

BACILLUS CÓ TIỀM NĂNG PROBIOTIC TỪ RUỘT GÀ

Nguyễn Thị Lâm Đoàn*, Nguyễn Hoàng Anh

Khoa Công nghệ thực phẩm, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

*Tác giả liên hệ: nlddoan@vnua.edu.vn

Ngày gửi bài: 18.07.2018

Ngày chấp nhận: 30.08.2018

TÓM TẮT

Mục đích của nghiên cứu này là sàng lọc được chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* có tiềm năng probiotic nhằm sản xuất chế phẩm ứng dụng trong chăn nuôi gia cầm. Bằng các phương pháp xác định một số đặc tính probiotic như khả năng chịu axit, chịu muối mật, sinh enzyme ngoại bào, kháng khuẩn gây bệnh, bám dính trên biểu mô ruột gà. Kết quả cho thấy trong 60 chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* phân lập từ ruột gà đã tuyển chọn được 3 chủng RGB6.11, RGB7.1, RGB8.8 có tiềm năng probiotic tốt với các đặc điểm như: khả năng chịu axit trong khoảng 1,0-3,0 sau 3 h nuôi cấy; chịu được nồng độ muối mật 0,3% sau 4 h nuôi cấy $\Delta OD_{620nm} > 0,44$; sinh hai enzyme ngoại bào amylase và cellulase cao với vòng phân giải cơ chất từ 13-21 mm; kháng hai vi khuẩn gây bệnh *Salmonella* Typhimurium và *Escherichia coli* đường kính vòng kháng khuẩn 9-14 mm; khả năng bám dính trên biểu mô ruột gà tốt. Ngoài ra, nghiên cứu đã xác định được khoảng nhiệt độ nuôi cấy thích hợp của 3 chủng này là 30-40°C và pH 6,5-7,0. Ba chủng *Bacillus* spp này là cơ sở để tiếp tục nghiên cứu xác định loài và tạo chế phẩm probiotic ứng dụng vào chăn nuôi gia cầm.

Từ khóa: *Bacillus*, probiotic, kháng vi khuẩn gây bệnh, ruột gà.

Bacillus with Potential Probiotic Properties from Chicken Intestine

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the probiotic potential of 60 *Bacillus* strains isolated from chicken intestine to produce probiotic preparation for use in the poultry industry. Three strains, RGB6.11, RGB7.1, and RGB8.8, were selected with good probiotic characteristics such as tolerance to low pH (pH 1.0; 2.0; 3.0) after 3 hrs culture, tolerance to 0.3% bile salt after 4 hrs culturing $\Delta OD_{620nm} > 0.44$, production of extracellular enzymes with ring diameter of substrate resolution from 13-21 mm, resistance to gastrointestinal pathogens *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* with zone of inhibition diameter 9-14mm, and good adhesion ability on chicken intestinal epithelium. Moreover, suitable cultural temperatures (30-40°C) and pH (6.5-7.0) for these strains were identified. The three *Bacillus* spp. strains were suggested for species identification and production of probiotics for the poultry industry.

Keywords: *Bacillus*, probiotic, resistance to bacterial pathogens.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong quá trình chăn nuôi gia cầm, đặc biệt ở quy mô công nghiệp, kháng sinh đóng vai trò quan trọng không chỉ trong phòng trị bệnh mà còn được sử dụng như chất kích thích sinh trưởng của vật nuôi (Phạm Kim Đăng và cs., 2016). Tuy nhiên, tình hình lạm dụng kháng sinh trong chăn nuôi đã dẫn đến sự kháng

thuốc của các vi sinh vật gây bệnh, dư lượng thuốc kháng sinh trong thực phẩm đã gây ảnh hưởng đến sức khỏe người tiêu dùng (Newman, 2002). Chế phẩm probiotic đang được đánh giá như một giải pháp thay thế hiệu quả và cung cấp một phương thức an toàn bền vững đối với vật nuôi và người tiêu dùng. Thực tế, sử dụng chế phẩm probiotic mang lại rất nhiều lợi ích như hỗ trợ tiêu hóa thức ăn, cân bằng hệ vi sinh

đường ruột bằng cách cạnh tranh với vi khuẩn gây bệnh cho vật nuôi (Kabir, 2009), từ đó giảm chi phí trong phòng bệnh, tăng hiệu quả chăn nuôi, đảm bảo chất lượng thịt và sức khỏe người tiêu dùng. Hiện nay, các sản phẩm probiotic cho chăn nuôi tại Việt Nam cũng khá phổ biến và được cung ứng bởi nhiều doanh nghiệp khác nhau. Tuy nhiên không phải chế phẩm nào cũng đạt “chuẩn”. Năm 2011 trên phương tiện thông tin đại chúng đã công bố khoảng 50% sản phẩm probiotic trên thị trường Việt Nam không đủ về số lượng vi sinh vật còn sống, thậm chí không có vi sinh vật sống (Nguyễn Thị Huyền và cs., 2014). Bên cạnh đó những chế phẩm tốt được ứng dụng rộng rãi ở nước ngoài nhưng khi sử dụng ở Việt Nam không phù hợp với môi trường, khí hậu, điều kiện chăn nuôi nên không phát huy tối đa hiệu quả như mong muốn. Do vậy, việc tuyển chọn các chủng có hoạt tính probiotic tại bản địa là hết sức cần thiết.

Bacillus là nhóm vi khuẩn được sử dụng phổ biến làm probiotic vì *Bacillus* có khả năng cạnh tranh với các vi khuẩn gây bệnh qua cơ chế ngăn cản miễn dịch, cạnh tranh vị trí bám dính và sản sinh ra chất kháng khuẩn (bacteriocins) hoặc các chất kháng khuẩn giống bacteriocin như lipopeptides có thể tiêu diệt các vi sinh vật gây bệnh (Kivanç *et al.*, 2014). Hơn nữa, *Bacillus* còn được ưa chuộng vì giá thành rẻ, dễ pha trộn, chịu được tác động của yếu tố nhiệt (Barbosa *et al.*, 2005). Do đó, bào tử *Bacillus* đã được sử dụng rộng rãi làm probiotic cho vật nuôi cũng như cho người. Các loài thuộc chi *Bacillus* từng được sử dụng làm probiotic, được nghiên cứu sâu rộng nhất là *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans* và *Bacillus licheniformis* (Hong *et al.*, 2005). Tuy nhiên, những nghiên cứu trong nước về tuyển chọn và nghiên cứu các đặc tính probiotic của các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* trong chăn nuôi, đặc biệt từ ruột gà vẫn còn hạn chế, chủ yếu nghiên cứu các đặc tính probiotic của nhóm vi khuẩn lactic (Trần Quốc Việt và cs., 2009; Dương Thu Hương và Phạm Kim Đăng, 2015). Chính vì vậy, nghiên cứu này được tiến hành nhằm khảo sát đặc tính probiotic như khả năng chịu axit, muối mật, sinh một số enzyme

ngoại bào, kháng đối với vi khuẩn gây bệnh, độ bám dính của các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* được phân lập từ ruột gà và nghiên cứu một số đặc điểm của chúng nhằm cung cấp nguồn giống sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo xác định loài và tạo chế phẩm probiotic cho chăn nuôi gia cầm.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Sáu mươi chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* được cung cấp từ phòng thí nghiệm trung tâm của Khoa Công nghệ thực phẩm, Học viện Nông nghiệp Việt Nam. Các chủng này được phân lập từ ruột gà với kí hiệu các chủng là RGB.

Các vi khuẩn kiểm định: *Escherichia coli* ATCC 25922 và *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 được cung cấp từ Viện Công nghệ sinh học thuộc Viện hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Môi trường NB dùng để nuôi cấy và hoạt hóa các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* (g/l): peptone-10,0; NaCl-5,0; cao thịt-3,0; pH 7,0. Môi trường NA dùng để xác định số lượng khuẩn lạc vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* (g/l): peptone-10,0; NaCl-5,0; cao thịt-1,5; cao nấm men-1,5, Agar-15,0, pH = 7,0. Môi trường nuôi vi sinh vật kiểm định LB (g/l): Cao nấm men-5,0; Peptone-10,0; NaCl-10,0; pH = 7,0. Môi trường có chứa tinh bột hoặc môi trường CMC (carboxymethyl cellulose) (g/l) dùng để xác định khả năng sinh amylase và cellulase: Agar-17,0; tinh bột hoặc CMC-1,0; pH = 7,0. Các môi trường được khử trùng 121°C/15 phút.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Sàng lọc các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* có khả năng chịu axit

Các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* có khả năng chịu axit được sàng lọc theo phương pháp của Dương Thu Hương và Phạm Kim Đăng (2015) có điều chỉnh ngưỡng pH (1,0; 2,0; 3,0) và thời gian nuôi cấy 3 h. Chuẩn bị môi trường NB, điều chỉnh pH (1,0; 2,0; 3,0) bằng

HCl 1N và NaOH 1N. Nhỏ 1% dịch giống vi khuẩn đã nuôi cấy dịch thể qua 24 h vào các ống nghiệm trên nuôi cấy 37°C. Sàng lọc các chủng có khả năng chịu pH bằng cách đo OD ở bước sóng 620 nm của dịch nuôi cấy ở 0 h và 3 h. Các chủng được đánh giá chịu được axit dựa vào giá trị ΔOD là giá trị hiệu số của giá trị OD đo tại thời điểm 3 h và giá trị OD đo tại thời điểm 0 h, ở mỗi nồng độ pH).

2.2.2. Sàng lọc các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* có khả năng chịu muối mật

Các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* được đánh giá khả năng chịu muối mật trong môi trường NB có bổ sung 0,3% muối mật dựa trên phương pháp của Gilliland & Walker (1990). Nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường NB có bổ sung muối mật 0,3% ở 37°C trong 4 h. Mật độ tế bào trong mẫu được xác định bằng cách đo mật độ quang ở bước sóng 620 nm. Mức độ chịu muối mật được xác định dựa vào giá trị OD_{620nm} sau khi nuôi 4 h, so với ban đầu nếu tăng lên 0,3 đơn vị thì chủng đó có khả năng chịu muối mật

2.2.3. Đánh giá khả năng sinh một số enzyme ngoại bào

Đánh giá khả năng sinh enzyme ngoại bào amylase và cellulase được sử dụng phương pháp đục lỗ thạch trên môi trường có bổ sung cơ chất tương ứng tinh bột và CMC (carboxymethyl cellulose) theo phương pháp của Nguyễn Lâm Dũng và cs. (1976). Các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* được hoạt hóa trong môi trường NB, sau 48 h nuôi ở 37°C, lấy dịch nuôi đem ly tâm với tốc độ 6.000 vòng/phút trong 30 phút, ở 4°C, thu lấy dịch. Dùng nút khoan có đường kính 5mm, đục lỗ thạch trên đĩa petri của môi trường có cơ chất tinh bột, CMC. Với mỗi chủng vi khuẩn tiến hành nhỏ 0,1 ml dịch ly tâm đã thu vào lỗ thạch. Sau khi nhỏ dịch để đĩa thạch trong tủ lạnh ở 4°C khoảng 2 h nhằm mục đích để dịch khuếch tán đều vào trong thạch. Để đĩa thạch vào tủ ấm 37°C trong 48 h để cho lượng dịch trong lỗ thạch thủy phân cơ chất. Hoạt tính của các enzyme được đo bằng đường kính vòng phân giải cơ chất xung quanh lỗ thạch, tức D-d. Trong đó, D là đường kính vòng phân giải (mm), d là đường kính lỗ thạch (5 mm).

2.2.4. Đánh giá khả năng kháng một số vi khuẩn gây bệnh

Tính kháng các vi khuẩn gây bệnh được xác định sử dụng phương pháp khuếch tán thạch của Herreros *et al.* (2005) với các vi khuẩn kiểm định là *Escherichia coli* ATCC 25922 và *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311. Các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* (tuyển chọn ở các thí nghiệm trước) được nuôi cấy trong môi trường NB ở 37°C trong 24 h, sau đó ly tâm 6.000 vòng/phút trong 20 phút thu dịch. Đối với các chủng vi khuẩn kiểm định được nuôi qua đêm trong môi trường LB lỏng ở 37°C trong 24 h. Sau đó lấy 30 μ l dung dịch mỗi chủng vi khuẩn kiểm định cấy gạt lên đĩa petri chứa môi trường LB agar, đục lỗ thạch có kích thước (d = 5 mm). Nhỏ 80 μ l dịch ly tâm của các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* vào các lỗ thạch và giữ ở nhiệt độ 4°C trong 4 h, sau đó giữ ở 37°C trong 24 h. Căn cứ vào việc xuất hiện vòng ức chế vi khuẩn kiểm định để xác định chủng có khả năng kháng. Hoạt tính được đánh giá bằng hiệu số D-d (mm), D là đường kính vòng kháng khuẩn (mm), d là đường kính lỗ thạch (5 mm). Hiệu số này càng lớn, khả năng kháng khuẩn càng cao.

2.2.5. Đánh giá khả năng bám dính

Khả năng bám dính của vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* tuyển chọn được tiến hành theo phương pháp của Trần Quốc Việt và cs. (2009). Các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* được nuôi cấy trong môi trường NB ở 37°C trong 24 h. Chuẩn bị mẫu ruột gà tươi: Rửa các đoạn ruột 3 lần với đệm PBS sao cho tất cả các vi sinh vật không còn trên bề mặt niêm mạc ruột. Rửa 1 lần với môi trường NB.

Tiến hành thử bám dính: Phủ dịch tế bào đã chuẩn bị lên trên bề mặt niêm mạc ruột. Ủ 1 h ở trong tủ ấm 37°C. Rửa mẫu ruột bằng đệm PBS (pH = 7,2) để loại ra các tế bào không bám dính. Thu lấy phần tế bào biểu mô ruột. Khả năng bám dính của mỗi chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* được đánh giá thông qua cấy trải và đếm số lượng vi khuẩn *Bacillus* trên đĩa thạch của phần tế bào biểu mô ruột đó.

2.2.6. Đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ, pH lên sự phát triển của các chủng *Bacillus* đã tuyển chọn

Ảnh hưởng của nhiệt độ

Xác định ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến sự phát triển của các chủng tuyển chọn theo nghiên cứu của Nguyễn Quang Huy và Trần Thúy Hằng (2012). Thí nghiệm tiến hành nuôi các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* trên môi trường NB có pH = 7 tại nhiệt độ 30; 37; 40; 45; 50°C, sau 24 h nuôi cấy đo OD_{620nm}. Xác định nhiệt độ nuôi cấy thích hợp nhất cho các chủng.

Ảnh hưởng của pH

Các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* được nuôi cấy trên môi trường dịch thể NB có pH khác nhau (4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0). Sau 24 h nuôi cấy trong tủ ấm ở nhiệt độ tối ưu của thí nghiệm trên, tiến hành đo OD_{620nm} (Nguyễn Quang Huy và Trần Thúy Hằng, 2012). Xác định pH môi trường thích hợp nhất cho các chủng.

2.3. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Sàng lọc các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* có khả năng chịu axit

Kết quả cho thấy 50/60 chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* có khả năng chịu được pH = 3,0, 35/60 chủng chịu được pH 2,0 có 22/60 chủng chịu được pH 1,0 (Bảng 1). Hầu hết các chủng đều có xu hướng giảm tỉ lệ sống khi hạ thấp pH. Như vậy, 22 chủng có khả năng chịu

được cả 3 mức pH = 1,0; 2,0; 3,0 tiếp tục được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

Theo một số nghiên cứu trước, các chủng có tiềm năng probiotic phải có khả năng chịu được pH thấp giúp chúng vượt qua hàng rào pH trong dạ dày của động vật, giới hạn pH = 2,0 và pH = 3,0 và trong thời gian 3 h là giới hạn quyết định sàng lọc của các chủng (Guo *et al.*, 2006; Nguyễn Thị Diễm Hương và Đỗ Thị Bích Thủy, 2012). Chính vì vậy, 60 chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* được phân lập từ ruột gà trong nghiên cứu này được tiến hành khảo sát khả năng chịu axit tại các pH = 1,0; 2,0; 3,0.

Guos *et al.* (2006) khi sàng lọc các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* có tiềm năng probiotic được phân lập từ ruột gà, phân lợn con, thực phẩm lên men... đã tuyển chọn được chủng *Bacillus subtilis* MA139 với nhiều đặc tính probiotic tốt trong đó có khả năng kháng được pH = 2,0. Theo một nghiên cứu khác của Barbosa *et al.* (2005) kiểm tra khả năng kháng điều kiện dạ dày mô phỏng tại pH = 2,0 của 7 chủng *Bacillus* (3, 37, 56, 197, 200, 210 và 259) phân lập từ ruột gà cho kết quả là tất cả các chủng này đều có khả năng chịu được ở pH này.

3.2. Sàng lọc các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* có khả năng chịu muối mật

Tổng số 22 chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* có khả năng chịu được pH thấp là kết quả của thí nghiệm trước đã được tiếp tục kiểm tra khả năng chịu muối mật. Kết quả cho thấy có 12/22 chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* có khả năng sinh trưởng tốt ở nồng độ muối mật 0,3% sau 4 h $\Delta OD_{620nm} > 0,3$ (Bảng 2). Những chủng có

Bảng 1. Khả năng chịu axit của một số chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus*

Ký hiệu chủng	Giá trị OD ban đầu	Giá trị OD tăng sau 3 h (ΔOD)			Ký hiệu chủng	Giá trị OD ban đầu	Giá trị OD tăng sau 3 h (ΔOD)		
		pH = 1,0	pH = 2,0	pH = 3,0			pH = 1,0	pH = 2,0	pH = 3,0
RGB1.6	0,402	0,12	0,26	0,31	RGB6.6	0,384	0,08	0,20	0,21
RGB2.7	0,311	0,09	0,22	0,26	RGB6.11	0,434	0,13	0,17	0,29
RGB2.12	0,519	0,08	0,19	0,23	RGB7.1	0,461	0,16	0,18	0,30
RGB3.9	0,327	0,16	0,24	0,27	RGB8.2	0,388	0,08	0,16	0,19
RGB4.3	0,341	0,10	0,22	0,24	RGB8.8	0,446	0,11	0,17	0,38

Bảng 2. Khả năng chịu muối mật của 12 chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus*

Ký hiệu chủng	Giá trị OD ban đầu	Giá trị OD tăng sau 4h (Δ OD)	Ký hiệu chủng	Giá trị OD ban đầu	Giá trị OD tăng sau 4h (Δ OD)
RGB1.6	0,513	0,31	RGB6.6	0,495	0,43
RGB2.7	0,429	0,42	RGB6.8	0,537	0,53
RGB2.12	0,606	0,40	RGB6.11	0,568	0,50
RGB3.9	0,519	0,31	RGB7.1	0,611	0,44
RGB3.10	0,670	0,32	RGB8.2	0,418	0,38
RGB4.3	0,458	0,35	RGB8.8	0,629	0,49

khả năng chịu được muối mật 0,3% sau 4 h được sử dụng cho nghiên cứu tiếp theo.

Các chủng có hoạt tính probiotic chỉ phát huy tác dụng được trong đường tiêu hóa của các loài vật nuôi khi chúng có khả năng chịu được muối mật trong ruột non (Dương Thu Hương và Phạm Kim Đăng 2015). Gillilan & Walker (1990) đã chứng minh 0,3% được xem là nồng độ quyết định để sàng lọc các chủng vi sinh vật có khả năng chịu muối mật. Thông thường thời gian thức ăn được lưu trữ trong ruột khoảng 4 h (Dương Thu Hương và Phạm Kim Đăng, 2015). Kết quả nghiên cứu của Spinosa *et al.* (2000) đã cho thấy *Bacillus* rất nhạy cảm với muối mật và đây là một tiêu chí khó khăn đối với chúng khi tồn tại ở ruột non, hầu hết ở các nồng độ muối mật được nghiên cứu số lượng vi khuẩn *Bacillus* đều giảm. Ngoài ra, Guos *et al.* (2006) cũng đã sàng lọc được chủng *Bacillus subtilis* MA139 có đặc tính probiotic từ các chủng *Bacillus* được phân lập từ ruột gà, phân lợn con, thực phẩm lên men với khả năng chịu được muối

mật ở nồng độ 0,3%.

3.3. Khả năng sinh enzyme ngoại bào

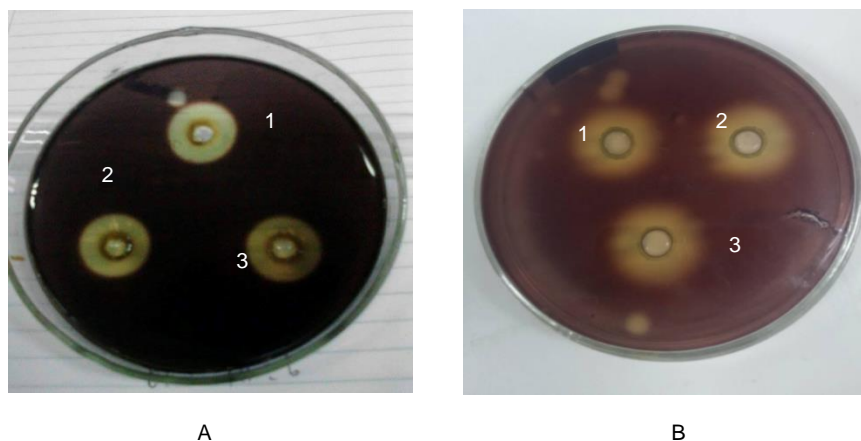
Thí nghiệm tiến hành đánh giá khả năng sinh enzyme ngoại bào amylase và cellulase với hai cơ chất tinh bột và CMC bằng phương pháp đục lỗ thạch của 12 chủng đã tuyển chọn. Trong số 12 chủng có 7 chủng thuộc chi *Bacillus* có khả năng sinh cả hai enzyme amylase và cellulase (Bảng 3), khả năng sinh cellulase của các chủng cao hơn so với khả năng sinh amylase thể hiện đường kính vòng phân giải cơ chất CMC (10-21 mm) cao hơn so đường kính vòng phân giải tinh bột (9-19 mm).

Kết quả thu được phù hợp với nghiên cứu của Samley Man & Nguyen Thi Thanh Thuy (2017) từ 100 chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* được phân lập từ tương ớt và từ dạ cỏ bò nghiên cứu đã tuyển chọn được 3 chủng (A1.2, A1.8, và B6.4) có đường kính vòng phân giải cơ chất CMC cao nhất là 24 mm.

Bảng 3. Khả năng sinh enzyme ngoại bào của chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus*

STT	Tên chủng	Đường kính vòng phân giải cơ chất (D-d) mm		STT	Tên chủng	Đường kính vòng phân giải cơ chất (D- d) mm	
		Amylase	Cellulase			Amylase	Cellulase
1	RGB1.6	9	10	7	RGB6.6	-	-
2	RGB2.7	12	14	8	RGB6.8	-	-
3	RGB2.12	-	-	9	RGB6.11	13	15
4	RGB3.9	9	13	10	RGB7.1	18	16
5	RGB3.10	10	11	11	RGB8.2	-	10
6	RGB4.3	12	-	12	RGB8.8	19	21

Ghi chú: D - d là đường kính vòng phân giải, d = 5 mm



Ghi chú: A. Phân giải cơ chất tinh bột. 1. RGB 2.7; 2. RGB4.3; 3. RGB6.11; B. Phân giải cơ chất CMC. 1. RGB 2.7; 2. RGB6.11; 3. RGB7.1

Hình 1. Khả năng sinh amylase và cellulase ngoại bào của các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus*

Cũng trong một nghiên cứu tương tự của Khuất Hữu Thanh và Bùi Văn Đạt (2010) khi nghiên cứu tuyển chọn các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* để tạo chế phẩm sinh học sử dụng trong nuôi trồng thủy sản đã tìm ra được 6 chủng phân lập từ đất và một số chế phẩm sinh học cho kết quả hoạt tính amylase 19,5-22,0 mm cao hơn hoạt tính cellulase từ 16,5-21,5 mm, kết quả hoạt tính amylase của tác giả cao hơn so với kết quả của bài báo này. Điều này có thể lý giải do các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* trong hai nghiên cứu có nguồn gốc khác nhau.

Hiệu quả của chế phẩm probiotic phụ thuộc rất nhiều vào hoạt tính enzyme ngoại bào của

các chủng vi sinh vật trong chế phẩm. Các enzyme này có tác dụng hỗ trợ tiêu hóa thức ăn, giúp thức ăn dễ hấp thu, vật nuôi tăng trọng tốt (Lê Thị Hải Yến và Nguyễn Đức Hiền 2016).

3.4. Khả năng kháng một số vi khuẩn gây bệnh

Trong 7 chủng có khả năng sinh cả hai enzyme amylase và cellulase được thử tính kháng vi khuẩn kiểm định có 4 chủng có khả năng kháng *Salmonella*, trong đó có 2 chủng (RGB6.11 và RGB8.8) với vòng kháng khuẩn mạnh bằng 14. Đối với vi khuẩn *E.coli* có 3 chủng kháng với đường kính vòng kháng khuẩn 9-10 mm (Bảng 4).

Bảng 4. Khả năng kháng vi khuẩn kiểm định của chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus*

Tên chủng	Hoạt tính kháng khuẩn (D-d) mm	
	<i>Salmonella</i> Typhimurium	<i>Escherichia coli</i>
RGB1.6	9	-
RGB2.7	-	-
RGB3.9	-	-
RGB3.10	-	-
RGB6.11	14	9
RGB7.1	11	10
RGB8.8	14	10

Ghi chú: D - d là đường kính vòng kháng khuẩn, d = 5 mm.

Kết quả nghiên cứu này tương đồng với kết quả nghiên cứu của Lê Thị Hải Yến và Nguyễn Đức Hiền (2016) cho thấy có 4 chủng *Bacillus* (AG27, AG60, VL05 và VL28) có khả năng kháng *Salmonella* và *E.coli* trong đó chủng VL28 có đường kính vòng kháng khuẩn lớn, đối với *Salmonella* đạt đường kính trung bình là 13 mm với *E. coli* là 10 mm. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Kivanç *et al.* (2014) khi chứng minh các chủng *Bacillus* spp. có thể sinh ra các chất kháng khuẩn bacteriocin hoặc các chất kháng khuẩn giống bacteriocin như lipopeptides có thể tiêu diệt các vi sinh vật gây bệnh. Do vậy, 3 chủng có khả năng kháng được cả 2 loại vi khuẩn kiểm định đó là RGB6.11, RGB7.1, RGB8.8 sẽ được sử dụng cho nghiên cứu tiếp theo.

Chế phẩm probiotic khi đưa vào đường tiêu hóa không chỉ giúp gia tăng sự chuyển hóa thức ăn, tăng khả năng miễn dịch mà còn có tác dụng ức chế sự phát triển của các vi sinh vật gây bệnh, giúp cân bằng hệ vi sinh vật đường

ruột và hạn chế các bệnh về đường tiêu hóa (Lê Thị Hải Yến và Nguyễn Đức Hiền, 2016).

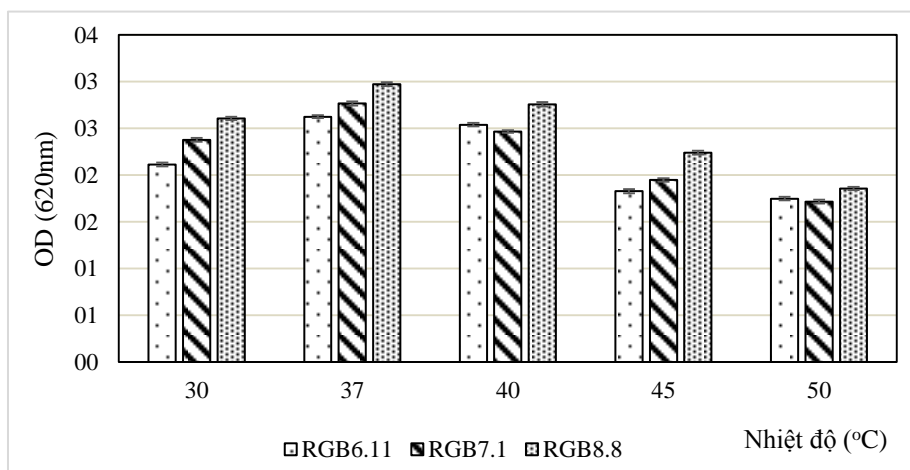
3.5. Khả năng bám dính

Kết quả nghiên cứu xác định khả năng bám dính của 3 chủng có khả năng kháng được cả 2 loại vi khuẩn kiểm định RGB6.11, RGB7.1, RGB8.8 được trình bày ở Bảng 5.. Các chủng vi khuẩn này đều bám dính tốt vào niêm mạc ruột nhưng mức độ không giống nhau. Chủng RG 7.1 có khả năng bám dính cao hơn so với các chủng còn lại. Điều này rất thích hợp khi phát triển các chế phẩm probiotic sau này.

Sự bám dính của các vi khuẩn probiotic giúp cạnh tranh vị trí bám dính của các tác nhân gây bệnh. Chúng có thể sinh sống một thời gian nhất định, cạnh tranh dinh dưỡng và tiết ra một số chất ức chế (Arthur *et al.*, 2003). Chính vì vậy khả năng bám dính biểu mô và dịch nhày ruột non nơi có tốc độ dòng lưu chuyển hỗn dịch thức ăn cao là một tiêu chí quan trọng tuyển chọn các chủng vi khuẩn probiotic.

Bảng 5. Khả năng bám dính của chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* trên biểu mô ruột gà

Kí hiệu chủng	Nồng độ ban đầu (CFU/ml)	Khả năng bám dính (CFU/ml)
RGB6.11	$5,6 \times 10^9$	$1,58 \times 10^8$
RGB7.1	$4,8 \times 10^9$	$2,14 \times 10^8$
RGB8.8	$3,9 \times 10^8$	$1,23 \times 10^7$



Hình 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng sinh trưởng của chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus*

3.6. Ảnh hưởng của nhiệt độ và pH đến sinh trưởng của các chủng probiotic đã tuyển chọn

3.6.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Kết quả cho thấy cả 3 chủng được chọn lọc đều phát triển tốt trong phạm vi nhiệt độ 30-40°C, tốt nhất ở nhiệt độ 37°C (Hình 2). Khi nuôi cấy ở nhiệt độ cao hơn 45 và 50°C sinh khối giảm, thể hiện qua chỉ số OD_{620nm} thấp hơn so với ở nhiệt độ 30, 37, 40°C. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Quang Huy và Trần Thúy Hằng (2012) khi nghiên cứu về nhiệt độ và pH tối ưu cho hai chủng vi khuẩn *Bacillus* (U1.3 và U3.7) cho thấy cả hai chủng đều phát triển tốt trong khoảng nhiệt độ từ 30 đến 40°C.

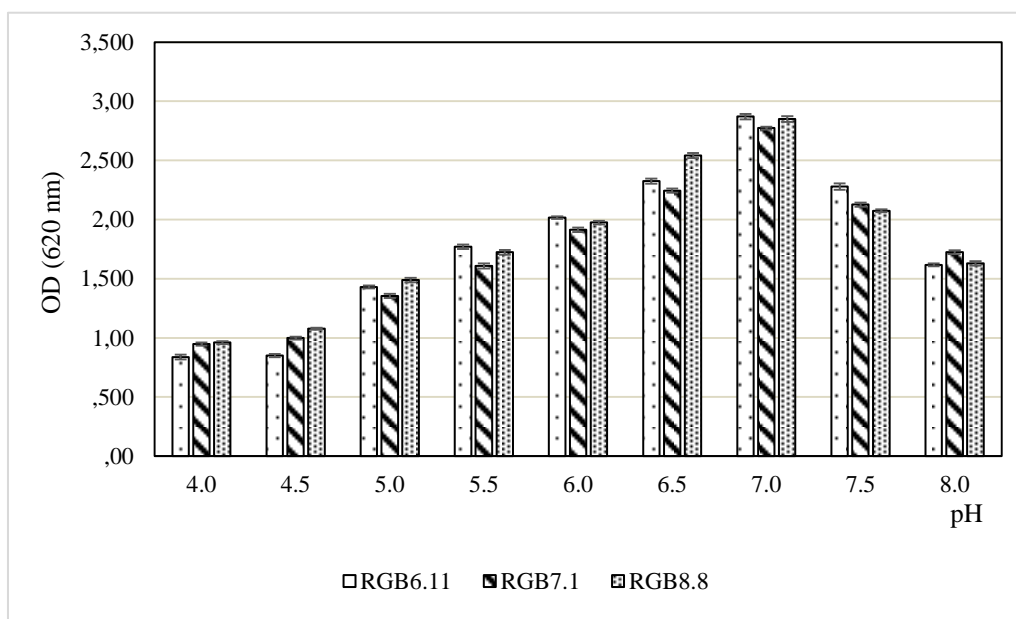
3.6.2. Ảnh hưởng của pH

Kết quả (Hình 3) cho thấy khoảng pH từ 4,0 đến 8,0 đều đáp ứng về sinh trưởng của các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* này. Tuy nhiên, các chủng này có sinh khối cao nhất ở môi trường có độ pH = 6,5-7,0. Ở môi trường có độ pH cao (8,0) thì giá trị OD_{620nm} giảm. Điều đó

chứng tỏ các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* này sinh trưởng tốt trong môi trường có độ pH từ 6,5 đến 7,0 và ở môi trường có độ pH cao hơn tốc độ sinh trưởng của chúng chậm nhưng vẫn tồn tại. Theo Nguyễn Quang Huy và Trần Thúy Hằng (2012), hai chủng vi khuẩn *Bacillus* mà họ nghiên cứu cũng đều phát triển tốt trong điều kiện pH môi trường từ 6,5 đến 7,5.

4. KẾT LUẬN

Qua sàng lọc 60 chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* có tiềm năng probiotic được phân lập từ ruột gà đã chọn ra được 3 chủng có đặc tính probiotic tốt: có khả năng chịu pH thấp từ 1,0 đến 3,0; chịu được nồng độ muối mật 0,3%; sinh 2 enzyme ngoại bào cao amylase và cellulase; kháng 2 vi khuẩn kiểm định *Salmonella* Typhimurium và *Escherichia coli*; có khả năng bám dính trên biểu mô ruột gà tốt. Nghiên cứu đã xác định được điều kiện để cho các chủng này phát triển tốt đó là nhiệt độ 30-40°C và pH từ 6,5 đến 7,0. Ba chủng *Bacillus* spp. này là cơ sở để tiếp tục xác định loài và nghiên cứu tạo chế phẩm probiotic cho chăn nuôi gia cầm.



Hình 3. Ảnh hưởng của pH đến khả năng sinh trưởng của chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Nguyễn Lâm Dũng, Đoàn Xuân Mượu, Nguyễn Phùng Tiến, Đặng Đức Trạch, Phạm Văn Ty (1976). Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học (Tập 2). Nhà xuất bản Khoa học kỹ thuật, Hà Nội.
- Phạm Kim Đăng Nguyên Đình Trinh, Nguyễn Hoàng Thịnh, Nguyễn Thị Phương Giang và Nguyễn Bá Tiếp (2016). Ảnh hưởng của probiotic *Bacillus* dạng bào tử chịu nhiệt đến năng suất, vi khuẩn và hình thái vi thể biểu mô đường ruột gà thịt lông màu. Tạp chí Khoa học kỹ thuật chăn nuôi, 213: 40-46.
- Dương Thu Hương và Phạm Kim Đăng (2015). Phân lập và tuyển chọn một số chủng vi khuẩn lactic có đặc tính probiotic từ ruột gà. Tạp chí Khoa học kỹ thuật chăn nuôi, 12: 78-86.
- Nguyễn Thị Diễm Hương và Đỗ Thị Bích Thủy (2012). Xác định và khảo sát một số tính chất có lợi của chủng *Lactobacillus fermentum* DC phân lập từ sản phẩm dưa cải Huế. Tạp chí Khoa học, Đại học Huế, 71(2): 177-187.
- Nguyễn Quang Huy, Trần Thúy Hằng (2012). Phân lập các chủng *Bacillus* có hoạt tính tạo màng sinh vật. Tạp chí sinh học, 34(1): 99-106.
- Nguyễn Thị Huyền, Nguyễn Thị Thu Hường, Trịnh Thị Thùy Linh, Nhữ Thị Hà, Trịnh Thị Hảo, Nguyễn Thành Linh và Đặng Xuân Nghiêm (2014). Khảo sát thành phần vi sinh và các đặc tính probiotic của các sản phẩm men tiêu hóa trên thị trường. Tạp chí Khoa học và Phát triển, 12(1): 65-72.
- Khuất Hữu Thanh và Bùi Văn Đạt (2010). Phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn *Bacillus* để tạo chế phẩm sinh học sử dụng trong nuôi trồng thủy sản. Tạp chí Khoa học và Công nghệ, 48(5): 57-63.
- Trần Quốc Việt, Bùi Thu Huyền, Dương Văn Hợp, Vũ Thành Lâm (2009). 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 công nghệ chăn nuôi, 16: 521-537.
- Lê Thị Hải Yến và Nguyễn Đức Hiền (2016). 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, 2: 26-32.
- Arthur C. O and Salminen S. (2003). In vitro adhesion assays for probiotics and their in vivo relevance: a review. Microbial Ecology in Health and Disease, 15(4): 175-184.
- Barbosa T.M., Claudia R.S., Roberto M.L., Martin J.W. and Adriano O.H. (2005). Screening for *Bacillus* isolates in the broiler gastrointestinal tract. Applied and environmental microbiology, 71(2): 968-978.
- Gilliland S.E., and Walker D.K. (1990). Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypercholesterolemic effect in humans. Journal of Dairy Science, 73(4): 905-909.
- Guo X., Li D., Lu W., Pio X., and Chen X. (2006). Screening of *Bacillus* strains as potential probiotics and subsequent confirmation of the in vivo effectiveness of *Bacillus subtilis* MA139 in pigs. Antonie van Leeuwenhoek, 90: 139-146.
- Herreros M.A., Sandoval H., Gonzalez L., Castro J.M., Fresno J.M., Tornadizo M.E. (2005). Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). Food Microbiol, 22(5): 455-459.
- Hong H.A., Duc le, H. and Cutting S.M. (2005). The use of bacterial spore formers as probiotics. FEMS Microbiol Rev., 29: 813-835.
- Kabir S.M. (2009). The Role of probiotics in the poultry industry. International Journal of Molecular Sciences, 10(8): 3531-3546.
- Kıvanç S.A., Murat T., Merih K., Gulay G. (2014). *Bacillus* spp. isolated from the conjunctiva and their potential antimicrobial activity against other eye pathogens. African Health Sciences, 14(2): 364-371.
- Newman M.G. (2002). Antibiotics resistance is a reality: novel techniques for over coming antibiotic resistance when using new growth promoters. Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries. Proceedings of Alltech's 18th Annual Symposium, Nottingham University Press, 98-106.
- Reuter G. (2001). Probiotics-possibilities and limitations of their application in food, animal feed, and in pharmaceutical preparations for men and animals. Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift, 114: 410-419.
- Samley Man and Nguyen Thi Thanh Thuy (2017). Screening and characterization of cellulase produced by *Bacillus* spp., Vietnam Journal of Agricultural Sciences, 15(9): 1105-1212.
- Spinosa M.R., Braccini T., Ricca E., De Felice M., Morelli L., Pozzi G., and Oggioni M.R. (2000). On the fate of ingested *Bacillus* spores. Res. Microbiol, 151: 361-368.