	100,00	8,56 ± 0,04	100,00	8,57 ± 0,05	100,00
1	7,50 ± 0,03	87,60	7,21 ± 0,06	84,24	6,96 ± 0,10	81,24
2	6,32 ± 0,08	73,78	6,12 ± 0,07	71,52	6,08 ± 0,06	70,90
3	6,16 ± 0,08	71,97	6,03 ± 0,11	70,47	5,82 ± 0,15	63,66

Mật độ vi khuẩn ở mức pepsin 0%, pH = 4,5 có giảm sau 2 và 3 giờ ủ ($6,32 \pm 0,08$ log CFU/mL và $6,16 \pm 0,08$ log CFU/mL). Ở môi trường có pepsin 0,2%, pH = 4,5 và môi trường pepsin 0,3%, pH = 4,5 cũng cho thấy mật độ vi khuẩn giảm dần sau 0, 1, 2 và 3 giờ ủ. Theo đó, mật độ vi khuẩn sau 3 giờ ủ lần lượt là 70,47% và 63,66% so với thời điểm ban đầu (Bảng 1). Có thể thấy mật độ vi khuẩn trong dịch dạ dày nhân tạo pH

= 4,5 ở cả 3 nồng độ pepsin 0%, 0,2%, 0,3% sau 3 giờ ủ đều đạt tiêu chuẩn 10^6 CFU/mL (ngoại trừ pepsin 0,3% pH = 4,5) nồng độ tối thiểu của một chế phẩm vi sinh để vi khuẩn phát huy tác dụng trong đường tiêu hoá (Kechagia & ctv., 2013). Tuy gặp trở ngại khi tăng nồng độ pepsin lên 0,3%, nhìn chung mật độ vi khuẩn vẫn duy trì ở ngưỡng tác động có lợi.

Bảng 2. Mật độ tế bào *B. amylo.* trong dịch dạ dày nhân tạo heo trưởng thành (pH = 2,5) ở các nồng độ pepsin khác nhau theo thời gian (n = 3)

Thời gian (giờ)	Pepsin 0%		Pepsin 0,2%		Pepsin 0,3%	
	Mật độ (log CFU/mL)	Tỷ lệ (%)	Mật độ (log CFU/mL)	Tỷ lệ (%)	Mật độ (log CFU/mL)	Tỷ lệ (%)
0	8,56 ± 0,03	100,00	8,56 ± 0,06	100,00	8,56 ± 0,02	100,00
1	7,16 ± 0,06	83,73	7,05 ± 0,02	82,43	6,88 ± 0,09	80,32
2	6,12 ± 0,07	71,55	5,92 ± 0,08	69,13	5,38 ± 0,12	62,77
3	5,34 ± 0,04	62,43	5,09 ± 0,08	59,44	4,73 ± 0,04	55,21

Điều kiện dịch dạ dày nhân tạo pH = 2,5 kết hợp với 3 nồng độ pepsin lần lượt là 0%, 0,2%, 0,3% không lí tưởng cho nhiều loài vi khuẩn. Nhưng kết quả cho thấy chủng *B. amylo.* có khả năng sống sót trên 50% trong các điều kiện thí

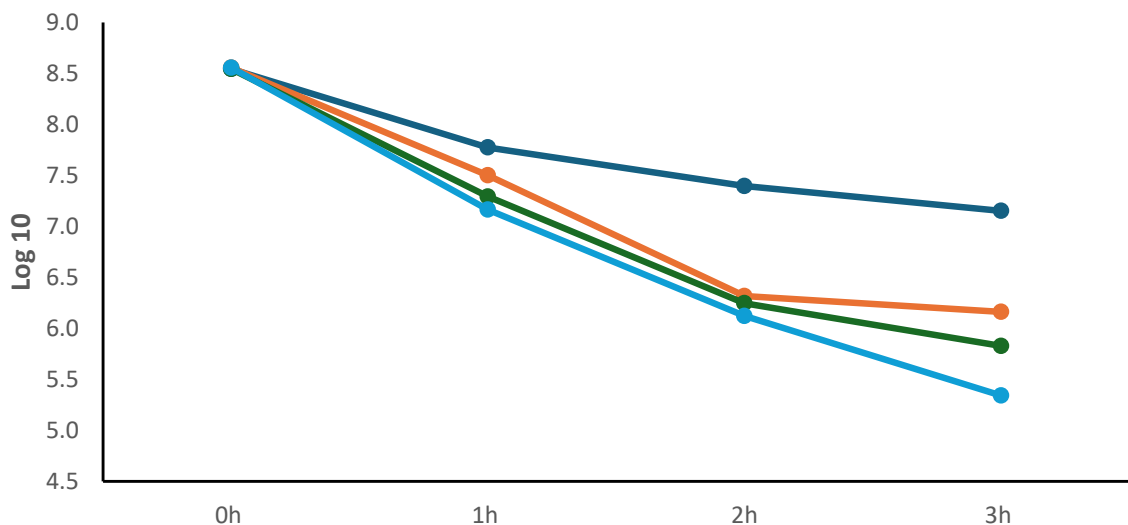
nghiệm khác nhau. Tỷ lệ sống sót giảm dần theo thời gian 0, 1, 2 và 3 giờ ủ. Trong môi trường pepsin 0%, pH = 2,5 quan sát thấy sự suy giảm mật độ vi khuẩn sau 1 giờ ủ là $7,16 \pm 0,06$ log CFU/mL (83,73%) sau 3 giờ ủ là $5,34 \pm 0,04$

log CFU/mL (62,43%). Sự suy giảm mật độ vi khuẩn tăng lên khi tăng nồng độ pepsin 0,2% pH = 2,5, cụ thể chỉ còn 59,44% sau 3 giờ. Tỷ lệ vi khuẩn sống sót ở nồng độ pepsin 0,3% pH = 2,5 duy trì khá tốt ở 80,32% sau 1 giờ ủ, tuy nhiên chỉ còn lại 55,21% sau 3 giờ ủ (Bảng 2). *Bacillus amyloliquefaciens* hoàn toàn có khả năng vượt qua được hàng rào dạ dày nhân tạo nhờ sức chống chịu của mình.

3.4. *Bacillus amyloliquefaciens* trong môi trường bổ sung muối mật

Muối mật lại có tác dụng kiểm soát thành phần đường ruột giúp cân bằng hệ vi sinh vật phong phú (Urdaneta & Casadesús, 2017) bị ức chế bởi muối mật, làm cho vi khuẩn không thể xâm lấn vào biểu mô hồi tràng (Prouty & Gunn, 2000). Muối mật cũng làm giảm sự biểu hiện gen gây bệnh trên tế bào ruột của vi khuẩn *E. coli* O157:H7 gây xuất huyết đường ruột (Hamner & ctv., 2013). Những tác động của muối mật lên vi khuẩn rất đa dạng, bao gồm cả sự phá vỡ màng tế bào vi khuẩn, gây tổn thương acid nucleic, biến tính protein, và tạo phức với sắt, canxi để ngăn sự phát triển của vi khuẩn. Các loài vi khuẩn

đường ruột ở động vật có vú chỉ tồn tại được khi chúng có khả năng kháng mật để có thể tự bảo vệ khỏi những thương tổn do mật gây ra (Urdaneta & Casadesús, 2017). Trong thí nghiệm này, mật độ vi khuẩn ở các nồng độ muối mật khác nhau được theo dõi theo thời gian ở Hình 3. Ở nồng độ muối mật 0%, mật độ vi khuẩn duy trì ổn định > 95%, sau 3 giờ ủ vẫn đạt mức $8,16 \pm 0,05$ log CFU/mL (95,43%). Trong điều kiện môi trường 0,3% muối mật, vi khuẩn *B. amylo.* vẫn thể hiện khả năng thích nghi khá tốt thông qua mật độ sau 1 giờ ủ là $7,91 \pm 0,12$ log CFU/mL (92,51%), sau 3 giờ, mật độ vi khuẩn giảm còn $6,33 \pm 0,05$ (74,07%). Khi tăng nồng độ muối mật lên 0,6%, sự giảm mật độ vi khuẩn thấy rõ sau 1, 2, 3 giờ ủ, tuy vậy vẫn đạt mức $5,24 \pm 0,07$ (log CFU/mL) tương đương 61,34% với tỉ lệ tế bào vi khuẩn sống sót này, vẫn đảm bảo số lượng vi khuẩn tối thiểu ($> 10^6$ CFU/mL) để phát huy công dụng của một chế phẩm vi sinh trên hệ tiêu hoá của heo. Trong một nghiên cứu khác, *B. amylo.* TL106 được phân lập từ lợn Tây Tạng cũng có khả năng sống sót lên đến 50% trong điều kiện invitro với muối mật 0,6% (Haitao, 2021). Có thể thấy rằng, *B. amylo.* đã thể hiện ưu điểm của mình thông qua việc duy trì mật độ vi khuẩn trong nồng độ muối mật cao.

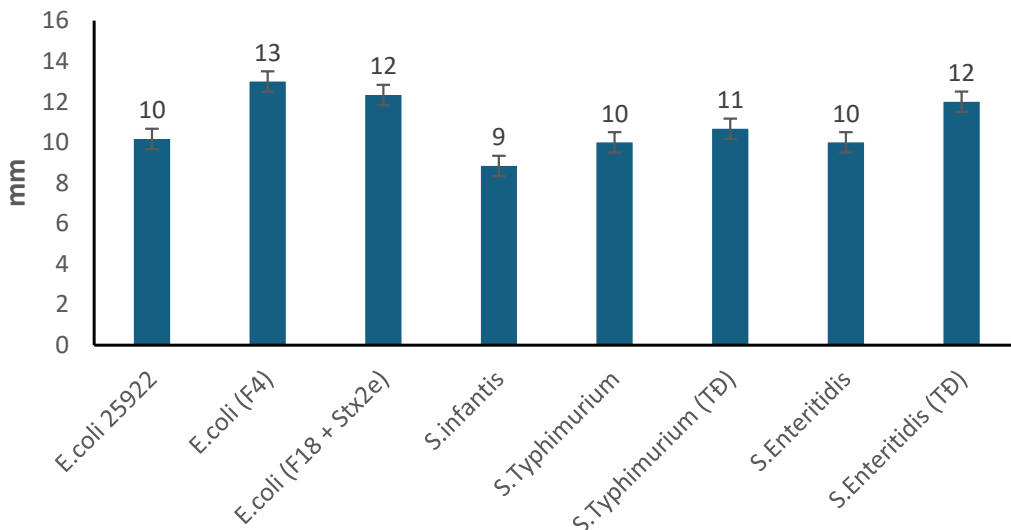


Hình 3. Mật độ tế bào *Bacillus amyloliquefaciens* ở các nồng độ muối mật khác nhau.

3.5. Khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh của *B. amylo*.

Bacteriocin là peptide kháng khuẩn được tiết ra bởi một số loài vi khuẩn, có khả năng gây chết các vi khuẩn khác. Một số nghiên cứu cho rằng bacteriocin được tạo ra bởi một số loài vi khuẩn trong đường ruột, và đó là phương tiện để chúng cạnh tranh trong môi trường có hệ vi sinh vật đa dạng này (Joerger, 2003). *B. amyloliquefaciens* thể hiện khả năng kháng khuẩn đáng kể chống lại nhiều loại vi khuẩn và nấm so với chủng *Bacillus* khác (Kadaikunnan & ctv., 2015). Một

nghiên cứu cho thấy bacteriocin do vi khuẩn gram dương tạo ra chủ yếu có tác dụng ức chế đối với vi khuẩn gram dương và ít hiệu quả hơn đối với vi khuẩn gram âm (Gray & ctv., 2006). Tuy nhiên, một nghiên cứu khác chỉ ra rằng bacteriocin của vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* RX7 ức chế sự phát triển của nhiều loài vi khuẩn Gram dương khác nhau, bao gồm *B. cereus*, *S. aureus* và *L. monocytogenes*, vi khuẩn Gram âm như: *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. enteritidis*, và *S. gallinarum* (Lim & ctv., 2016). Trong nghiên cứu này, *B. amylo*. thể hiện khả năng kháng các vi khuẩn gram âm hiệu quả (Hình 4).

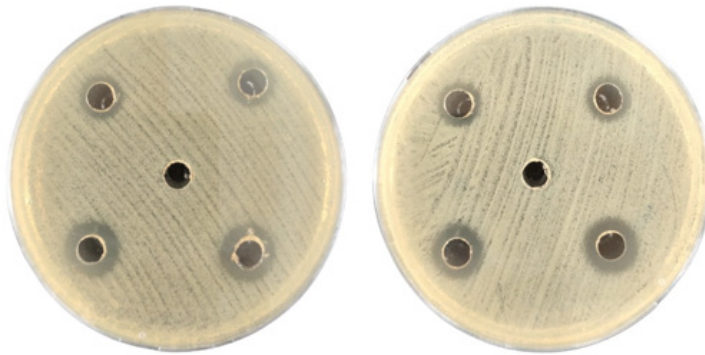


Hình 4. Khả năng kháng khuẩn của dịch chiết từ *Bacillus amyloliquefaciens*.

Thí nghiệm được thiết kế có mẫu đối chứng âm (không chứa tác nhân kháng khuẩn) và mẫu chứa dịch chiết canh khuẩn để kiểm tra khả năng kháng khuẩn. Kết quả cho thấy, hoạt tính ức chế vi khuẩn tăng trưởng lớn nhất của *B. amylo*. được ghi nhận đối với *E. coli* thực địa có yếu tố bám F4, đường kính vòng vô khuẩn là $13 \pm 2,6$ mm. Tiếp theo là *E. coli* thực địa có yếu tố bám F18 + Stx2e và *Salmonella* Enteritidis thực địa với đường kính vòng vô khuẩn lần lượt là $12 \pm 2,1$ mm và $12 \pm 2,2$ mm. *Salmonella* Typhimurium thực địa có vòng vô khuẩn lần lượt là $11 \pm 0,6$ mm. Cho thấy rằng *B. amylo*. tạo ra vòng vô khuẩn lớn hơn

đối chứng âm, điều này củng cố khả năng kháng khuẩn từ hoạt động kháng khuẩn thực sự của nó.

Vòng vô khuẩn có giá trị là 10 mm được quan sát thấy với chủng vi khuẩn *E. coli* 25922, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Salmonella* Enteritidis WHO 2014 (Hình 5). Hoạt tính ức chế vi khuẩn *Salmonella* Infantis ở mức thấp nhất với vòng vô khuẩn là $9 \pm 1,4$ mm. Kết quả này có sự khác biệt so với nghiên cứu về *B. amylo*. TL106, đường kính vòng ức chế vi khuẩn *E. coli* và *Salmonella* lần lượt là 15 mm và 14 mm (Haitao, 2021).



Hình 5. Khả năng kháng vi khuẩn *E. coli* (F4) (bên trái) và *Salmonella* Enteritidis (bên phải).

Đường kính các vòng vô khuẩn của *B.amylo.* trong thí nghiệm giao động từ 9 đến 13 mm tùy theo chủng vi khuẩn. Tuy nhiên, mức này cho thấy *B. amyloliquefaciens* có khả năng kháng khuẩn nhưng không mạnh (James, 2023). Có thể tăng nồng độ hoặc điều chỉnh môi trường để kiểm tra xem có thể cải thiện hiệu quả kháng khuẩn không.

Cho đến nay, sự phát triển của các loại kháng sinh mới vẫn chưa đủ nhanh để kiểm soát để kháng kháng sinh. Bacteriocin có thể là một giải pháp thay thế hữu hiệu. Tuy nhiên, cần tiến hành thêm các nghiên cứu để đánh giá lâm sàng, cơ chế hoạt động, tác động đến hệ thống miễn dịch của vật chủ và hệ vi sinh vật, chi phí sản xuất quy mô lớn cũng như sự xuất hiện của tình trạng kháng bacteriocin.

4. Kết Luận

Bacillus amyloliquefaciens có các đặc tính sinh học tốt với khả năng chịu đựng được các điều kiện giả định trong phòng thí nghiệm: nhiệt độ cao, pH thấp, muối mật, dịch dạ dày nhân tạo. Mật độ vi khuẩn sau khi thử nghiệm vẫn đảm bảo trên 10^6 CFU/mL giúp vi khuẩn duy trì tác động tích cực lên hệ vi sinh vật đường ruột. Vi khuẩn có hoạt tính sinh học kháng vi khuẩn gram âm gây bệnh là *E. coli* và *Salmonella*. *Bacillus amyloliquefaciens* thể hiện tiềm năng trở

thành một chế phẩm vi sinh an toàn, hiệu quả, lựa chọn mới thay thế kháng sinh bổ sung vào thức ăn để phòng bệnh cho đàn vật nuôi thân thiện với sức khỏe con người.

Lời Cam Đoan

Chúng tôi cam đoan bài báo do nhóm tác giả thực hiện và không có bất kỳ mâu thuẫn nào giữa các tác giả.

Lời Cảm Ơn

Trân trọng cảm ơn phòng thí nghiệm Kiểm nghiệm Súc sản, Môi trường và Sức khỏe vật nuôi, Khoa Chăn nuôi Thú Y, Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM đã tạo điều kiện tốt nhất về trang thiết bị, cung cấp chủng giống vi khuẩn để hoàn thiện đề tài.

Tài Liệu Tham Khảo (References)

- Bergey, D. H., Holt, J. G., & Bergey, D. H. (2000). *Bergey's manual of determinative bacteriology* (9th ed.). Pennsylvania, USA: Lippincott Williams and Wilkins.
- Centner, T. J. (2016). Recent government regulations in the United States seek to ensure the effectiveness of antibiotics by limiting their agricultural use. *Environment International* 94, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.04.018>.

- Cho, W. I., & Chung, M. S. (2020). Bacillus spores: A review of their properties and inactivation processing technologies. *Food Science and Biotechnology* 29(11), 1447-1461. <https://doi.org/10.1007/s10068-020-00809-4>.
- Dayan, A. D. (1993). Allergy to antimicrobial residues in food: Assessment of the risk to man. *Veterinary Microbiology* 35(3-4), 213-226. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(93\)90146-x](https://doi.org/10.1016/0378-1135(93)90146-x).
- Dibner, J. J., & Richards, J. D. (2005). Antibiotic growth promoters in agriculture: History and mode of action. *Poultry Science* 84(4), 634-643. <https://doi.org/10.1093/ps/84.4.634>
- Du, H., Yao, W., Kulyar, M. F. A., Ding, Y., Zhu, H., Pan, H., Li, K., Bhutta, Z. A., Liu, S., & Li, J. (2022). Effects of bacillus amyloliquefaciens TL106 isolated from tibetan pigs on probiotic potential and intestinal microbes in weaned piglets. *Microbiology Spectrum* 10(1), e01205-01221. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01205-21>.
- Farias, B. C. S., Hissa, D. C., do Nascimento, C. T. M., Oliveira, S. A., Zampieri, D., Eberlin, M. N., Migueleti, D. L. S., Martins, L. F., Sousa, M. P., Moyses, D. N., & Melo, V. M. M. (2018). Cyclic lipopeptide signature as fingerprinting for the screening of halotolerant bacillus strains towards microbial enhanced oil recovery. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102(3), 1179-1190. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8675-9>.
- Fimmel, C. J., & Blum, A. L. (1984). Pepsin secretion: Neurohumoral regulation and drug effects. *Scandinavian Journal of Gastroenterology Supplement* 101, 39-46.
- GOV (Government of the Socialist Republic of Viet Nam). (2023). Decision No. 1121/QĐ-TTg of the Prime Minister dated on September 25, 2023. Approving the national strategy on prevention and control of antimicrobial resistance in Vietnam for the period 2023 - 2030, with a vision to 2045. Retrieved May 26, 2024, from <http://vanban.chinhphu.vn/?pageid=27160&docid=208701>.
- Gray, E. J., Lee, K. D., Souleimanov, A. M., Di Falco, M. R., Zhou, X., Ly, A., Charles, T. C., Driscoll, B. T., & Smith, D. L. (2006). A novel bacteriocin, thuricin 17, produced by plant growth promoting rhizobacteria strain bacillus thuringiensis NEB17: Isolation and classification. *Journal of Applied Microbiology* 100(3), 545-554. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02822.x>.
- Haitao, D. (2021). *Effects of bacillus amyloliquefaciens TL106 isolated from tibetan pigs on probiotic potential and intestinal microbes in weaned piglets-PMC*. Retrieved May 26, 2024, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8791190/>.
- Hamner, S., McInnerney, K., Williamson, K., Franklin, M. J., & Ford, T. E. (2013). Bile salts affect expression of escherichia coli O157:H7 genes for virulence and iron acquisition, and promote growth under iron limiting conditions. *Plos One* 8(9), e74647. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074647>.
- Hu, Y. J., & Cowling, B. J. (2020). Reducing antibiotic use in livestock, China. *Bulletin of The World Health Organization* 98(5), 360-361. <https://doi.org/10.2471/BLT.19.243501>.
- Ioannis, M. (2016). *How piglet gastric pH development affects gut health*. Retrieved May 26, 2024, from <https://www.wattagnet.com/broilers-turkeys/poultry-nutrition-formulation/article/15517867/how-piglet-gastric-ph-development-affects-gut-health-wattagnet>.
- James, S. L. II. (2023). *M100-Performance standards for antimicrobial susceptibility testing* (33rd ed.). Pennsylvania, USA: CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Jeon, H. L., Lee, N. K., Yang, S. J., Kim, W. S., & Paik, H. D. (2017). Probiotic characterization of bacillus subtilis P223 isolated from kimchi. *Food Science and Biotechnology* 26(6), 1641-1648. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0148-5>.

- Joerger, R. D. (2003). Alternatives to antibiotics: Bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. *Poultry Science* 82(4), 640-647. <https://doi.org/10.1093/ps/82.4.640>.
- Kadaikunnan, S., Rejiniemon, T., Khaled, J. M., Alharbi, N. S., & Mothana, R. (2015). In-vitro antibacterial, antifungal, antioxidant and functional properties of bacillus amyloliquefaciens. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 14, 9. <https://doi.org/10.1186/s12941-015-0069-1>.
- Kasimanickam, V., Kasimanickam, M., & Kasimanickam, R. (2021). Antibiotics use in food animal production: Escalation of antimicrobial resistance: Where are we now in combating AMR? *Medical Sciences* 9(1), 14. <https://doi.org/10.3390/medsci9010014>.
- Kechagia, M., Basoulis, D., Konstantopoulou, S., Dimitriadi, D., Gyftopoulou, K., Skarmoutsou, N., & Fakiri, E. M. (2013). Health benefits of probiotics: A review. *ISRN Nutrition* 2013, 481651. <https://doi.org/10.5402/2013/481651>.
- Lim, K. B., Balolong, M. P., Kim, S. H., Oh, J. K., Lee, J. Y., & Kang, D. K. (2016). Isolation and characterization of a broad spectrum bacteriocin from *Bacillus amyloliquefaciens* RX7. *BioMed Research International* 2016, e8521476. <https://doi.org/10.1155/2016/8521476>.
- Lund, P. A., De Biase, D., Liran, O., Scheler, O., Mira, N. P., Cetecioglu, Z., Fernández, E. N., Bover-Cid, S., Hall, R., Sauer, M., & O'Byrne, C. (2020). Understanding how microorganisms respond to acid pH is central to their control and successful exploitation. *Frontiers in Microbiology* 11, 556140. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.556140>.
- Luo, Y., Ren, W., Smidt, H., Wright, A. D. G., Yu, B., Schyns, G., McCormack, U. M., Cowieson, A. J., Yu, J., He, J., Yan, H., Wu, J., Mackie, R. I., & Chen, D. (2022). Dynamic distribution of gut microbiota in pigs at different growth stages: composition and contribution. *Microbiology Spectrum* 10(3), e00688-21. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00688-21>.
- Mingmongkolchai, S., & Panbangred, W. (2018). Bacillus probiotics: An alternative to antibiotics for livestock production. *Journal of Applied Microbiology* 124(6), 1334-1346. <https://doi.org/10.1111/jam.13690>.
- Prouty, A. M., & Gunn, J. S. (2000). Salmonella enterica serovar typhimurium invasion is repressed in the presence of bile. *Infection and Immunity* 68(12), 6763-6769.
- Stein, T. (2005). Bacillus subtilis antibiotics: Structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology* 56(4), 845-857. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x>.
- Urdaneta, V., & Casadesús, J. (2017). Interactions between bacteria and bile salts in the gastrointestinal and hepatobiliary tracts. *Frontiers in Medicine* 4, 163. <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00163>.
- Zhu, J., Chen, Y., Imre, K., Arslan-Acaroz, D., Istanbulgil, F. R., Fang, Y., Ros, G., Zhu, K., & Acaroz, U. (2023). Mechanisms of probiotic bacillus against enteric bacterial infections. *One Health Advances* 1, 21. <https://doi.org/10.1186/s44280-023-00020-0>.