

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN CÁC CHỦNG *Bacillus amyloliquefaciens* CÓ KHẢ NĂNG ĐỐI KHÁNG VỚI VI KHUẨN *Salmonella gallinarum*

**Hoàng Minh Đức, Nguyễn Thị Thu Hằng, Nguyễn Thị Lan,
Cam Thị Thu Hà, Trần Thị Khánh Hoà, Phạm Thuỳ Linh, Hoàng Minh Sơn***

Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

*Tác giả liên hệ: hson@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 10.02.2025

Ngày chấp nhận đăng: 30.12.2025

TÓM TẮT

Probiotics là một trong những chế phẩm sinh học phổ biến nhất sử dụng để thay thế kháng sinh nhằm mục đích phòng bệnh và kích thích sinh trưởng cho vật nuôi. Vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* (*B. amyloliquefaciens*) được biết đến với nhiều đặc tính phù hợp để tạo chế phẩm probiotics bao gồm khả năng đề kháng với nhiệt độ cao, pH thấp, muối mật và sản sinh chất kháng khuẩn. Nghiên cứu này được thực hiện với mục đích phân lập và tuyển chọn vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* có khả năng đối kháng với vi khuẩn *Salmonella gallinarum* gây bệnh thương hàn gà. Kết quả nghiên cứu đã phân lập và định danh được 4 chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* từ 100 mẫu phân của gà khỏe mạnh bằng phương pháp nuôi cấy và công nghệ khối phổ MALDI TOF. Tất cả chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* phân lập đều không gây dung huyết trên thạch máu và có tính ổn định cao trong môi trường bất lợi (pH = 3,0 và muối mật 0,3%) với tỷ lệ sống sót > 80%. Kết quả kiểm tra tính miễn cảm với kháng sinh cho thấy cả 4/4 (100%) các chủng *B. amyloliquefaciens* phân lập đều có khả năng kháng tetracycline và 3/4 (75%) chủng kháng erythromycin. Các chủng phân lập cũng thể hiện tính đối kháng cao với vi khuẩn *Salmonella gallinarum* (*S. gallinarum*) trong điều kiện phòng thí nghiệm, tạo ra vòng vô khuẩn với đường kính >16 mm.

Từ khóa: Chế phẩm sinh học, kháng kháng sinh, thương hàn gà.

Isolation and Selection of *Bacillus amyloliquefaciens* Strains Antagonistic Against *Salmonella gallinarum*

ABSTRACT

Probiotics are one of the most popular alternatives to antibiotics for disease prevention and growth promotion in livestock. *Bacillus amyloliquefaciens* (*B. amyloliquefaciens*) possesses several characteristics suitable for probiotics, including resistance to high temperatures, low pH, bile salts, and antagonism against pathogens. This study was conducted to isolate and select *B. amyloliquefaciens* strains antagonistic against *Salmonella gallinarum* (*S. gallinarum*), which causes Salmonellosis. The result showed that four *B. amyloliquefaciens* strains were isolated and identified from 100 fresh fecal samples of healthy chickens using the culture methods and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time-of-Flight (MALDI-TOF) technology. The isolates were not hemolytic on blood agar and exhibited high stability in adverse conditions (pH 3.0 and 0.3% bile salt), with a survival rate greater than 80%. The results of the antimicrobial susceptibility test revealed that all 4/4 (100%) of the *B. amyloliquefaciens* isolates were resistant to tetracycline and 3/4 (75%) were resistant to erythromycin. The isolates also exhibited strong antagonism against *S. gallinarum* *in vitro*, producing inhibition zones with diameters greater > 16 mm.

Keywords: Probiotics, antimicrobial resistance, salmonellosis.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi khuẩn *Salmonella gallinarum* có khả năng gây bệnh thương hàn trên gà với tỷ lệ mắc và tỷ lệ chết cao ở gà mọi lứa tuổi (Rodrigues &

cs., 2024). Gà mắc bệnh thường xuất hiện các triệu chứng như phân lỏng, màu trắng có nhiều dịch nhầy, phân bết dính hậu môn, khi bệnh chuyển nặng gà không đi ngoài được dẫn đến chướng bụng, khớp viêm, sưng to khiến gà đi lại

khó khăn và giảm sản lượng trứng (Barrow & Freitas, 2011). Theo Tổ chức Thú y Thế giới, bệnh thương hàn là một trong những bệnh gây thiệt hại nghiêm trọng đến ngành chăn nuôi gia cầm trên thế giới cần được giám sát và kiểm soát (OIE, 2023). Thông qua các biện pháp kiểm soát và cải thiện điều kiện vệ sinh giết mổ, phần lớn bệnh thương hàn gà gần như đã được loại trừ ở châu Âu và Bắc Mỹ; nhưng tại châu Phi và châu Á, vi khuẩn *S. gallinarum* vẫn chưa được kiểm soát (Michael & cs., 2001). Đáng chú ý, sự lây lan vi khuẩn *S. gallinarum* kháng kháng sinh dẫn đến điều trị bệnh thương hàn trở nên khó khăn hơn và làm tăng tỷ lệ tử vong ở đàn gia cầm (Farahani & cs., 2023). Từ đó, thúc đẩy việc tìm kiếm các biện pháp kiểm soát mới để chống lại *S. gallinarum* đa kháng kháng sinh.

Probiotics được biết đến là lợi khuẩn có khả năng cải thiện hệ thống miễn dịch, ức chế và kháng lại các vi khuẩn gây bệnh khi được bổ sung với lượng vừa đủ (Ismat & cs., 2021). Chế phẩm sinh học có nguồn gốc từ *Bacillus* đang được sử dụng rộng rãi và là một trong những giải pháp thay thế kháng sinh đầy hứa hẹn trong chăn nuôi nhằm giảm thiểu tình trạng kháng kháng sinh (Mingmongkolchai & Panbangred, 2018). Trong đó, *B. amyloliquefaciens* là một loại probiotics tiềm năng trong kiểm soát mầm bệnh, cải thiện hiệu suất tăng trưởng và chức năng miễn dịch ở vật nuôi (Aikun & cs., 2019). Nhờ khả năng sản xuất một số enzyme ngoại bào, bao gồm α -amylase, cellulase và protease giúp tăng cường khả năng tiêu hóa và hấp thu chất dinh dưỡng (Lee & cs., 2008). Bên cạnh đó, *B. amyloliquefaciens* sản xuất các hoạt chất kháng khuẩn có khả năng tiêu diệt vi khuẩn gây bệnh như axit hữu cơ, bacteriocin (Chang & cs., 2015; Siahmoshteh & cs., 2017; Afrin & Bhuiyan, 2019). Một số nghiên cứu trước đây cũng đã chỉ ra *B. amyloliquefaciens* có khả năng đối kháng với vi sinh vật gây bệnh. *B. amyloliquefaciens* thể hiện hoạt động đối kháng nhiều loại vi khuẩn Gram âm (*Salmonella Typhi*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Vibrio parahemolyticus*) và vi khuẩn Gram dương

(*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*); ngoài ra chủng vi khuẩn này sản xuất các chất có hoạt tính kháng nấm mạnh đã được báo cáo trong nghiên cứu của Afrin & Bhuiyan (2019). Theo nghiên cứu của Ahmed & cs. (2014), việc bổ sung men vi sinh *B. amyloliquefaciens* vào khẩu phần ăn giúp cải thiện hiệu suất tăng trưởng ở gà, ức chế sự phát triển của nhiều loại mầm bệnh bao gồm cả vi khuẩn và nấm (Afrin & Bhuiyan, 2019). Tại Việt Nam, nghiên cứu của Lê Lưu Phương Hạnh & cs. (2021) cũng cho thấy *B. amyloliquefaciens* có khả năng đối kháng với các chủng vi khuẩn gây bệnh gan thận mủ và xuất huyết trên cá tra. Nghiên cứu khác của tác giả Nguyễn Duy Linh & cs. (2025) cho thấy vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* có khả năng kháng lại các loại vi khuẩn Gram âm 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.

Mặc dù, trước đây đã có nhiều nghiên cứu chứng minh lợi ích của việc bổ sung *B. amyloliquefaciens* trong chăn nuôi và thủy sản. Tuy nhiên, theo hiểu biết của chúng tôi đến nay chưa có nghiên cứu báo cáo liên quan đến khả năng kiểm soát vi khuẩn *S. gallinarum* của *B. amyloliquefaciens*. Vì vậy, nghiên cứu này được tiến hành nhằm mục đích phân lập, tuyển chọn và đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn *S. gallinarum* gây bệnh thương hàn gà của các chủng *B. amyloliquefaciens*.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Mẫu nghiên cứu: Phân gà tươi (100 mẫu) được thu thập từ các trại không sử dụng chế phẩm vi sinh trong khẩu phần ăn trên địa bàn thành phố Hà Nội.

- Môi trường nuôi cấy vi khuẩn của hãng Merck, Đức: Tryptone Soya Agar (TSA, 105458), Brain Heart Infusion (BHI, 1104930500), Mueller Hinton Broth (MHB, 70192).

Hóa chất: Phosphate-Buffered Saline (PBS, P4474-500ml, Sigma - Mỹ), Glycerol (1040942500, Merck - Đức), HCl (1099730001, Merck - Đức), NaOH (106498, Merck - Đức), Bile Salt (48305, Merck - Đức), dNTPs - deoxynucleoside triphosphate (1708874, Bio-rad, Mỹ), Taq polymerase (10342053, Invitrogen - Mỹ), Taq Buffer - (NH₄)₂SO₄ (B333, Thermo - Mỹ), Sodium EDTA (EB0185, BioBasic - Canada), Primer định danh *Bacillus*, Agarose (A9539, Sigma - Mỹ), DNA gel loading dye (R0611, Thermo - Mỹ), SalagenTM 100bp DNA ladder (TEP100-500, Salagen - Việt Nam), Ethidium Bromide (15585-011, Invitrogen - Mỹ), Tris-Acetate-EDTA (TAE) (B49, Thermo - Mỹ).

- Kháng sinh: ampicillin (59349-100MG, Merck - Đức), meropenem (PHR1772-500MG, Merck - Đức), gentamicin (G1264-1G, Sigma - Mỹ), erythromycin (E5389, Sigma - Mỹ), tetracycline (T4062-1G, Sigma - Mỹ), ciprofloxacin (33434-100MG-R, Merck - Đức), clindamycin (C5269-100MG, Merck - Đức), trimethoprim (T7883, Sigma - Mỹ), sulfamethoxazole (S7507-10G, Merck - Đức), chloramphenicol (31667, Sigma - Mỹ).

- Chủng vi khuẩn *S. gallinarum* được phân lập và giữ giống tại phòng nghiên cứu Vi sinh vật Thú y, Trung tâm Nghiên cứu Xuất sắc và Đổi mới sáng tạo, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

2.2. Địa điểm và thời gian

- Địa điểm: Mẫu được phân tích tại phòng nghiên cứu Vi sinh vật Thú y, Trung tâm Nghiên cứu Xuất sắc và Đổi mới sáng tạo, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

- Thời gian: từ tháng 2 năm 2023 đến tháng 7 năm 2024.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Thu thập mẫu

Tổng 100 mẫu phân gà tươi (1 mẫu phân/gà) được thu thập từ 10 trang trại trên địa bàn thành phố Hà Nội. Dùng tấm bông vô trùng đưa nhẹ nhàng vào khoảng 1-2cm trong lỗ huyết, xoay nhẹ để lấy phân/dịch phân rồi cho

vào túi. Mỗi mẫu được đựng trong túi zip, ký hiệu tên riêng, thời gian, địa điểm lấy mẫu và bảo quản lạnh ở nhiệt độ 2-8°C, vận chuyển về phòng thí nghiệm để tiến hành nuôi cấy trong vòng 24h.

2.3.2. Phân lập và định danh vi khuẩn *B. amyloliquefaciens*

Các mẫu phân được đồng nhất với dung dịch đệm PBS theo tỷ lệ 1:9, ủ ở nhiệt độ 80°C trong vòng 15 phút. Mẫu sau ủ được ria trên môi trường thạch TSA, ủ ở 37°C trong 24h. Trên môi trường TSA, khuẩn lạc *B. amyloliquefaciens* màu trắng/trắng kem, rìa không đều, bề mặt khô và hơi nhô lên. Chọn những khuẩn lạc đặc trưng, cấy chuyển sang môi trường BHI, ủ ở 37°C trong 24h và tiến hành nhuộm Gram. Tiếp đó, công nghệ khối phổ MALDI TOF được sử dụng để xác định loài *B. amyloliquefaciens* từ các chủng vi khuẩn phân lập được. Cụ thể, khuẩn lạc được phết trên đĩa mục tiêu (MBT Biotarget 96). Axit formic 70% (1μl) sau đó được nhỏ vào vị trí đã phết khuẩn lạc, để khô tự nhiên trước khi tiến hành nhỏ Matrix (1μl). Đĩa được để khô tự nhiên ở nhiệt độ phòng trong 5 phút trước khi đưa vào hệ thống máy để định danh. Điểm giá trị score $\geq 2,0$ được coi là tin cậy để xác định đến loài.

2.3.3. Kiểm tra khả năng gây dung huyết của các chủng *B. amyloliquefaciens*

Khả năng gây dung huyết được thực hiện theo mô tả bởi Ritter & cs. (2018) với một số điều chỉnh, cụ thể như sau: các chủng *B. amyloliquefaciens* sau khi tăng sinh trong BHI được ria cấy lên môi trường thạch máu 5%, ủ ở 37°C trong vòng 24h. Khả năng dung huyết được phân loại bằng cách quan sát các vùng xung quanh khuẩn lạc: có quầng tông màu xanh lục xung quanh khuẩn lạc (dung huyết α); quầng trong suốt, rõ ràng xung quanh khuẩn lạc (dung huyết β) và không có quầng xung quanh khuẩn lạc (dung huyết γ). *Bacillus cereus* KCTC 1012 được sử dụng làm đối chứng dương tính đối với tình trạng tan máu. Các chủng không có hiện tượng dung huyết xảy ra trên thạch máu (dung huyết γ) được lựa chọn để tiếp tục nghiên cứu.

Bảng 1. Giá trị điểm nhạy cảm giới hạn của *Bacillus* spp.

Nhóm kháng sinh	Tên kháng sinh	Ký hiệu	Giá trị điểm nhạy cảm giới hạn (µg/ml)
Penicillins	ampicillin	AMP	0,5
Carbapenems	meropenem	MEM	16
Aminoglycosides	gentamicin	GEN	16
Macrolides	erythromycin	ERY	8
Tetracyclines	tetracycline	TET	16
Fluoroquinolones	ciprofloxacin	CIP	4
Lincosamides	clindamycin	CLI	4
Folate Pathway Inhibitors	trimethoprim-sulfamethoxazole	SXT	4/76
Phenicol	chloramphenicol	CHL	32

2.3.4. Đánh giá tính ổn định của *B. amyloliquefaciens*

Tính ổn định của *B. amyloliquefaciens* được thực hiện dựa trên phương pháp mô tả bởi Golnari & cs. (2024) với một số điều chỉnh: Cấy chuyển canh khuẩn *B. amyloliquefaciens* lần lượt vào môi trường PBS đã được điều chỉnh pH = 3,0 và PBS đã được bổ sung muối mật 0,3%, sau đó ủ ở 37°C trong 3h. Trước và sau ủ, 100µl mẫu được lấy ra, pha loãng theo cơ số 10 với dung dịch đệm PBS. Mẫu (100µl) ở các độ pha loãng thích hợp được láng trên thạch TSA, ủ qua đêm ở 37°C. Ngày hôm sau, xác định được lượng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* trước và sau khi ủ trong 3h ở điều kiện pH = 3,0 và muối mật 0,3%. Tỷ lệ sống sót của *amyloliquefaciens* trong các điều kiện kiểm tra được xác định bằng công thức sau:

$$\text{Tỷ lệ sống sót (\%)} = \frac{\text{Số lượng khuẩn lạc sau khi ủ 3h (CFU/ml)}}{\text{Số lượng khuẩn lạc trước khi ủ (CFU/ml)}} \times 100$$

2.3.5. Xác định khả năng kháng kháng sinh của các chủng *B. amyloliquefaciens*

Khả năng kháng kháng sinh của *B. amyloliquefaciens* được thực hiện bằng phương pháp pha loãng canh thang để xác định nồng độ ức chế tối thiểu (Minimum Inhibitory Concentration - MIC). Kháng sinh lựa chọn sử dụng trong thí nghiệm dựa theo hướng dẫn của Viện Tiêu chuẩn Lâm sàng và phòng thí nghiệm (CLSI, 2015).

2.3.6. Đánh giá khả năng đối kháng với *S. gallinarum* của *B. amyloliquefaciens*

Khả năng đối kháng của *B. amyloliquefaciens* với vi khuẩn *S. gallinarum* gây bệnh thương hàn gà được xác định bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch dựa trên mô tả của Shubham & cs. (2021) với một số điều chỉnh. Các chủng *B. amyloliquefaciens* được tăng sinh trong môi trường BHI, tiến hành ly tâm và lọc qua màng 0,22µm để thu dịch nổi CFS (Cell Free Supernatant) chứa chất kháng khuẩn. Canh khuẩn *S. gallinarum* được trộn với thạch mềm BHI và phủ lên bề mặt đĩa chứa TSA, sau đó tạo giếng (5mm), cho 100µl CFS vào từng giếng, đĩa được ủ 37°C/18h. Đánh giá khả năng đối kháng dựa trên đường kính vòng vô khuẩn: < 6mm (không tạo vòng vô khuẩn): âm tính, 6-10mm: đối kháng yếu, 11-16mm: đối kháng trung bình, > 16mm: đối kháng mạnh (Jini & cs., 2011).

2.3.7. Xử lý số liệu

Số liệu được tổng hợp, tính toán và vẽ đồ thị trong phần mềm Microsoft Office Excel

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập vi khuẩn *B. amyloliquefaciens*

Trong nghiên cứu này, tổng cộng 4 chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* được phân lập từ 100 mẫu phân gà. Các chủng *B. amyloliquefaciens* phân lập được có khuẩn lạc trắng/trắng kem, rìa không đều, bề mặt khô

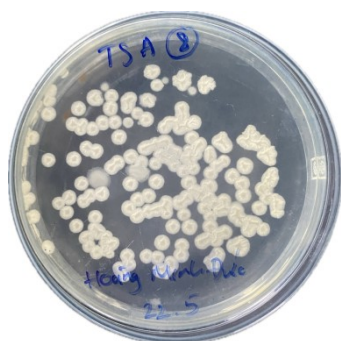
và hơi nhô lên như túp lều trên TSA; bắt màu tím, hình que (Hình 1). Kết quả giám định chi và loài bằng công nghệ khối phổ MALDITOF cho thấy các chủng phân lập thuộc loài *B. amyloliquefaciens*. Đây là nghiên cứu đầu tiên công bố các chủng *B. amyloliquefaciens* phân lập được từ phân gà.

Bacillus có mặt ở khắp nơi trong tự nhiên và có thể phân lập từ nhiều môi trường sinh thái khác nhau nhưng các chủng *Bacillus* spp. có tiềm năng thường được tìm thấy trong đất, phân động vật và các sản phẩm từ sữa. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phân lập được 4 chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* từ 100 mẫu phân gà, tỷ lệ này thấp hơn so với một số nghiên cứu công bố trước đây. Nghiên cứu của Golnari & cs. (2024) báo cáo rằng 5 chủng *B. amyloliquefaciens* đã được phân lập từ 54 mẫu đất, phân và các sản phẩm từ sữa. Một số báo cáo chứng minh *B. amyloliquefaciens* được phân lập từ đất có khả năng ức chế nhiều loại mầm bệnh, bao gồm cả vi khuẩn Gram âm và Gram dương (Afrin & Bhuiyan, 2023; Boottanun & cs., 2017). Một nghiên cứu khác tại Bangladesh cho biết

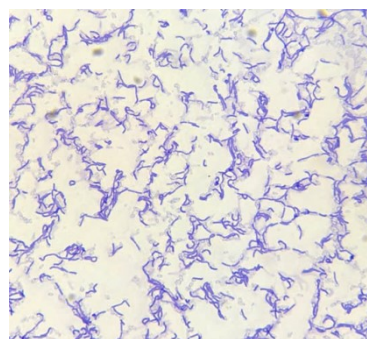
trong tổng số 180 mẫu sữa, trứng, phân đã phân lập được 218 chủng *Bacillus* spp. trong đó có 112 chủng *B. cereus*, 49 chủng *Bacillus subtilis*, 20 chủng *B. amyloliquefaciens*, 13 chủng *B. licheniformis*, 11 chủng *B. thuringiensis*, 8 chủng *B. megaterium* và 5 chủng *B. coagulans* (Haque & cs., 2022).

3.2. Kiểm tra khả năng gây dung huyết của các chủng *B. amyloliquefaciens* phân lập được

Khả năng dung huyết được coi là yếu tố độc lực và là một trong các thử nghiệm đánh giá mức độ an toàn cơ bản để sàng lọc một chủng lợi khuẩn trước khi tiến hành khảo sát các đặc tính probiotics khác. Dựa theo Cơ quan An toàn Thực phẩm châu Âu (European Food Safety Authority; EFSA), khả năng dung huyết được khuyến cáo là thử nghiệm bắt buộc để đảm bảo rằng chủng vi khuẩn không có khả năng gây độc ngay cả khi chúng được công nhận GRAS (Generally Recognized as Safe) hay QPS (Qualified Presumption of Safety) (EFSA, 2014).



(A)



(B)

Hình 1. (A) Khuẩn lạc *B. amyloliquefaciens* trên môi trường TSA, (B) Hình thái vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* dưới vật kính dầu 100x

Bảng 2. Khả năng gây dung huyết của các chủng *B. amyloliquefaciens* phân lập được

Ký hiệu tên chủng	Dung huyết α	Dung huyết β	Dung huyết γ
BA1	-	-	+
BA2	-	-	+
BA3	-	-	+
BA4	-	-	+

Trong nghiên cứu này, khả năng dung huyết của các chủng *B. amyloliquefaciens* được đánh giá và phân loại dựa trên sự ly giải hồng cầu ở môi trường thạch máu xung quanh khuẩn lạc. Dung huyết dạng α và γ được coi là an toàn và β được coi là có hại. Kết quả kiểm tra cho thấy, tất cả các chủng *B. amyloliquefaciens* không gây dung huyết β và được xác định an toàn. Tương đồng với các nghiên cứu trước đây cho rằng *B. amyloliquefaciens* không gây dung huyết, không sản sinh độc tố (Nguyen & cs., 2024).

3.3. Đánh giá tính ổn định của các chủng *B. amyloliquefaciens* phân lập được trong môi trường pH axit và muối mật

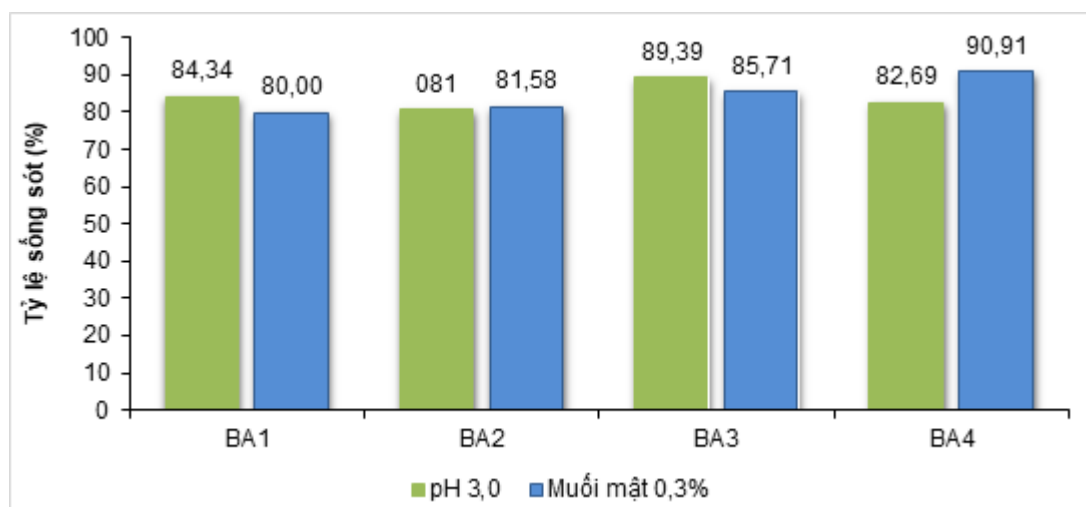
Một trong những đặc tính quan trọng và cần thiết trong việc lựa chọn các chủng vi khuẩn sản xuất chế phẩm probiotics là khả năng sống sót của vi khuẩn dưới tác dụng của pH axit và muối mật ở đường tiêu hóa. Khả năng chịu axit của lợi khuẩn không chỉ quan trọng đối với việc tồn tại trong dạ dày mà còn là tiêu chí để ứng dụng sản xuất và bảo quản thực phẩm lên men. Khả năng chịu muối mật là điều kiện tiên quyết để vi khuẩn cư trú, phát triển và cân bằng hệ vi sinh đường ruột ở vật chủ (Shehata & cs. 2016). Trong thí nghiệm này, tất cả các chủng đều có khả năng sống sót trong môi trường pH 3,0 và muối mật 0,3% sau 3 giờ ủ. Trong môi trường pH 3,0 tỷ lệ sống sót của các chủng *B. amyloliquefaciens* dao động từ 80,85-89,39%. Ở môi trường có nồng độ muối mật 0,3%, tỷ lệ

các chủng sống sót dao động từ 80,00-90,91%. Dựa trên kết quả thử nghiệm, chủng BA3 cho thấy mức độ ổn định cao nhất trong môi trường pH 3,0 với tỷ lệ sống sót là 89,39%. Trong khi đó, chủng BA4 có sức đề kháng cao nhất trong môi trường muối mật 0,3% với tỷ lệ sống sót là 90,91%. Tỷ lệ sống sót của các chủng *B. amyloliquefaciens* phân lập được thể hiện chi tiết tại hình 2.

Kết quả nghiên cứu tương đồng với các báo cáo trước đây cho thấy các chủng *B. amyloliquefaciens* có sức đề kháng cao của với điều kiện đường tiêu hóa. Zulkhairi & cs. (2019) đã báo cáo rằng tỷ lệ sống sót của các tế bào *B. amyloliquefaciens* HTI-19 trên 85% sau khi tiếp xúc với điều kiện axit 3,0 và muối mật 0,3% trong 3 giờ. Nghiên cứu của Lu & cs. (2023) cho thấy chủng *B. amyloliquefaciens* LPB-18 có sức đề kháng cao với môi trường pH 3,0 và muối mật 0,3% với tỷ lệ sống sót lần lượt là $93,84 \pm 0,61\%$ và $92,65 \pm 0,27\%$. Mặt khác, theo báo cáo của Du & cs. (2022), nồng độ muối mật cao và pH axit ảnh hưởng đến sự tồn tại của *B. amyloliquefaciens*, số lượng tế bào có xu hướng giảm trong thời gian thử nghiệm vào khoảng 50% ở môi trường pH 2 và muối mật 0,6%.

3.4. Khả năng kháng kháng sinh của các chủng *B. amyloliquefaciens* phân lập được

Kết quả kiểm tra khả năng kháng kháng sinh của *B. amyloliquefaciens* được tổng hợp ở bảng 3.



Hình 2. Kết quả đánh giá sức đề kháng của các chủng *B. amyloliquefaciens* phân lập được

Bảng 3. Kết quả kiểm tra khả năng kháng kháng sinh của các chủng *B. amyloliquefaciens* phân lập (n = 4)

Nhóm kháng sinh	Tên kháng sinh	Ký hiệu	Số chủng kháng (tỷ lệ %)
Penicillins	ampicillin	AMP	0
Carbapenems	meropenem	MEM	0
Aminoglycosides	gentamicin	GEN	0
Macrolides	erythromycin	ERY	3 (75)
Tetracyclines	tetracycline	TET	4 (100)
Fluoroquinolones	ciprofloxacin	CIP	0
Lincosamides	clindamycin	CLI	0
Folate Pathway Inhibitors	trimethoprim-sulfamethoxazole	SXT	0
Phenicol	chloramphenicol	CHL	0

Kết quả kiểm tra cho thấy cả 4 chủng *B. amyloliquefaciens* đều có khả năng kháng tetracycline và 3/4 chủng kháng erythromycin. Kết quả nghiên cứu có phần tương đồng với một số báo cáo trước đây. Theo nghiên cứu của Du & cs. (2022), chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* được phân lập từ lợn Tây Tạng kháng tetracycline. Kết quả nghiên cứu của Golnari & cs. (2024) cho thấy các chủng *B. subtilis* được phân lập từ phân động vật và các chế phẩm từ sữa có khả năng kháng kháng sinh streptomycin và tetracycline. Ngược lại, nghiên cứu của Nguyen & cs. (2024) cho thấy chủng *B. amyloliquefaciens* nhạy cảm với tất cả kháng sinh trong thử nghiệm, bao gồm nhóm ức chế tổng hợp thành tế bào (kanamycin và cefotaxime) và nhóm ức chế tổng hợp protein (chloramphenicol, erythromycin, streptomycin và gentamicin).

Trong điều trị, chế phẩm sinh học có thể được sử dụng đồng thời với kháng sinh để hỗ trợ và nâng cao hiệu quả điều trị. Kháng sinh có vai trò ức chế và tiêu diệt mầm bệnh, tuy nhiên có thể gây ảnh hưởng đến hệ vi sinh vật trong đường ruột bao gồm cả lợi khuẩn. Vì vậy, để có thể phát huy tối đa hiệu quả, lợi khuẩn cần có khả năng kháng kháng sinh để không bị ảnh hưởng và có thể tiếp tục phát triển, duy trì và thiết lập lại cân bằng cho hệ vi sinh vật đường tiêu hóa trong và sau quá trình điều trị. Chính vì vậy, EFSA đã đề xuất việc kiểm tra

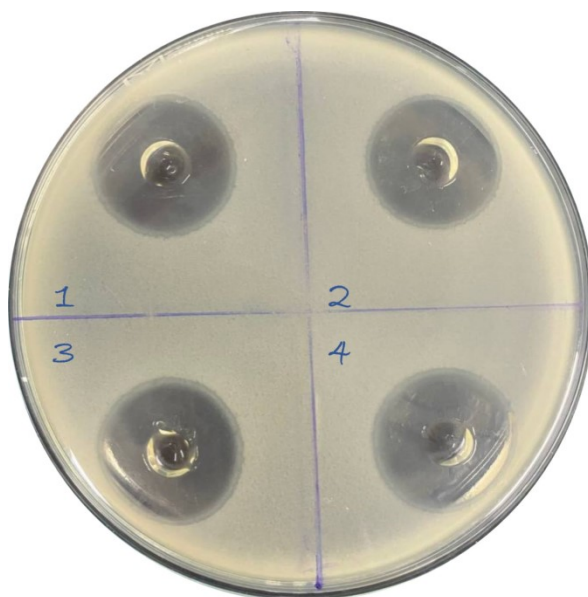
tính miễn cảm với kháng sinh của các chủng *Bacillus* trước khi đưa vào sản xuất chế phẩm sinh học (EFSA, 2012).

3.5. Khả năng đối kháng với vi khuẩn *S. gallinarum* của các chủng *B. amyloliquefaciens* phân lập được

B. amyloliquefaciens được sử dụng rộng rãi như một loại men vi sinh tiềm năng bởi nó mang nhiều đặc tính có lợi và khả năng ức chế tác nhân gây bệnh ở cả động vật và thực vật. *B. amyloliquefaciens* được sử dụng làm chất phụ gia sinh học bổ sung vào thức ăn cho gà thịt, lợn con cai sữa để cải thiện hiệu suất tăng trưởng bởi khả năng sản xuất các enzyme amylase và protease (Ahmed & cs., 2014; Ji & cs., 2013). Trong ngành công nghiệp thực phẩm, *B. amyloliquefaciens* có hoạt tính đối kháng phổ rộng chống lại các tác nhân gây bệnh, bao gồm vi khuẩn và các loại nấm mốc. Đặc biệt, *B. amyloliquefaciens* có khả năng phân hủy aflatoxin, ochratoxin do các loại nấm mốc sản sinh ra (Chang & cs., 2015; Siahmoshteh & cs., 2017). Trong nghiên cứu này, khả năng kiểm soát của *B. amyloliquefaciens* với *S. gallinarum* cũng được đánh giá. Kết quả kiểm tra cho thấy tất cả các chủng *B. amyloliquefaciens* đều thể hiện hoạt tính đối kháng mạnh *S. gallinarum* với kích thước đường kính vòng vô khuẩn > 20mm.

**Bảng 4. Khả năng đối kháng
của các chủng *B. amyloliquefaciens* với vi khuẩn *S. gallinarum***

Ký hiệu tên chủng	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)	Hoạt tính đối kháng
BA1	22	Mạnh
BA2	20	Mạnh
BA3	21	Mạnh
BA4	21	Mạnh



Ghi chú: 1: Chủng BA1, 2: Chủng BA2, 3: Chủng BA3, 4: Chủng BA4.

**Hình 3. Kết quả kiểm tra khả năng đối kháng với vi khuẩn *S. Gallinarum*
của các chủng *B. Amyloliquefaciens***

Trong nghiên cứu này, các chủng *B. amyloliquefaciens* ức chế sự phát triển *S. gallinarum* thông qua việc sản xuất các chất kháng khuẩn có trong dịch nổi không tế bào (CFS), dẫn đến tạo ra vòng vô khuẩn xung quanh các giếng trên bề mặt thạch. *Bacillus* spp. với các đặc tính probiotics có thể tác động trực tiếp lên vi khuẩn gây bệnh và ngăn chặn sự xâm nhiễm đường ruột của chúng. Cơ chế kháng khuẩn phổ biến của các loài này là sản xuất các peptide và chất chuyển hóa, bao gồm bacteriocin và axit hữu cơ có tác dụng đối kháng với các vi sinh vật gây bệnh (Abriouel & cs. 2011). *Bacillus* ngăn chặn sự phát triển của các loài sinh vật gây bệnh theo nhiều cách khác nhau, như giảm độ pH, áp suất thẩm thấu, phân hủy protein, ức chế tổng hợp thành tế bào hoặc hình

thành lỗ trên màng tế bào (Baharudin & cs., 2021; Das & cs., 2014).

4. KẾT LUẬN

Các chủng *B. amyloliquefaciens* phân lập được đều không gây dung huyết, chịu được điều kiện đường tiêu hóa (pH 3,0; muối mật 0,3%), kháng tetracycline và erythromycin, đồng thời có khả năng ức chế *S. gallinarum*. Kết quả nghiên cứu cho thấy, 4 chủng *B. amyloliquefaciens* phân lập được có tiềm năng sử dụng để phòng bệnh *S. gallinarum* trên gà. Tuy nhiên, cần nghiên cứu thêm về đặc tính kháng kháng sinh và đánh giá hiệu suất tăng trưởng trên gà của các chủng *B. amyloliquefaciens* phân lập được trước khi ứng dụng trong sản xuất chế phẩm sinh học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abriouel H., Franz C.M.A. Omar P., Ben N. & Galvez A. (2011). Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. FEMS Microbiology Reviews. 35(1): 201-232.
- Afrin S. & Bhuiyan M.N.I. (2019). Antagonistic activity of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* against multidrug resistant *Serratia rubidaea*. Current Research in Microbial Sciences. 5: 818054.
- Ahmed S.T., Islam M.M., Mun H.S., Sim H.J., Kim Y.J. & Yang C.J. (2014). Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* as a probiotic strain on growth performance, cecal microflora, and fecal noxious gas emissions of broiler chickens. Poultry Science, 93(8): 1963-1971.
- Aikun Fu, Qiufen Mo, Yanping Wu, Baikui Wang, Rongrong Liu, Li Tang, Zhonghua Zeng, Xiaoping Zhang & Weifen Li (2019). Protective effect of *Bacillus amyloliquefaciens* against *Salmonella* via polarizing macrophages to M1 phenotype directly and to M2 depended on microbiota. Food and Function. 10(12): 7653-7666.
- Baharudin M.M.A.A., Ngaliat M.S., Shariff F.M., Yusof Z.N.B., Karim M., Baharum S.N. & Sabri S. (2021). Antimicrobial activities of *Bacillus velezensis* strains isolated from stingless bee products against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. PLoS ONE. 16(5): e0251514.
- Barrow P.A. & Freitas Neto O.C. (2011). Pullorum disease and fowl typhoid-new thoughts on old diseases: A review. Avian Pathology. 40 (1): 1465-3338.
- Boottanun P., Potisap C., Hurdle J.G. & Sermswan R.W. (2017). Secondary metabolites from *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from soil can kill *Burkholderia pseudomallei*. AMB Express. 7(1): 1-11.
- Chang X., Wu Z., Wu S., Dai Y. & Sun C. (2015). Degradation of ochratoxin A by *Bacillus amyloliquefaciens* ASAG1. Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment. 32(4): 564-571.
- CLSI (2015). M45| Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria. 3rd Edition.
- Das B.K., Nidhi R.G.N., Roy P., Muduli A.K., Swain P., Mishra S.S. & Jayasankar P. (2014). Antagonistic activity of cellular components of *Bacillus subtilis* AN11 against bacterial pathogens. In Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 3(5): 795-809.
- Du H., Yao W., Fakhar-E- M., Kulyar 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): e01205-21.
- EFSA (2012). Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. EFSA Journal. 10(6): 2740.
- EFSA (2014). Guidance on the assessment of the toxigenic potential of *Bacillus* species used in animal nutrition. EFSA Journal. 12(5): 1-10.
- Ezema W.S., Onuoha E. & Chah K.F. (2009). Observations on an outbreak of fowl typhoid in commercial laying birds in Udi, South Eastern Nigeria. Comparative Clinical Pathology. 18(4): 395-398.
- Farahani R.K., Ebrahimi-Rad M., Shahrokhi N., Farahani A.H.K., Ghafouri S.A., Rezaei M., Gharibzadeh S., Langeroudi A.G. & Ehsani P. (2023). High prevalence of antibiotic resistance and biofilm formation in *Salmonella Gallinarum*. Iranian Journal of Microbiology, 15(5): 631.
- Golnari M., Bahrami N., Milanian Z., Rabbani Khorasgani M., Asadollahi M.A., Shafiei R. & Fatemi S.S.A. (2024). Isolation and characterization of novel *Bacillus* strains with superior probiotic potential: comparative analysis and safety evaluation. Scientific Reports. 14(1): 1457.
- Gracia M.I., Aranibar M.J., Lázaro R., Medel P. & Mateos G.G. (2003). Alpha-amylase supplementation of broiler diets based on corn. Poultry Science. 82(3): 436-442.
- Haque M.A., Wang F., Chen Y., Hossen F., Islam M.A., Hossain M.A., Siddique N., He C. & Ahmed F. (2022). *Bacillus* spp. Contamination: A Novel Risk Originated From Animal Feed to Human Food Chains in South-Eastern Bangladesh. Frontiers in Microbiology. 12: 783103.
- Ismat Jahan Anee, Shamimul Alam, Rowshan Ara Begum, Reza Md Shahjahan & Ashfaque Muid Khandaker (2021). The role of probiotics on animal health and nutrition. The Journal of Basic and Applied Zoology. 82: 52.
- Ji J., Hu S. & Li W. (2013). Probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* SC06 Prevents Bacterial Translocation in Weaned Mice. Indian Journal of Microbiology. 53(3): 323-328.
- Jini R., Swapna H.C., Rai A.K., Vrinda R., Halami P.M., Sachindra N.M. & Bhaskar N. (2011). Isolation and characterization of potential lactic acid bacteria (LAB) from freshwater fish processing wastes for application in fermentative utilisation of fish processing waste. Brazilian Journal of Microbiology. 42(4): 1516-1525.

- Lê Lưu Phương Hạnh, Nguyễn Hoàng Chi Mai, Trần Ngọc Phương Linh, Lê Văn Hậu, Nguyễn Đăng Quân & Ngô Huỳnh Phương Thảo (2021). Hoạt động đối kháng của chủng *Bacillus amyloliquefaciens* B894 với vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* và *Aeromonas hydrophila*. Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam. 01(122): 113-119.
- Lee Y.J., Kim B.K., Lee B.H., Jo K.I., Lee N.K., Chung C.H., Lee Y.C. & Lee J.W. (2008). Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull. Bioresource Technology. 99(2): 378-386.
- Lu H., Yang P., Zhong M., Bilal M., Xu H., Zhang Q., Xu J., Liang N., Liu S., Zhao L., Zhao Y. & Geng C. (2023). Isolation of a potential probiotic strain *Bacillus amyloliquefaciens* LPB-18 and identification of antimicrobial compounds responsible for inhibition of food-borne pathogens. Food Science and Nutrition. 11(5): 2186-2196.
- Michael A. Jones, Paul Wigley, Kerrie L. Page, Scott D. Hulme & Paul A. Barrow. (2001). *Salmonella enterica* serovar Gallinarum requires the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system but not the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system for virulence in chickens. Infection and Immunity. 69(9): 5471-5476.
- Mingmongkolchai S. & Panbangred W. (2018). *Bacillus* probiotics: an alternative to antibiotics for livestock production. Journal of Applied Microbiology. 124(6): 1334-1346.
- Nguyễn Duy Linh, Nguyễn Phạm Ánh Dương, Lê Phương Uyên Nhi, Lê Hữu Ngọc, Đường Chi Mai & Lê Thanh Hiền (2025). Tiềm năng probiotic và khả năng kháng *Escherichia coli*, *Salmonella* của vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens*. Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển. 24(4): 54-65.
- Nguyen H.A., Dam H.T., Van Nguyen H., Le T.H., Ho P.H. & Huong N.L. (2024). Whole genome sequence analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* strain S2. 5 as a potential probiotic for feed supplement in livestock production. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. 22(3): 100404.
- OIE (2023). Fowl typhoid. World Organisation for Animal Health.
- Ritter A.C., Paula A., Correa F. Fonseca Veras F. & Brandelli A. (2018). Characterization of *Bacillus subtilis* Available as Probiotics. Journal of Microbiology Research. 8(2): 23-32.
- Rodrigues Alves L.B., Freitas Neto O.C. de, Saraiva M. de M.S., do Monte D.F.M., de Lima B.N., Cabrera J.M., Barbosa F. de O., Benevides V.P., de Lima T.S., Campos I.C., Rubio M. da S., Nascimento C. de F., Arantes L.C.R.V., Alves V.V., de Almeida A.M., Olsen J.E. & Berchieri Junior A. (2024). *Salmonella Gallinarum* mgtC mutant shows a delayed fowl typhoid progression in chicken. Gene. 892: 147827.
- Shehata M.G., El Sohaimey S.A., El-Sahn M.A. & Youssef M.M. (2016). Screening of isolated potential probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering property and bile salt hydrolase activity. Annals of Agricultural Sciences. 61(1): 65-75.
- Shubham Gupta, Upasana Mohanty & Ranendra K. Majumdar (2021). Isolation and characterization of lactic acid bacteria from traditional fermented fish product Shidal of India with reference to their probiotic potential. LWT. 146: 111641.
- Siahmoshteh F., Siciliano I., Banani H., Hamidi-Esfahani Z., Razzaghi-Abyaneh M., Gullino M.L. & Spadaro D. (2017). Efficacy of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* in the control of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxins production on pistachio. International Journal of Food Microbiology, 254: 47-53.
- Zulkhairi Amin F.A., Sabri S., Ismail M., Chan K.W., Ismail N., Mohd Esa N., Mohd Lila M.A. & Zawawi N. (2019). Probiotic Properties of *Bacillus* Strains Isolated from Stingless Bee (*Heterotrigona itama*) Honey Collected across Malaysia. International Journal of Environmental Research and Public Health. 17(1): 278.