

TUYỂN CHỌN CÁC CHỦNG *BACILLUS* SPP. CÓ ĐẶC TÍNH PROBIOTIC PHÂN LẬP TỪ MẪU ĐẤT VÀ PHÂN GÀ TẠI TỈNH TRÀ VINH

Nguyễn Thị Đậu
Trường Đại học Trà Vinh

TÓM TẮT

7 chủng *Bacillus* spp. tuyển chọn đã được khảo sát các đặc điểm đặc trưng cho vi khuẩn probiotic như: khả năng sinh enzyme ngoại bào (amylase, protease), khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh (*Salmonella enterica*), khả năng chịu pH thấp (2,0), khả năng chịu muối mật (0,3%), khả năng bám dính (tự bám dính), tính nhạy cảm kháng sinh (colistin, trimethoprim, streptomycin, ampicillin, tetracyclin, norfloxacin). Kết quả khảo sát 7 chủng vi khuẩn cho thấy có 2 chủng P6.N và P21.N có các đặc tính probiotic tốt nhất.

Từ khóa: *B. subtilis*, gà, phân lập, định danh, probiotic.

Selecting *Bacillus* spp. strains having probiotic characteristics isolated from chicken fecal and soil samples in Tra Vinh province

Nguyen Thi Dau

SUMMARY

7 selected *Bacillus* spp. isolates were investigated about extracellular enzyme production (amylase, protease), pathogen bacteria inhibition properties (*Salmonella enterica*), tolerance to acidity of the gastric juice (pH 2.0) and 0.3% of bile salts, adherence ability (autoaggregation), susceptibility to antibiotics (colistin, trimethoprim, streptomycin, ampicillin, tetracyclin, norfloxacin). The results of investigating 7 isolates showed that there were 2 isolates P6.N and P21.N exposed the best probiotic characteristics.

Keywords: *B. subtilis*, chicken, isolation, identification, probiotic.

I. MỞ ĐẦU

Việc sử dụng kháng sinh phòng bệnh, chất kích thích tăng trưởng trong chăn nuôi đã làm gia tăng các chủng vi khuẩn kháng thuốc tự nhiên, làm giảm hiệu quả sử dụng kháng sinh trong điều trị các bệnh nhiễm khuẩn ở người (Lê Thị Hải Yến, 2018). Để hạn chế sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi, các nhà khoa học đã tìm ra nhiều giải pháp khác nhau, trong đó có giải pháp sử dụng probiotic - là những vi sinh vật còn sống khi đưa vào cơ thể một lượng đầy đủ sẽ có lợi cho sức khỏe của ký chủ (WHO/FAO, 2002). Các chủng vi sinh vật sử dụng làm probiotic chủ yếu là các chủng vi khuẩn thuộc các chi *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* và *Bacillus*.

Bacillus subtilis là một vi khuẩn rất phổ biến trong tự nhiên, đa số cư trú trên cơ thể động vật, trong đất, rơm rạ và cỏ khô được gọi là “trực khuẩn cỏ khô” (Euzé by, 1997), không có độc tính trên người cũng như nhiều loài động vật và có sức đề kháng cao với

nhiều tác nhân vật lý và hóa học (Lê Thị Hải Yến, 2018). *Bacillus subtilis* có thể sản xuất thành các sản phẩm thương mại ứng dụng trong y học, nông nghiệp và trong công nghiệp thực phẩm. Đây cũng chính là một trong những giải pháp thay thế kháng sinh phòng bệnh, cải thiện năng suất vật nuôi và đóng góp vào quy trình chăn nuôi theo hướng an toàn sinh học.

Bacillus spp. rất đa dạng về các đặc tính sinh học nên không phải tất cả các chủng đều được sử dụng làm probiotic. Nghiên cứu “Tuyển chọn các chủng *Bacillus* spp. có đặc tính probiotic phân lập từ mẫu đất và phân gà tại tỉnh Trà Vinh” nhằm chọn lọc các chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. sử dụng làm chế phẩm probiotic trong phòng bệnh đường tiêu hóa trên gà.

II. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung

- Khả năng sinh các enzyme tiêu hóa của các chủng *Bacillus* spp.

- Khả năng đối kháng với vi khuẩn gây bệnh của các chủng *Bacillus* spp.

- Khả năng chịu đựng tác động của dịch tiêu hóa (pH thấp và muối mật)

- Khả năng bám dính của các chủng *Bacillus* spp.

- Khả năng kháng kháng sinh của các chủng *Bacillus* spp.

2.2. Vật liệu

Các chủng *Bacillus* spp. được phân lập từ đất và phân gà tại tỉnh Trà Vinh (Nguyễn Thị Đầu, 2021), *Salmonella* spp. được cung cấp từ công ty Nam Khoa (thành phố Hồ Chí Minh).

Môi trường nuôi cấy: TSB (Tryptic Soy Broth), MHA (Muller Hinton), NA (Nutrient agar), đĩa kháng sinh (colistin, trimethoprim, streptomycin, ampicillin, tetracyclin, norfloxacin), các loại thuốc thử và hoá chất khác.

2.3. Dụng cụ, thiết bị

Máy ly tâm, tủ -20°C, tủ lạnh, tủ cấy vô trùng, hệ thống ELISA (đo OD).

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Khả năng sinh các enzyme tiêu hóa (amylase, protease)

- Amylase: Theo Stein (2005). Các chủng vi khuẩn thử nghiệm được cấy lên môi trường TSB (Tryptic Soy Broth), để ủ ấm 37°C trong 2-6 giờ. Đọc kết quả bằng thuốc thử lugol. Nếu trong môi trường không còn tinh bột thì lugol sẽ không làm chuyển màu môi trường.

- Protease: Theo Harley (2004).

2.4.2. Khả năng đối kháng với vi khuẩn gây bệnh

Khả năng đối kháng được đo bằng đường kính vòng ức chế vi khuẩn gây bệnh theo đơn vị mm (Moore *et al.*, 2013).

2.4.3. Khả năng chịu đựng tác động của dịch tiêu hóa (pH thấp và muối mật)

Khả năng chịu pH thấp

Canh khuẩn có mật số 10^8 CFU/ml với OD=0,3-0,5 (Huff *et al.*, 2002) được ly tâm 2.000 vòng/phút trong 15 phút. Phần cặn ủ vào môi trường NB và điều chỉnh pH 2,5; 2,0; 1,5. Canh khuẩn được pha loãng đến 10^{-5} cho vào đĩa thạch dinh dưỡng ủ ở 37°C. Chọn các mức pha loãng có từ 30-300 khuẩn lạc rời nhau để đếm khuẩn lạc. Tính số lượng vi khuẩn (CFU) theo công thức:

N

$$A = \frac{N}{n1Vf1 + \dots + n2Vf2}$$

Trong đó: A: số vi khuẩn trong 1ml mẫu

N: tổng số khuẩn lạc đếm được trên các đĩa đã chọn

ni: số lượng đĩa cấy tại độ pha loãng thứ i

V: thể tích dịch mẫu (ml) cấy vào trong mỗi đĩa

fi: độ pha loãng tương ứng.

Chỉ tiêu theo dõi là mật số vi khuẩn sống được trên môi trường nuôi cấy. Từ đó đánh giá khả năng chịu pH thấp của chủng vi khuẩn đó.

2.4.4. Khả năng bám dính các chủng *Bacillus* spp.

Khả năng bám dính của các chủng *Bacillus* spp. nghiên cứu được xác định theo mô tả của Kos *et al.* (2003). Kết quả được tính theo công thức sau:

Khả năng tự bám dính (%) = $(A_0 - A_t) / A_0 \times 100$

Trong đó: A_0 : OD₆₀₀ của dung dịch tế bào ở thời điểm $t = 0$ giờ

A_t : OD₆₀₀ dung dịch tế bào ở các thời điểm $t = 1, 2, 3, 4$.

2.4.5. Khả năng kháng kháng sinh

Thực hiện theo phương pháp khuếch tán trên thạch. Đường kính vòng kháng khuẩn được đo trên đĩa MHA sẽ được xác định là kháng (≤ 14 mm), nhạy (≥ 20 mm) hoặc trung gian (15-19 mm) với kháng sinh thử nghiệm theo tiêu chuẩn của CLSI (2016).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khả năng sinh các enzyme tiêu hóa (amylase, protease)

Kết quả khả năng sinh enzyme amylase và protease được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Khả năng sinh emzyme ngoại bào của 7 chủng chọn lọc

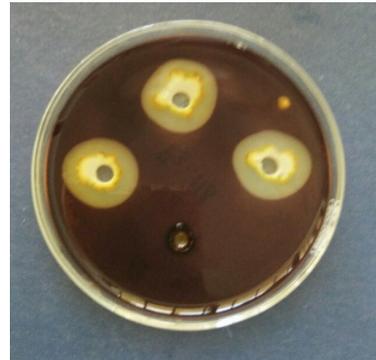
Chủng vi khuẩn	Amylase	Protease
P5.N	+	+
P6.N	+	+
P18.N	+	+
P21.N	+	+
Đ3.M	+	+
Đ8.M	+	+
Đ28.M	+	+

“+” : có khả năng sinh enzyme

Theo Parsons (2004), các enzyme ngoại bào như amylase, protease và lipase đóng vai trò quan trọng trong việc tiêu hóa thức ăn, giúp thức ăn được hấp thu dễ dàng, nếu tiêu hóa tốt chất béo trong thức ăn sẽ giảm tỷ lệ tiêu chảy. Do đó vi khuẩn dùng làm probiotic cần có khả năng sản sinh các enzyme này.

3.2. Khả năng đối kháng với vi khuẩn gây bệnh của các chủng *Bacillus* spp.

E. coli, *Salmonella* đã được chứng minh là một trong những vi khuẩn kháng thuốc cao nhất (Wybo *et al.*, 2004) như kháng oxytetracycline, penicillin và tetracycline.



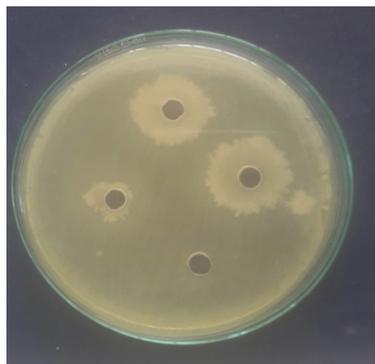
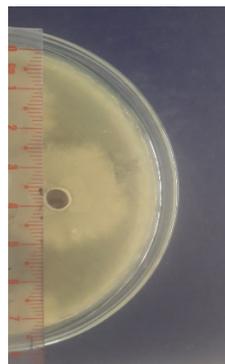
Amylase (+)



Protease (+)

Hình 1. Khả năng sinh enzyme ngoại bào của vi khuẩn *Bacillus* spp.

Trong chăn nuôi gia cầm, các vi khuẩn probiotic đóng vai trò quan trọng trong việc cân bằng hệ vi sinh vật đường ruột, ức chế vi khuẩn gây bệnh và điều hòa miễn dịch, từ đó giúp tăng cường sức khỏe của hệ tiêu hóa và chống các bệnh nhiễm trùng đường tiêu hóa (Dhama *et al.*, 2011). Vì vậy khả năng đối kháng vi khuẩn gây bệnh của các chủng *Bacillus* spp. là một chỉ tiêu quan trọng để chọn lọc làm probiotic.



Hình 2. Hoạt tính đối kháng của vi khuẩn *Bacillus* spp. với vi khuẩn *Salmonella enterica*

Kết quả cho thấy 6 chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. khảo sát đều có khả năng đối kháng với vi khuẩn *Salmonella enterica* nhưng ở mức độ khác nhau. Ở nồng độ 10^7 CFU/ml; các chủng P6.N, P21.N và Đ3.M khác biệt không có ý nghĩa. Mật khác ở nồng độ cao nhất (10^5 CFU/ml); 3 chủng

Đ3.M, P6.N, P21.N vẫn có khả năng kìm hãm sự phát triển của vi khuẩn gây bệnh; điều này có thể quan sát qua đường kính đối kháng, được ghi nhận đạt từ 7-10 mm. Đặc tính đối kháng với vi khuẩn gây bệnh cũng là điều kiện quan trọng để tuyển chọn vi khuẩn *Bacillus* spp. để sản xuất probiotic.

Bảng 2. Khoảng cách kháng khuẩn trung bình của các chủng *Bacillus* spp. chọn lọc

TT	Chủng vi khuẩn	10^7 CFU/ml	10^6 CFU/ml	10^5 CFU/ml
1	P5.N	13,333 ^A	12,333 ^A	4,333 ^A
2	P6.N	19,667 ^A	15,000 ^A	9,333 ^A
3	P18.N	9,000 ^A	7,667 ^A	1,667 ^{AB}
4	P21.N	18,333 ^B	15,667 ^B	10,000 ^{BC}
5	Đ3.M	19,667 ^{BC}	16,000 ^B	7,000 ^{BC}
6	Đ28.M	13,333 ^C	11,667 ^C	3,333 ^C

Ghi chú: ^{A, B, C, D, E} các giá trị mang số mũ khác nhau trong cùng một cột thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,001$)

3.3. Khả năng chịu đựng tác động của dịch tiêu hóa (pH thấp và muối mật)

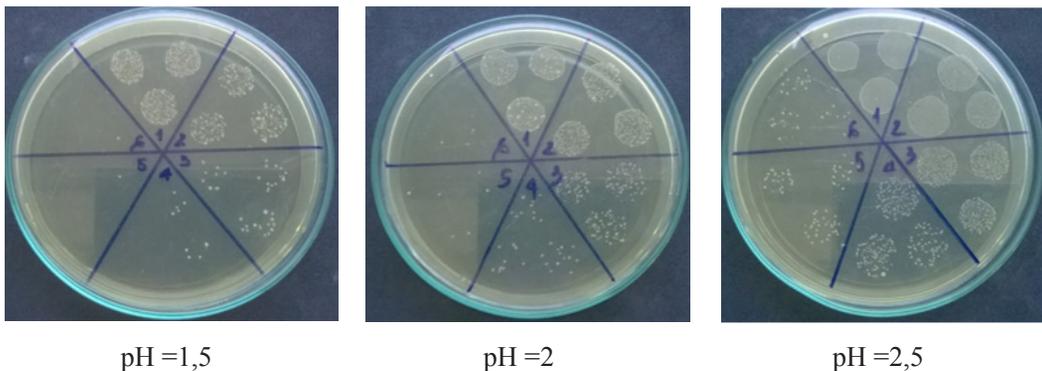
Theo Tuomola *et al.* (2001), để sống được trong đường tiêu hóa, các chủng probiotic phải có khả năng chịu được pH acid và muối mật.

Khả năng sinh bào tử giúp các chủng *Bacillus* spp. chống chịu được những điều kiện khắc nghiệt

trong đó bao gồm acid dạ dày và muối mật.

3.3.1. Đánh giá khả năng chịu pH thấp của *Bacillus* spp.

Dưới điều kiện của pH 2,5; 2; 1,5; hầu hết các dòng vi khuẩn *Bacillus* đều có khả năng sống sót với mật số vi khuẩn giảm dần từ pH=2,5 xuống pH=1,5 (hình 3 và bảng 3).



Hình 3. Khả năng chịu pH của chủng P6.N

Hình 3 và kết quả phân tích thống kê cho thấy ở các mức pH = 2,5; 2; 1,5 thì 5 chủng khảo sát P5.N, P6.N, P21.N, Đ3.M, Đ28.M khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Mật độ vi khuẩn dao động từ 6,08 – 8,61 log CFU/ml.

Các chủng *Bacillus* spp. đều có khả năng tồn

tại trong điều kiện pH thấp phù hợp với mức dạ dày tuyến và dạ dày cơ của gia cầm dao động trong khoảng từ 2,5-3,5 (Gauthier, 2002), vì vậy 5 chủng khảo sát đều đáp ứng tiêu chí chịu pH thấp. Ở pH=1,5 tương ứng nồng độ 10^5 và 10^6 chủng Đ28.M không có khả năng phát triển khuẩn lạc.

Bảng 3. Mật độ vi khuẩn *Bacillus* spp. tại các mức pH

Chủng vi khuẩn	Mật độ vi khuẩn (log CFU/ml)		
	pH = 2,5	pH = 2,0	pH = 1,5
P5.N	8,61	8,34	7,74
P6.N	8,35	8,36	8,20
P21.N	8,39	8,23	8,11
Đ3.M	8,50	8,03	6,80
Đ28.M	8,45	7,98	6,08

3.3.2. Đánh giá khả năng chịu muối mật của *Bacillus* spp.

Bảng 4. Mật độ vi khuẩn *Bacillus* spp. tại các thời điểm khảo sát

Chủng vi khuẩn	Mật độ vi khuẩn (log CFU/ml)			
	T0	T1	T2	T3
P5.N	7,69 ^A	7,82 ^A	7,98 ^A	7,91 ^A
P6.N	8,07 ^A	8,32 ^B	8,44 ^B	8,69 ^B
P21.N	7,96 ^A	8,15 ^C	8,51 ^C	8,76 ^C
Đ3.M	7,94 ^{A, B}	7,94 ^D	8,05 ^D	7,77 ^D
Đ28.M	7,79 ^B	7,89 ^E	7,89 ^E	7,74 ^D

Ghi chú: ^{A, B, C, D, E} các giá trị mang số mũ khác nhau trong cùng một cột thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,001$)

Kết quả phân tích thống kê cho thấy mật độ 5 chủng vi khuẩn khảo sát sau 3 giờ ủ với muối mật đều tăng so với mật độ ban đầu. Trong đó có chủng P5.N, Đ3.M và Đ28.M bắt đầu có khuynh hướng giảm ở thời điểm T2 đến T3, chứng tỏ không có tiềm năng sống sót trong điều kiện muối mật.

Trần Quốc Việt và cs. (2009) cho biết các dòng vi sinh vật thử nghiệm đều có khả năng tồn tại trong môi trường với nồng độ muối mật từ 0,3-0,5%. Kết quả khảo sát trên tương tự với khả năng sinh trưởng trong điều kiện muối mật của *B. subtilis* K-1993 và *B. amyloliquefaciens* B-1895 với tỷ lệ lần lượt là

88% và 84,85% (AIGburi *et al.*, 2016).

3.4. Khả năng bám dính của các chủng *Bacillus* spp.

Để thực hiện được chức năng probiotic, các vi khuẩn cần phải có khả năng bám dính với một số lượng lớn, phải có tỷ lệ kết dính cao. Do đó, khả năng bám dính là một trong những đặc tính cần phải được tiến hành kiểm tra trong quá trình chọn lọc vi khuẩn probiotic.

Khả năng tự bám dính trong cùng một chủng được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Tỷ lệ bám dính của vi khuẩn *Bacillus* spp. sau 1, 2, 3 và 4 giờ khảo sát

STT	Chủng vi khuẩn	Khả năng bám dính (%)			
		1 giờ	2 giờ	3 giờ	4 giờ
1	P6.N	3,35 ^A	11,41 ^A	13,73 ^A	27,13 ^A
2	P21.N	8,48 ^A	10,16 ^B	12,96 ^B	28,88 ^A

Ghi chú: ^{A, B} các giá trị mang số mũ khác nhau trong cùng một cột thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,001$)

Bảng 5 cho thấy 2 chủng P6.N và P21.N đều có khả năng tự bám dính và tỷ lệ này có xu hướng tăng dần theo thời gian. Sau 4 giờ ủ ở 37°C, chủng P6.N có tỷ lệ tự bám dính là 27,94% và P21.N 28,88%. Tại thời điểm 1 giờ và 4 giờ ủ, tỷ lệ tự bám dính của hai chủng khác biệt không có ý nghĩa thống kê, nhưng tại thời điểm 2 giờ và 3 giờ ủ thì có sự khác biệt.

Tỷ lệ bám dính cùng chủng tăng dần theo thời gian ủ là phù hợp với kết quả nghiên cứu của Lê Thị Hải Yến (2018), tỷ lệ tự bám dính của *B. subtilis* P33 và *B. subtilis* P72 lần lượt là 35,7% và 42,2%.

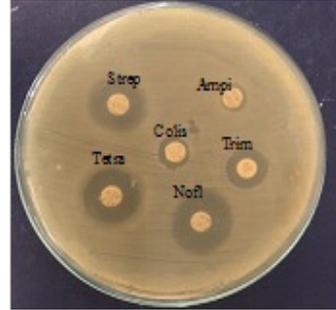
3.5. Khả năng kháng kháng sinh

Khả năng nhạy cảm với kháng sinh của vi khuẩn probiotic được xem là một trong những tiêu chí quan trọng trong tiêu chuẩn chọn lọc vi khuẩn probiotic (Hummel *et al.*, 2007).

Sáu loại kháng sinh được sử dụng trong thử nghiệm gồm colistin, trimethoprim, streptomycin, ampicillin, tetracycline, norfloxacin.

Tiêu chuẩn chọn vi khuẩn làm probiotic là không mang gen kháng kháng sinh vì nếu có chúng sẽ như một vector truyền gen kháng kháng sinh cho vật nuôi, từ đó làm tăng vi khuẩn kháng kháng sinh ở người. Do đó, việc chọn lọc chủng vi khuẩn probiotic an toàn cho người và động vật

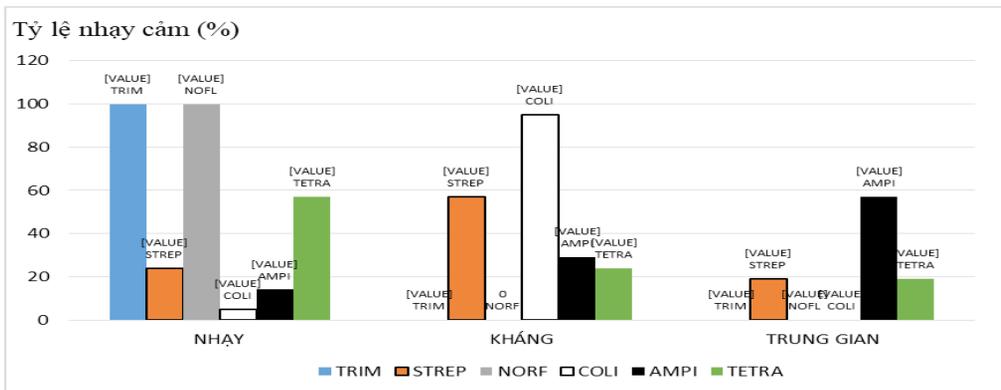
phải là chủng vi khuẩn càng nhạy với nhiều kháng sinh càng tốt.



Hình 4. Kết quả kháng sinh đồ của chủng vi khuẩn *Bacillus spp.*

Hình 5 cho thấy 7 chủng *Bacillus spp.* có tỷ lệ nhạy với kháng sinh lần lượt là: norfloxacin và trimethoprim 100%, tetracycline 57%, streptomycin 24%, ampicilin 14%, có đến 95% chủng vi khuẩn *Bacillus* đề kháng với colistin; điều này có thể giải thích là do colistin được sử dụng rộng rãi trong việc phòng và điều trị các bệnh nhiễm khuẩn đường ruột. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Sampa *et al.* (2012) khi khảo sát khả năng kháng kháng sinh đối với các chủng vi khuẩn phân lập từ nội tạng gà, kết quả tất cả các chủng đều kháng với colistin.

Qua khảo sát 7 chủng *Bacillus spp.* chúng tôi ghi nhận cả 7 chủng đều nhạy với kháng sinh và có khả năng chọn lọc làm probiotic.



Hình 5. Mức độ nhạy cảm kháng sinh của 7 chủng vi khuẩn *Bacillus spp.*

IV. KẾT LUẬN

Trong 7 chủng vi khuẩn *Bacillus* gồm: P5.N, P6.N, P18.N, P21.N, Đ3.M, Đ8.M, Đ28.M được

chọn để thử các đặc tính probiotic, có 2 chủng P6.N và P21.N đáp ứng cao các đặc tính về probiotic:

- Khả năng chịu pH thấp và muối mật tốt;

- Kháng với vi khuẩn gây bệnh trên gà ở cả 3 nồng độ khảo sát;

- Có khả năng tự bám dính trong 3 giờ đầu khảo sát và sinh enzyme ngoại bào mạnh;

- Nhạy với 3 loại kháng sinh: norfloxacin và trimethoprim 100%, tetracycline 57%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thị Đầu, 2021. Phân lập vi khuẩn *Bacillus* spp. từ đất và phân gà tại tỉnh Trà Vinh. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y*, số 6, trang 45-51.
2. Lê Thị Hải Yến, 2018. Tuyển chọn chủng *Bacillus subtilis* ứng dụng trong phòng trị bệnh đường tiêu hóa trên gà. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ* số 2, trang 26-32.
3. Trần Quốc Việt, Ninh Thị Len, Lê Văn Huyền, Bùi Thị Thu Huyền và Nguyễn Thị Hồng, 2009. Ảnh hưởng của việc bổ sung probiotic vào thức ăn và nước uống đến sinh trưởng và hiệu quả sử dụng thức ăn của gà thịt. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Chăn nuôi*, 20: 32-35.
4. AlGhuri A., A. Volski, C. Cugini, E.M. Walsh, V.A Chistyakov, M.S. Mazanko, A.B. Bren, L.M. Dicks. & M.L. Chikindas, 2016. Safety properties & probiotic potential of *Bacillus subtilis* KATMIRA1933 & *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895. *Advances in Microbiology*, vol. 6.
5. Dhama, K., V. Verma, P. Sawant, R. Tiwari, R. Vaid & R. Chauhan, 2011. Applications of probiotics in poultry: Enhancing immunity & beneficial effects on production performances & health: A review. *J. Immunol. Immunopathol*, 13 (1): 1-19.
6. Gauthier, R., 2002. Intestinal health, the key to productivity: The case of organic acids. *IASA XXVII convencion ANECA-WPDC*.
7. Harley J. P., 2004. Laboratory exercises in microbiology: McGraw-Hill Science. *Engineering & Mathematics*.
8. Huff W.E., G.R. Huff, N.C. Rath, J.M. Balog, A.M. Donoghue, 2002. Prevention of *Escherichia coli* respiratory infection in broiler chickens with bacteriophages (SPRO2). *Environment & Health Poultry Science*. 81:437-441.
9. Hummel, A. S., C. Hertel, W. H. Holzapfel & C. M. Franz, 2007. Antibiotic resistances of starter & probiotic strains of lactic acid bacteria. *Applied & environmental microbiology*, 73 (3): 730-739.
10. Kos B, Šušković J, Vuković S, Šimpraga M, Frece J, Matošić S, 2003. Adhesion & aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of applied microbiology* 94 (6): 981-987.
11. Moore T, Globa L., Barbaree J., Vodanoy V., Sorokulova I., 2013. Antagonistic activity of *Bacillus* bacteria against food-borne pathogens. *Prob Health* 1:110.
12. Parsons, C., 2004. Gastrointestinal development & nutrient digestion in chicks. Paper read at Proceedings of the 25th Western Nutrition Conference, Saskatoon, Canada. *University of Saskatchewan*, Saskatoon, Canada.
13. Sampa R.R, Bahanur R., Jayedul H., Nazmul H.N, 2012. Isolation and identification of bacterial flora from internal organs of broilers and their antibiogram studies. *Microbes and Health* 1(2): 72-75
14. Stein T, 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses & specific functions. *Mol Microbiol* 56(4): 845-857.
15. Tuomola, E., R. Crittenden, M. Playne, E. Isolauri & S. Salminen, 2001. Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *The American journal of clinical nutrition*, 73 (2): 393s-398s.
16. Wybo, I., C. Wildemaue, C. Godard, S. Bertrand & J.-M. Collard, 2004. Antimicrobial drug resistance in nontyphoid human *Salmonella* in Belgium: trends for the period 2000-2002. *Acta Clinica Belgica*, 59 (3): 152-160.
17. FAO/WHO, 2002. *Guidelines for the evaluation of probiotics in food*. London, Ontario: Food & Agriculture Organization of United Nations & World Health Organization Working Group Report.
18. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2016.

Ngày nhận 1-4-2021

Ngày phản biện 20-4-2021

Ngày đăng 1-7-2022