ẢNH HƯỞNG CỦA HÀM LƯỢNG KHOÁNG LÊN KHẢ NĂNG HÌNH THÀNH BÀO TỬ VÀ CHỊU NHIỆT CỦA CHỦNG *Bacillus subtilis* CM3.1 TRONG ĐIỀU KIỆN *in vitro*

Phạm Thị Tuyết Ngân*, Vũ Hùng Hải, Huỳnh Trường Giang

Trường Thủy sản, Đại học Cần Thơ

**Tác giả liên hệ: pttngan@ctu.edu.vn*

Ngày nhận bài: 29.03.2023 Ngày chấp nhận đăng: 05.10.2023

TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm đánh giá ảnh hưởng của các khoáng chất như canxi (Ca^{2+}), kali (K^{+}), mangan (Mn^{2+}), magie (Mg^{2+}) và sắt (Fe^{2+}) lên khả năng hình thành bào tử và chịu nhiệt của *Bacillus subtilis* CM3.1 trong điều kiện in vitro. Bào tử của *Bacillus* được nuôi trong môi trường dinh dưỡng sinh bào tử bổ sung các nồng độ khoáng chất khác nhau. Sau 7 ngày nuôi, bổ sung riêng biệt các khoáng chất Ca^{2+} (1mm), Mg^{2+} (3mm), Mn^{2+} (1mm) và Fe^{2+} (1mm) vào môi trường Nutrient Broth (NB) gia tăng đáng kể mật độ bào tử *Bacillus subtilis* CM3.1, ngoại trừ K^{+} (10mm). Hơn nữa, mật độ và tỉ lệ sống của bào tử vi khuẩn nuôi trong các môi trường bổ sung khoáng chất như m-NB, SSM và m-SM cao hơn có ý nghĩa (P <0,05) so với môi trường NB sau thời gian xử lý nhiệt, đặc biệt là ở thời điểm 30 và 40 phút. Kết quả cho thấy các khoáng chất khi bổ sung vào môi trường giúp đã nâng cao mật độ, khả năng chịu nhiệt của bào tử *Bacillus*, qua đó tăng độ ổn định của loài *Bacillus subtilis* CM3.1 trong quá trình bảo quản và sản xuất probiotic.

Từ khóa: *Bacillus*, hình thành bào tử, khoáng chất, khả năng chịu nhiệt, mật độ.

In Vitro Effects of Minerals on Sporulation and Heat Resistance of *Bacillus subtilis* CM3.1

ABSTRACT

This study sought to evaluate the in vitro effects of minerals, including calcium (Ca^{2+}), potassium (K^{+}), manganese (Mn^{2+}), magnesium (Mg^{2+}) and iron (Fe^{2+}) on sporulation efficiency and heat resistance of Bacillus subtilis CM3.1. Sporulation of Bacillus cells was induced in sporulation medium supplemented with various concentrations of the minerals. 7 days after inoculation, Ca^{2+} (1mm), Mg^{2+} (3mm), Mn^{2+} (1mm) and Fe^{2+} (1mm) as single supplements into Nutrient Broth (NB) significantly increased spore cell density of Bacillus subtilis CM3.1, except for K^{+} (10mm). Furthermore, the spore cell density and viability of Bacillus were detectable in sporulation media such as m-NB, SSM and m-SM, significantly higher compared to those in NB (P <0.05) after heating periods, especially from 30 to 40 minutes of exposure. Our results could provide better understanding of the importance of minerals supplemented into culture medium in improving the density, heat resistance of Bacillus spore, and thus enhancing the stability of probiotic Bacillus subtilis CM3.1 during manufacturing process and storage time.

Keywords: *Bacillus*, sporulation, heat resistance, minerals, spore cell density.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Những năm gần đây, probiotic được ứng dụng rộng rãi trong nuôi trồng thủy sản do các tác động có lợi đến sức khỏe của vật chủ thông qua khả năng nâng cao tốc độ tăng trưởng, nguồn dưỡng chất, thay đổi cấu trúc quần thể vi sinh vật, cải thiện hệ miễn dịch, khả năng sử dụng thức ăn, tăng hoạt tính enzyme, khả năng tiêu hóa, chất lượng nước và kiểm soát dịch bệnh (Selim & Reda, 2015). Hầu hết, các probiotic được thương mại hóa ở dạng nước hoặc bột và nhiều công nghệ đã được áp dụng trong quá trình lên men nhằm gia tăng tỉ lệ sống và các đặc tính của probiotic, nâng cao chất lượng sản phẩm (Cruz & cs., 2012; Lacroix & Yildirim, 2007).

Trong số các loài lợi khuẩn được thương mại hóa, loài vi khuẩn sinh bào tử như *Bacillus*

subtilis, *B. clausii*, *B. cereus*, *B. coagulans* và *B. licheniformis* có tính phổ biến hơn so với các loài lợi khuẩn khác thuộc giống *Lactobacillus* spp. (Kuebutornye & cs., 2019). Khác với tế bào sinh dưỡng, bào tử của giống *Bacillus* có khả năng sống sót khi sấy ở nhiệt độ cao, đông khô lạnh ở nhiệt độ thấp, bền với độc tính, áp suất, độ bức xạ và độ ẩm thấp, giúp tăng tính ổn định của các sản phẩm thương mại (Nayak, 2020). Hầu hết các nghiên cứu liên quan đến bào tử *Bacillus* tập trung chủ yếu về mặt di truyền, nhưng các điều kiện môi trường như thành phần khoáng chất cũng ảnh hưởng đáng kể đến quá trình hình thành bào tử (Sinnelä & cs., 2019). Sự hiện diện của các khoáng chất chứa các cation Ca^{2+}, Mn^{2+}, Mg^{2+} và Fe^{2+} trong môi trường nuôi cấy có tác động đáng kể trong quá hình thành bào tử và đặc tính bền với nhiệt của bào tử *Bacillus* (Cazemier & cs., 2001; Ren & cs., 2018), nguyên nhân là do ảnh hưởng đến mức độ khoáng hóa, cấu trúc của lớp peptidoglycan và mức độ khử nước trong lõi bào tử (Sella & cs., 2014). Nhu cầu khoáng chất của mỗi loài *Bacillus* là hoàn toàn khác nhau, đặc biệt là thành phần và hàm lượng khoáng trong môi trường (Kolodziej & Slepecky, 1964). Chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* CM3.1 phân lập từ bùn ao nuôi tôm quảng canh ở Cà Mau có tiềm năng phát triển sản phẩm probiotic với các đặc tính nổi trội như sinh enzyme ngoại bào (protease, amylase và cellulase), khả năng kháng *Vibrio parahaemolyticus* mạnh (Phạm Thị Tuyết Ngân & cs., 2021), cũng như khả năng cải thiện chất lượng nước, nâng cao tăng trưởng và tỉ lệ sống của tôm thẻ chân trắng *Litopenaeus vannamei* (Phạm Thị Tuyết Ngân & cs., 2022). Do đó, tối ưu thành phần khoáng chất trong môi trường nuôi cấy loài *Bacillus subtilis* CM3.1 là cần thiết nhằm cải thiện mật độ và khả năng chịu nhiệt của bào tử, làm cơ sở cho việc phát triển sản phẩm probiotic với độ ổn định và hiệu quả cao.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng

Chủng *Bacillus subtilis* CM3.1 được phân lập từ bùn ao nuôi tôm (Phạm Thị Tuyết Ngân & cs., 2021) và bảo quản tại Phòng thí nghiệm Chế phẩm sinh học thủy sản, Trường Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ. Chủng CM3.1 được phục hồi trên môi trường Nutrient Agar (NA Himedia, Ấn Độ) và nuôi tăng sinh trong bình tam giác 250ml chứa 100ml canh trường Nutrient Broth (NB, Himedia, Ấn Độ) trên máy lắc (tốc độ 150 vòng/phút) ở 30°C trong 24 giờ. Tế bào vi khuẩn được thu bằng cách ly tâm ở 4°C với vận tốc 3.000 vòng/phút trong 10 phút, sau đó sinh khối tế bào được rửa 2 lần với dung dịch đệm phosphate (PBS; pH 7,2) và pha loãng để đạt độ đục xấp xỉ 1 ở bước sóng 600nm (tương ứng với mật độ 5×10^8 CFU/ml) (Kewcharoen & Srisapoome, 2019). Mật độ *Bacillus* tổng số được kiểm tra lại bằng phương pháp cấy trải (APHA, 2017) trên môi trường Nutrient Agar.

2.2. Ảnh hưởng của các nồng độ cation lên khả năng sinh bào tử của chủng *Bacillus subtilis* CM3.1

Nghiên cứu được tiến hành với 5 loại muối khoáng bao gồm $CaCl_2.2H_2O$, KCl, $MnSO_4.H_2O$, $MgSO_4.7H_2O$ và $FeSO_4.H_2O$ được sử dụng để bổ sung riêng biệt các gốc cation Ca^{2+} (0; 1; 2; 3; 4mm), K^+ (0; 10; 13; 17; 20mm), Mn^{2+} (0; 0,5; 1; 2; 3mm) Mg^{2+} (0; 1; 2; 3; 4mm) và Fe^{2+} (0; 1; 2; 3; 4mm) vào môi trường NB ở các nồng độ khác nhau. Các nồng độ trong nghiên cứu được tham khảo trong các nghiên cứu trước đây trên loài *Bacillus* (Ren & cs., 2018) và nồng độ khuyến cáo trong các môi trường nuôi cấy sinh bào tử (Cazemier & cs., 2001). Huyền phù tế bào CM3.1 được cấy chuyển vào môi trường NB đã chuẩn bị sẵn với tỉ lệ 1% (nồng độ *Bacillus* đạt 10^6 CFU/ml) và ủ ở 30°C trên máy lắc (tốc độ 150 vòng/phút). Hơn 95% tế bào vi khuẩn sẽ chuyển sang dạng bào tử trong 5-10 ngày nuôi trong môi trường dinh dưỡng (Cazemier & cs., 2001). Do đó sau 7 ngày nuôi, tiến hành xử lý nhiệt ở 80°C trong 20 phút (Martin & Chuang, 1971) để loại bỏ tế bào sinh dưỡng và kiểm tra lại mật độ bào tử trên môi trường NA bằng phương pháp cấy trải (APHA, 2017). Môi trường NB tiệt trùng được sử dụng làm đối chứng và thí nghiệm được đánh giá 3 lần lặp lại.

2.3. Khả năng chịu nhiệt của bào tử *Bacillus subtilis* CM3.1

Bào tử chủng CM3.1 được chuẩn bị theo phương pháp mô tả ở mục 2.1. Các môi trường sử dụng bao gồm môi trường NB; môi trường NB bổ sung các muối khoáng (m-NB) ở nồng độ tốt nhất từ thí nghiệm ảnh hưởng của các nồng độ cation; môi trường sinh bào tử m-SM trong nghiên cứu của Faille & cs. (1997) gồm NB (13 g/l) bổ sung 2mm Mg^{2+}; 13mm K^{+}; 1,4mm Ca^{2+}; 15µm Mn^{2+}; 2µm Fe^{2+}, pH 7,0) và môi trường SSM theo mô tả bởi Schaeffer & cs. (1965) gồm NB (8 g/l) bổ sung 1mm Mg^{2+}; 13,4mm K^{+}; 0,5mm Na^{+}; 0,1µm Mn^{2+}; 1mm Ca^{2+} và 5,4µm Fe^{2+}. Khả năng chịu nhiệt của bào tử được đánh giá theo phương pháp trước đây của Cazemier & cs. (2001) với một vài thay đổi như sau: 100µl huyền phù bào tử từ mỗi canh trường trộn đều với 9,9ml môi trường Trypticase Soy Broth (TSB) tiệt trùng. Sau đó, tiến hành xử lý nhiệt ở 95°C trong bể điều nhiệt (GP2S, Thermo Scientific, Mỹ) ở các mốc thời gian khác nhau (0, 5, 10, 20, 30 và 40 phút). Sau thời gian xử lý, các ống nghiệm được làm lạnh và bảo quản ở 4°C cho đến khi phân tích. Khả năng chịu nhiệt của bào tử khi nuôi trong các môi trường dinh dưỡng khác nhau được đánh giá thông qua số lượng khuẩn lạc phát triển trên môi trường TSA bằng phương pháp cấy trải (APHA, 2017). Mật độ bào tử vi khuẩn giảm sau khi xử lý nhiệt được tính toán thông qua chỉ số giảm logarit: log (N_t/N_0). Trong đó, N_0 là mật độ bào tử của mẫu trước xử lý (CFU/ml) và N_t là mật độ của mẫu sau xử lý (CFU/ml) ở thời điểm thu mẫu t (Igura & cs., 2003).

2.4. Xác định mật độ bào tử vi khuẩn

Mật độ bào tử chủng CM3.1 được đánh giá thông qua mật độ tế bào phát triển trên môi trường dinh dưỡng như sau: hút 100µl dung dịch vi khuẩn ở các nồng độ pha loãng thích hợp (10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} và 10^{-7}) cho vào đĩa thạch NA hoặc TSA để xác định mật độ *Bacillus* tổng số, trải đều cho đến khi khô và mỗi độ pha loãng lặp lại 3 lần. Các đĩa thạch vừa cấy vi khuẩn được ủ ở 28 ± 1°C sau 48 giờ. Kiểm tra các đĩa hình thành khuẩn lạc, đếm và chọn số khuẩn lạc ở các đĩa dao động trong khoảng 30-300 khuẩn lạc để đảm bảo độ tin cậy của phương pháp (APHA, 2017). Mật độ vi khuẩn được xác định theo đơn vị hình thành khuẩn lạc trong mỗi 1ml dung dịch bằng công thức: Mật độ bào tử vi khuẩn (CFU/ml) = số khuẩn lạc trung bình × độ pha loãng × 10.

2.5. Xử lý số liệu

Dữ liệu được thu thập và trình bày dưới dạng trung bình ± SE (standard error) của ba lần lặp lại và phân tích ANOVA một nhân tố bằng phần mềm Statistical Product and Services Solutions (SPSS, phiên bản 20.0) so sánh thống kê các giá trị trung bình giữa các nghiệm thức ở mức P <0,05 bằng phép thử Duncan.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của các nồng độ cation trong canh trường Nutrient Broth nuôi cấy *Bacillus subtilis* CM3.1

3.1.1. Ảnh hưởng của Ca^{2+}

Kết quả cho thấy bổ sung Ca^{2+} vào môi trường giúp gia tăng mật độ bào tử sau 7 ngày nuôi (Hình 1A). Theo đó, mật độ bào tử ở nghiệm thức đối chứng đạt giá trị trung bình 7,789 ± 0,063 Log CFU/ml, trong khi các nghiệm thức bổ sung 1, 2, 3 và 4mm Ca^{2+} đạt giá trị lần lượt là 8,789 ± 0,144; 8,75 ± 0,096; 8,518 ± 0,064 và 8,554 ± 0,115 Log CFU/ml. Kết quả thống kê cho thấy mật độ bào tử ở các nghiệm thức bổ sung cation Ca^{2+} cao hơn có ý nghĩa so với đối chứng (P <0,05), tuy nhiên không tìm thấy sự khác biệt giữa các nồng độ bổ sung (P >0,05).

3.1.2. Ảnh hưởng của K^{+}

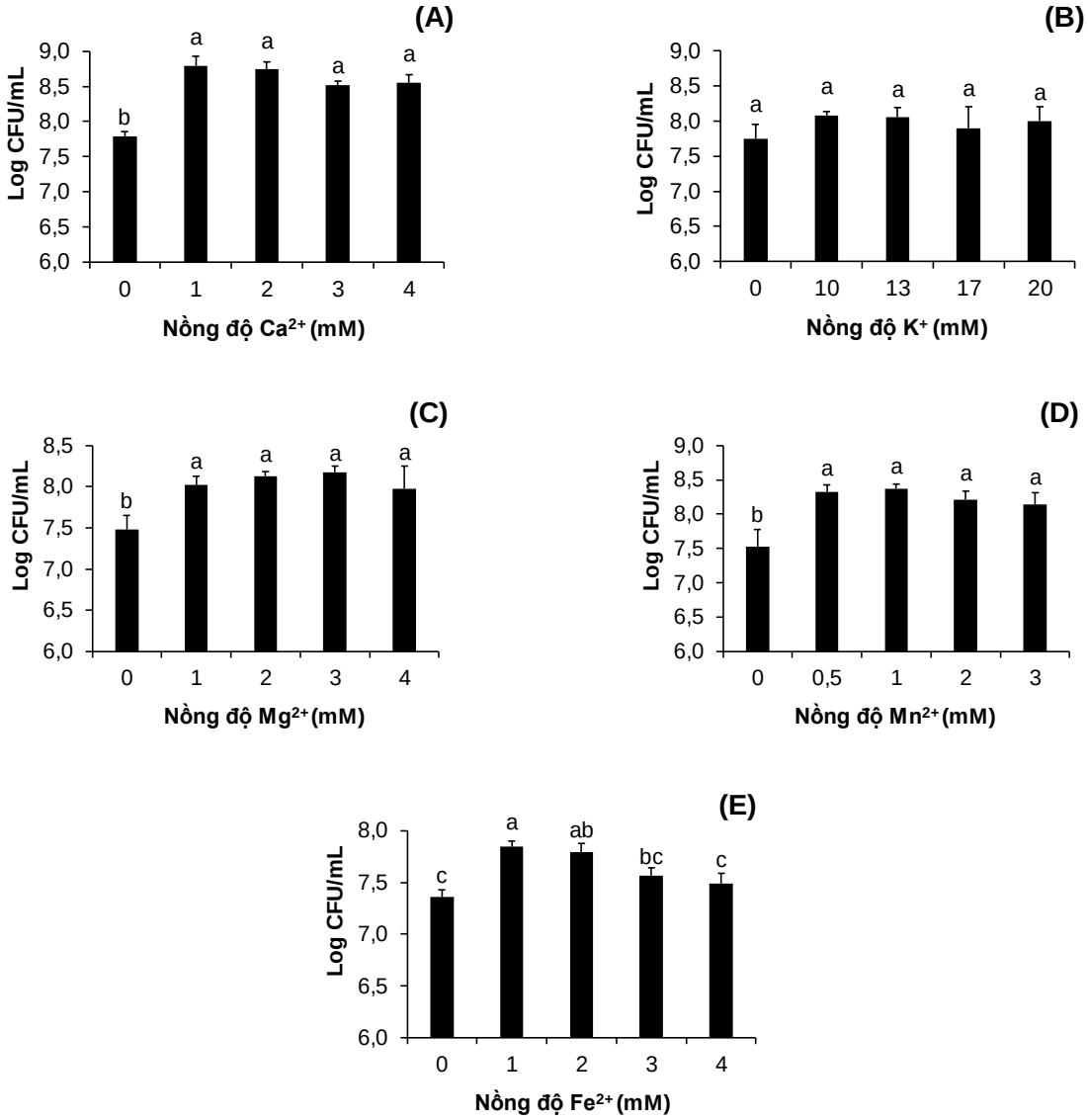
Mật độ bào tử chủng CM3.1 nuôi trong môi trường NB đạt trung bình là 7,752 ± 0,197 Log CFU/ml và có xu hướng tăng khi có sự hiện diện của cation K^{+} trong môi trường (Hình 1B). Cụ thể là, khi bổ sung K^{+} ở nồng độ 10, 13, 17 và 20mm, mật độ bào tử đạt giá trị lần lượt là 8,074 ± 0,061; 8,056 ± 0,138; 7,899 ± 0,31 và 7,996 ± 0,209 Log CFU/ml, tuy nhiên khác biệt không có ý nghĩa so với môi trường đối chứng (P >0,05).

3.1.3. Ảnh hưởng của Mn^{2+}

Tương tự, cation Mn^{2+} có ảnh hưởng tích cực đến quá trình hình thành bào tử của chủng CM3.1 (Hình 1C). Trong đó, mật độ đạt cao nhất ở nồng độ 1mm (8,371 ± 0,072 Log CFU/ml), kế tiếp là 0,5mm (8,328 ± 0,097 Log CFU/ml), 2mm (8,208 ± 0,134 Log CFU/ml) và thấp nhất là 3mm (8,145 ± 0,165 Log CFU/ml). Kết quả cho thấy giữa các nồng độ không tìm thấy sự khác biệt có ý nghĩa (P >0,05), nhưng khác biệt có ý nghĩa (P <0,05) so với môi trường không bổ sung (7,53 ± 0,245 Log CFU/ml).

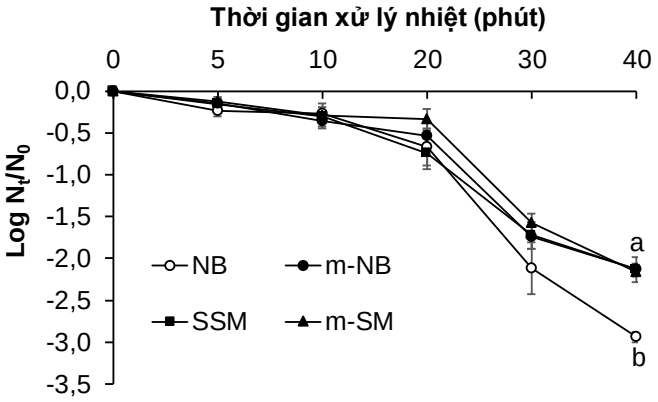
3.1.4. Ảnh hưởng của Mg^{2+}

Khi bổ sung Mg^{2+} vào môi trường ở nồng độ 1, 2, 3 và 4mm thì mật độ bào tử đạt lần lượt là 8,027 ± 0,194; 8,13 ± 0,056; 8,177 ± 0,071 và 7,976 ± 0,273 Log CFU/ml, nhưng khác biệt không đáng kể (P >0,05) giữa các nồng độ (Hình 1D). Trong khi, mật độ bào tử ở môi trường đối chứng đạt trung bình 7,281 ± 0,169 Log CFU/ml và thấp hơn có ý nghĩa (P <0,05) so với môi trường bổ sung cation Mg^{2+}.



Ghi chú: Các giá trị ở các nghiệm thức có ký tự (a, b) khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê (P <0,05).

Hình 1. Mật độ bào tử chủng CM3.1 nuôi trong môi trường NB bổ sung Ca^{2+} (A), K^{+} (B), Mg^{2+} (C), Mn^{2+} (D) và Fe^{2+} (E) ở các nồng độ khác nhau



Hình 2. Khả năng chịu nhiệt của bào tử *Bacillus* CM3.1 nuôi trong các môi trường bổ sung khoáng chất khác nhau

3.1.5. Ảnh hưởng của Fe^{2+}

Tương tự như các cation trên, ở môi trường đối chứng đạt mật độ bào tử thấp nhất (7,357 ± 0,075 Log CFU/ml), khác biệt không có ý nghĩa (P >0,05) so với môi trường bổ sung Fe^{2+} ở nồng độ 3mm (7,562 ± 0,079 Log CFU/ml) và 4mm (7,486 ± 0,102 Log CFU/ml). Tuy nhiên, khi bổ sung Fe^{2+} ở nồng độ 1mm (7,85 ± 0,051 Log CFU/ml) và 2mm (7,797 ± 0,081 Log CFU/ml) vào môi trường đạt mật độ bào tử cao hơn và khác biệt có ý nghĩa (P <0,05) so với đối chứng (Hình 1E).

3.2. Khả năng chịu nhiệt của bào tử

Khả năng chịu nhiệt của bào tử *Bacillus subtilis* CM3.1 được đánh giá thông qua chỉ số giảm logarit sau thời gian xử lý nhiệt (Hình 2). Sau 30 phút xử lý nhiệt ở 95°C, bào tử *Bacillus* nuôi trong các môi trường có tỉ lệ sống giảm xấp xỉ từ 1,577-2,116 Log và không tìm thấy sự khác biệt có ý nghĩa (P >0,05) giữa bốn loại canh trường nuôi cấy. Tuy nhiên, ở mốc thời điểm 40 phút thì bào tử chủng CM3.1 nuôi trong môi trường NB có chỉ số giảm cao nhất với 2,941 ± 0,065 Log và khác biệt có ý nghĩa so với các môi trường còn lại (P <0,05). Cụ thể là ở các môi trường bổ sung khoáng cation có tỉ lệ bào tử giảm từ 1,941-2,436 Log và khác biệt không có ý nghĩa giữa các loại môi trường (P >0,05). Nhìn chung, bào tử chủng CM3.1 nuôi trong môi trường không bổ sung khoáng NB có khả năng chịu nhiệt kém hơn so với các môi trường bổ sung khoáng chất như m-NB, SSM và m-SM.

4. THẢO LUẬN

Hầu hết các loài trực khuẩn *Bacillus subtilis* có khả năng sinh bào tử khi môi trường cạn kiệt các yếu tốc dinh dưỡng. Bào tử duy trì ở trạng thái nghỉ trong thời gian dài và có khả năng chịu được nhiều yếu tố bất lợi bên ngoài như nhiệt độ cao, phóng xạ, hóa chất và pH cao (Cho & Chung, 2020). Trong giai đoạn này, các khoáng cation được tích lũy trong lõi bào tử (chủ yếu là Ca^{2+}, Mg^{2+} và Mn^{2+}), nồng độ các khoáng chất sẽ thay đổi và phụ thuộc vào thành phần dinh dưỡng của môi trường nuôi cấy (Bassi & cs., 2012). Atrih & Foster (2001) nhận định rằng sự hiện diện của các cation Mn^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+} và Ca^{2+} giúp tăng số lượng bào tử *Bacillus*, đồng thời duy trì sự ổn định của bào tử, không trải qua quá trình tự nảy mầm. Thời gian để tế bào *Bacillus* chuyển sang trạng thái bào tử lâu hơn gấp 5 lần so với khi bổ sung Ca^{2+} vào môi trường (Hue & cs., 2011). Điều này có thể là do cation Ca^{2+} ức chế quá trình sinh sản của tế bào sinh dưỡng và kích thích khả năng sinh bào tử. Bên cạnh đó, Mn^{2+} và Fe^{2+} là hai thành phần không thể thiếu cho quá trình hình thành bào tử và quá trình sinh tổng hợp các chất chuyển hóa thứ cấp của loài *Bacillus* như các hợp chất kháng sinh và các peptit (Ren & cs., 2018). Các cation khác như Mg^{2+} và K^{+} cũng tham gia vào quá trình chuyển đổi từ trạng thái hoạt động sang trạng thái nghỉ của vi khuẩn *Bacillus* (Eisenstadt, 1972; Wakisaka & cs., 1982; Mah & cs., 2008), tuy nhiên ở nồng độ cao sẽ ức chế quá trình phát triển và hình thành bào tử của trực

khuẩn. Hơn nữa, các muối khoáng sử dụng chứa gốc sulfate (SO_4^{2-}) là một trong các tác nhân làm giảm khả năng sinh bào tử của giống *Bacillus* khi hiện diện ở nồng độ cao (Yuniarti & cs., 2019). Trong nghiên cứu hiện tại, khi bổ sung các khoáng cation Ca^{2+} (1mm), Mg^{2+} (3mm), Mn^{2+} (1mm) và Fe^{2+} (1mm) vào môi trường dinh dưỡng NB thì mật độ bào tử của loài *Bacillus subtilis* CM3.1 tăng đáng kể, ngoại trừ cation K^+ (10mm). Theo đề xuất của Zhang & cs. (2018) thì hàm lượng các cation Ca^{2+}, Mg^{2+} và Mn^{2+} nên thấp hơn 100 µg/l đối với loài *Bacillus* sp. L15 khi nuôi trong môi trường nước ngọt. Tương tự, trong nghiên cứu của Ren & cs. (2018), loài *Bacillus amyloliquefaciens* BS-20 khi nuôi trong môi trường Luria Bertani (LB) bổ sung Fe^{2+} (3mm), Mn^{2+} (1mm), Mg^{2+} (3mm) và Ca^{2+} (2mm) đạt mật độ bào tử cao hơn đáng kể so với môi trường đối chứng LB. Hơn nữa, nhóm tác giả cũng nhận định rằng bổ sung kết hợp các cation Mn^{2+}, Fe^{2+} và Ca^{2+} ở nồng độ tối ưu sẽ giúp nâng cao mật độ bào tử chủng BS-20 nuôi trong môi trường LB lên gấp 3,4 lần. Việc kết hợp các khoáng cation cũng giúp cải thiện tính ổn định của bào tử trong nghiên cứu hiện tại, sau 40 phút xử lý nhiệt, bào tử ở môi trường NB (không bổ sung muối khoáng) có mật độ giảm đáng kể so với các môi trường bổ sung muối khoáng. Theo Cazemier & cs. (2001) thì bào tử *Bacillus* thu từ môi trường Nutrient agar bổ sung Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Fe^{2+} và K^+ bền với nhiệt hơn so với bào tử thu được từ môi trường NA chỉ bổ sung Mn^{2+}. Khả năng bền với nhiệt của bào tử phụ thuộc vào ba yếu tố: mức độ khử nước, khoáng hóa và khả năng điều hòa nhiệt độ của tế bào (Beaman & Gerhardt, 1986). Trong đó, sự khoáng hóa được cho là yếu tố chính quyết định đến tính bền nhiệt cao của bào tử (Palop & cs., 1999). Quá trình khoáng hóa của bào tử vi khuẩn với Ca^{2+} và các muối khoáng cation khác nâng cao khả năng bền với nhiệt, điều này được lý giải là do sự gia tăng mức độ khử nước trong nguyên sinh chất hoặc lõi bào tử (Marquis & Shin, 1994). Mặc dù, kết quả không có sự khác biệt khi nuôi chủng *Bacillus subtilis* CM3.1 trong môi trường m-NB so với các môi trường tham khảo khác như m-SM và SSM, nhưng nghiên cứu cho thấy được tầm quan trọng của các khoáng chất trong cải thiện mật độ và khả năng bền với nhiệt của bào tử vi khuẩn. Do đó, cần các nghiên cứu đánh giá tác động về phương thức bổ sung riêng lẽ và kết hợp các loại muối khoáng Ca^{2+}, K^+, Mn^{2+}, Mg^{2+} và Fe^{2+}, cũng như tối ưu nồng độ các khoáng chất khi bổ sung kết hợp bằng phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM) để thấy rõ hơn về tác động hiệp đồng của các khoáng chất lên năng suất và đặc tính của bào tử trực khuẩn *Bacillus.*

5. KẾT LUẬN

Bổ sung riêng biệt 4 loại khoáng chất chứa các cation Ca^{2+} (1mm), Mg^{2+} (3mm), Mn^{2+} (1mm) và Fe^{2+} (1mm) vào môi trường nuôi cấy gia tăng đáng kể mật độ bào tử *Bacillus subtilis* CM3.1, ngoại trừ cation K^+ (10mm). Khi nuôi trong các môi trường bổ sung khoáng như m-NB, SSM và m-SM thì mật độ và khả năng chịu nhiệt của bào tử cải thiện rõ rệt sau 30 và 40 phút xử lý nhiệt so với môi trường NB không bổ sung khoáng chất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

APHA (2017). Standard methods for the examination of water and wastewater, 23rd Edition. American public health association, American water works association, water environment federation, Denver. 1504p.

Atrih A. & Foster S.J. (2002). Bacterial endospores the ultimate survivors. International Dairy Journal. 12: 217-223.

Bassi D., Cappa F. & Cocconcelli P.S. (2012). Water and cations flux during sporulation and germination. In: Abel-Santos E (ed). Bacteria Spores: Current Research and Applications. Norfolk, UK: Caister Academic Press. pp. 143-167.

Beaman T.C. & Gerhardt P. (1986). Heat resistance of bacterial spores correlated with protoplast dehydration, mineralization and thermal adaptation. Applied and Environmental Microbiology. 52: 1242- 1246.

Cazemier A.E., Wagenaars S.F.M. & ter Steeg P.F. (2001). Effect of sporulation and recovery medium on the heat resistance and amount of injury of spores from spoilage bacilli. Journal of Applied Microbiology. 90: 761-770.

Cho W.-I. & Chung M.-S. (2020). *Bacillus* spores: a review of their properties and inactivation processing technologies. Food Science and Biotechnology. 29: 1447-1461.

Cruz M.P., Ibáñez A.L., Monroy H.O.A. & Ramírez S.H.C. (2012). Use of Probiotics in Aquaculture. ISRN Microbiology. pp. 1-13.

Eisenstadt E. (1972). Potassium content during growth and sporulation in *Bacillus subtilis*. Journal of bacteriology. 112(1): 264-267.

Faille C., Lebret V., Gavin F. & Maingonnat J.F. (1997). Injury and lethality of heat treatment of *Bacillus cereus* spores in buffer and poultry meat. Journal of Food Protection. 60: 544-547.

Hue N.T.M., Guyot S., Perrier-Cornet J.M. & Gervais P. (2008). Effect of the osmotic conditions during sporulation on the subsequent resistance of bacterial spores. Applied microbiology and biotechnology. 80(1): 107-114.

Igura N., Kamimura Y., Islam M.S., Shimoda M. & Hayakawa I. (2003). Effects of minerals on resistance of *Bacillus subtilis* spores to heat and hydrostatic pressure. Applied and environmental microbiology. 69(10): 6307-6310.

Kewcharoen W. & Srisapoome P. (2019). Probiotic effects of *Bacillus* spp. from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) on water quality and shrimp growth, immune responses, and resistance to *Vibrio parahaemolyticus* (AHPND strains). Fish and Shellfish Immunology. 94: 175-189.

Kolodziej B.J. & Slepecky R.A. (1964). Trace metal requirements for sporulation of *Bacillus megaterium*. Journal of Bacteriology. 88(4): 821-830.

Kuebutornye F.K.A., Abarike E.D. & Lu Y. (2019). A review on the application of *Bacillus* as probiotics in aquaculture. Fish & Shellfish Immunology. 87: 820-828.

Lacroix C. & Yildirim S. (2007). Fermentation technologies for the production of probiotics with high viability and functionality. Current Opinion in Biotechnology. 18(2): 176-183.

Mah J-H., Kang D-H. & Tang J. (2008). Effects of minerals on sporulation and heat resistance of *Clostridium sporogenes.* International Journal of Food Microbiology. 128(2): 385-389.

Marquis R.E. & Shin S.Y. (1994). Mineralization and responses of bacterial spores to heat and oxidative agents. FEMS Microbiology Reviews. 14(4): 375-379.

Martin J.H. & Chuang A.H.L. (1971). Changes in Cation Concentration in Spores of *Bacillus licheniformis* During Germination Induced by L-alanine. Journal of Dairy Science. 54(6): 921-923.

Nayak S.K. (2020). Multifaceted applications of probiotic *Bacillus* species in aquaculture with special reference to *Bacillus subtilis*. Reviews in Aquaculture. pp. 1-45.

Phạm Thị Tuyết Ngân, Vũ Hùng Hải, Vũ Ngọc Út & Huỳnh Trường Giang (2021). Chọn lọc vi khuẩn *Bacillus* sp. từ ao nuôi tôm quảng canh có khả năng phân hủy hữu cơ và kháng *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh trên tôm thẻ. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 57(3B): 191-199.

Phạm Thị Tuyết Ngân, Vũ Hùng Hải Vũ Ngọc Út & Huỳnh Trường Giang (2022). Ảnh hưởng của vi khuẩn *Bacillus* CM3.1 lên chất lượng nước và tăng trưởng của tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*). Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ. 58(4B): 175-184.

Palop A., Mañas P. & Condón S. (1999). Sporulation temperature and heat resistance of *Bacillus* spores: a review. Journal of Food Safety. 19: 57-72.

Park H.S., Yang J., Choi H. J. & Kim K.H. (2017). Effective Thermal Inactivation of the Spores of *Bacillus cereus* Biofilms Using Microwave. Journal of Microbiology and Biotechnology. 27(7): 1209-1215.

Ren H., Su Y.T. & Guo X.H. (2018). Rapid optimization of spore production from *Bacillus amyloliquefaciens* in submerged cultures based on dipicolinic acid fluorimetry assay. AMB Express. 8: 21.

Schaeffer P., Millet J. & Aubert J.P. (1965). Catabolic repression of bacterial sporulation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 54: 704.

Selim K.M. & Reda R.M. (2015). Improvement of immunity and disease resistance in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, by dietary supplementation with *Bacillus amyloliquefaciens*. Fish & Shellfish Immunology. 44: 496-505.

Sella S.R.B.R., Vandenberghe L.P.S. & Soccol C.R. (2014). Life cycle and spore resistance of spore-forming *Bacillus atrophaeus*. Microbiological Research. 169(12): 931-939.

Sinnelä M.T., Park Y.K., Lee J.H., Jeong K.C., Kim Y.-W., Hwang H.-J. & Mah J.-H (2019). Effects of Calcium and Manganese on Sporulation of *Bacillus* Species Involved in Food Poisoning and Spoilage. Foods. 8: 119.

Wakisaka Y., Masaki E. & Nishimoto Y. (1982). Formation of crystalline δ-endotoxin or poly-β-hydroxybutyric acid granules by asporogenous mutants of *Bacillus thuringiensis*. Applied and Environmental Microbiology. 43: 1473-1480.

Yuniarti A., Arifin N.B., Fakhri M. & Hariati A.M. (2019). Spore production and sporulation efficacy of *Bacillus subtilis* under different source of manganese supplementation. Jurnal ilmiah perikanan dan kelautan. 11(2): 51-58.

Zhang D., Wang Z. & Zhou W. (2018). Effect of Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+} on Growth and Sporulation of *Bacillus* sp. L15. 7th International Conference on Energy. Environment and Sustainable Development (ICEESD 2018).