

## PHÂN LẬP VÀ ĐÁNH GIÁ TIỀM NĂNG PROBIOTIC CÁC CHỦNG *Bacillus subtilis*

Lý Thị Thu Lan<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Anh Thu<sup>2\*</sup>, Nguyễn Thị Mỹ Hằng<sup>3</sup>, Võ Nguyễn Nghĩa<sup>4</sup>

*ISOLATION AND EVALUATION OF POTENTIAL PROBIOTIC OF Bacillus subtilis*

Ly Thi Thu Lan<sup>1</sup>, Nguyen Thi Anh Thu<sup>2\*</sup>, Nguyen Thi My Hang<sup>3</sup>, Vo Nguyen Nghia<sup>4</sup>

**Tóm tắt** – Thu thập 60 mẫu ruột gà từ các trại gà ở thành phố Cần Thơ, Trà Vinh, và An Giang, nghiên cứu ghi nhận được 22 chủng có khả năng là vi khuẩn *Bacillus spp.* với các đặc điểm như vi khuẩn hình que, khuẩn lạc trắng đục, tròn lồi, và là vi khuẩn gram dương. Các chủng vi khuẩn được tìm thấy (22 chủng) tiếp tục được khảo sát về khả năng di động và xin bào tử. Kết quả lựa chọn được 5/22 chủng để tiến hành chạy PCR và giải trình tự gen. Các vi khuẩn nghi ngờ được xác định bằng kỹ thuật giải mã trình tự gen 16S rRNA. Hai khuẩn tìm được là *Bacillus subtilis*, đặc tính probiotic của hai chủng TV12 và AG10 được khảo sát các đặc điểm bao gồm: khả năng bám dính, sức chịu đựng được trong môi trường pH và muối mật của hệ tiêu hoá, mức độ tự bám dính. Tại pH 2 và 3, hai vi khuẩn có tỉ lệ sống khá cao là 56,07% (TV12), 55,06% (AG10) và duy trì tỉ lệ sống trong suốt 180 phút khảo sát ở nồng độ muối mật 0,3%. Về mức độ tự bám dính, khả năng liên kết của hai chủng tăng gấp đôi sau 5 giờ thử thách ở nhiệt độ tiêu chuẩn.

**Từ khóa:** *Bacillus subtilis*, phân lập, probiotic, ruột gà.

**Abstract** – The study was conducted on 60 chicken intestine samples collected from chicken farms in Can Tho City, Tra Vinh Province, and

An Giang Province. The results obtained a total of 22 potential *Bacillus spp.* with cultural characteristics such as circular colonies, fuzzy white, round, rod-shaped bacteria, and gram-positive. These bacterial strains (22 strains) were further examined for motility and spore formation capabilities. Five out of the 22 strains were selected for PCR and gene sequencing. Suspected bacteria were identified using 16S rRNA gene sequencing. After collecting the *Bacillus subtilis*, the probiotic properties of the two strains TV12 and AG10 were evaluated with criteria including the tolerance of acid bile salts (pH and bile salts), and aggregation ability. The study recorded that the two bacterial strains had quite high survival rates of 56.07% (TV12) and 55.06% (AG10), respectively at pH 2 and 3, and maintained survival rates during 180 minutes at 0.3% bile salt concentration. Regarding aggregation ability and high temperature doubled after 5 hours of incubation at standard temperature.

**Keywords:** *Bacillus subtilis*, intestine sample, isolation, probiotics.

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, dịch bệnh trên động vật đang ngày càng có chiều hướng tăng cao và khó kiểm soát. Vì vậy, kháng sinh được dùng trong việc ngăn ngừa bệnh ngày càng rộng rãi. Trương Huỳnh Anh Vũ và cộng sự [1] cho biết kháng sinh được sử dụng chưa được kiểm soát đã dẫn đến thịt tươi sống cũng có thể vấy bẩn các dạng vi trùng, vi khuẩn có khả năng kháng kháng sinh. Do đó, một số biện pháp thay thế đang được nghiên cứu, trong đó có vấn đề sử dụng các chế phẩm probiotic. Đặc biệt, các hộ chăn nuôi gia cầm,

<sup>1,2,3</sup>Trường Đại học Trà Vinh, Việt Nam

<sup>4</sup>Học viên cao học, Trường Đại học Trà Vinh, Việt Nam  
Ngày nhận bài: 07/4/2024; Ngày nhận bài chỉnh sửa: 03/5/2024; Ngày chấp nhận đăng: 17/5/2024

\*Tác giả liên hệ: [anhthucnty@tvu.edu.vn](mailto:anhthucnty@tvu.edu.vn)

<sup>1,2,3</sup>Tra Vinh University, Vietnam

<sup>4</sup>Graduated, Tra Vinh University, Vietnam

Received date: 07<sup>th</sup> April 2024; Revised date: 03<sup>rd</sup> May 2024; Accepted date: 17<sup>th</sup> May 2024

\*Corresponding author: [anhthucnty@tvu.edu.vn](mailto:anhthucnty@tvu.edu.vn)

probiotic dựa trên việc sử dụng vi khuẩn *Bacillus* spp. đang trở nên phù hợp như là lựa chọn thay thế cho việc dùng kháng sinh [2]. Theo Kabir [3], việc sử dụng probiotic có rất nhiều ưu điểm như giúp khả năng tiêu hoá và hấp thụ thức ăn tốt hơn, hạn chế sự phát triển vi khuẩn có hại, từ đó giúp vật nuôi tăng sức đề kháng chống lại bệnh và tăng năng suất vật nuôi [4]. Trong đó, vi khuẩn *Bacillus* được sử dụng rộng rãi vì chưa có nghiên cứu ghi nhận chủng này có khả năng gây hại trong quá trình sử dụng [5]. Tuy nhiên, việc tìm được vi khuẩn chuyên biệt trên gia cầm vẫn còn hạn chế [6] và chỉ có một vài chủng nhất định có đặc tính sinh học thích hợp để sử dụng làm probiotic. Vì vậy, nghiên cứu này có mục tiêu tìm ra chủng vi khuẩn có thể dùng làm probiotic ứng dụng trong thực tế.

## II. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

Từ lâu, vi khuẩn *Bacillus* spp. có ưu điểm là an toàn và có khả năng thích nghi cao đối với tác động lí hoá. Do vậy, vi khuẩn này được ưu tiên để chế tạo probiotic cho vật nuôi ở quy mô công nghiệp. Ngoài ra, hai đặc điểm quan trọng quyết định để trở thành vi khuẩn probiotic là khả năng phát triển và khả năng bám dính [7, 8] trong hệ tiêu hoá. Chaiyawan et al. [9] thực hiện chọn lọc vi khuẩn hình thành bào tử tại địa phương có đặc tính sinh học, 164 chủng vi khuẩn hình thành bào tử đã được phân lập từ 152 mẫu ruột được thu thập từ 38 con gà thả vườn ở địa phương được nuôi ở phía bắc Thái Lan. Để xác định các chủng vi khuẩn, phương pháp xác định dựa vào hình thái và sinh hóa, sau đó là phân tích trình tự 16S rDNA. Dựa vào trình tự 16S rDNA, T3-1 được xác định là *Bacillus* spp. Bào tử của chủng này có khả năng kháng dịch dạ dày và dịch ruột non mô phỏng, nhiệt độ cao lên tới 100°C và có thể tồn tại trong nước có chứa dư lượng clo 5 ppm trong 120 phút. Razdan et al. [10] khảo sát các vi khuẩn được phân lập trong điều kiện pH thấp 2,0, muối mật (0,02 – 0,25%) và NaCl (2–14%). Kết quả cho thấy các chủng đều tồn tại được ở môi trường đường tiêu hoá. Ngoài ra, các chủng CM-4 và KD-7 đáng chú ý nhất vì có thể chống lại một số chủng gây hại như *S.ureus* và *Streptococcus* spp. Tương tự, khảo sát của Lê Thị Hải Yến và cộng sự [6] tìm được 42 chủng

từ phân và mẫu đất tại trại gà ở Cần Thơ. Các chủng này được sàng lọc qua các xét nghiệm như xét nghiệm lecithinase và catalase, xét nghiệm Voges-Proskauer (test VP), xét nghiệm amylase, khả năng tồn tại ở 50°C và xét nghiệm cellulose. Để định danh vi khuẩn, nhóm tác giả sử dụng bộ kit API CH50B và giải mã trình tự gen 16S rRNA để khẳng định lại kết quả nghiên cứu của kit API, kết quả chủng vi khuẩn CT11 đã được xác định là *Bacillus subtilis*. Ramlucken et al. [2] cũng tiến hành đánh giá bằng việc đánh giá khả năng sống sót và tăng sinh của chủng khuẩn phân lập trong điều kiện dịch tiêu hóa và độ bám dính trên tế bào biểu mô, sản xuất các enzym ngoại bào và thể hiện hoạt tính đối kháng chống lại các mầm bệnh. Kết quả thu được sáu chủng phân lập đã được chọn do khả năng sinh học toàn diện của một probiotic. Các chủng được xác định bằng trình tự RNA 16S và tìm ra các chủng phân lập này là *B. subtilis* và *B. velezensis*. Khảo sát của Nguyễn Thị Hạnh Chi và cộng sự [11], Nguyễn Thị Phương Thảo và cộng sự [12] cũng đã nghiên cứu được vi khuẩn *Bacillus* spp. có thể sinh enzyme và có thể sống sót và phát triển được ở 50°C, kháng các vi khuẩn có hại đường tiêu hóa *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* với đường kính vùng ức chế 12–22 mm; có thể chống chịu trong môi trường có độ pH 2,0 và muối mật 2%. Các nghiên cứu trước đây đã cho thấy vấn đề probiotic đang rất được quan tâm và sẽ là một xu thế tất yếu để ứng dụng trong tương lai, do vậy việc tìm ra chủng vi khuẩn probiotic có đặc tính probiotic và nguồn gốc từ Việt Nam là thật sự cần thiết.

## III. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### A. Địa điểm nghiên cứu

Thí nghiệm được thực hiện tại Phòng Thí nghiệm Công nghệ Sinh học Động vật, Khoa Chăn nuôi, Trường Đại học Cần Thơ và Phòng Thí nghiệm Trường Đại học Trà Vinh.

Mẫu được giải trình tự gen 16S rRNA *Bacillus* spp. tại Công ty TNHH T&N Biosolution (Việt Nam).

### B. Vật liệu nghiên cứu

Tổng cộng 60 mẫu ruột (20 mẫu/tỉnh) được thu lấy tại các trại gà ở tỉnh An Giang, tỉnh Trà Vinh

và thành phố Cần Thơ. Mẫu được kí hiệu gồm hai chữ cái đầu tiên là tên của tỉnh tương ứng như Trà Vinh: TV, Cần Thơ: CT, An Giang: AG; và số thứ tự từ 1 đến 20 đại diện cho số thứ tự của mẫu thu được.

### C. Phương pháp xác định các chủng *Bacillus* spp.

#### - Phân lập vi khuẩn

Mẫu ruột (ruột non và ruột già) sẽ được nghiền và pha loãng theo phương pháp Aslim et al. [13]. Mẫu sau khi được pha loãng, ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ 37°C để tăng sinh. Sau đó, lấy 1 ml dung dịch mẫu đã tăng sinh chuyển vào ống tube để xử lí nhiệt ở nhiệt độ 80°C trong 30 phút. Sử dụng que cấy, cấy mẫu lên môi trường LB (Lauryl Tryptose Broth-Himedia) và ủ ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ. Các khuẩn lạc *Bacillus* spp. được nhận dạng dựa trên mô tả của David et al. [14] với đặc điểm như có màu trắng đục, hình dạng tròn, bìa nguyên. Vi khuẩn sẽ được lưu trữ trong ống Eppendorf chứa môi trường NB với glycerol 20% theo tiêu chuẩn TCVN 8736 - 2011. Sau khi được nuôi cấy, phân lập, thực hiện nhuộm Gram để chọn lọc ra các chủng có đặc điểm của vi khuẩn *Bacillus* spp. như hình que, Gram dương, sinh bào tử và di động.

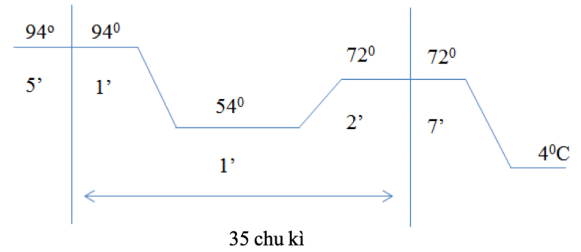
#### - Kiểm tra khả năng di động

Sử dụng que cấy chấm khuẩn lạc *Bacillus* spp. từ đĩa TSA cho vào các ống nghiệm chứa môi trường thạch chuyên biệt LB đặt theo phương thẳng đứng, nuôi thích hợp ở 37°C/24 giờ. Dựa vào đặc điểm mọc theo đường cấy để xác định sự di động của vi khuẩn: di động (mọc lan ra), không di động (mọc thẳng đứng).

#### - Định danh vi khuẩn

Quy trình trích xuất DNA được mô tả theo Breugelmans et al. [15], sau khi li trích DNA, sử dụng cặp mồi được thiết kế theo Lane et al. (1985) [16] để thực hiện PCR với trình tự gồm: 27F: (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') 1492R: (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'27F), hỗn hợp được cho vào ống tube chuyên dùng trong PCR với chu kì gia nhiệt như Hình 1. Triển khai điện di các sản phẩm PCR trên gel agarose 2%, 110 V, 400 mA trong 15 phút. Các mẫu điện di PCR sẽ được quan sát thông qua hình ảnh hiện

trên gel bằng hệ thống chụp hình Logic 1500 Imaging System của Kodak. Tiến hành giải mã trình tự gene để xác định tên loài [5] đối với các mẫu có vạch DNA đậm và rõ trên gel agarose.



Hình 1: Chu kì gia nhiệt của phản ứng PCR [16]

### D. Phương pháp kiểm tra đặc điểm Probiotic

#### - Ảnh hưởng của pH lên khả năng tồn tại của vi khuẩn

Bổ trí được thực hiện ở mức pH khác nhau: 2 và 3. Nghiên cứu được lặp lại ba lần theo mô tả của Erkkilä et al. [17]. Huyền phù vi khuẩn (được nuôi trong môi trường NB ở 37°C trong 24 giờ) trong dịch đệm PBS (pH = 7,2). Tiếp tục pha loãng để có được mật độ vi khuẩn là 10<sup>8</sup> cfu/ml. Sau đó, cho 1 ml dịch huyền phù vào 9 ml dung dịch (NaCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O và KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) được chuẩn độ về các pH = 2 và 3 bằng HCL 1 M. Cho dung dịch đã được trộn đều ủ trong máy lắc 90 phút ở 37°C. Các sinh vật sống sót được đếm trên môi trường thạch NB (37°C trong 24 giờ). Đếm số lượng khuẩn lạc ở các đĩa có từ 30 đến 300 khuẩn lạc, dựa vào số lượng khuẩn lạc để tìm ra mật độ vi khuẩn ban đầu theo công thức sau:  $Stbo/ml = Ax100 \times B$

#### Trong đó:

Số khuẩn lạc trung bình đếm được của ba giọt là A (số khuẩn lạc/10 μl).

Hệ số pha loãng là B (ví dụ 10<sup>4</sup>; 10<sup>5</sup>; 10<sup>6</sup>;...)

Hệ số chuyển đổi từ 10 μl đến 1 ml là 100

- Tác động của nồng độ muối mật lên khả năng chống chịu của vi khuẩn

Nghiên cứu dựa trên mô tả bởi Gilliland et al. (1984) [18], sau tăng sinh của vi khuẩn ở môi trường NB trong 24 giờ, đo chỉ số quang học (OD) tại bước sóng 600 nm nhằm đưa nồng

độ vi khuẩn ở mức 108 cfu/ml, với OD từ 0,3 đến 0,5. Lấy 1,5 ml dung dịch nuôi cấy chứa vi khuẩn với mật số 108 cfu/ml và chuyển vào 4 ống Eppendorf (2 ml), li tâm với tốc độ 2.000 vòng/phút trong 15 phút để thu tế bào. Tiếp theo, rút 1,5 ml nước cất vô trùng để rửa tế bào và thu cạn. Cạn thu được từ 04 ống Eppendorf (1 ml) được chuyển vào 04 ống nghiệm chứa 9 ml môi trường NB có bổ sung 0,3% muối mật và được kí hiệu lần lượt là G0, G1, G2, G3, các ống nghiệm được lắc đều. Sau các mốc thời gian (0, 60, 120 và 180 phút) tương ứng với các ống nghiệm G0, G1, G2, G3, tiến hành pha loãng và đếm sống nhỏ giọt để đếm mật số vi khuẩn. Mật số khuẩn lạc mà vi khuẩn sống được trên môi trường nuôi cấy sẽ được ghi nhận.

Số lượng khuẩn lạc ở các đĩa có từ 30 đến 300 khuẩn lạc được đếm, mỗi khuẩn lạc phát triển từ một tế bào vi khuẩn, dựa vào số lượng khuẩn lạc để tìm ra mật độ vi khuẩn ban đầu theo công thức sau:  $Stbo/ml = Ax100 \times B$

Trong đó:

Số khuẩn lạc trung bình đếm được của ba giọt là A (số khuẩn lạc/10  $\mu$ l).

Hệ số pha loãng là B (ví dụ  $10^4$ ;  $10^5$ ;  $10^6$ ;...)

Hệ số chuyển đổi từ 10  $\mu$ l đến 1 ml là 100

- Đánh giá khả năng tự bám dính của vi khuẩn

Áp dụng phương pháp của AIGburi et al. [19] để triển khai thí nghiệm, nuôi vi khuẩn trong NB và lắc ở 120 vòng/phút, ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ. Sau khi tăng sinh, sinh khối tế bào thu được được rửa hai lần và tái huyền phù dung dịch đệm PBS. Sau đó, đo chỉ số quang học (OD) tại bước sóng 600 nm và đưa mật độ vi khuẩn để đạt mức 108 cfu/ml. Tiếp tục rút 4 ml dịch vi khuẩn cho vào 04 ống nghiệm và đánh dấu là TR1, TR2, TR3, TR4. Ủ các ống nghiệm ở nhiệt độ 37°C và đo OD của từng ống nghiệm tại 04 thời điểm 60, 120, 180 và 240 phút. Đặc tính tự bám dính được đo như sau:

Khả năng tự bám dính (%) =  $(A0 \sim At) / A0 \times 100$ .

Trong đó:

$A_0$ : OD 600 của dung dịch tế bào ở thời điểm  $t = 0$  giờ;

$A_t$ : OD 600 dung dịch tế bào ở các thời điểm  $t = 60$  phút, 120 phút, 180 phút, 240 phút.

#### E. Xử lí số liệu

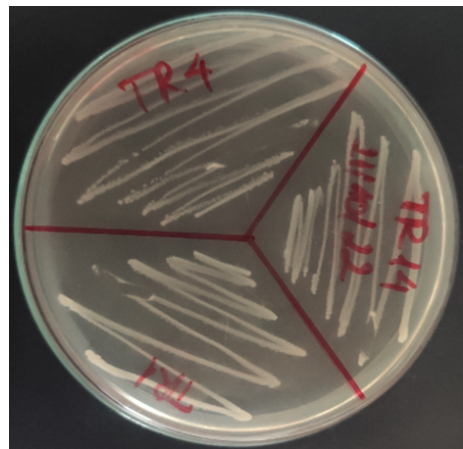
Nghiên cứu sử dụng phần mềm Excel 2013 để tổng hợp số liệu và phân tích thống kê theo Minitab 16.1, ở mức ý nghĩa 95%.

### IV. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### A. Kết quả phân lập và định danh vi khuẩn *Bacillus* spp.

##### Phân lập vi khuẩn *Bacillus* spp.

Hình 2 cho thấy có 22 chủng vi khuẩn chiếm tỉ lệ 36,67% (22/60 mẫu) có đặc điểm được ghi nhận như sau: hầu hết các khuẩn lạc có dạng tròn đều, màu trắng trong hoặc trắng đục, và hình dạng bìa nguyên. Kết quả này tương thích với Lee et al. [20], Nguyễn Thị Hạnh Chi và cộng sự [11] và Lu et al. [21], các khuẩn lạc *Bacillus* spp. có màu trắng, tròn, khô, bìa nguyên, Gram dương và tế bào có kích thước trên 3  $\mu$ m.



Hình 2: Khuẩn lạc trên môi trường LB

##### Khả năng sinh bào tử

Nghiên cứu đã chọn 22 dòng vi khuẩn để kiểm tra việc sinh bào tử. Vi khuẩn được tăng sinh, sau đó nuôi cấy trên môi trường LB (dành cho *Bacillus* spp.) ở 37°C/24 giờ.

Kết quả Bảng 1 cho thấy rằng, trên môi trường LB, tỉ lệ vi khuẩn sinh bào tử là 9/22 (40,90%). Tỉ lệ nghiên cứu này tương đương với Nguyễn Thị Hạnh Chi [11], tìm được 137 chủng vi khuẩn nghi ngờ là vi khuẩn *Bacillus* với đặc điểm như trực khuẩn Gram dương và sinh bào tử khi quan sát sau 48 giờ. Trong đó, vi khuẩn có bào tử ở

**Bảng 1: Kết quả sinh bào tử của vi khuẩn phân lập từ tỉnh Trà Vinh, tỉnh An Giang và thành phố Cần Thơ**

Địa điểm	Số lượng mẫu	Số lượng <i>Bacillus</i> spp. phân lập		Số lượng vi khuẩn sinh bào tử	
		Số lượng	Tỉ lệ (%)	Số lượng	Tỉ lệ (%)
Trà Vinh	20	10	50	5	50
Cần Thơ	20	8	40	2	25
An Giang	20	4	20	2	50
Tổng	60	22	36,66	9	40,90

trung tâm chiếm 50,36% và 37,96% khuẩn lạc có bào tử không làm biến đổi hình dạng tế bào.

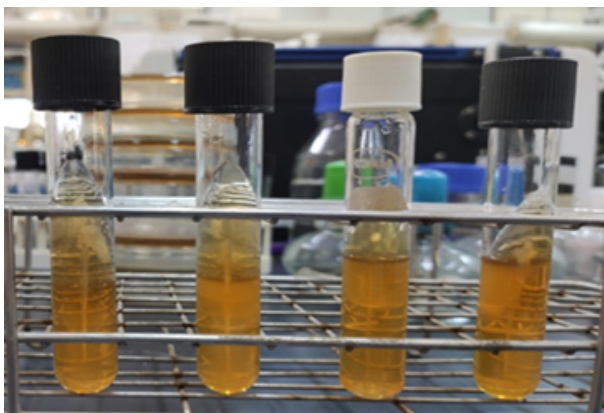
**Kiểm tra sự di động của vi khuẩn**

Từ kết quả sinh bào tử, 09 dòng vi khuẩn được chọn lọc để kiểm tra sự di động.

**Bảng 2: Sự di động của dòng vi khuẩn**

Đặc điểm	Số lượng vi khuẩn nuôi trên LB(n = 9)	
	Số lượng (dòng)	Tỉ lệ (%)
Di động	5	55,56
Không di động	4	44,44

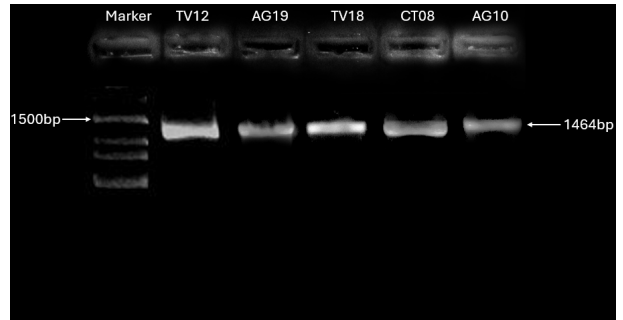
Bảng 2 thể hiện tỉ lệ vi khuẩn di động được là khá cao, với 5/9 dòng vi khuẩn, chiếm 55,56%, trong khi các dòng vi khuẩn không di động chiếm 4/9 dòng (44,44%). Theo Nguyễn Lâm Dũng [22], khi vi khuẩn đó có thể phát triển lan ra theo đường cây cho thấy vi khuẩn có sự di động. Dựa vào kết quả di động (Hình 3), 05 chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. được chọn lọc vì theo Lee et al. [20], Nguyễn Thị Hạnh Chi và cộng sự [11], hầu hết các đặc điểm như hình que, Gram dương, sinh bào tử và di động đều xuất hiện ở vi khuẩn *Bacillus* spp.



**Hình 3: Vi khuẩn di động khi phát triển trong môi trường LB**

**Định danh vi khuẩn**

Năm chủng được chọn lọc dựa vào các đặc điểm của chủng *Bacillus* spp. được đưa vào để thực hiện phản ứng PCR với cặp mồi 27F và 1492R, khuếch đại vùng 16S rRNA của vi khuẩn. Sản phẩm PCR có kích thước 1464 bp (Hình 4).



**Hình 4: Kết quả PCR trên thạch agarose**

Kết quả giải trình tự thu được đoạn gene 16S rRNA của dòng *Bacillus* là 898 nucleotides và đạt độ tương đồng cao lên đến 99% khi đối sánh trên ngân hàng gene thế giới bằng chương trình BLAST, do đó vi khuẩn được xác định là *B. subtilis* đủ độ tin cậy. Trình tự đoạn gene 16S rRNA của dòng *Bacillus* như sau Hình 5.

Janda et al. [23] đề nghị độ dài trình tự gen 16S khi giải mã để định danh loài cần ít nhất từ 500 đến 525 bp và khi đối sánh trình tự đoạn gen với mức độ tương đồng đạt  $\geq 99\%$  thì độ chính xác đến mức độ loài (Hình 6). Như vậy, từ 22 chủng vi khuẩn ban đầu được sàng lọc các đặc điểm vi khuẩn và sử dụng phương pháp PCR, giải trình tự gen 16S rRNA trên 5 chủng, có hai chủng vi khuẩn được phân lập từ tỉnh Trà Vinh (TV10) và An Giang (AG12), xác định là *Bacillus subtilis*.

**B. Đặc tính probiotic của hai chủng *Bacillus subtilis***

**Khả năng chịu pH**

Môi trường axit trong hệ tiêu hoá được coi là một môi trường khắc nghiệt, vì có độ pH rất thấp. Theo Lê Thị Hải Yến và cộng sự [6], để có thể trở thành chủng probiotic tiềm năng, vi khuẩn có thể chịu đựng trong môi trường có pH thấp.

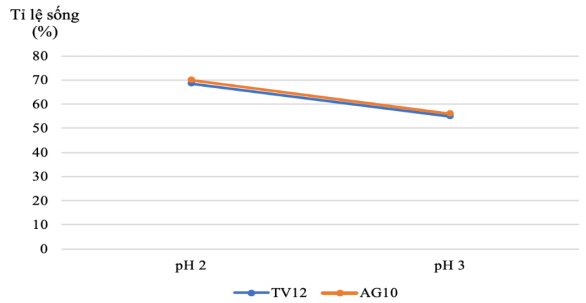
```
<ATCGGGGGCTGGCTCCTAAAGGTTACCTCACCGACTTCGG
GTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGGGGTGTGTACAAG
GCCCGGGAACGTATTACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTA
CTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCCA
TCCGAACAGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGC
GGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGT
AGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCC
ACCTTCCTCCGGTTTGTCCACGGCAGTCACCTTAGAGTGCC
CAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTT
GCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACA
ACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCGAAGGGGACGTCC
TATCTCTAGGATTGTCAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGT
TCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTT
GTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGA
CCGTAATCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGC
ACTAAGGGGGCGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTT
TACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCC
CAGCTTTTCGCTCCTCAGCGTCACTTACAGACCAGAGAGTC
GCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTTACGCATTTCA
CCGCTACAGTGGAATTCACCTCTCCTCTTCTGCACTCAAG
TTCAGTTTCAATGACCTCCCGGTTGAGCCGGGGTTTC
CATCAGACTTAAGACCGCTGCGAGCCTTACGCCATAA>
```

Hình 5: Trình tự đoạn gene 16S rRNA của dòng Bacillus

Distribution of the top 4 Blast Hits on 4 subject sequences



Hình 6: Trình tự gene vi khuẩn



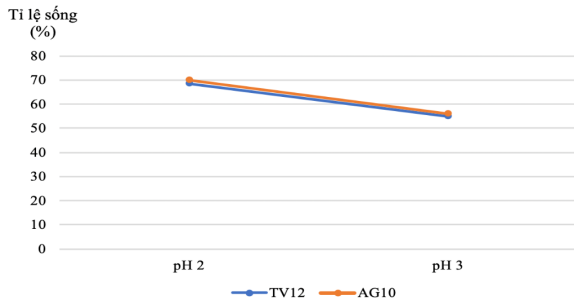
Hình 7: Tỷ lệ sống ở pH 2 và 3 của vi khuẩn Bacillus subtilis

Qua Hình 7, chủng AG10 có tỷ lệ sống sót cao hơn chủng TV12 ở pH thấp với tỷ lệ lần lượt là 55,06 (AG10) và 56,07 (TV12), sự chênh lệch này không ý nghĩa về thống kê. Ngoài ra, 02 chủng đều có tỷ lệ sống giảm từ pH 2 đến pH 3 nhưng sự giảm này không quá khác biệt với chủng AG10 (từ 69,87% đến 56,07%) và TV12 (từ 68,44% giảm còn 55,05%). Tỷ lệ nghiên cứu này thấp hơn Lê Thị Hải Yến và cộng sự [6], ở pH 2 và 3 thì chủng VL28 có tỷ lệ sống đến 98% và Vũ Thanh Thảo và cộng sự [12], ghi nhận tỷ lệ sống của chủng B. subtilis BS02 là 95% ở pH 2. Tuy nhiên, ở pH = 2, tỷ lệ sống của 02 chủng tương đồng với chủng B. subtilis natto trong nghiên cứu của Nhi et al. [24] (59,68% ở pH = 2). Hồ Thị Trường Thy và cộng sự [25] nghiên cứu trên chủng B. subtilis B20.1 cho biết chủng này có thể chịu đựng tốt ở pH 4 và 5, nhưng lại giảm tỷ lệ sống ở pH 2 và 3. Do đó, cả 02 chủng AG10 và TV12 có thể sống sót ở độ pH thấp (> 50%) và cho thấy được đặc tính probiotic tiềm năng.

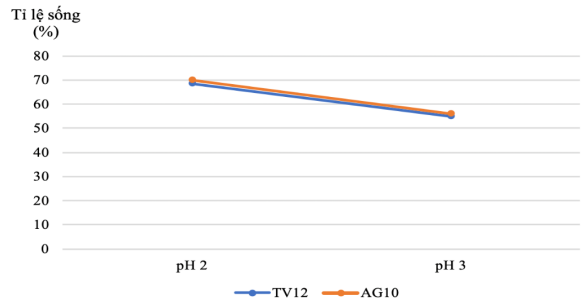
**Khả năng chịu đựng trong điều kiện muối mật 0,3%**

Theo Gillilan et al. [18], môi trường muối mật 0,3% được xem là lựa chọn để đánh giá vi sinh vật có thể chịu đựng môi trường mật. Do đó, ngoài việc chịu được pH thấp, chủng vi khuẩn cần vượt qua được nồng độ muối mật trong đường tiêu hoá.

Theo Hình 8, kết quả 02 chủng có thể duy trì sự sống cao trong điều kiện muối mật 0,3% và có xu hướng tăng trong suốt thời gian 180 phút từ 66,52% đến 72,64% (TV12) và từ 66,64% đến 72,18% (AG10), đạt đỉnh cao ở thời điểm 120



Hình 8: Vi khuẩn tồn tại trong muối mật



Hình 9: Độ tự bám dính của 02 vi khuẩn *Bacillus subtilis*

phút với tỉ lệ 77,31% (TV12) và 77,28% (AG10). Sự khác nhau này không có ý nghĩa trong thống kê. Kết quả này tương đương với Trần Quốc Việt và cộng sự [26] và Trịnh Thị Hồng Mơ [5], các tác giả đã tìm được vi khuẩn *Bacillus* có thể sống sót ở điều kiện muối mật 0,3%. Ngô Chí Công và cộng sự [27] cũng khảo sát 11 chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. về sự chịu đựng chịu muối mật ở các phần trăm muối mật khác nhau, kết quả đạt được các dòng vi khuẩn đều có thể duy trì sự sống và phát triển và tồn tại ở muối mật 0,3%. Thêm vào đó, theo Chaiyawan et al. [9], thời gian vận chuyển thức ăn từ dạ dày và mề đến ruột non là khoảng hơn 120 phút. Do đó, vi khuẩn được khảo sát có thể duy trì trong suốt 180 phút. Điều này chứng tỏ vi khuẩn có thể vượt qua rào cản trong đường tiêu hoá. Vì vậy, các chủng *Bacillus* spp. tiềm năng được tìm thấy khả năng rất cao vượt qua hàng rào đường tiêu hoá trong gia cầm.

#### Khả năng tự bám dính

Sau thời gian theo dõi 240 phút, *Bacillus subtilis* có độ bám dính cao và xu hướng tăng gấp đôi so với lúc bắt đầu. Tỉ lệ bám dính (Hình 8) tăng ở chủng TV12 (từ 23,90% đến 65,44%) và AG10 (từ 24,42% đến 66,63%)

Kết quả tương đương với Hmani et al. [28] tại vị trí hồng tràng, theo đó độ bám dính của tế bào *B. subtilis* HB2 và DB430 với tế bào ruột gà cho thấy có tiềm năng tốt. Trên thực tế, độ bám dính tế bào biểu mô của HB2 và DB430 ở tá tràng (độ bám dính lần lượt là 82 và 80%) và hồng tràng (độ bám dính lần lượt là 69 và 68%) so với ở hồi tràng (độ bám dính lần lượt là 56 và 48%). Theo Kos et al. [29], tự bám dính là khả năng liên kết của vi khuẩn trong cùng một chủng để có thể tạo thành một quần thể, qua đó các vi khuẩn sẽ

có được kiểu quan hệ hỗ trợ cùng loài để tăng cường sức sống và phát triển, đồng thời giúp vi khuẩn không bị đào thải ra ngoài và cạnh tranh mạnh mẽ hơn các vi khuẩn khác. Hmani et al. [28] cũng cho rằng đặc tính bám dính rất quan trọng vì nó ngăn chặn sự trục xuất nhanh chóng của men vi sinh bằng sự co bóp và chuyển động nhu động của ruột, đồng thời cũng có thể ngăn chặn sự bám dính của mầm bệnh bằng các tương tác không gian hoặc tắc nghẽn các thụ thể tế bào cụ thể và loại bỏ chúng khỏi đường ruột. Do đó, 02 chủng trên đều có khả năng tương đương nhau trong việc được chọn làm probiotic.

#### V. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Từ 60 mẫu ruột gà, nghiên cứu đã tìm được 02 chủng *Bacillus subtilis* là AG10 và TV12. Vi khuẩn được khảo sát các đặc điểm probiotic và chứng minh cả 02 chủng có thể sống phát triển trong điều kiện pH thấp và muối mật ở 0,3% với tỉ lệ tương đương nhau. Bên cạnh đó, khả năng tự bám dính của 02 chủng cũng ở mức cao, qua đó có thể thấy cả AG10 và TV12 đều có thể được sử dụng để sản xuất ra các probiotic trong chăn nuôi.

Các nghiên cứu tiếp theo có thể sử dụng các vi khuẩn được tìm thấy để sản xuất probiotic và thử nghiệm khả năng phòng, điều bệnh trong chăn nuôi gà.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Trương Huỳnh Anh Vũ, Nguyễn Hoàng Khuê Tú, Chu Văn Hải, Huỳnh Yên Hà. Thực trạng và đặc điểm kháng kháng sinh của *Salmonella* spp. phân lập từ sản phẩm thịt tươi sống tại Thành phố Hồ Chí Minh. *Tạp*

- chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*. 2021;63(8): 55–59. [Truong Huynh Anh Vu, Nguyen Hoang Khue Tu, Chu Van Hai, Huynh Yen Ha. Antimicrobial susceptibility of Salmonella spp. isolated from raw meats at traditional markets in Ho Chi Minh. *Vietnam Journal of Science and Technology*. 2021;63(8): 55–59].
- [2] Ramlucken U, Roets Y, Ramchuran SO, Moonsamy G, Van Rensburg CJ, Thantsha MS, Lalloo R. Isolation, selection and evaluation of *Bacillus* spp. as potential multi-mode probiotics for poultry. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 2020;66(4): 228–238.
- [3] Kabir SML. The role of probiotics in the poultry industry. *International Journal of Molecular Sciences*. 2009;10(8): 3531–3546.
- [4] Reuter G. Probiotics possibilities and limitations of their application in food, animal feed, and in pharmaceutical preparations for men and animals. *Berlin and Munich Veterinary Weekly [Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift]*. 2001;114(11–12): 410–419.
- [5] Trịnh Thị Hồng Mơ. *Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn có tiềm năng probiotic ứng dụng trong chăn nuôi heo*. Luận văn Thạc sĩ. Trường Đại học Trà Vinh; 2018. [Trinh Thi Hong Mo. *Isolation and selection of bacteria with probiotic potential for application in pig farming*. Graduation thesis. Tra Vinh University; 2018].
- [6] Lê Thị Hải Yến, Nguyễn Đức Hiền. Khảo sát đặc tính probiotic các chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* phân lập tại các tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*. 2016;2: 26–32. [Le Thi Hai Yen, Nguyen Duc Hien. Evaluation of the probiotic properties of *Bacillus subtilis* strains isolated from the Mekong Delta. *Can Tho University Journal of Science*. 2016;2: 26–32].
- [7] Chou LS, Weimer B. Isolation and characterization of acid-and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Science*. 1999;82(1): 23–31.
- [8] Bujnakova D, Kmet V. Aggregation of animal lactobacilli with O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Journal of Veterinary Medicine*. 2002;49(3): 152–154.
- [9] Chaiyawan N, Taveeteptaikul P, Wannissorn B, Ruengsomwong S, Klungsunya P, Buaban W, et al. Characterization and probiotic properties of *Bacillus* strains isolated from broiler. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*. 2010;40(2): 207–214.
- [10] Razdan K, Parihar J, Bajaj BK. Isolation and characterization of a lipolytic and phytase producing probiotic for potential application in poultry feed. *Online Journal of Animal and Feed Research*. 2012;2(4): 369–377.
- [11] Nguyễn Thị Hạnh Chi, Văng Khánh Ly, Đặng Nguyễn Hoàng Minh, Võ Hồng Nhịnh, Nguyễn Tuyết Giang. Phân lập, tuyển chọn các chủng *Bacillus* sp. Sinh enzyme và kháng vi khuẩn *Echerichia coli*. *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Chăn nuôi*. 2021;265: 93–99. [Nguyen Thi Hanh Chi, Vang Khanh Ly, Dang Nguyen Hoang Minh, Vo Hong Ninh, Nguyen Tuyet Giang. Isolation and selection of *Bacillus* spp. strains for the enzyme production and resistance to *Echerichia coli*. *Journal of Animal Husbandry Science and Technics*. 2021;265: 93–99].
- [12] Nguyễn Thị Phương Thảo, Nguyễn Thị Ngọc Anh, Vũ Kim Thoa, Tạ Thị Thu Thảo. Đánh giá tiềm năng sản xuất chế phẩm probiotic của chủng *Bacillus subtilis* MHN21 trong chăn nuôi gà. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Thái Nguyên*. 2024;229(01): 376–383. [Nguyen Thi Phuong Thao, Nguyen Thi Ngoc Anh, Vu Kim Thoa, Ta Thi Thu Thao. Evaluation of the probiotic production potential of *Bacillus subtilis* MHN21 strain in chicken farming. *Thai Nguyen University Journal of Science and Technology*. 2024;229(01): 376–383].
- [13] Aslim B, Yuksekdog ZN, Beyatli Y. Determination of PHB growth quantities of certain *Bacillus* species isolated from soil. *Turkish Electronic Journal of Biotechnology*. 2002;52: 24–30.
- [14] David OM, Olagunju JL, Adebayo AA, Oluwaniyi TT, Olajide MO. Probiotic properties and antibiotic resistance pattern of *Bacillus* spp. isolated from two types of fermented locust bean (iru). *Biotechnol Journal*. 2016;10(4): 1–12.
- [15] Breugelmans P, Uyttebroek M. *Protocol for DNA extraction and purification*. KU Leuven, Belgium: Laboratory of Soil and Water Management; 2004.
- [16] Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML, Pace NR. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1985;82(20): 6955–6959.
- [17] Erkkilä S, Petäjä E. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. *Meat Science*. 2000;55(3): 297–300.
- [18] Gilliland SE, Staley TE, Bush LJ. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *Journal of Dairy Science*. 1984;67(12): 3045–3051.
- [19] AlGhuri A, Volski A, Cugini C, Walsh EM, Chistyakov VA, Mazanko MS, et al. Safety properties and probiotic potential of *Bacillus subtilis* KAT-MIRA1933 and *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895. *Advances in Microbiology*. 2016;6(6): 432–452.
- [20] Lee S, Lee J, Jin YI, Jeong JC, Chang YH, Lee Y, et al. Probiotic characteristics of *Bacillus* strains isolated from Korean traditional soy sauce. *LWT-Food Science and Technology*. 2017;79: 518–524.
- [21] Lu Z, Guo W, Liu C. Isolation, identification and characterization of novel *Bacillus subtilis*. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2018;80(3): 427–433.
- [22] Nguyễn Lâm Dũng. *Giáo trình Vi sinh vật học*. Nhà Xuất bản Nông nghiệp. 2007. [Nguyen Lan Dung. *Microbiology Book*. Agriculture Publisher. 2007].
- [23] Janda JM, Abbott SL. 16S rRNA gene sequencing

- for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*. 2007;45(9): 2761–2764.
- [24] Huynh Thi Hong Nhi, Nguyen Thuy Huong. Examining some probiotics activities of *Bacillus subtilis natto*. *International Journal of Modern Engineering Research*. 2016;6(5): 33–37.
- [25] Hồ Thị Trường Thy, Nguyễn Nữ Trang Thùy, Võ Minh Sơn. Khảo sát một số đặc tính chủng *Bacillus subtilis* B20.1 làm cơ sở cho việc sản xuất probiotic phòng bệnh gan thận mũ do *Edwardsiella ictaluri* trên cá tra (*Pangasius hypophthalmus*) nuôi thâm canh. Trong: *Kỷ yếu Hội nghị Khoa học Thủy sản Toàn quốc*. 2011: 226–233. [Ho Thi Truong Thi, Nguyen Nu Trang Thuy, Vo Minh Son. Investigate some characteristic of *Bacillus subtilis* B20.1 for probiotic product to prevent disease caused by *Edwardsiella ictaluri* on stripe catfish (*Pangasius hypophthalmus*) cultured in intensive farms. In: *Proceedings of the National Fisheries Science Conference*. 2011: 226–233]
- [26] Trần Quốc Việt, Bùi Thị Thu Huyền, Dương Văn Hợp, Vũ Thành Lâm. Phân lập, tuyển chọn và đánh giá các đặc tính probiotic của một số chủng vi sinh vật hữu ích để sản xuất các chế phẩm probiotic dùng trong chăn nuôi. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Chăn nuôi*. 2009;16: 35–45. [Tran Quoc Viet, Bui Thi Thu Huyen, Duong Van Hop, Vu Thanh Lam. Isolation, selection and evaluation of probiotic properties of some useful microbial strains to produce probiotic products for use in livestock. *Journal of Animal Science and Technology*. 2009;16: 35–45].
- [27] Ngô Chí Công, Trịnh Ngọc Nam. Đánh giá đặc tính probiotic của vi khuẩn gram dương phân lập từ đường tiêu hoá gà. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*. 2021;49(01): 15–25. [Ngo Chi Cong, Trinh Ngoc Nam. Evaluation of Probiotic characteristics of Gram positive bacteria isolated from digestive tract of chickens. *Journal of Science and Technology*. 2021;49(01): 15–25].
- [28] Hmani H, Daoud L, Jlidi M, Jalleli K, Ben Ali M, Hadj Brahim A, et al. *Bacillus subtilis* strain as probiotic in poultry: selection based on in vitro functional properties and enzymatic potentialities. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2017;44(8): 1157–1166.
- [29] Kos BVZE, Šušková J, Vuković S, Šimpraga M, Frece J, Matošić S. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology*. 2003;94(6): 981–987.

