

NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP CÁC CHỦNG *BACILLUS* SPP CÓ HOẠT TÍNH PROBIOTIC CAO TỪ CÁC SẢN PHẨM LÊN MEN TỰ NHIÊN TẠI THÀNH PHỐ THÁI NGUYÊN

• ThS. Đỗ Thị Tuyền^(*), ThS. Đỗ Bích Huệ^(**),
ThS. Vũ Xuân Tạo^(***), Nguyễn Thị Minh^(****)

Tóm tắt

Từ các sản phẩm lên men truyền thống, chúng tôi đã phân lập và tuyển chọn được 5 chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* được ký hiệu lần lượt là: *Bacillus* spp SC1, *Bacillus* spp SC2, *Bacillus* spp NC1, *Bacillus* spp MC1 và *Bacillus* spp DM1. Trong đó đã tuyển chọn được 3 chủng *Bacillus* spp DM1, *Bacillus* spp MC1, *Bacillus* spp SC1 có khả năng sinh axit lactic cao từ 0,315% đến 0,396%. Ba chủng này đều có khả năng phát triển tốt trong môi trường có bổ sung muối mật 0,3%, môi trường pH axit thấp và pH kiềm. Trong đó chủng *Bacillus* spp DM1 có tỉ lệ sống sót cao nhất ở pH=2, pH=3 và pH=8 sau 3 giờ nuôi cấy. Điều này cho thấy khả năng ứng dụng của các chủng này trong sản xuất chế phẩm probiotic sử dụng cho chăn nuôi.

Từ khóa: *Bacillus*, vi khuẩn gram dương, probiotic, vi khuẩn sinh axit lactic, chế phẩm probiotic.

1. Đặt vấn đề

Việt Nam là một nước nông nghiệp có ngành chăn nuôi rất phát triển và có đóng góp rất lớn vào sự phát triển kinh tế của đất nước. Vì vậy, vấn đề nâng cao năng suất, chất lượng sản phẩm và cải thiện môi trường chăn nuôi rất được quan tâm ở nước ta hiện nay. Trong ngành chăn nuôi hiện nay, probiotic (còn gọi là lợi khuẩn) được sử dụng rộng rãi dưới dạng thức ăn bổ sung để cải thiện sức khỏe đường ruột và phòng bệnh cho vật nuôi. Tuy nhiên, nhiều chủng vi khuẩn probiotic thuộc các chi *Lactobacillus* đã được thương mại cho thấy khả năng đề kháng kém với các điều kiện pH đường ruột nên cho hiệu quả trên vật nuôi chưa cao [4].

Bacillus có tiềm năng như là chủng probiotic. Mặc dù nó không phải là vi khuẩn có ưu thế vượt trội trong hệ tiêu hóa của con người nhưng nó lại có khả năng tạo bào tử, bào tử này có thể chống lại độ axit cao trong dạ dày. Điều đó giúp *Bacillus* có thể sống sót khi đưa vào cơ thể. Các chủng *Bacillus* được tìm thấy và phân lập nhiều trong các sản phẩm lên men như sữa chua, phomat, nước dưa chua, nem chua... [1]. Các sản phẩm này có chứa hàm lượng axit lactic rất cao là tiềm năng

để sản xuất probiotic. Bài báo này đã phân lập và tuyển chọn được chủng vi khuẩn *Bacillus* spp có khả năng sinh axit lactic cao, đồng thời chống chịu tốt trong điều kiện pH đường ruột nhân tạo nên có khả năng ứng dụng để sản xuất chế phẩm probiotic sử dụng cho vật nuôi.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

- Các chủng *Bacillus* spp có hoạt tính probiotic cao phân lập từ các sản phẩm lên men tự nhiên như: sữa chua, mẻ chua, nem chua, nước dưa muối được thu thập ở một số khu vực thuộc thành phố Thái Nguyên.

- Các chủng vi sinh vật kiểm định: *Escherichia coli* VTCC-B-883, *Pseudomonas aeruginosa* VTCC-B-481, *Bacillus subtilis* VTCC-B-888 do Bảo tàng Giống chuẩn Vi sinh vật cung cấp; *Staphylococcus aureus* ATCC-25923 do Viện Kiểm nghiệm - Bộ Y tế cung cấp.

- Môi trường nuôi cấy: môi trường MPA gồm: Cao thịt: 5; pepton: 10; NaCl: 5; thạch: 18; Nước máy vừa đủ 1 lít; pH: 7,0 - 7,2. Môi trường hoạt hóa các chủng kiểm định sử dụng môi trường MPA dịch thể giống môi trường MPA thạch nhưng không bổ sung agar.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp nuôi cấy, phân lập [3].

- Phương pháp thử nghiệm catalaza [2], [3].

- Phương pháp thử khả năng di động [2], [3].

^(*) Trường Đại học Khoa học - Đại học Thái Nguyên.

^(**) Viện Khoa học sự sống - Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên.

^(***) Công ty Cổ phần Ứng dụng Khoa học Kỹ thuật Việt Nam.

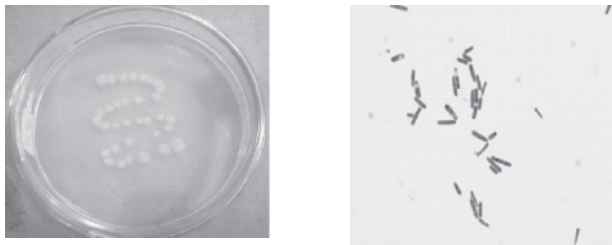
^(****) Cử nhân, Trường Đại học Khoa học - Đại học Thái Nguyên.

- Phương pháp định lượng axit lactic được sinh ra [2], [6].
- Phương pháp đánh giá khả năng tồn tại trong môi trường pH axit thấp và pH kiềm [2].
- Phương pháp đánh giá khả năng chống chịu trong muối mật [2].

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn chi Bacillus

Từ các mẫu sản phẩm lên men tự nhiên, chúng tôi đã phân lập được 9 chủng vi khuẩn nghi ngờ thuộc chi *Bacillus* spp dựa vào các đặc điểm hình thái. Các chủng này đều có đặc điểm khuẩn lạc tròn, nhỏ, màu trắng đục, bề mặt khuẩn lạc khô hình thái tế bào giống với vi khuẩn *Bacillus* spp (theo khóa phân loại của Bergey’s (1984)). Để có thêm căn cứ phân loại, chúng tôi tiến hành khảo sát một số đặc điểm sinh hóa của các chủng trên. Kết quả thể hiện ở Hình 1 và Bảng 1.



Hình 1. Khuẩn lạc (a) và tế bào (b) chủng DM1 phân lập được

Bảng 1. Đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa của các chủng vi khuẩn nghi ngờ thuộc chi *Bacillus* spp phân lập được

Tên mẫu	Kí hiệu mẫu	Đặc điểm		
		Nhuộm Gram	Phản ứng catalaza	Di động
Sữa chua	SC1	+	-	-
	SC2	+	-	-
Nem chua	NC1	+	-	-
	NC2	+	+	-
Mề chua	MC1	+	-	-
	MC2	-	-	-
	BM	+	+	-
Nước dưa muối	DM1	+	-	-
	DM2	-	+	-

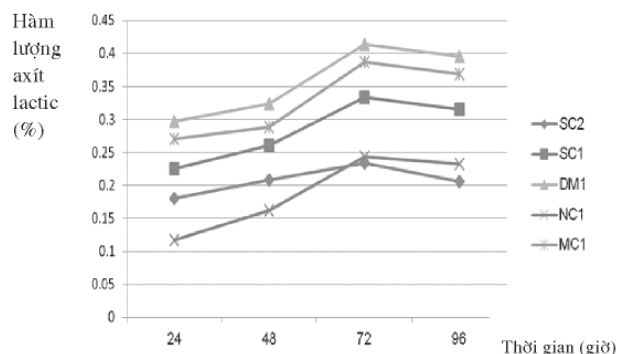
Ghi chú: (+) là phản ứng dương tính
(-) là phản ứng âm tính.

Các phản ứng sinh hóa là đặc điểm quan trọng để nhận dạng vi khuẩn *Bacillus* spp. Theo khóa phân loại của Bergey’s (1984), các vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* spp bắt màu Gram dương, phản ứng catalaza âm tính, không có khả năng di động. Chúng tôi dựa vào những đặc điểm này để tiến hành thử nghiệm các phản ứng sinh hóa của 9 chủng vi khuẩn nghi ngờ. Kết quả thu được cho thấy có 7/9 chủng bắt màu Gram dương, 2/9 chủng bắt màu Gram âm là MC2, DM2. Phản ứng catalaza có 6/9 chủng cho phản ứng catalaza âm tính, 3/9 chủng catalaza dương tính là NC2, DM2, BM. Thử khả năng di động tất cả 9 chủng đều không có khả năng di động. Như vậy, thông qua việc so sánh một số đặc điểm hình thái, nuôi cấy và đặc điểm sinh lý sinh hóa theo khóa phân loại của Bergey’s (1984), có thể sơ bộ nhận định trong số 9 chủng nghi ngờ chỉ có 5 chủng được xác định là *Bacillus* spp, bao gồm SC1, SC2, NC1, MC1 và DM1 [2]. Tuy nhiên, để có thể định tên loài các chủng này cần phải có những nghiên cứu đầy đủ hơn về các đặc điểm trên, đặc biệt cần xác định trình tự nucleotide của đoạn gen 16S rRNA. Trong phạm vi của bài báo này, chúng tôi tạm thời đặt tên các chủng này là *Bacillus* spp SC1, *Bacillus* spp SC2, *Bacillus* spp NC1, *Bacillus* spp MC1 và *Bacillus* spp DM1. Các chủng vi khuẩn này được cấy chuyển và giữ giống trong tủ lạnh để sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.2. Kết quả định lượng axit lactic sinh ra từ các chủng phân lập

Để xác định khả năng sinh axit lactic, 5 chủng trên được nuôi lắc 200 vòng/phút ở 37°C trong 24 giờ. Kết quả được trình bày ở Hình 2 và Bảng 2.

Hình 2. Biểu đồ thể hiện sự thay đổi về hàm lượng axit lactic được sinh ra theo thời gian nuôi cấy



Bảng 2. Khả năng sinh axit lactic của các chủng *Bacillus* spp phân lập được

Kí hiệu chủng	Chỉ tiêu theo dõi	Thời gian nuôi (giờ)			
		24	48	72	96
SC2	OD	0,216	0,236	0,266	0,223
	Axit lactic sinh ra (%)	0,180	0,208	0,234	0,206
SC1	OD	0,231	0,259	0,279	0,266
	Axit lactic sinh ra (%)	0,225	0,261	0,333	0,315
DM1	OD	0,239	0,258	0,277	0,271
	Axit lactic sinh ra (%)	0,297	0,324	0,414	0,396
NC1	OD	0,171	0,201	0,242	0,202
	Axit lactic sinh ra (%)	0,117	0,162	0,243	0,233
MC1	OD	0,235	0,243	0,275	0,269
	Axit lactic sinh ra (%)	0,270	0,288	0,387	0,369

Ghi chú: axit lactic sinh ra = $V_{\text{NaOH}} \times 0,009$ (%).

Qua kết quả Hình 2 và Bảng 2, chúng tôi nhận thấy có sự tương quan tuyến tính giữa mật độ tế bào và axit lactic được sinh ra của 3 chủng DM1, MC1, SC1. Các chủng *Bacillus* spp nghiên cứu đều có xu hướng sinh trưởng và sinh tổng hợp axit lactic mạnh theo chiều tăng dần trong khoảng thời gian từ 24 - 72 giờ. Từ 72 - 96 giờ sự sinh trưởng và sinh tổng hợp axit lactic có xu hướng giảm dần. Điều này có thể lý giải là do sự tích lũy axit lactic làm cho pH môi trường giảm mạnh gây ức chế sinh trưởng của các chủng vi khuẩn *Bacillus* spp khảo sát. Khi đó lượng axit lactic vẫn được tạo thành nhưng với mức độ chậm.

Nhìn chung, các chủng vi khuẩn *Bacillus* spp chúng tôi phân lập được cũng giống như phần lớn các loài vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* đã công bố đều cho thấy khả năng tổng hợp axit lactic thấp hơn so với các chủng vi khuẩn thuộc chi *Lactobacillus* [6]. Điều này cũng được thể hiện rõ khi so sánh với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Mạnh Tuấn về khả năng sinh axit lactic của các chủng *Lactobacillus* phân lập được tại Thái Nguyên [8]. Tuy nhiên, với mục tiêu hướng tới là tuyển chọn được những chủng không chỉ sinh axit lactic mạnh mà còn có khả năng chống chịu tốt với điều kiện dịch vị nhân tạo và muối mật thì các chủng *Bacillus* vẫn cho thấy là một dòng lợi khuẩn thích hợp

dùng để sản xuất probiotic. Như vậy, với hướng nghiên cứu đó, chúng tôi tiến hành tuyển chọn 3 chủng để tiếp tục nghiên cứu khả năng ứng dụng của các chủng này.

3.3. Kết quả đánh giá khả năng tồn tại trong môi trường pH axit thấp và pH kiềm của 3 chủng SC1, DM1, MC1

Theo Zavaglia và cộng sự (2002) cho rằng giá trị pH=2 và pH=3 ở điều kiện *in vitro* được xem là giới hạn quyết định trong sàng lọc các chủng vi sinh vật có tiềm năng sử dụng làm probiotic. Từ đó chúng tôi sử dụng một hệ thống *in vitro* với mức pH=2, pH=3 và pH= 8 để xác định ảnh hưởng của môi trường pH axit ở dạ dày đến khả năng sống sót của 3 chủng SC1, DM1, MC1.

Bảng 3. Khả năng chống chịu trong môi trường axit thấp và kiềm của các chủng SC1, DM1, MC1

Giá trị pH	Kí hiệu chủng	Thời gian (giờ)		
		0	1,5	3
2	DM1	0,495±0,002	0,479±0,007	0,466±0,025
	MC1	0,466±0,007	0,452±0,003	0,417±0,008
	SC1	0,398±0,001	0,202±0,005	0,101±0,003
3	DM1	0,474±0,015	0,469±0,006	0,458±0,002
	MC1	0,470±0,005	0,466±0,002	0,435±0,015
	SC1	0,423±0,003	0,398±0,007	0,311±0,004
8	DM1	0,454±0,015	0,439±0,001	0,425±0,006
	MC1	0,442±0,004	0,423±0,007	0,401±0,002
	SC1	0,414±0,004	0,399±0,005	0,322±0,005

Kết quả Bảng 3 cho thấy, pH của môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng rất lớn đến sự tồn tại và sinh trưởng của các chủng khảo sát. Nhìn chung, số lượng tế bào của 3 chủng SC1, DM1, MC1 đều có xu hướng giảm sau 3 giờ tiến hành thí nghiệm.

Với pH=2, khả năng sống sót của chủng SC1 giảm mạnh, tỉ lệ sống sót chỉ đạt 50,75% ở 1,5 giờ và 25,38% ở 3 giờ nghiên cứu. Trong khi đó, khả năng sống sót của hai chủng DM1, MC1 tương đối cao, tỉ lệ sống sót đạt tới 96,77% và 96,99% sau 1,5 giờ nuôi cấy. Ở pH=2, tại thời điểm 3 giờ số lượng tế bào hầu như không thay đổi (tỉ lệ sống sót hầu như không thay đổi), tỉ lệ sống sót DM1 đạt 94,14% và MC1 đạt 89,48%. Như vậy, trong ba chủng nghiên cứu, chủng DM1 có khả năng sống sót cao nhất, số lượng tế bào

sống sót là 94,14% (ở 3 giờ nuôi cấy) trong khi chủng SC1 có số lượng tế bào giảm mạnh nhất chỉ còn 25,38% (ở 3 giờ nuôi cấy). Điều này cũng được thể hiện rõ hơn khi nghiên cứu khả năng sống sót của 3 chủng này ở pH=3.

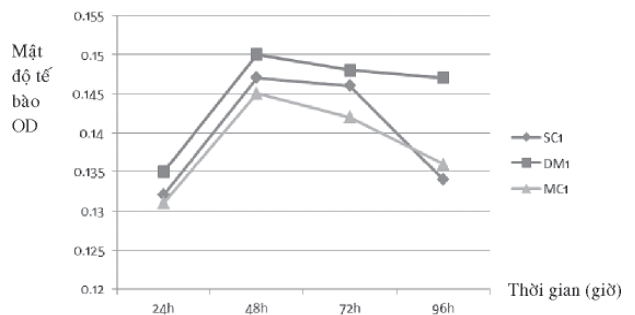
Với pH=3, khả năng sống sót của các chủng cũng tương tự như pH=2, chủng SC1 có số lượng tế bào giảm mạnh, tỉ lệ sống sót chỉ đạt 94,09% ở 1,5 giờ nuôi cấy và 75,52% ở 3 giờ nuôi cấy. Trong khi đó, 2 chủng DM1, MC1 có số lượng tế bào cao hơn nên khả năng sống sót tương đối cao, tỉ lệ sống sót đạt tới 96,62% đối với chủng DM1 và 92,55% đối với chủng MC1 ở 3 giờ nuôi cấy. Như vậy, sau 3 giờ nuôi cấy số lượng tế bào chủng DM1 giảm không đáng kể do đó khả năng sống sót cao nhất, số lượng tế bào sống sót đạt 96,62% trong khi chủng SC1 có số lượng tế bào giảm mạnh nhất, chỉ còn 75,52% sau 3 giờ nuôi cấy.

Với pH=8, cũng giống như pH=2 và pH=3, dễ dàng nhận thấy chủng SC1 có số lượng tế bào sống sót thấp nhất so với 2 chủng DM1, MC1 nên khả năng sống sót thấp nhất chỉ đạt 96,38% ở 1,5 giờ nuôi cấy và 77,78% ở 3 giờ nuôi cấy. Hai chủng DM1, MC1 ở thời điểm 1,5 giờ số lượng tế bào đã giảm xuống, khả năng sống sót của chủng DM1 là 96,7%, MC1 là 95,70% nhưng đến thời điểm 3 giờ thì gần như ít biến động, chủng DM1, MC1 có khả năng sống sót đạt lần lượt là 93,61%, 90,72%. Như vậy, chủng DM1, MC1 có khả năng sống sót tương đối cao so với chủng SC1 và khả năng sống sót của chủng DM1 là cao nhất.

Theo các tài liệu đã được công bố, axit hydrochloric (HCl) được tìm thấy trong dạ dày của vật nuôi là một chất oxy hoá mạnh [5]. Chính vì vậy, nó có thể oxy hóa nhiều các hợp chất sinh học quan trọng như axit béo, protein, cholesterol và DNA trong các tế bào. Tuy nhiên, theo nghiên cứu của Boylston và cộng sự (2004) các chủng vi khuẩn lactic đáp ứng được đặc tính probiotic khi chúng có khả năng sống sót trong điều kiện *in vitro* (pH từ 2÷3 và pH=8). Như vậy, các chủng khảo sát trong thí nghiệm này là tiềm năng để sử dụng chế tạo probiotic cho vật nuôi. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của các tác giả khi nghiên cứu khảo sát một số đặc tính probiotic trong điều kiện *in vitro* [6], [7], [8].

3.4. Kết quả đánh giá khả năng chống chịu của các chủng SC1, DM1, MC1 trong môi trường muối mật 0,3%

Theo nghiên cứu của Gilliland và cộng sự (1984) chỉ ra rằng muối mật 0,3% được xem là nồng độ để tuyển chọn các chủng vi sinh vật mang đặc tính probiotic. Theo đó, chúng tôi đã đánh giá độ nhạy cảm của 3 chủng nghiên cứu với muối mật bằng cách nuôi cấy nó ở môi trường MPA có chứa 0,3% muối mật. Kết quả ở Hình 3 cho thấy, muối mật có ảnh hưởng tới khả năng sống sót của các chủng nghiên cứu. Nhìn chung, mật độ tế bào của các chủng SC1, DM1, MC1 trong môi trường muối mật 0,3% ở thời điểm 96 giờ đều tăng so với ở thời điểm 24 giờ khảo sát. Sau 48 giờ mật độ tế bào của các chủng SC1, DM1, MC1 có xu hướng giảm nhẹ và giảm mạnh hơn từ giai đoạn 72 - 96 giờ. Tuy nhiên, khả năng sống sót và sinh trưởng của ba chủng SC1, DM1, MC1 có sự khác biệt nhau. Sự ảnh hưởng của muối mật tới hai chủng SC1, MC1 là rõ ràng nhất cụ thể là: ở thời điểm 48 giờ mật độ tế bào có xu hướng giảm và giảm mạnh sau 96 giờ nuôi cấy, còn chủng DM1 có khả năng chống chịu với môi trường muối mật tốt hơn thể hiện sau 48 giờ chủng DM1 cũng có xu hướng giảm nhưng không đáng kể. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với kết quả nghiên cứu của tác giả Nguyễn Mạnh Tuấn khi tiến hành khảo sát đặc tính probiotic của các chủng *Lactobacillus* spp, trong môi trường chứa muối mật với nồng độ 0,3% [8].



Hình 3. Biểu đồ thể hiện sự biến động mật độ tế bào của các chủng SC1, DM1, MC1 trong môi trường muối mật 0,3%

Như vậy, các chủng *Bacillus* spp nghiên cứu đều có khả năng sinh axit lactic, duy trì tương đối ổn định trong dịch vị dạ dày nhân tạo và muối mật

0,3% sau 3 giờ nghiên cứu. Xét tất cả các điểm này cho thấy các chủng này có triển vọng là những lợi khuẩn thích hợp dùng trong công nghiệp sản xuất probiotic.

4. Kết luận

Nghiên cứu phân lập, tuyển chọn được 5 chủng mang đặc điểm của chi *Bacillus* spp từ các sản phẩm lên men tự nhiên. Các chủng được kí hiệu lần lượt là *Bacillus* spp SC1, *Bacillus* spp SC2, *Bacillus* spp NC1, *Bacillus* spp

MC1 và *Bacillus* spp DM1.

Nghiên cứu tuyển chọn được 3 chủng *Bacillus* spp DM1, *Bacillus* spp MC1, *Bacillus* spp SC1 có khả năng sinh axit lactic cao từ 0,315% đến 0,396%.

Các chủng *Bacillus* spp DM1, *Bacillus* spp MC1, *Bacillus* spp SC1 đều có khả năng phát triển tốt trong môi trường có bổ sung muối mật 0,3%, môi trường pH axit thấp và pH kiềm. Trong đó chủng DM1 có tỉ lệ sống sót cao nhất ở pH=2, pH=3 và pH=8 sau 3 giờ nuôi cấy./.

Tài liệu tham khảo

- [1]. Hoài Anh (2008), “Probiotic - lợi ích và triển vọng”, *Tạp chí Chăn nuôi*, tập 1, (số 8), tr. 37-39.
- [2]. Bộ Y tế (2006), *Thường quy kỹ thuật xác định tổng số vi khuẩn Lactic trong thực phẩm*, Tiêu chuẩn Ngành y tế, TCN - TQTP 0013:2006.
- [3]. Nguyễn Lâm Dũng, Hoàng Đức Nhuận (1976), *Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học*, tập I, II, III, NXB Khoa học và Kỹ thuật.
- [4]. Phạm Thị Ngọc Lan (2007), *Ảnh hưởng của chủng có tính chất probiotic khu hệ vi khuẩn đường ruột và sự tăng trọng của gà trong điều kiện bình thường và khi chịu stress nhiệt*, Luận án tiến sĩ khoa học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.
- [5]. Michail S. (2005), *The Mechanism of Action of Probiotic*, Wright State University School of Medicine, The Children's Medical Center, Dayton, Ohio.
- [6]. Hồ Trung Thông, Hồ Lê Quỳnh Châu (2009), “Nghiên cứu khả năng sống trong môi trường đường tiêu hóa của động vật của một số chủng vi sinh vật nhằm từng bước chọn lọc tạo nguyên liệu sản xuất probiotic”, *Tạp chí Khoa học Đại học Huế*, (số 55), tr. 88-94.
- [7]. Nguyễn Thế Trang (2011), *Nghiên cứu sử dụng vi khuẩn lactic tạo chế phẩm bảo quản cá*, Luận án tiến sĩ Sinh học, Viện Công nghệ sinh học Việt Nam.
- [8]. Nguyễn Mạnh Tuấn (2012), *Phân lập, tuyển chọn một số chủng Lactobacillus có khả năng sinh axit lactic cao từ các sản phẩm lên men tại khu vực thành phố Thái Nguyên*, Luận văn thạc sĩ Công nghệ sinh học, Thái Nguyên.

INVESTIGATING THE ISOLATION OF BACILLUS SPP STRAINS WITH HIGH PROBIOTIC ACTIVITY FROM NATURALLY FERMENTED PRODUCTS IN THAI NGUYEN CITY

Summary

From the traditionally fermented products we isolated and selected five bacterial strains of the genus *Bacillus*, named respectively *Bacillus* spp SC1, *Bacillus* spp SC2, *Bacillus* spp NC1, *Bacillus* spp MC1 and *Bacillus* spp DM1. Among them, three selected strains *Bacillus* spp DM1, *Bacillus* spp MC1, and *Bacillus* spp SC1 are potential for high lactic acid production, from 0.315% to 0.396%. These three strains can grow well in the habitat supplemented 0.3% bile salts, and in that of low pH and alkaline pH. Particularly, *Bacillus* spp DM1 shows the highest survival rate at pH=2, pH=3 and pH=8 after 3 hours of incubation. Thus, these strains can be used to make probiotic products for breeding.

Keywords: *Bacillus*, positive gram bacteria, probiotic, lactic acid bacteria, probiotic products.