



PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN CÁC CHỦNG LỢI KHUẨN *LACTOBACILLUS* TIỀM NĂNG KHÁNG MỘT SỐ VI KHUẨN GRAM ÂM GÂY TIÊU CHẢY TRÊN GÀ

Hoàng Thị Anh Phương^{1,2}, Phan Vũ Hải^{2*}, Lê Thị Kiều Giang², Lê Minh Đức²,
Nguyễn Đình Thùy Khương², Nguyễn Xuân Hòa²

¹ Trường Đại học Tây Nguyên, 567 Lê Duẩn, Buôn Ma Thuột, Đắk Lắk, Việt Nam

² Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế, 102 Phùng Hưng, Huế, Việt Nam

* Tác giả liên hệ: Phan Vũ Hải <phanvuhai@huaf.edu.vn>

(Ngày nhận bài: 19-8-2024; Ngày chấp nhận đăng: 23-9-2024)

Tóm tắt. Nghiên cứu này nhằm phân lập và lựa chọn các chủng *Lactobacillus* từ phân gà bản địa tại những khu vực nông thôn quanh thành phố Huế, có khả năng chống lại vi khuẩn *Escherichia coli* FG31-1 và *Salmonella typhimurium* FC13827 gây bệnh tiêu chảy ở gà. Trong số 67 *Lactobacillus* spp. phân lập được, 7 chủng được lựa chọn dựa trên hoạt tính kháng khuẩn cao với cả 2 mầm bệnh được chọn. Sau khi khẳng định tính an toàn (không có hoạt tính dung huyết và không tiềm ẩn chứa gene mã hoá kháng kháng sinh), 5 chủng đã được định danh bằng giải trình tự 16S rRNA để khẳng định từ chi *Lactobacillus*. Kết quả 5 chủng được định danh gồm LA8 (*L. plantarum* 1582), LA3 (*L. plantarum* JDM1), LA18 (*L. acidophilus* NCFM), LA5 (*L. agilis* DSM 20509), LA36 (*L. agilis* La3). Trong đó, chủng có tiềm năng được lựa chọn là *L. plantarum* 1582 dựa trên các đặc tính probiotic vượt trội như khả năng sinh enzyme ngoại bào (amylase và protease), khả năng bám dính vào niêm mạc ruột (tính kỵ nước, khả năng tự/đồng kết tụ), khả năng chống chịu axit và muối mật của đường tiêu hóa gà. Kết quả nghiên cứu này là cơ sở khoa học cho việc sử dụng chế phẩm sinh học từ *Lactobacillus* như một giải pháp thay thế kháng sinh tiềm năng chống lại vi khuẩn gây bệnh đường tiêu hóa trong chăn nuôi gà.

Từ khoá: Probiotic, kháng kháng sinh, *Lactobacillus*, *E. coli*, *Salmonella*

Isolation and selection of potential *Lactobacillus* probiotic strains against Gram-negative bacteria causing diarrhea in chickens

Hoang Thi Anh Phuong¹, Phan Vu Hai^{2*}, Le Thi Kieu Giang², Le Minh Duc²,
Nguyen Dinh Thuy Khuong², Nguyen Xuan Hoa²

¹Tay Nguyen University, 567 Le Duan St., Buon Ma Thuot, Dak Lak, Vietnam

²University of Agriculture and Forestry, Hue University, 102 Phung Hung St., Hue, Vietnam

* Correspondence to Phan Vu Hai <phanvuhai@huauf.edu.vn>

(Submitted: August 19, 2024; Accepted: September 23, 2024)

Abstract. This study aimed to isolate and select *Lactobacillus* strains from indigenous chicken feces, which were collected from rural areas surrounding Hue City, capable of counteracting *Escherichia coli* FG31-1 and *Salmonella typhimurium* FC13827, which cause diarrhea in chickens. Among the 67 isolated *Lactobacillus* spp., 7 strains were selected based on their high antibacterial activity against both pathogens. After confirming their safety (no hemolytic activity and no potential for antibiotic resistance gene transfer), 5 strains were identified using 16S rRNA sequencing to confirm their belonging to the *Lactobacillus* genus. The result showed that the identified strains include LA8 (*L. plantarum* 1582), LA3 (*L. plantarum* JDM1), LA18 (*L. acidophilus* NCFM), LA5 (*L. agilis* DSM 20509), and LA36 (*L. agilis* La3). Among them, *L. plantarum* 1582 was selected as the most promising strain based on its superior probiotic characteristics, such as extracellular enzyme production (amylase and protease), adhesion to intestinal mucosa (hydrophobicity, auto/co-aggregation ability), and tolerance to acidic and bile salt conditions of the chicken gastrointestinal tract. In conclusion, this finding provides a scientific basis for using *Lactobacillus*-based probiotics as a potential alternative to antibiotics in combating gastrointestinal pathogens in poultry farming.

Keywords: Antibiotic resistance, *Lactobacillus*, *E. coli*, Probiotic, *Salmonella* spp.

1 Đặt vấn đề

Escherichia coli (*E. coli*) và *Salmonella* là vi khuẩn Gram âm phổ biến gây ra các bệnh đường tiêu hóa ở gà, gây thiệt hại kinh tế đáng kể cho ngành chăn nuôi [1]. Đặc biệt, đây là những bệnh có khả năng lây truyền từ động vật sang người (zoonoses), chủ yếu thông qua thực phẩm bị nhiễm khuẩn, gây ra các vấn đề sức khỏe cộng đồng [1]. Hiện tại, không có vắc xin có hiệu quả trực tiếp để bảo vệ gà khỏi nhiễm khuẩn, chủ yếu là do các vi khuẩn có nhiều type và thiếu khả năng bảo vệ chéo [2]. Trên thực tế, cả *E. coli* và *Salmonella* đã được WHO liệt kê là một trong những mầm bệnh cần xác định tính miễn cảm kháng sinh trước điều trị [3]. Vấn đề kháng kháng sinh đang gia tăng do lạm dụng kháng sinh trong chăn nuôi, khiến nhiều loại kháng sinh thông dụng đã bị kháng bởi *E. coli* và *Salmonella* spp., làm giảm hiệu quả của kháng sinh, thay đổi hệ vi sinh vật đường ruột và ảnh hưởng xấu đến sức khỏe [4]. Do đó, cần tìm kiếm các giải pháp thay thế kháng sinh như probiotic bao gồm cả vi sinh vật sống và các chất chuyển hóa của chúng, khi được sử dụng bằng đường ăn/uống sẽ mang lại lợi ích sức khỏe cho vật chủ tiếp nhận [5]. Cơ chế tác động của các chủng lợi khuẩn lên vật nuôi rất đa chiều và phức tạp. Các vi sinh vật lợi khuẩn

thay đổi quần thể vi sinh vật trong hệ tiêu hóa bằng cách cân bằng số lượng hệ vi sinh vật có lợi và có hại [6, 7]. Probiotic còn có liên quan đến việc sản xuất các chất kháng khuẩn, chẳng hạn như acid hữu cơ hoặc bacteriocin [5]. Ngoài ra, men vi sinh cho thấy khả năng bám dính vào biểu mô ruột và chúng có thể can thiệp vào quá trình giao tiếp của vi khuẩn gây bệnh, ngăn cản sự xâm chiếm của chúng [8]. Không giống như thuốc kháng sinh, men vi sinh không thể gây ra sự xuất hiện của vi khuẩn kháng thuốc hoặc dư lượng thuốc và thân thiện với môi trường [9]. Thành phần của quần thể vi khuẩn trong đường tiêu hóa, được hỗ trợ bởi việc sử dụng men vi sinh, thường liên quan đến việc tăng năng suất của vật nuôi, ảnh hưởng đến quá trình tiêu hóa và hấp thu chất dinh dưỡng hiệu quả hơn, tăng khả năng miễn dịch và kiểm soát dịch bệnh [10, 11], nâng cao chất lượng thịt và giảm phát thải khí độc ở gà thịt [12, 13]. Vi khuẩn acid lactic (LAB) bao gồm các loài và chủng *Lactobacillus* khác nhau là một trong những loại vi khuẩn phổ biến nhất đáp ứng các đặc điểm này và do đó ngày càng được sử dụng làm chế phẩm sinh học [6]. So với các chế phẩm sinh học thương mại hiện có (chủ yếu được nhập khẩu), thường chứa các chủng lợi khuẩn được sử dụng chung cho nhiều loài vật nuôi, việc sử dụng các chủng vi khuẩn probiotic được phân lập từ các giống gà bản địa có thể mang lại hiệu quả cao hơn. Các chủng vi khuẩn này đã thích nghi với điều kiện môi trường và hệ vi sinh vật đường ruột của gà, do đó có khả năng sống sót và phát triển tốt hơn, đồng thời giảm thiểu các rủi ro liên quan đến việc sử dụng vi khuẩn ngoại lai [14, 15].

Đây là nghiên cứu đầu tiên ở nước ta nhằm phân lập, lựa chọn các chủng *Lactobacillus* tiềm năng từ phân gà bản địa chống lại một số vi khuẩn Gram âm (*E. coli* và *Salmonella* spp.) gây bệnh tiêu chảy trên gà thịt, dựa vào khả năng kháng khuẩn và các đặc tính probiotic.

2 Nội dung và phương pháp

2.1 Đối tượng, vật liệu nghiên cứu

Chủng LAB từ phân của gà bản địa (Gà Kiến).

Môi trường MRS, Muller Hinton Agar (MHA), môi trường BHI (Brain Heart Infusion), xylene.

Chủng *Escherichia coli* FG31-1 và *Salmonella typhimurium* FC13827 (Genbank ID: CP142680.1 và MN704402.1), phân lập từ gà tiêu chảy nghi nhiễm *E. coli* và *Salmonella* spp., các chủng đều mang gene độc lực *invA* và *stn*, được lưu trữ tại Phòng thí nghiệm Vi sinh, Khoa Chăn nuôi thú y, Trường Đại học Nông Lâm – Đại học Huế.

2.2 Thời gian và địa điểm

Thí nghiệm được tiến hành từ tháng 5 đến tháng 8 năm 2024 tại thành phố Huế, tỉnh Thừa Thiên Huế.

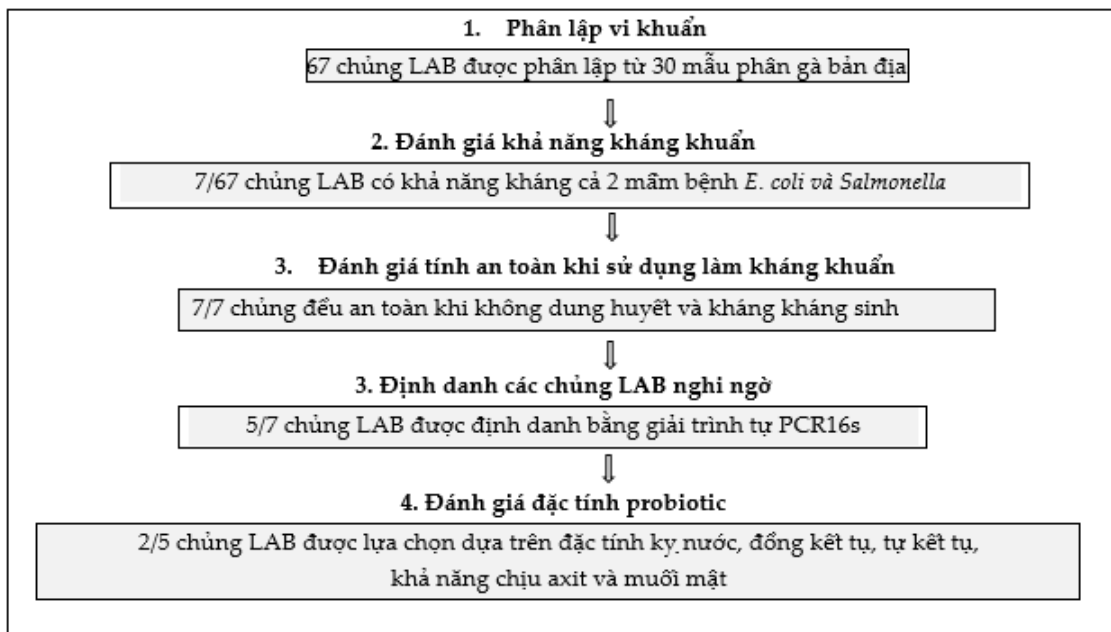
2.3 Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp phân lập và giám định *Lactobacillus* spp.

Lactobacillus spp. được thu thập bằng ngoáy tăm bông vào trực tràng của gà thịt bản địa (Gà Kiến) khỏe mạnh, nuôi bán chăn thả, không bổ sung các loại men tiêu hóa. Phân lập *Lactobacillus* theo phương pháp của Man và cs. [16], 10 g mẫu được làm giàu trong môi trường MRS (40 ml), đồng nhất và cấy ở 37 °C trong 24 giờ với tốc độ lắc 200 v/p trong điều kiện yếm khí. Các ống có độ đục được chọn và tiếp tục cấy vào đĩa thạch MRS, ủ 24–72 giờ ở 37 °C trong điều kiện yếm khí. Khuẩn lạc trắng và kem giả định là *Lactobacillus*, được tinh sạch qua ba lần chuyển trên môi trường MRS. Xác định đặc điểm sinh học gồm nhuộm Gram, hình thái tế bào, phản ứng catalase và phân giải CaCO₃. Chủng Gram+, phân giải CaCO₃, không có hoạt tính catalase được coi là *Lactobacillus* và bảo quản ở -20 °C trong môi trường MRS thêm 30% glycerol. Sơ đồ về các tiêu chí để xác định và lựa chọn các chủng *Lactobacillus* tiềm năng nhằm thay thế kháng sinh trong chăn nuôi gà thịt được trình bày như Sơ đồ 1.

Phương pháp đánh giá khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh đường tiêu hóa ở gà

Hoạt tính kháng khuẩn của các chủng *Lactobacillus* đối với vi khuẩn gây bệnh được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch [17]. Đĩa Muller Hinton Agar (MHA) được phủ với 0,5 OD 630 huyền phù vi khuẩn gây bệnh. Sau 15–20 phút, sáu giếng (cách nhau 30 mm) được đục trên thạch MHA. Mỗi giếng chứa 100 µl dịch nuôi cấy canh thang MRS qua đêm của các chủng *Lactobacillus* đã chọn (điều chỉnh thành 0,5 OD 630). Dịch được để khuếch tán vào thạch trong một giờ ở 4 °C. Sau đó, đĩa được ủ ở 37 °C trong 24 giờ. Công thức đánh giá: Đường kính



Sơ đồ 1. Quy trình xác định và lựa chọn các chủng *Lactobacillus* (LAB)

(ĐK, mm) = Đường kính vòng vô khuẩn – Đường kính giếng. Kết quả được coi là có tính kháng khuẩn khi ĐK ≥ 10 mm [18].

Phương pháp đánh giá tính an toàn của chủng *Lactobacillus* được chọn với mục đích kháng khuẩn

Đánh giá khả năng dung huyết: Các chủng *Lactobacillus* phân lập (10^8 CFU/ml) được cấy lên đĩa thạch MRS bổ sung 7% máu cừu. Sau 48 giờ ủ ở 37°C , quan sát vùng dung huyết. Mức độ dung huyết được phân loại thành vùng màu xanh lục nhạt – vàng đậm quanh khuẩn lạc là dung huyết α , vùng màu vàng nhạt là dung huyết β , và không có vùng là γ [19].

Thử nghiệm khả năng đề kháng kháng sinh: Các chủng *Lactobacillus* được nuôi đến 10^8 CFU/ml (OD 0,48 – 0,52), sau đó cấy 100 μL lên đĩa MH. Đĩa kháng sinh (5 mm) được đặt lên thạch và ủ 24 giờ ở 37°C . Đo ĐK vòng vô khuẩn. Kháng sinh thử nghiệm gồm ciprofloxacin (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$), erythromycin (15 $\mu\text{g}/\text{ml}$), tetracycline (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$), gentamicin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), ampicillin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), vancomycin (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$), streptomycin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), ertapenem (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), kanamycin (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$), doxycycline (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Oxoid, Anh). Kết quả được phân loại theo CLSI (2021) dựa trên ĐK vòng vô khuẩn: kháng (R), nhạy trung bình (I), và nhạy (S).

Phương pháp định danh các chủng *Lactobacillus* nghi ngờ

Chọn chủng giám định gen thông qua phân tích trình tự đoạn gen ổn định mã hóa ribosome 16S rRNA. Các mồi xuôi và ngược 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) và 1492R (TACGGCTACCTTGTACGACTT) được sử dụng để khuếch đại ở 1500 bp [20]. Phản ứng PCR được thực hiện với 20 μl chứa NZYtaq 2 \times Green Master Mix, 0,5 μl mỗi đoạn mồi xuôi và ngược (nồng độ là 0,3 μM), 6 μl nước không có DNase và 2 μl khuôn mẫu DNA (khối lượng 50 ng). Sau khuếch đại, 10 μl sản phẩm PCR được phân tích để điện di và sau đó được hình ảnh hóa dưới tia UV bằng ImageMaster (Pharmacia Biotech, Anh). Sản phẩm PCR kích thước 1,5 kb được tinh chế và giải trình tự bằng các mồi giống với mồi PCR (27F và 1492R). Sau khi giải trình tự bằng phương pháp Sanger và BLAST, dữ liệu được so sánh với cơ sở dữ liệu Genbank của NCBI để xác định các chủng *Lactobacillus*.

Phương pháp phân tích thuộc tính probiotic của *Lactobacillus* spp.

Đánh giá khả năng sinh enzyme ngoại bào: Chỉ tiêu này được tiến hành bằng phương pháp đục lỗ thạch [21]. Sau khi được nuôi cấy trong môi trường MRS, dịch nuôi cấy *Lactobacillus* spp. được ly tâm để thu dịch chứa enzyme ngoại bào. Sau đó nhỏ dịch này lên các giếng thạch MRS đã bổ sung tinh bột (sinh amylase) hoặc gelatin (sinh protease). Khả năng sinh enzyme được đánh giá dựa trên sự hình thành vòng phân giải cơ chất xung quanh giếng sau 24 giờ.

Đánh giá tính kỵ nước bề mặt tế bào: Xét nghiệm đặc tính kỵ nước được thực hiện theo phương pháp được mô tả bởi Thapa và cs. [22] bằng cách dùng khả năng bám dính của vi sinh vật với hydrocarbon kết hợp với xylene. Nuôi cấy các chủng *Lactobacillus* trong 10 ml MRS, ly tâm ở 6000 vòng/phút trong 5 phút và rửa hai lần bằng dung dịch Ringer. Ngâm lại tế bào trong

dung dịch này, điều chỉnh mật độ quang $\sim 0,08$ ở 600 nm. Thêm 1 ml xylene vào 5 ml huyền phù vi khuẩn, trộn mạnh 2 phút và để yên 5 phút. Loại bỏ pha nước phía dưới, đo ở 600 nm. Tỷ lệ phần trăm kỵ nước = $[(OD_0 - OD) / OD_0] \times 100$, với OD_0 và OD là mật độ quang trước và sau khi trộn với xylene.

Đánh giá khả năng tự kết tụ và đồng kết tụ: Thử nghiệm tự kết tụ và đồng kết tụ được thực hiện bằng các phương pháp như được mô tả bởi Mallappa và cs. [23]. Các chủng *Lactobacillus* được ly tâm ở 8500 vòng/phút trong 10 phút và cho vào dung dịch muối đệm phốt phát, ủ tiếp 4 giờ ở 37 °C. Mẫu (0,2 mL) huyền phù được lấy ra, đo OD 600 nm trước và sau khi ủ. Tính tự kết tụ bằng công thức: $1 - [At / Ao] \times 100$, với Ao và At là mật độ quang trước và sau ủ. Xét nghiệm đồng kết tụ *Lactobacillus* spp. được chuẩn bị như trong xét nghiệm tự kết tụ. Huyền phù *E. coli* trong môi trường BHI được chuẩn hóa thành khoảng 1×10^8 CFU/mL. Trộn 1 ml huyền phù *Lactobacillus* với 1 ml huyền phù *E. coli* và khuấy trong 10 giây, để lắng tự nhiên. Đối chứng chỉ chứa 2 ml huyền phù vi khuẩn. Đo độ hấp thụ ở bước sóng 600 nm sau 5 giờ ủ ở 37 °C. Tỷ lệ phần trăm tổng hợp tính bằng công thức: $(OD_{600}(x) + OD_{600}(y) - OD_{600}(x + y)) / (OD_{600}(x) + OD_{600}(y)) \times 100$.

Đánh giá khả năng dung nạp axit và mật: Khả năng chịu axit và mật của *Lactobacillus* spp. được tiến hành theo mô tả của Mallappa và cs. [23]. Các chủng *Lactobacillus* được nuôi cấy qua đêm và tạo huyền phù trong 10 ml MRS với pH 2 và 50 ml MRS chứa 0,3% muối mật (Himedia, Ấn Độ). Kích thước vật liệu cấy được điều chỉnh theo độ đục chuẩn 0,5 McFarland ($\sim 1,5 \times 10^8$ CFU/ml). Sau đó, ủ các ống ở 37 °C trong 3 giờ, lấy mẫu dịch (300 μ L) ở 0, 1, 2, và 3 giờ để đo động lực tăng trưởng bằng quang phổ kế ở 600 nm. Đồng thời, lấy mẫu dịch (100 μ L) để đếm tổng số tế bào sống theo phương pháp đĩa chuẩn.

Phương pháp xử lý số liệu

Tất cả các xét nghiệm được thực hiện ba lần độc lập trong ba lần và dữ liệu được biểu thị dưới dạng trung bình (Mean) \pm độ lệch chuẩn (SD) và tỉ lệ %. Số lượng được chuyển đổi thành \log_{10} CFU/mL. Phân tích thống kê được thực hiện bằng cách sử dụng phần mềm IBM.SPSS (Phiên bản 22) và ý nghĩa thống kê được so sánh, phân tích bằng oneway ANOVA, sau kiểm tra hậu kiểm của Tukey và được coi là có ý nghĩa ở mức $\alpha = 0,05$.

3 Kết quả và thảo luận

Trong nghiên cứu này chúng tôi phân lập được 67 chủng LAB từ 30 mẫu phân của gà bản địa. Trong đó, 7/67 chủng LAB có khả năng kháng cả hai mầm bệnh *E. coli* và *Salmonella*. Kết quả nghiên cứu ghi nhận được rằng 7/7 chủng đều an toàn khi không dung huyết và kháng kháng sinh, 5/7 chủng LAB được định danh bằng giải trình tự PCR16s, và 2/5 chủng LAB được lựa chọn dựa trên đặc tính kỵ nước, đồng kết tụ, tự kết tụ, khả năng chịu axit và muối mật.

Theo Paul và cs. [24], dựa trên nhiều yếu tố khác nhau, hệ vi sinh vật đường ruột của các giống gà bản địa nuôi thả khác với các giống gà thương phẩm. Thức ăn cho gà thả vườn trên

nhiều nguồn thức ăn tự nhiên có thể làm phong phú thêm sự đa dạng hệ vi sinh vật của chúng; kết quả là, so với các giống thương mại, các giống gà thả vườn có khả năng miễn dịch cao hơn, và do đó, có thể chống lại các bệnh truyền nhiễm khác nhau tốt hơn [25].

3.1 Phân lập các chủng *Lactobacillus*

Tổng cộng có 67 chủng phân lập từ 30 mẫu phân của gà thịt bản địa khỏe mạnh được xác định sơ bộ là *Lactobacillus* spp. dựa trên tiêu chí hình thái là có màu trắng, khuẩn lạc hình tròn, bìa nguyên, nhô cao, bóng ướt, đường kính khuẩn lạc dao động từ 0.2 mm – 2.6 mm (Hình 1 A). Các chủng đều có dạng hình que (trực khuẩn), hai đầu tròn, đứng riêng lẻ hoặc chuỗi ngắn (Hình 1 C). Kết quả kiểm tra sinh hóa cho thấy trên môi trường MRSA có bổ sung 1% CaCO₃ (Hình 1 B, khuẩn lạc *Lactobacillus* có vòng trong suốt xung quanh do CaCO₃ bị phân giải bởi acid lactic, tất cả các chủng đều là Gram dương. Tuy nhiên, vi khuẩn không có phản ứng Catalase (âm tính).

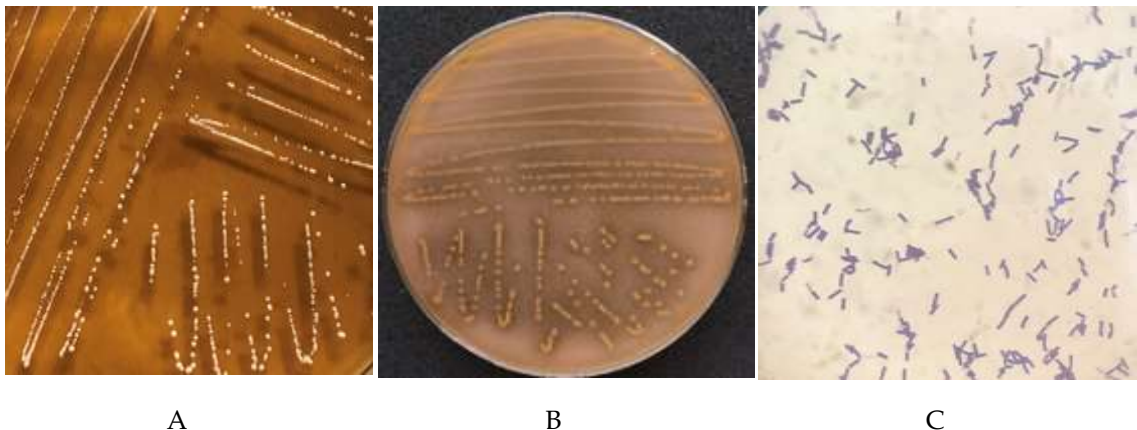
Kết quả giám định đặc tính, hình thái và sinh hóa cho thấy các chủng vi khuẩn đặc trưng của chi *Lactobacillus* như mô tả của Arimah và cs. [26].

3.2 Lựa chọn chủng *Lactobacillus* dựa trên các đặc tính thay thế kháng sinh

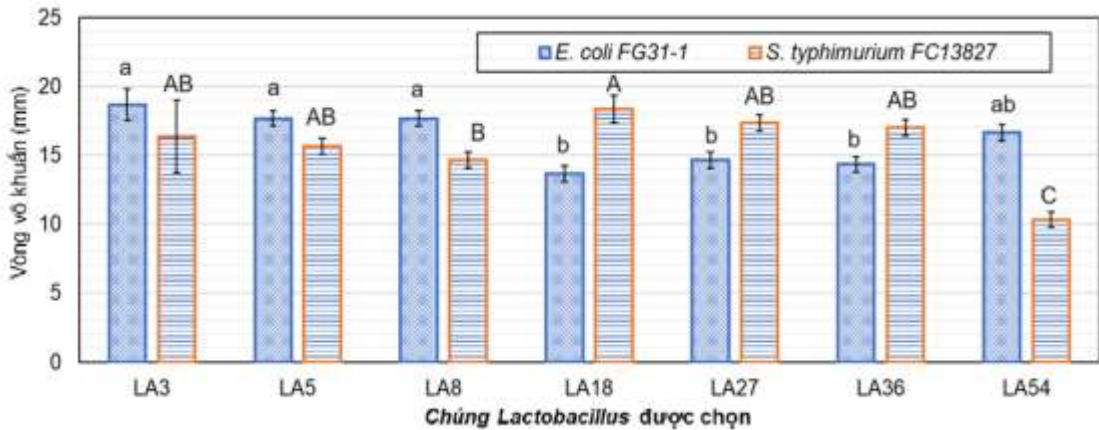
Kết quả xét nghiệm khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh trên gà của các chủng *Lactobacillus* như Hình 2.

Với mục tiêu tìm chủng vi khuẩn tiềm năng thay thế kháng sinh, việc đánh giá hoạt tính kháng khuẩn là tiêu chí tiên quyết. Hoạt tính đối kháng với 2 chủng vi khuẩn Gram âm gây bệnh đường tiêu hóa được thử nghiệm với 67 chủng *Lactobacillus* được phân lập. Kết quả ở Hình 2 đã chọn ra được 7 chủng *Lactobacillus* (10,45%) có hoạt động ức chế chống lại cả 2 mầm bệnh (ĐK ≥ 10 mm). Còn lại, 11 chủng (16,42%) có thể ức chế được 1 trong 2 mầm bệnh và 49 chủng

(73,13%) không ức chế được mầm bệnh nào. Nhìn chung, đối với vi khuẩn *E. coli* FG31-1, 3 chủng LA3, LA5 và LA8 có ĐK (18 – 19 mm) lớn hơn đáng kể ($P < 0,05$) so với các chủng khác là LA18, LA17 và LA36 (~13 – 14 mm). Trong khi đó, đối với *S. typhimurium* FC13827, ĐK của các



Hình 1. Phân lập các chủng *Lactobacillus*. A: Khuẩn lạc *Lactobacillus* trên đĩa MRS; B: Khuẩn lạc *Lactobacillus* phân giải CaCO₃; C: Tế bào vi khuẩn *Lactobacillus* dưới kính hiển vi (× 100)



Hình 2. Đánh giá một số đặc tính kháng khuẩn của các chủng *Lactobacillus* được lựa chọn. Giá trị có chữ số (a, b hoặc A, B, C) khác nhau thể hiện sai khác có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$)

chủng *Lactobacillus* nhỏ hơn (~10 – 18 mm) so với *E. coli* FG31-1 (14 – 19 mm); chủng LA 18 có ĐK (18,3 mm) cao hơn đáng kể ($P < 0,05$) so với chủng LA8 và LA54 (14,7 và 10,3 mm).

Tương tự, *Lactobacillus* spp. phân lập từ phân lợn cho thấy hoạt động kháng khuẩn chống lại mầm bệnh đường ruột bao gồm vi khuẩn *E. coli* [27]. *Lactobacillus* có thể ức chế sự phát triển của vi khuẩn gây bệnh thông qua nhiều cơ chế, bao gồm sản xuất axit lactic từ việc lên men carbohydrate, từ đó làm giảm pH môi trường để ức chế sự phát triển của vi khuẩn [28]. Bên cạnh đó, *Lactobacillus* spp. có khả năng sản xuất các hoạt chất kháng khuẩn như bacteriocin, hydrogen peroxide [29], H_2O_2 [30] và các axit hữu cơ khác như axit acetic, axit propionic... [31]. Hoạt động này, cùng với cơ chế loại trừ cạnh tranh, trong đó các chủng lợi khuẩn cạnh tranh với mầm bệnh để lấy chất dinh dưỡng và vị trí gắn kết, đã ngăn chặn mầm bệnh xâm nhập vào ruột.

3.3 Đánh giá sự an toàn của các chủng *Lactobacillus*

Hoạt động dung huyết

Vi khuẩn dương tính với dung huyết được coi là không an toàn để sử dụng làm chế phẩm sinh học do độc lực của chúng gây phù nề và thiếu máu. Hemolysin do mầm bệnh tạo ra được cho là có tác dụng ly giải tế bào vật chủ để giải phóng các hợp chất chứa sắt như huyết sắc tố, có lợi cho sự phát triển của vi khuẩn trong cơ thể vật chủ [32]. Trong khi kết quả xét nghiệm dung huyết β được coi là có hại, thì dung huyết γ và α được coi là an toàn. Trong nghiên cứu này, tất cả các chủng đều biểu hiện dung huyết α , biểu hiện an toàn (Hình 3). Tương tự, Reuben và cs.



Hình 3. Các chủng có vùng sáng màu vàng đậm quanh khuẩn lạc, biểu hiện dung huyết α

[33] đã báo cáo rằng phần lớn các chủng *Lactobacillus* được phân lập từ ruột gà và gà thịt không có khả năng gây dung huyết.

Khả năng kháng kháng sinh

Sự an toàn của men vi sinh đã nhận được sự chú ý ngày càng tăng do khả năng chuyển giao và lan truyền các gen kháng kháng sinh giữa các vi sinh vật [34]. Do đó, sự vắng mặt của các gen mã hoá kháng kháng sinh là lựa chọn quan trọng để đảm bảo an toàn cho men vi sinh. Nghiên cứu của Campedelli và cs. [35] cho thấy các gen kháng thuốc mắ phải đôi khi xuất hiện ở các loài *Lactobacillus*.

Trong nghiên cứu này, chủng LA3 và LA27 đã kháng (R) với vancomycin, trong khi các chủng khác thì ở mức nhạy (IS). Đối với các kháng sinh còn lại, mức độ khác của các chủng *Lactobacillus* ở mức trung bình (IS) hoặc nhạy (S). Tuy nhiên, theo một số tác giả, khả năng kháng vancomycin của *Lactobacillus* sẽ không được truyền sang vi khuẩn gây bệnh vì đây là một đặc điểm nội tại, được mã hóa bởi các gen nhiễm sắc thể [36] và sự thay thế đầu cuối d -alanine bằng d -lactate hoặc d -serine trong muramyl-pentapeptide ngăn chặn sự gắn kết của vancomycin [37]. Như vậy, nhìn chung các chủng *Lactobacillus* được lựa chọn đều an toàn và sử dụng cho các thử nghiệm tiếp theo.

3.4 Định danh vi khuẩn *Lactobacillus* dự kiến

Qua xác định bằng trình tự 16S rRNA cho thấy các chủng được lựa chọn đều dương tính với kích thước 1500 bp sau điện di gel agarose. Trình tự 16S rRNA được gửi vào GenBank và xây dựng cây phát sinh loài dựa trên trình tự gen. Năm chủng *Lactobacillus* định danh với ký hiệu LA8, LA3, LA18, LA5 và LA36, được xác định tương ứng là *L. plantarum* 1582, *L. plantarum* JDM1, *L. acidophilus* NCFM, *L. agilis* DSM 20509 và *L. agilis* La3 thông qua giải trình tự gen 16S rRNA.

Bảng 1. Khả năng kháng kháng sinh của các chủng *Lactobacillus* được lựa chọn

Kháng sinh	Nồng độ (μg^{-1})	LA3	LA5	LA8	LA18	LA27	LA36	LA54
Ciprofloxacin	30	S	S	S	S	IS	S	S
Erythromycin	15	IS	IS	S	IS	S	IS	S
Tetracycline	30	IS	IS	IS	IS	IS	IS	IS
Gentamicin	10	IS	S	S	IS	S	S	S
Ampicillin	10	S	S	S	S	S	S	S
Vancomycin	30	R	IS	IS	IS	R	IS	S
Streptomycin	10	S	IS	S	IS	S	IS	IS
Ertapenem	5	IS	S	S	S	S	S	S
Kanamycin	30	S	S	S	S	S	S	S
Doxycycline	30	S	IS	S	S	S	S	S

Chú thích: Độ nhạy kháng sinh được biểu thị bằng R (kháng), IS (trung bình) hoặc S (nhạy).

Các trình tự gen này đã được đánh giá dựa trên cơ sở dữ liệu NCBI với các số truy cập ID tương ứng là MT597487.1, CP001617.1, CP000033.2, KM886859.1 và CP016766.1 (Bảng 2).

3.5 Lựa chọn chủng *Lactobacillus* dựa trên đặc tính probiotic

Khả năng sinh enzyme ngoại bào của các chủng *Lactobacillus* là đặc tính probiotic quan trọng nhất nhằm hỗ trợ tiêu hóa thức ăn và giảm phác thải từ phân [38]. Kết quả cho thấy ĐK vòng phân giải của enzyme protease của chủng LA3 và LA18 là khoảng 20 mm, lớn hơn đáng kể ($P < 0,05$) so với chủng LA5 (14mm). Trong khi đó, ĐK vòng phân giải của enzyme amylase là tương đương nhau ($P = 0,126$) giữa các chủng *Lactobacillus* và dao động từ 3,67–5,0 mm, khoảng 1/3 so với khả năng sinh enzyme protease. Kết quả nghiên cứu này tương đồng với kết quả thí nghiệm khảo sát khả năng sinh enzyme của các chủng *Lactobacillus* spp. phân lập từ manh tràng gà của Kim và cs. [39], các chủng vi khuẩn đều khả năng sinh enzyme protease và amylase. Sự khác biệt về enzyme giữa các chủng *Lactobacillus* có thể bắt nguồn từ nguồn gốc của chúng. Các chủng từ thực phẩm giàu tinh bột lên men thường có khả năng phân giải tinh bột mạnh [40]. Mức độ liên kết của enzyme với tế bào cũng ảnh hưởng đến đặc tính sinh hóa của vi khuẩn. Lee và cs. [38] phát hiện hoạt động phân giải tinh bột của *L. acidophilus* L23 liên quan chặt chẽ với tế bào niêm mạc ruột, cho thấy enzyme này gắn liền với thành tế bào.

Tính kỵ nước trên bề mặt tế bào ảnh hưởng đến khả năng bám dính tổng thể và có thể tạo điều kiện thuận lợi cho sự tiếp xúc giữa tế bào biểu mô của lợi khuẩn và vật chủ, giúp lợi khuẩn cạnh tranh với các vi khuẩn gây bệnh, sản xuất enzyme tiêu hóa [41]. Tính kỵ nước cao cho thấy vi khuẩn có thể liên kết tốt hơn với niêm mạc ruột và được phân thành 3 loại: thấp ($< 33\%$), trung bình ($33\%–66\%$) hoặc cao ($> 66\%$) [42]. Kết quả cho thấy chủng LA8 và LA18 thể hiện tính kỵ nước cao ($66,07\%$ và $66,98\%$), và cao hơn đáng kể ($P < 0,05$) so với các chủng khác.

Khả năng của lợi khuẩn hình thành các tập hợp tế bào thông qua sự tự kết tụ (sự kết tụ của vi khuẩn cùng chủng) hoặc sự kết tụ đồng thời (sự kết tụ của vi khuẩn thuộc các chủng khác nhau về mặt di truyền) cũng có thể góp phần vào sự tồn tại của chủng lợi khuẩn trong ruột. Hơn nữa, sự kết tụ có thể hoạt động đối kháng với các vi sinh vật gây bệnh [43]. LA36 cho thấy khả năng đồng kết tụ cao nhất với cả hai chủng vi khuẩn gây bệnh *S. typhimurium* FC13827 ($42,13\%$) và *E. coli* FG31-1 ($40,80\%$). Trong khi đó, chủng LA8 có khả năng đồng kết tụ với *E. coli* FG31-1 ($18,16\%$) thấp hơn đáng kể ($P < 0,05$) so với các chủng còn lại ($40–45\%$) (Bảng 3).

Bảng 2. Xác định các chủng *Lactobacillus* bằng giải trình tự 16S rRNA

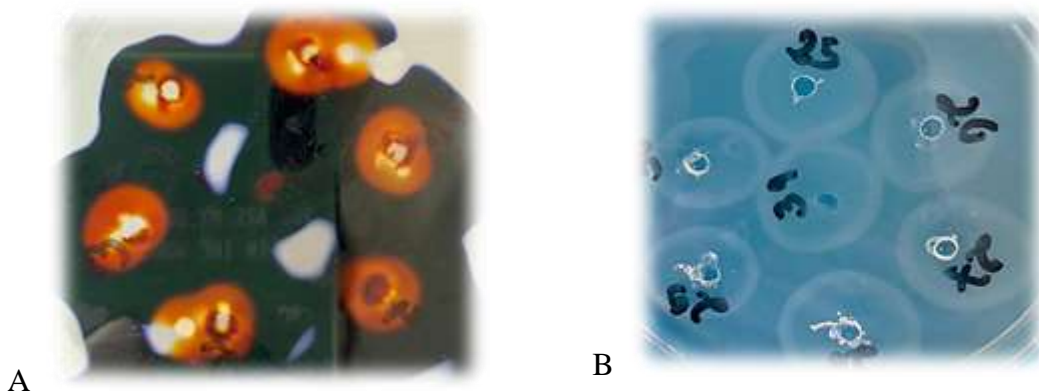
Mẫu phân lập	Chủng <i>Lactobacillus</i>	Tỉ lệ tương đồng (%)	ID GenBank của chủng tham chiếu
LA8	<i>L. plantarum</i> 1582	99,86	MT597487.1
LA3	<i>L. plantarum</i> JDM1	100	CP001617.1
LA18	<i>L. acidophilus</i> NCFM	98,73	CP000033.2
LA5	<i>L. agilis</i> DSM 20509	100	KM886859.1
LA36	<i>L. agilis</i> La3	100	CP016766.1

Bảng 3. Đặc tính probiotic của các chủng phân lập

Đặc tính	LA3	LA5	LA8	LA18	LA36	SEM	P value
Sinh enzyme ngoại bào							
protease (mm)	19,33 ^a	14,00 ^c	17,33 ^{ab}	20,00 ^a	17,67 ^{ab}	0,42	<0,001
amylase (mm)	4,33	5,00	3,67	4,67	5,00	0,22	0,126
Kỵ nước (%)	49,15 ^c	50,88 ^c	66,07 ^a	66,98 ^a	61,66 ^{ab}	2,97	0,006
Đồng kết tụ (%)							
với <i>S. typhimurium</i> FC13827	28,97 ^b	34,52 ^{ab}	30,36 ^b	31,55 ^b	42,13 ^a	2,70	0,024
với <i>E. coli</i> FG31-1	40,21 ^a	38,71 ^a	18,16 ^b	45,08 ^a	40,80 ^a	3,21	0,079
Tự kết tụ (%)	35,58 ^c	57,75 ^a	62,31 ^a	56,74 ^a	23,21 ^d	2,16	<0,001
Chống chịu axit (%)							
ở pH = 2	84,59 ^a	70,42 ^b	83,71 ^a	84,41 ^a	83,87 ^a	0,87	0,039
ở pH = 3	90,99 ^a	76,71 ^b	89,45 ^a	91,42 ^a	90,49 ^a	0,79	0,021
Chống chịu muối mật (%)							
ở mức 0,3%	85,13 ^b	96,02 ^a	95,54 ^a	96,75 ^a	82,00 ^b	1,89	0,009
ở mức 0,5%	78,24 ^b	82,35 ^a	82,66 ^a	82,61 ^a	74,34 ^b	1,44	0,017
Tổng số đặc tính probiotic cao*	4/10	4/10	6/10	8/10	4/10	-	-

Chú thích: Giá trị có chữ số mũ (a-d) khác nhau biểu thị sai khác có ý nghĩa thống kê ($P < 0.05$);

* Tính bằng số giá trị cao nhất (có chữ số mũ là a).



Hình 4. Đường kính vòng phân giải tinh bột (A) và gelatin (B) của vi khuẩn *Lactobacillus*

Khả năng chịu axit và muối mật là hai yếu tố quan trọng để vi khuẩn probiotic có thể sống sót và phát triển trong môi trường đường tiêu hóa của gà. Độ pH của dạ dày tuyến và mù là 1,9 – 4,5 và thức ăn phải di chuyển trong khoảng thời gian 2 giờ, trong khi đó, nồng độ muối mật trong phần trên của ruột non (tá tràng) ở gà có thể dao động từ 0,1 đến 0,5% [44]. Theo Prabhurajeshwar và Chandrakanth [45], vi khuẩn có nguồn gốc từ vật chủ thường thích nghi tốt hơn với

điều kiện tiêu hóa của chúng, giúp chúng xâm chiếm hiệu quả hơn so với vi khuẩn từ các nguồn khác. Bằng chứng trong nghiên cứu này, các chủng *Lactobacillus* phân lập đều có khả năng chịu axit tốt ở pH 2 và pH 3, với tỷ lệ sống sót trên 70%. Trong đó, LA18 cho thấy khả năng sống sót cao nhất (84,41% ở pH 2 và 91,42% ở pH 3). Bên cạnh đó, các chủng *Lactobacillus* đều có khả năng chịu muối mật tốt ở nồng độ 0,3% và 0,5%, với tỷ lệ sống sót trên 74%. Trong đó, LA5 cho thấy khả năng sống sót cao nhất (96,02% ở 0,3% và 82,35% ở 0,5%).

Đánh giá chung về các đặc tính probiotic cho thấy chủng vi khuẩn LA8 (*L. plantarum* 1582) có nhiều đặc tính (8/10 đặc tính) vượt trội hơn so với các chủng khác (4–6/10 đặc tính) nên được lựa chọn sử dụng trong sản xuất thử nghiệm chế phẩm sinh học. Chủng phân lập này do có khả năng kháng axit và muối mật, đồng thời tạo ra hàm lượng axit hữu cơ cao nên tương thích hơn với đường tiêu hóa của gia cầm, dẫn đến tăng năng suất sinh trưởng và đồng thời cải thiện hệ thống miễn dịch. Ngoài ra, những chủng phân lập này cho thấy khả năng cao để gắn vào các tế bào biểu mô ruột và loại bỏ cạnh tranh của vi khuẩn *E. coli* và *Salmonella* spp. xâm nhập vào niêm mạc ruột.

4 Kết luận

Từ 67 chủng *Lactobacillus* phân lập từ phân gà bản địa theo các đặc tính kiểu hình và sinh hóa, 7 chủng (10,45%) đã được lựa chọn dựa trên khả năng kháng khuẩn với cả hai mầm bệnh gây tiêu chảy ở gà (*E. coli* FG31-1 và *S. typhimurium* FC13827). Sau khi được kiểm tra và xác nhận không có khả năng gây dung huyết và không mang gen kháng kháng sinh, 5/7 chủng đã được định danh bằng giải trình tự 16S rRNA để khẳng định từ chi *Lactobacillus*. Trong số 5 chủng được chọn, chủng LA8 (*L. plantarum* 1582) có nhiều đặc tính probiotic vượt trội hơn so với các chủng khác, bao gồm khả năng sản xuất enzyme tiêu hóa (amylase và protease), đặc tính bám dính (kỵ nước, tự/đồng kết tụ) và chống chịu acid (pH 2,0–3,0) và muối mật (0,3 – 0,5%). Do đó, *L. plantarum* 1582 có thể là tiềm năng trong sản phẩm men vi sinh bản địa phù hợp để sử dụng trong chăn nuôi gà trong việc thay thế kháng sinh chống lại vi khuẩn gây bệnh đường tiêu hóa, tuy nhiên cần thêm nghiên cứu *in vivo* để khẳng định hiệu quả.

Tài liệu tham khảo

1. Newman, D. M., Barbieri, N. L., de Oliveira, A. L., Willis, D., Nolan, L. K. and Logue, C. M. (2021), Characterizing avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) from *Colibacillosis* cases, 2018, *PeerJ*, 9, e11025.
2. Zhu, D., Zhang, Y., Wang, Z., Dai, J., & Zhuge, X. (2024), Exploiting membrane vesicles derived from avian pathogenic *Escherichia coli* as a cross-protective subunit vaccine candidate against avian colibacillosis, *Poultry Science*, 103(10), 104148.
3. Farhat, M., Khayi, S., Berrada, J., Mouahid, M., Ameer, N., El-Adawy, H. and Fellahi, S. (2023), *Salmonella enterica* serovar *gallinarum* biovars *pullorum* and *gallinarum* in poultry: review of pathogenesis, antibiotic resistance, diagnosis and control in the genomic era, *Antibiotics (Basel)*, 13(1), 1–20.

4. Shim, Y. H., Ingale, S. L., Kim, J. S., Kim, K. H., Seo, D. K., Lee, S. C., Chae, B. J. and Kwon, I. K. (2012), A multi-microbe probiotic formulation processed at low and high drying temperatures: Effects on growth performance, nutrient retention and caecal microbiology of broilers. *British Poultry Science*, 53(4), 482–90.
5. Mountzouris, K. C., Balaskas, C., Xanthakos, I., Tzivinikou, A. and Fegeros, K. (2009), Effects of a multi-species probiotic on biomarkers of competitive exclusion efficacy in broilers challenged with *Salmonella enteritidis*, *British Poultry Science*, 50(4), 467–78.
6. Thomas, C. M. and Versalovic, J. (2010), Probiotics-host communication, *Gut Microbes*, 1(3), 148–163.
7. Medellin-Peña, M. J., Wang, H., Johnson, R., Anand, S. and Griffiths, M. W. (2007), Probiotics affect virulence-related gene expression in *Escherichia coli* O157:H7, *Applied Environment Microbiology*, 73(13), 4259–4267.
8. Kazemi, S. A., Ahmadi, H. and Karimi Torshizi, M. A. (2019), Evaluating two multistrain probiotics on growth performance, intestinal morphology, lipid oxidation and ileal microflora in chickens, *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 103(5), 1399–1407.
9. Hung, A., Lin, S.-Y., Yang, T.-Y., Chou, C.-K., Liu, H.-C., Lu, J.-J., Wang, B., Chen, S.-Y. and Lien, T.-F. (2012), Effects of *Bacillus coagulans* ATCC 7050 on growth performance, intestinal morphology, and microflora composition in broiler chickens, *Animal Production Science*, 52, 874–879.
10. Xin, J., Zeng, D., Wang, H., Sun, N., Zhao, Y., Dan, Y., Pan, K., Jing, B. and Ni, X. (2020), Probiotic *Lactobacillus johnsonian* bs15 promotes growth performance, intestinal immunity, and gut microbiota in piglets, *Probiotics Antimicrobe Proteins*, 12(1), 184–193.
11. Jeong, J. S. and Kim, I. H. (2014), Effect of *Bacillus subtilis* C-3102 spores as a probiotic feed supplement on growth performance, noxious gas emission, and intestinal microflora in broilers, *Poultry Science*, 93(12), 3097–3103.
12. Peng, Q., Zeng, X. F., Zhu, J. L., Wang, S., Liu, X. T., Hou, C. L., Thacker, P. A. and Qiao, S. Y. (2016), Effects of dietary *Lactobacillus plantarum* B1 on growth performance, intestinal microbiota, and short chain fatty acid profiles in broiler chickens, *Poultry Science*, 95(4), 893–900.
13. Chiang, M. L., Chen, H. C., Chen, K. N., Lin, Y. C., Lin, Y. T. and Chen, M. J. (2015), Optimizing production of two potential probiotic *Lactobacilli* strains isolated from piglet feces as feed additives for weaned piglets, *Asian-Australas Journal Animal Science*, 28(8), 1163–1170.
14. Dowarah, R., Verma, A. K. and Agarwal, N. (2017), The use of *Lactobacillus* as an alternative of antibiotic growth promoters in pigs: A review, *Animal Nutrition*, 3(1), 1–6.
15. Man, J., Rogosa, M. A. and Sharpe, M. (2008), A medium for the cultivation of *Lactobacilli*, *Journal of Applied Microbiology*, 23(1), 130–135.
16. Aujoulat, F., Lebreton, F., Romano, S., Delage, M., Marchandin, H., Brabet, M., Bricard, F., Godreuil, S., Parer, S. and Jumas-Bilak, E. (2011), Comparative diffusion assay to assess efficacy of topical antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa* in burns care, *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 10, 1–10.

17. Georgieva, R., Yocheva, L., Tserovska, L., Zhelezova, G., Stefanova, N., Atanasova, A., Danguleva, A., Ivanova, G., Karapetkov, N., Rumyan, N. and Karaivanova, E. (2015), Antimicrobial activity and antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* spp. intended for use as starter and probiotic cultures, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(1), 84–91.
18. Benbara, T., Lalouche, S., Drider, D. and Bendali, F. (2020). *Lactobacillus plantarum* S27 from chicken faeces as a potential probiotic to replace antibiotics: in vivo evidence, *Beneficial Microbes*, 11(2), 163–173.
19. Shokryazdan, P., Kalavathy, R., Sieo, C., Alitheen, N., Liang, J., Jahromi, M. and Ho, Y. (2014), Isolation and characterization of *Lactobacillus* strains as potential probiotics for chickens, *Tropical Agricultural Science*, 37(1), 141–157.
20. Taheri, A., Robinson, S., Parkin, I. and Gruber, M. (2012), Revised selection criteria for candidate restriction enzymes in genome walking, *PLoS One*, 7(4), e35117.
21. Thapa, N., Pal, J., Tamang, J. P. J. W. J. o. M. and Biotechnology (2004), Microbial diversity in Ngari, Hentak and Tungtap, fermented fish products of North-East India, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20, 599–607.
22. Mallappa, R. H., Singh, D. K., Rokana, N., Pradhan, D., Batish, V. K. and Grover, S. (2019), Screening and selection of probiotic *Lactobacillus* strains of Indian gut origin based on assessment of desired probiotic attributes combined with principal component and heatmap analysis, *Lwt*, 105, 272–281.
23. Paul, S. S., Chatterjee, R. N., Raju, M., Prakash, B., Rama Rao, S. V., Yadav, S. P. and Kannan, A. (2021), Gut microbial composition differs extensively among Indian native chicken breeds originated in different geographical locations and a commercial broiler line, but breed-specific, as well as across-breed core microbiomes, are found, *Microorganisms*, 9(2), 1–21.
24. Kannaki, T. R., Priyanka, E. and Haunshi, S. (2021), Research Note: Disease tolerance/resistance and host immune response to experimental infection with *Pasteurella multocida* A:1 isolate in Indian native Nicobari chicken breed, *Poultry Science*, 100(8), 1–5.
25. Arimah, B. D., Ogunlowo, O., Adebayo, M. A. and Jesumirhewe, C. (2014), Identification of lactic acid bacteria isolated from selected Nigerian foods and comparison of their bacteriocins activities, *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 6, 20–26.
26. Mulaw, G., Muleta, D., Tesfaye, A. and Sisay, T. J. I. J. O. M. (2020), Protective effect of potential probiotic strains from fermented Ethiopian food against *Salmonella typhimurium* DT104 in mice, *International Journal of Microbiology*, 2020(1), 1–8.
27. O'Shea, E. F., Cotter, P. D., Stanton, C., Ross, R. P. and Hill, C. (2012), Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic mechanisms: Bacteriocins and conjugated linoleic acid, *International Journal of Food Microbiology*, 152(3), 189–205.
28. Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D. and Kuipers, O. P. (2016), Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(7), 2939–2951.
29. Hertzberger, R., Arents, J., Dekker, H. L., Pridmore, R. D., Gysler, C., Kleerebezem, M. and Mattos, M. J. T. d. (2014), Production in species of the *Lactobacillus acidophilus* group: a central

- role for a novel NADH-dependent flavin reductase, *Applied and Environmental Microbiology Journal*, 80(7), 2229–2239.
30. Makras, L. and De Vuyst, L. (2006), The *in vitro* inhibition of Gram-negative pathogenic bacteria by bifidobacteria is caused by the production of organic acids, *International Dairy Journal*, 16(9), 1049–1057.
 31. Argyri, A. A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K.-A. G., Tsakalidou, E., Nychas, G.-J. E., Panagou, E. Z. and Tassou, C. C. (2013), Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* tests, *Food Microbiology*, 33(2), 282–291.
 32. Reuben, R. C., Roy, P. C., Sarkar, S. L., Alam, R.-U. and Jahid, I. K. (2019), Isolation, characterization, and assessment of lactic acid bacteria toward their selection as poultry probiotics, *BMC Microbiology*, 19(1), 253.
 33. Doron, S. and Snyderman, D. R. (2015), Risk and safety of probiotics, *Clinical Infectious Diseases*, 60 Suppl 2(Suppl 2), S129–S134.
 34. Campedelli, I., Mathur, H., Salvetti, E., Clarke, S., Rea, M. C., Torriani, S., Ross, R. P., Hill, C. and O'Toole, P. W. (2019), Genus-wide assessment of antibiotic resistance in *Lactobacillus* spp., *Applied and Environmental Microbiology Journal*, 85(1), 1–21.
 35. Divya, J. B., Varsha, K. K. and Nampoothiri, K. M. (2012), Newly isolated lactic acid bacteria with probiotic features for potential application in food industry, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167, 1314–1324.
 36. Gueimonde, M., Sánchez, B., G. de los Reyes-Gavilán, C. and Margolles, A. (2013), Antibiotic resistance in probiotic bacteria, *Frontiers in Microbiology*, 4, 1–6.
 37. Lee, H., Gilliland, S. and Carter, S. (2001), Amylolytic cultures of *Lactobacillus acidophilus*: potential probiotics to improve dietary starch utilization, *Journal of Food Science*, 66(2), 338–344.
 38. Kim, S.-H., Kim, D.-W., Park, S.-Y., Kim, J.-H., Kang, G.-H., Kang, H.-K., Yu, D.-J., Na, J.-C. and Lee, S.-J. (2008). Characterization of *Lactobacilli* isolated from chicken ceca as probiotics, *Journal of Animal Science and Technology*, 50, 509–518.
 39. Sanni, A., Morlon-Guyot, J. and Guyot, J. (2002), New efficient amylase-producing strains of *Lactobacillus plantarum* and *L. fermentum* isolated from different Nigerian traditional fermented foods, *International Journal of Food Microbiology*, 72(1-2), 53–62.
 40. Sánchez-Ortiz, A., Luna, A., Campa-Córdova, Á., Escamilla-Montes, R., Flores Miranda, M. D. C. and Mazón-Suástegui, J. M. (2015), Isolation and characterization of potential probiotic bacteria from Pustulose ark (*Anadara tuberculosa*) suitable for shrimp farming, *Latin American Journal of Aquatic Research*, 43, 123–136.
 41. Bouchard, D. S., Seridan, B., Saraoui, T., Rault, L., Germon, P., Gonzalez-Moreno, C., Nader-Macias, F. M., Baud, D., François, P. and Chuat, V. J. P. o. (2015), Lactic acid bacteria isolated from bovine mammary microbiota: potential allies against bovine mastitis, *PloS One*, 10(12), 1–18.
 42. Sidira, M., Kourkoutas, Y., Kanellaki, M. and Charalampopoulos, D. (2015), *In vitro* study on the cell adhesion ability of immobilized *Lactobacilli* on natural supports, *Food Research International*, 76, 532–539.

43. Scanes, C. G. (2021), Preface. *Sturkie's Avian Physiology*, Academic Press.
44. Prabhurajeshwar, C. and Chandrakanth, R. K. J. B. J. (2017), Probiotic potential of *Lactobacilli* with antagonistic activity against pathogenic strains: An *in vitro* validation for the production of inhibitory substances, *Biomedical Journal*, 40(5), 270–283.