

# PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN CHỦNG VI KHUẨN *BACILLUS SUBTILIS* TIỀM NĂNG SỬ DỤNG SẢN XUẤT CHẾ PHẨM SINH HỌC

Nguyễn Xuân Hoà<sup>1\*</sup>, Phạm Thái Bình<sup>2</sup>, Phan Thị Hằng<sup>1</sup>, Hồ Khả Hồng Đức<sup>1</sup>,  
Nguyễn Thị Hoa<sup>1</sup>, Lê Minh Đức<sup>1</sup>, Lê Thị Hoài Chúc<sup>1</sup>, Phan Vũ Hải<sup>1</sup>

\*Tác giả liên hệ email: nguyensexuanhoa@huaaf.edu.vn

## TÓM TẮT

Nghiên cứu được tiến hành tại khoa Chăn nuôi Thú y, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế nhằm phát hiện chủng *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) tiềm năng ứng dụng trong sản xuất chế phẩm vi sinh phục vụ chăn nuôi. Tổng số 27 khuẩn lạc thuần khiết có đặc điểm hình thái giống với *Bacillus* đã được phân lập. Kết quả giám định sinh hóa cho thấy *B. subtilis* (3/27 chủng), *B. pumilis* (4/2 chủng), *B. licheniformis* (2/27 chủng), *B. coagulans* (3/27 chủng), *B. sphaericus* (3/27 chủng) và *Bacillus* sp. (12/27 chủng) đã được xác định. Vi khuẩn thuộc chi *B. subtilis*, *B. pumilis* và *B. sphaericus* có khả năng lên men đường lactose và glucose, không sinh hơi, tuy nhiên chỉ có *B. subtilis* có thêm khả năng phân giải tinh bột và protein. Trong ba chủng (B4, B17 và B23) được kiểm tra sinh hoá đều là *B. subtilis*, chúng tôi đã chọn chủng B23 để giải trình tự gen 16S ribosomal RNA, kết quả cho thấy chủng *B. subtilis*-B23 có trình tự gen tương đồng 100% với *B. subtilis* strain H1. Kết quả khảo sát đường cong sinh trưởng của *Bacillus subtilis*-B23 cho thấy sinh trưởng đạt số lượng cực đại sau 10 đến 14 giờ trong điều kiện nuôi cấy tĩnh với tỷ lệ tiếp giống 1%. Chủng *B. subtilis*-B23 có nhiều đặc tính sinh học quý, tiềm năng cho các nghiên cứu để chế tạo probiotics phục vụ chăn nuôi.

Từ khoá: Lợi khuẩn, *Bacillus subtilis*-B23, sinh hoá, sinh trưởng, 16S ribosomal RNA.

## Isolation and selection of potential *Bacillus subtilis* strain for producing probiotics

Nguyen Xuan Hoa, Pham Thai Binh, Phan Thi Hang, Ho Kha Hong Duc,  
Nguyen Thi Hoa, Le Minh Duc, Le Thi Hoai Chuc, Phan Vu Hai

## SUMMARY

The study was conducted at the Faculty of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Hue University of Agriculture and Forestry, Hue University to detect the potential strains of *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) for producing probiotics for animal husbandry. A total of 27 pure colonies having the morphological characteristics similar to *Bacillus* were isolated. The results of biochemical examination showed that there were *B. subtilis* (3/27 strains), *B. pumilis* (4/27 strains), *B. licheniformis* (2/27 strains), *B. coagulans* (3/27 strains), *B. sphaericus* (3/27 strains) and *Bacillus* sp. (12/27 strains) identified. Bacteria belonging to the *B. subtilis*, *B. pumilis* and *B. sphaericus* genus had the ability to ferment sugars without producing gas, but only *B. subtilis* had the ability to break down starch and proteins. Three strains (B4, B17 and B23) that were tested biochemically, they were all as *B. subtilis*, B23 strains was chosen for sequencing the 16S ribosomal RNA gene, as a result the similarity level of B23 and *B. subtilis* strain H1 was 100%. The surveyed result on the growth curve of *B. subtilis* - B23 showed that the growth reached the maximum number after 10 to 14 hrs. in the static culture conditions with the rate of seeding 1%. The *B. subtilis*-B23 strain has many potential valuable biological properties for research on creating probiotics for animal husbandry.

Keywords: Probiotics, *Bacillus subtilis*-B23, biochemistry, growth, 16S ribosomal RNA.

<sup>1</sup> Trường Đại học Nông Lâm Huế

<sup>2</sup> Công ty Cổ phần Công nghệ sinh học R.E.P (R.E.P Biotech JSC)

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong chăn nuôi, tiêu chảy do mất cân bằng hệ vi sinh đường ruột trên gia súc, gia cầm là bệnh xảy ra rất phổ biến. Từ lâu kháng sinh được xem là thuốc đặc trị bệnh tiêu chảy. Tuy nhiên sử dụng kháng sinh thiếu kiểm soát dẫn đến hiện tượng kháng thuốc ngày càng tăng và điều trị bệnh không hiệu quả (Lê Hải Yên và cs., 2016). Trong bối cảnh này, việc nghiên cứu để tìm ra những chế phẩm sinh học có thể thay thế kháng sinh trong chăn nuôi như một nhu cầu có tính chất thời sự, chế phẩm sinh học sản xuất từ *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) được nhiều nhà nghiên cứu trong và ngoài nước rất quan tâm. Vi khuẩn *B. subtilis* là trực khuẩn gram dương có nha bào, có khả năng chịu nhiệt, chịu được dịch tiêu hoá. Chúng xuất hiện trong đường tiêu hóa của động vật thông qua thức ăn, nước uống. Vi khuẩn *B. subtilis* khi cộng sinh trong đường tiêu hóa thể hiện một số tính chất có lợi cho cơ thể vật chủ như: cạnh tranh vị trí bám với các vi khuẩn có hại; sản sinh ra các chất ức chế sự phát triển của các vi khuẩn có hại như *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* và *Clostridium difficile* (Juan và cs., 2016); sản sinh ra các enzyme tăng cường các quá trình tiêu hóa hấp thu dinh dưỡng, vì vậy *B. subtilis* còn có tên là lợi khuẩn đường ruột (Lee và cs., 2012; Lê Anh Tuấn và cs., 2020). Kể từ khi phát hiện được những đặc tính có lợi của *B. subtilis*, con người đã ứng dụng chúng trong phòng trị bệnh tiêu chảy do nhiễm khuẩn và tăng cường tiêu hóa cho người và động vật (Uraisha và cs., 2020). Ngày nay trong chăn nuôi người ta đã biết tận dụng tối đa các lợi khuẩn *B. subtilis*, *Lactobacillus* và nấm *Saccharomyces* để nâng cao hiệu quả chăn nuôi. Theo tiêu chuẩn của WHO/FAO, lợi khuẩn để có thể sử dụng buộc phải có đặc tính như: khả năng sinh enzyme ngoại bào, khả năng đối kháng với các vi khuẩn gây bệnh đường ruột, khả năng chịu acid, muối mật, và các yếu tố an toàn (Leser và cs., 2008; Lê Hải Yên và cs., 2016; Ngô Chí Công và cs., 2021). Nghiên cứu của Muhammad (2020) cho thấy sử dụng lợi khuẩn trong chăn nuôi không chỉ tăng cường chuyển hóa mà nó còn tăng khả năng miễn dịch cho cơ thể. Vì vậy, nghiên cứu này nhằm mô

tả một số đặc điểm sinh hoá và định danh một số chủng *Bacillus* spp. được phân lập từ các mẫu phân gà thả vườn nuôi tại tỉnh Thừa Thiên-Huế, làm cơ sở cho việc sản xuất chế phẩm sinh học bổ sung vào thức ăn chăn nuôi.

## II. NỘI DUNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Nội dung nghiên cứu

- Phân lập vi khuẩn *Bacillus* spp.
- Định danh các chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. phân lập được
- Chọn chủng giám định gen thông qua phân tích trình tự gen 16S rRNA
- Xác định đường cong sinh trưởng của chủng tiềm năng.

### 2.2. Vật liệu nghiên cứu

30 mẫu phân tươi được thu thập từ gà khoẻ mạnh không được sử dụng men vi sinh từ 10 hộ chăn nuôi gia cầm khác nhau tại các xã ven thành phố Huế. Môi trường nuôi cấy Luria Bertani (LB), LB agar, Luria Bertani Broth (LB broth), Nutrient Agar (NA) (HiMedia, Ấn Độ). Hoá chất phân tích sinh hoá được cung cấp bởi công ty Cổ phần Công nghệ sinh học R.E.P (R.E.P Biotech JSC), trang thiết bị tại phòng thí nghiệm vi sinh truyền nhiễm khoa Chăn nuôi Thú y, Đại học Nông Lâm, Đại học Huế.

### 2.3. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.3.1. Xử lý tạt khuẩn

Cân 1g mẫu phân cho vào bình tam giác có chứa 9 ml LB broth đánh cho tan đều/hấp ở 80°C/20-25 phút để loại bỏ tế bào sinh dưỡng, chỉ giữ lại những chủng có sinh bào tử để làm nguyên liệu phân lập *Bacillus*, sau đó hỗn hợp dung dịch được ủ ở 37°C/24 giờ (Nguyễn Thị Đâu, 2020).

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

Mẫu phân sau khi xử lý sẽ được sử dụng để tách dòng khuẩn lạc thuần bằng phương pháp cấy ria trên môi trường NA (Nutrient agar)/ủ ở 37°C/24h.

Sau đó kiểm tra hình dạng, màu sắc khuẩn lạc, nhuộm màu gram để kiểm tra hình thái vi khuẩn dưới kính hiển vi. *Bacillus* là trực khuẩn gram dương. Khuẩn lạc thuần được tăng sinh trong môi trường LB broth, canh khuẩn thuần bảo quản trong ống eppendorf có bổ sung 40% glycerol bảo quản ở  $-80^{\circ}\text{C}$  (TCVN 8136:2011, TCVN 8736:2011).

Thực hiện định danh bằng các thử nghiệm sinh hóa: Catalase, di động, sinh Indol, Citrate, Voges-Proskauer, tiêu huyết trên môi trường thạch máu, sinh Urease, sinh  $\text{H}_2\text{S}$ , lên men các đường (glucose, lactose, mannitol, xylose), thủy giải starch, thủy giải lecithinase, thủy giải gelatine, phenylalanine deaminase, mọc trong môi trường có 7,5% NaCl (Patricia, 2014).

### 2.3.3. Chọn chủng giám định gen thông qua phân tích trình tự đoạn gen ổn định mã hóa ribosome 16S

Sau khi kiểm tra đặc tính sinh hóa, các chủng được chọn lọc sau cùng được tách chiết DNA theo phương pháp của Bai và cs. (2012).

Kiểm tra gen 16S bằng kỹ thuật PCR và trình tự đoạn gen ổn định của gen 16S được phân tích trình tự bởi Công ty TNHH T&N BIOSOLUTION.

Tiến hành so sánh với các loài vi khuẩn được lưu trữ từ ngân hàng dữ liệu gen của NCBI.

### 2.3.4. Xác định đường cong sinh trưởng của chủng *B. subtilis* có tiềm năng sản xuất chế phẩm

Sử dụng 3 bình tam giác mỗi bình chứa 100 ml LB broth, giống *B. subtilis*  $10^6\text{CFU/ml}$  được sử dụng để tiếp giống ở các nồng độ khác nhau 0,1%; 0,5%; 1%. Sau đó định lượng vi khuẩn sau khi nuôi cấy 15 phút, 30 phút, 60 phút, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h, 12h, 14h, từ đó xây dựng đường cong sinh trưởng.

### 2.3.5. Xử lý số liệu

Dùng phần mềm Excel 2010 để xử lý số liệu thu được thông qua tính tỷ lệ, %, phần mềm Blast so sánh trình tự gen trên cơ sở dữ liệu NCBI.

## III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Đặc điểm hình thái, sinh hóa của các vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* phân lập được

Ba mươi mẫu phân gà đã được thu thập từ các hộ chăn nuôi nhỏ lẻ không sử dụng men vi sinh, chúng tôi đã phân lập được 27 chủng vi khuẩn về hình thái, nhuộm màu gram được chẩn đoán thuộc chi *Bacillus* thuần khiết, kết quả định danh sinh hóa được thể hiện qua bảng 1.

Về đặc tính lên men đường: Hầu hết các loài *Bacillus* phân lập được có khả năng lên men đường lactose, glucose, mannitol, không lên men xylose, riêng ba loài *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilis*, *Bacillus sphaericus* lên men đường nhưng không sinh hơi.

Kết quả thử nghiệm sinh hóa cho thấy 100% các loài *Bacillus* phân lập được đều dương tính với catalase và có khả năng di động, trong khi đó âm tính hoàn toàn với indole và  $\text{H}_2\text{S}$ . Kết quả sinh hóa này phù hợp với kết quả định danh của chi *Bacillus* công bố trong các tài liệu vi sinh vật (Cowan và cs., 2004).

Các đặc tính tiềm năng cho việc sử dụng làm chế phẩm cũng được khảo sát: như khả năng sử dụng nguồn carbon vô cơ (Simmons citrate), có thể phát triển được trong môi trường có nồng độ muối NaCl 7,5%, không dung huyết, có khả năng phân giải protein và tinh bột (amylase dương tính), lên men đường không sinh hơi.

Như vậy thông qua giám định sinh hóa chúng tôi nhận thấy 3 loài vi khuẩn thuộc chi *Bacillus subtilis* (3 chủng), *Bacillus pumilis* (4 chủng) và *Bacillus sphaericus* (4 chủng) lên men đường nhưng không sinh hơi, đây là đặc tính yêu cầu cần có của chi *Bacillus* khi sử dụng để tạo chế phẩm. Tuy nhiên trong ba loài này chỉ có loài *B. subtilis* mới có đầy đủ đặc tính phân giải được tinh bột và protein, đây là cơ sở để chúng tôi chọn những chủng này trong các nghiên cứu tạo chế phẩm tiếp theo.

**Bảng 1. Kết quả kiểm tra sinh hóa của các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* đã phân lập được**

Tính chất	<i>Bacillus subtilis</i> (SL)	<i>Bacillus pumilis</i> (SL)	<i>Bacillus licheniformis</i> (SL)	<i>Bacillus coagulans</i> (SL)	<i>Bacillus sphaericus</i> (SL)	<i>Bacillus</i> sp. (SL)
Lactose	3	3	1	1	1	6
Glucose	3	4	2	2	1	6
Mannitol	3	4	2	3	3	8
Xylose	0	0	0	0	0	0
Sinh hơi	0	0	2	3	0	4
Motility	3	4	2	3	3	12
Indole	0	0	0	0	0	0
Urease	0	0	1	0	3	6
Catalase	3	4	2	3	3	12
H <sub>2</sub> S	0	0	0	0	0	0
Voges-Proskauer (VP)	3	4	2	3	1	6
Simmons citrate	3	2	2	0	0	2
7,5% NaCl	3	2	2	1	0	0
Betahemolysis 5% SBA	0	4	2	3	0	0
Gelatin liquefaction 22 °C (protease)	3	4	2	1	0	8
Starch hydrolysis (amylase)	3	0	2	3	0	4
Lecithinase (acid béo)	0	0	0	0	0	2
Phenylalanine deaminase (protease)	0	0	0	0	0	0

Ghi chú: SL: số lượng chủng vi khuẩn phân lập

### 3.2. Phân loài *Bacillus* từ các mẫu phân gà thu thập được

Thông qua phân tích đặc tính sinh hoá của các chi *Bacillus* phân lập được, kết quả phân loại cấp loài *Bacillus* được thể hiện qua bảng 2.

Bảng 2 cho thấy 27 dòng khuẩn lạc của chi *Bacillus* đã phân lập được thuộc loài và phụ loài sau: 3 loài *B. subtilis*, 4 loài *B. pumilis*, 2 loài *B. licheniformis*, 3 loài *B. coagulans*, 3 loài *B. sphaericus* và 12 loài *Bacillus* sp.

Kết quả kiểm tra hình thái, sinh hóa ba chủng vi khuẩn *B. subtilis* (ký hiệu B4, B17 và B23) như sau:

Về hình thái, khuẩn lạc của *B. subtilis*-B4 có dạng S/M, hình con mắt không đồng đều, có tâm

ở giữa; trong khi đó *B. subtilis*-B17 khuẩn lạc có dạng S, hình tròn không đều, không có tâm; *B. subtilis*-B23 hình dạng khuẩn lạc tương tự khuẩn *B. subtilis*-B17 tuy nhiên khuẩn lạc không có tâm ở giữa. Tất cả 3 chủng vi khuẩn phân lập được thuộc chi *B. subtilis* đều có dạng hình que, Gram dương, nha bào hình elip ở trung tâm của tế bào.

Về đặc tính sinh hóa, tất cả 3 chủng vi khuẩn *B. subtilis* phân lập được đều dương tính với catalase, phát triển được trên môi trường 7,5% NaCl, hoàn nguyên citrate, có khả năng di động, hầu hết có khả năng lên men mannitol, tan chảy gelatin, thủy phân tinh bột, Voges-Proskauer (VP); lên men không sinh hơi với các đường lactose, glucose. Âm tính với các thử nghiệm: xylose, indol, H<sub>2</sub>S lecithinase, phenylalanine deaminase, urease.

**Bảng 2. Kết quả phân lập các loài thuộc chi *Bacillus***

Tên vi khuẩn	Số chủng phân lập	Tỷ lệ (%)
<i>Bacillus subtilis</i>	3	11,11
<i>Bacillus pumilis</i>	4	14,81
<i>Bacillus licheniformis</i>	2	7,41
<i>Bacillus coagulans</i>	3	11,11
<i>Bacillus sphaericus</i>	3	11,11
<i>Bacillus</i> sp.	12	44,44
<b>Tổng</b>	<b>27</b>	<b>100</b>

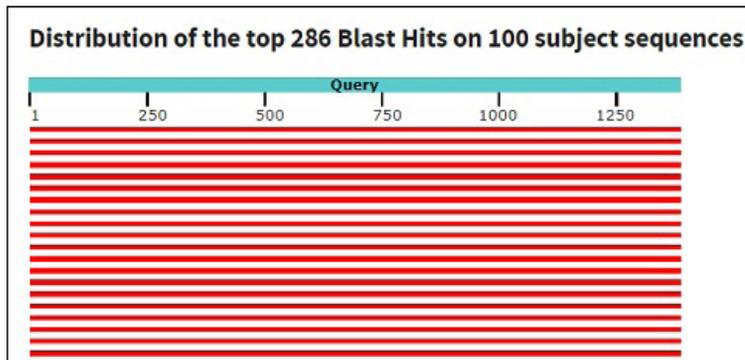
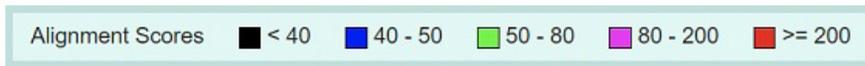
Như vậy thông qua kiểm tra sinh hóa chúng tôi nhận thấy cả ba chủng *B. subtilis* (B4, B17, B23) đều có những đặc tính tiềm năng cho sử dụng làm chế phẩm sinh học bổ sung vào thức ăn chăn nuôi như: khả năng phân giải tinh bột, khả năng tan chảy gelatin, khả năng lên men đường, không sinh hơi.

**3.4. Định danh chủng vi khuẩn *B. subtilis* B23 bằng giải trình tự RNA gen 16S**

```

TAGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGT
AAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTGAACCGC
ATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTTGGCTACCACCTACAGATGGACCCCGGGCGC
ATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGA
GAGGGTGATCGGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAG
CAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACAAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTG
ATGAAGGTTTTCCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCAA
TAGGGCGGTACCTTGACGTTACCTAACAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGC
AGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGC
TCGACGGCGTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCA
TTGAAACTGGGGAACCTTGATGTCAGAAGAGGAGAGTGAATTCACGTGTAGCCG
TGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGGGACTCTCTGGTCTGT
AACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAG
TCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTCCGCCCTTAGTGTGTC
AGCTAACGCATTAAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAA
GGAATTGACGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATCGAAGCAACG
CGAAGAACCTTACCAGGCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCTCC
TTCGGGGGCGAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTCAGCTCGTGTCTGAGATGT
TGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTACAGTTGG
GCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAACCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAAT
CATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGG
CAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCAAAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCA
GTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGGGATCAGCATGCCG
CGGTGAATACGTTCCCGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCACGAGAGTTGTA
ACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACC
    
```

**Hình 1. Trình tự (5'-3') chủng *Bacillus* B23**



Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Bacillus subtilis strain H1 chromosome, complete genome	Bacillus subtilis	2536	25253	99%	0.0	100.00%	4356270	CP026662.1
Bacterium strain T2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	bacterium	2536	2536	99%	0.0	100.00%	1458	MH197370.1
Bacterium strain T3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	bacterium	2536	2536	99%	0.0	100.00%	1455	MH197368.1
Bacterium strain T2-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	bacterium	2536	2536	99%	0.0	100.00%	1455	MH197366.1
Bacterium strain T1-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	bacterium	2536	2536	99%	0.0	100.00%	1455	MH197365.1

**Hình 2. Kết quả BLAST trình tự đoạn gen 16S Bacillus B23 trên NCBI**

Trình tự đại diện: *Bacillus subtilis* strain H1 chromosome, complete genome (100% tương đồng).

Trình tự chủng *Bacillus* B23 khảo sát tương đồng cao với các trình tự trên Ngân hàng Gen NCBI bao gồm:

- *Bacillus subtilis* strain H1 chromosome, complete genome, tỷ lệ 100%.

- *Bacterium strain* T2 16S ribosomal RNA gen, partial sequence, tỷ lệ 100%.

- *Bacterium strain* T3 16S ribosomal RNA gen, partial sequence, tỷ lệ 100%.

**Bacillus subtilis strain H1 chromosome, complete genome**  
 Sequence ID: [CP026662.1](#) Length: 4356270 Number of Matches: 10

Range 1: 2671006 to 2672378 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2536 bits(1373)	0.0	1373/1373(100%)	0/1373(0%)	Plus/Plus
Query 3	GCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTG	62		
Sbjct 2671006	GCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTG	2671065		
Query 63	GGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAAC	122		
Sbjct 2671066	GGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAAC	2671125		
Query 123	ATAAAAGGTGGCTTTGGCTACCACTTACAGATGGACCGCGGCATTAGCTAGTTGGTG	182		
Sbjct 2671126	ATAAAAGGTGGCTTTGGCTACCACTTACAGATGGACCGCGGCATTAGCTAGTTGGTG	2671185		
Query 183	AGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACT	242		
Sbjct 2671186	AGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACT	2671245		
Query 243	GGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGG	302		
Sbjct 2671246	GGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGG	2671305		
Query 303	ACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCT	362		
Sbjct 2671306	ACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCT	2671365		
Query 363	GTTGTTAGGGGAAGAACAAAGTACCGTTTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAG	422		
Sbjct 2671366	GTTGTTAGGGGAAGAACAAAGTACCGTTTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAG	2671425		
Query 423	AAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCC	482		
Sbjct 2671426	AAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCC	2671485		
Query 483	GGAAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCCCG	542		
Sbjct 2671486	GGAAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCCCG	2671545		
Query 543	GCTCAACCGGGAGGGTTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAA	602		
Sbjct 2671546	GCTCAACCGGGAGGGTTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAA	2671605		

**Hình 3. Toàn bộ trình tự gen trên nhiễm sắc thể của chủng Bacillus subtilis strain H1 từ Ngân hàng Gen**

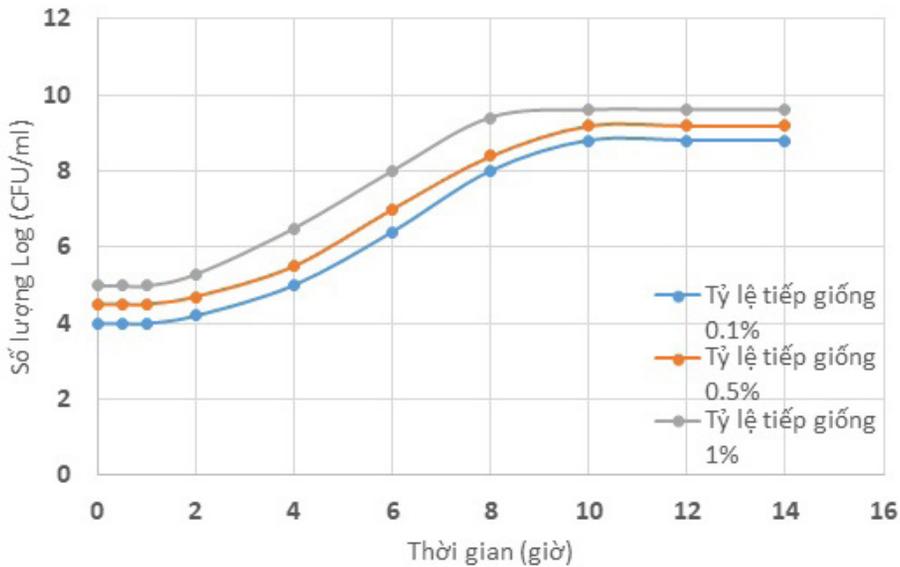
Như vậy, chủng *Bacillus* B23 chúng tôi phân lập được thông qua phân tích kiểu hình và kiểu gen khẳng định là *Bacillus subtilis*- B23.

**3.5. Xây dựng đường cong sinh trưởng của chủng *Bacillus subtilis*- B23**

Vi khuẩn *B. subtilis*-B23 đạt nồng độ 10<sup>6</sup> CFU/ml được sử dụng để tiếp giống với các tỷ lệ 0,1%; 0,5% và 1%; theo dõi sự sinh trưởng trong vòng 14h kết quả thể hiện qua bảng 3 và hình 4.

**Bảng 3. Sinh trưởng của chủng *B. subtilis*-B23 ở các tỷ lệ tiếp giống khác nhau (log CFU/ml)**

Số lượng (Log)	Thời gian (giờ)									
	0	0,5	1	2	4	6	8	10	12	14
Tỷ lệ tiếp giống 0,1 %	4	4	4	4,2	5	6,4	8	8,8	8,8	8,8
Tỷ lệ tiếp giống 0,5 %	4,5	4,5	4,5	4,7	5,5	7	8,4	9,2	9,2	9,2
Tỷ lệ tiếp giống 1 %	5	5	5	5,5	6,5	8	9,4	9,6	9,6	9,6



**Hình 4. Biểu đồ đường cong sinh trưởng của chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis*-B23**

Thông qua kết quả theo dõi sự biến động số lượng CFU/ml sau khi tiếp giống ở các nồng độ 0,1%; 0,5% và 1% cho thấy giai đoạn thích nghi của *B. subtilis*-B23 tính từ khi tiếp giống đến trước 2 giờ, từ sau 2 giờ số lượng tăng lên theo cấp số nhân hay gọi là pha logarit quá trình này kéo dài đến 8 giờ đạt đỉnh về số lượng CFU, sau nuôi cấy từ 8 giờ đến 14 giờ số lượng CFU không thay đổi hay gọi là pha ổn định về số lượng.

**IV. KẾT LUẬN**

Nghiên cứu đã phân lập được chủng *B. subtilis*-B23 có nhiều đặc tính sinh học quý đáp ứng yêu cầu sử dụng để sản xuất chế phẩm sinh học nâng cao hiệu quả chăn nuôi gia cầm. Khảo sát đường cong sinh trưởng của *B. subtilis*-B23 cho thấy sinh trưởng đạt số lượng tối đa sau 10 giờ trong điều kiện nuôi cấy tĩnh với tỷ lệ tiếp giống 1%.

**Lời cảm ơn:** Nguồn kinh phí cho việc thực hiện nghiên cứu này từ quỹ nghiên cứu khoa học hàng năm của trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế và sự hỗ trợ phân tích sinh hoá từ công ty Công ty Cổ phần Công nghệ sinh học R.E.P (R.E.P Biotech JSC).

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ngô Chí Công, Trịnh Ngọc Nam, 2021. Đánh giá đặc tính probiotic của vi khuẩn gram dương phân lập từ đường tiêu hóa gà. *Khoa học và Công nghệ*, 49, 16-25.
2. Nguyễn Thị Đâu, 2020. Phân lập vi khuẩn *Bacillus* spp. từ đất và phân gà tại tỉnh Trà Vinh. *Khoa học kỹ thuật Thú y*, 28(6).
3. Lê Anh Tuấn, Lê Thị Hoàng Oanh, Phạm Văn Quang, Nguyễn Đăng Lưu, Vũ Hồng Quân, Lê Ngọc Ánh, 2020. Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn *Bacillus* có khả năng sinh tổng hợp polymer ngoại bào polyglutamic axit. *TNU Journal of Science and Technology*, 225(08), 443-447.
4. Lê Hải Yến, 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. *Khoa học Trường Đại học Cần Thơ, số chuyên đề: Nông Nghiệp*, 2, 26-32.
5. Bai S., Kumar M. R., Kumar D. M., Balashanmugam P., Kumaran M. B., Kalaichelvan P., 2012. Cellulase production by *Bacillus subtilis* isolated from cow dung. *Arch Appl Sci Res*, 4 (1): 269-279.
6. Lee J., Park I., Choi Y., Cho J., 2012. *Bacillus* strains as feed additives: *In vitro* evaluation of its potential probiotic properties. *Rev Colomb Pecu*, 25, 577-585.
7. Leser T., Knarreborg A., Worm J., 2008. Germination and outgrowth of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* spores in the gastrointestinal tract of pigs. *J. Appl. Microbiol.*, 104, 1025–1033
8. Muhammad Bilal, Wei Si, Florence Barbe, Eric Chevaux, Olimpia Sienkiewicz, Xin Zhao, 2020. Effects of novel probiotic strains of *Bacillus pumilus* and *Bacillus subtilis* on production, gut health, and immunity of broiler chickens raised under suboptimal conditions. *Poultry Science*, 100 (3), 100871.
9. Patricia M., 2014. *Bacillus* and Similar Organisms, Bailey & Scott's diagnostic microbiology. *Mosby, Inc., an affiliate of Elsevier Inc*, 265 – 271.
10. Uraisha Ramlucken, Yrielle Roét, Santosh O. Ramchuran, Ghaneshree Moonsamy, Christine Jansen van Rensburg, Mapitsi S. Thantsha, and Rajesh Laloo, 2020. Isolation, selection and evaluation of *Bacillus* spp. as potential multi-mode probiotics for poultry. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 66, 228-238.

Ngày nhận: 18-3-2023

Ngày phản biện: 16-6-2023

Ngày đăng: 1-1-2024