

# PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN MỘT SỐ CHỦNG VI SINH VẬT HỮU ÍCH CƯ TRÚ TRONG RUỘT LỢN

Đào Thị Hồng Vân<sup>1</sup>, Nguyễn Văn Hiếu<sup>2</sup>

## TÓM TẮT

Từ các mẫu vật chất thu thập ở ruột của lợn tại một số trang trại nuôi lợn của huyện Gia Lâm, Hà Nội, đã phân lập được 31 chủng vi sinh vật, trong đó có 6 chủng nấm men. Đã chọn được 4 chủng vi khuẩn ký hiệu AH3, AH4, H11, H9 và chủng nấm men V1 có đặc tính probiotic. Kết quả nghiên cứu đặc điểm sinh học cho thấy, chúng thuộc nhóm vi sinh vật ưa ẩm, sinh trưởng tốt ở pH thấp 2-5 và ở nồng độ muối mật 3% và 4 chủng vi khuẩn có khả năng ức chế vi khuẩn *E. coli*, *Salmonella* sp. Kết quả phân loại dựa trên đặc điểm sinh học và phân tích trình tự gen 16S rRNA của 4 chủng vi khuẩn trên cho thấy chúng có mức độ tương đồng cao (> 99%) với loài *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus licheniformis* và *Bacillus subtilis* và 1 chủng nấm men với trình tự phân tích gen 5,8S rRNA cho kết quả với mức độ tương đồng cao (> 99%) thuộc loài *Saccharomyces cerevisiae*. Cả 5 chủng đều thuộc nhóm vi sinh vật không gây bệnh cho người và vật nuôi, có thể được sử dụng làm chế phẩm vi sinh (probiotics).

Từ khóa: *Lactobacillus*, *Bacillus*, nấm men, chế phẩm vi sinh.

## Isolation and selection of some useful microorganisms living in the pig intestine

Dao Thi Hong Van, Nguyen Van Hieu

## SUMMARY

From the material samples collected in the intestine of pigs raising in Gia Lam district, Ha Noi City, 31 strains of microorganisms were isolated, of which, there were 6 yeast strains. 4 bacteria strains, signing AH3, AH4, H11, H9 strains and V1 yeast strain were selected, having probiotic properties. The results of studying biological characteristics showed that they belonged to the group of moist-loving microorganisms, grew well at low pH (2-5) and at the concentration of 3% bile salt, 4 bacteria strains were capable in inhibiting *E.coli*, *Salmonella* sp. The result of classification based on biological characteristics and sequence analysis of 16S rRNA genes of 4 bacteria strains showed that they presented high similarity level (> 99%) with species: *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* and the result of analyzing sequence of 5.8S rRNA gene of 1 yeast strain showed high similarity level (> 99%) with 1 species: *Saccharomyces cerevisiae*. All of 5 these strains belonged to the microorganism group that do not cause diseases for human and domestic animals. they can be used as the probiotics.

Keywords: *Lactobacillus*, *Bacillus*, yeasts, probiotics.

## I. MỞ ĐẦU

Chất thải chăn nuôi lợn chứa nhiều hợp chất hữu cơ, vô cơ, vi sinh vật gây bệnh và có mùi hôi. Đặc thù của chất thải chăn nuôi lợn là chất thải rắn, lỏng trộn lẫn nên rất khó thu gom và xử lý triệt để. Do vậy, giảm bớt mức độ ô nhiễm

của chất thải trước khi chúng phát tán ra môi trường là việc làm rất cần thiết.

Tăng cường sức khoẻ hệ thống tiêu hoá của vật nuôi thông qua những tác động tới hệ vi sinh vật đường ruột được coi là một giải pháp rất hữu hiệu, tạo nên một thể cân bằng tối ưu

<sup>1</sup> Khoa Công nghệ sinh học, Trường Đại học Mỏ Hà Nội

<sup>2</sup> Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm khoa học Việt Nam

giữa các loài vi sinh vật đường ruột theo hướng có lợi cho vật chủ đã và đang là hướng nghiên cứu được các nhà khoa học trong và ngoài nước quan tâm. Có nhiều biện pháp để cải thiện quan hệ cân bằng giữa các nhóm vi khuẩn có lợi và có hại trong đường tiêu hoá của gia súc, gia cầm. Một trong những giải pháp hữu hiệu nhất hiện nay là probiotic. Các chủng vi sinh vật sử dụng làm probiotic chủ yếu thuộc các chi *Bacillus*, *Lactobacillus*, nấm men... Đây là các nhóm vi sinh vật có khả năng sinh ra một số kháng sinh, acid lactic, các enzym tiêu hóa (amylase, cellulase, protease), các nhóm vi sinh vật này với hệ enzym phong phú của mình đã chuyển hóa các chất cao phân tử có trong thức ăn thành các chất dễ hấp thụ cho vật nuôi, kích thích khả năng tiêu hóa thức ăn của vật nuôi, giúp vật nuôi hấp thụ thức ăn hiệu quả hơn, hạn chế sự dư thừa và không hấp thụ hết thức ăn, kích thích tiêu hóa và giúp vật nuôi tăng trọng nhanh (Lessard và Brisson, 1987; Patil *et al.*, 2015). Do vậy, sử dụng các chủng vi sinh vật có đặc điểm probiotic sẽ góp phần hạn chế các chất thải có khả năng gây ô nhiễm môi trường, nâng cao sức khỏe vật nuôi. Trên thị trường hiện nay có khá nhiều chế phẩm probiotic chứa những vi khuẩn này, bao gồm cả chế phẩm nhập khẩu, nhưng việc ứng dụng chúng vào thực tế chưa mấy tác dụng. Có thể do chủng vi sinh vật chưa thực sự phù hợp và thích nghi với môi trường tiêu hóa của vật nuôi, hoặc vì một lý do nào đó mà chúng không phát huy được năng lực vốn có. Nghiên cứu này của chúng tôi nhằm mục đích tìm ra lợi khuẩn phù hợp với tiêu hóa của lợn bản địa, định hướng sản xuất chế phẩm bổ sung vào thức ăn cho lợn, giúp tăng cường chuyển hóa thức ăn và giảm ô nhiễm môi trường do chất thải. Do vậy, trong nghiên cứu này sẽ trình bày một số kết quả về đặc điểm sinh học, phân loại của một số chủng vi sinh vật có đặc tính probiotic phân lập từ chất thải của một số giống lợn Móng Cái và Yorkshire Việt Nam.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu

- Thu thập mẫu chất chứa trong ruột non và ruột già của lợn giống Yorkshire và lợn Móng Cái tại huyện Gia Lâm, Hà Nội.

- Vi khuẩn *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. được sử dụng làm chủng vi khuẩn kiểm định, nhận từ Viện Công nghệ sinh học.

### 2.2. Thời gian, địa điểm nghiên cứu

- Thời gian: tháng 1 đến tháng 5 năm 2018

- Địa điểm: Phòng thí nghiệm Vi sinh vật, Khoa Công nghệ sinh học, Trường Đại học Mở Hà Nội.

### 2.3. Nội dung nghiên cứu

- Phân lập và tuyển chọn nhóm vi khuẩn lactic, *Bacillus*, nấm men có đặc tính probiotic.

- Nghiên cứu đặc điểm sinh học, phân loại các chủng vi sinh vật đã tuyển chọn.

### 2.4. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.4.1. Phương pháp phân lập các chủng vi sinh vật

Pha loãng mẫu  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ... $10^{-7}$ , lấy các mẫu ở nồng độ pha loãng cấy trên môi trường chọn lọc: MRS (De Man, Rogosa and Sharpe agar) cho nhóm vi khuẩn *Lactobacillus*, MPA (Meat peptone agar) cho nhóm vi khuẩn *Bacillus*, môi trường Hansen's cho nhóm nấm men. Nuôi vi khuẩn ở  $37^{\circ}\text{C}$ , nấm men ở  $30^{\circ}\text{C}$  trong 48 giờ. Sau đó căn cứ vào hình thái đặc trưng được mô tả với các chủng vi khuẩn dựa theo khóa phân loại Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1984). Với nấm men, sử dụng khóa phân loại của Kurtzman, Fell (1998) và Barnett *et al.*, (1990), để tách ra và thuần khiết, các chủng sau khi thuần khiết được giữ giống trên môi trường tương ứng ở nhiệt độ  $4^{\circ}\text{C}$  phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo.

#### 2.4.2. Thử khả năng đối kháng với vi sinh vật gây bệnh

Theo phương pháp của Moore *et al.* (2013) có điều chỉnh: Nhóm vi khuẩn *Escherichia coli*,

*Salmonella* sp. được hoạt hóa trên môi trường TSB sau thời gian 20-24 giờ, mật độ vi sinh vật có trong mẫu  $10^9$  cfu/ml, hút bổ sung vào môi trường thạch đã để nguội xuống  $40^\circ\text{C}$ , sao cho đạt nồng độ  $10^6$  cfu/ml và đổ đĩa với độ dày của đĩa thạch đạt 0,5cm, sau đó đục lỗ và bổ sung dịch nuôi của các chủng đã lựa chọn, tiếp đến nuôi ở  $37^\circ\text{C}$ , sau thời gian 14-18 giờ kiểm tra khả năng tạo vòng ức chế vi khuẩn gây bệnh, lặp lại 3 lần.

#### 2.4.3. Xác định hoạt tính enzym

Dịch enzym được nhỏ vào lỗ trên các đĩa thạch sau khi môi trường đã đông cứng (phương pháp đục lỗ thạch) hoặc chấm điểm trên đĩa thạch có chứa cơ chất tinh bột, xenluloza và casein; ủ ở  $37^\circ\text{C}$  trong 24 giờ, sau đó hiện vòng phân giải cơ chất bằng thuốc thử Lugol, trichloacetic và Công đồ đỏ. Đo vòng phân giải D-d (mm), D là đường kính vòng ngoài, d là đường kính lỗ nhỏ dịch (hoặc đường kính khuẩn lạc).

#### 2.4.4. Thử khả năng chịu pH acid

Tương tự như trong dạ dày và muối mật: Thực hiện theo phương pháp của Corcoran *et al.* (2005) có cải tiến. Nuôi các chủng vi sinh vật sau quá trình tuyển chọn bao gồm: vi khuẩn *Bacillus* trên môi trường MP, *Lactobacillus* trên môi trường MRS, nấm men trên môi trường Hansen's sau 20-36 giờ đạt mật độ  $10^9$  cfu/ml, ly tâm 8000 vòng/phút ở nhiệt độ  $4^\circ\text{C}$  để thu nhận sinh khối, rửa sinh khối hai lần bằng đệm PBS ở pH 7,0, pha loãng căn cứ vào mật độ (D600nm) để cho nồng độ vi sinh vật đạt  $10^7$  cfu/ml. Tiếp đến hút 1 ml vào 9 ml dung dịch dạ dày mô phỏng gồm (g/L): glucose 3,5; NaCl 2,05,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,6;  $\text{CaCl}_2$  0,11 và KCl 0,37 đã được chuẩn độ về các pH khác nhau, pH 2, 3, 4 và 5 bằng dung dịch HCl 1M và được vô khuẩn bằng cách lọc qua phin lọc 0,2  $\mu\text{m}$  và bổ sung thêm pepsin 13,3 mg/l và dịch mật lợn 0,2; 0,5; 1; 2; 3; 4 và 5 (%). Dịch gốc được bổ sung vi sinh vật lựa chọn và đem ủ hỗn hợp ở  $37^\circ\text{C}$ , xác định khả năng

sống sót bằng cách nuôi trên môi trường MRS (De Man, Rogosa và Sharpe agar) cho nhóm vi khuẩn *Lactobacillus*, MPA (Meat peptone agar) cho nhóm vi khuẩn *Bacillus*, môi trường Hansen's cho nhóm nấm men.

#### 2.4.5. Nghiên cứu đặc điểm sinh học, phân tích trình tự RNA phân loại các chủng vi sinh vật

- Nghiên cứu đặc điểm sinh học của các chủng vi khuẩn thực hiện theo các phương pháp mô tả trong khóa phân loại Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1984). Với nấm men sử dụng để phân loại, sử dụng các phương pháp mô tả theo khóa phân loại của Kurtzman, Fell (1998) và Barnett *et al.* (1990).

- Tách DNA tổng số: DNA tổng số của vi khuẩn được tách theo phương pháp được mô tả bởi Sambrook (Sambrook, 2001) và nấm men theo phương pháp của Manitis và cs. (1982).

- Khuếch đại gen: Trình tự gen 16S rRNA của vi khuẩn được khuếch đại bằng phản ứng PCR sử dụng cặp mồi 27F (5'-TAACACATGCAAGTCGAACG-3') và 1492R (5'-GGTGTGACGGGCGGTGTGTA-3') và nấm men cho vùng gen 5,8S rRNA sử dụng cặp mồi ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' và ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'. Sản phẩm của phản ứng PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1 %, so sánh với thang DNA chuẩn (Fermentas). Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ kit PureLink™ - DNA Purification (Invitrogen) và giải trình tự trên máy đọc trình tự tự động ABI PRISM®3100-Avant Genetic Analyzer (USA) tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Phân tích, so sánh với trình tự gen tương ứng trên cơ sở dữ liệu GenBank và lập cây phân loại với phần mềm CLC Main Workbench 8.10.

### III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Phân lập và tuyển chọn các chủng vi sinh vật hữu ích

Sau khi thu thập các mẫu vật từ đường ruột lợn, phân lập các chủng vi sinh vật đặc trưng cho

từng nhóm vi khuẩn lactic, vi khuẩn *Bacillus* và nấm men, kết quả đã phân lập được 31 chủng vi

sinh vật, trong đó có 10 chủng vi khuẩn lactic, 15 chủng *Bacillus* và 6 chủng nấm men.



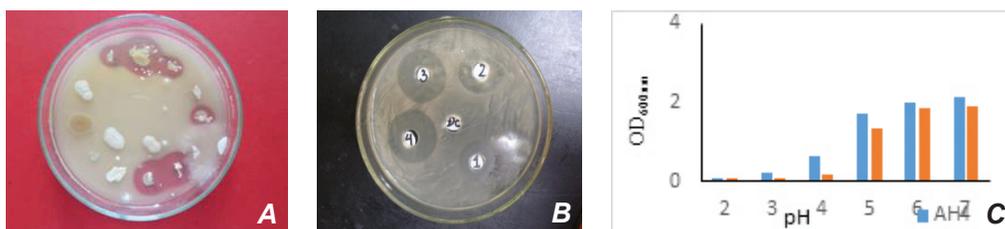
**Hình 1. Hình ảnh một số nhóm vi sinh vật có trong mẫu**  
(A: môi trường MPA; B: môi trường MRSA và C: môi trường Hansen)

Từ các chủng phân lập được sẽ tuyển chọn các chủng có thể sử dụng làm chế phẩm probiotic với các đặc tính chịu acid dạ dày, muối mật 1-3%, sinh enzym thủy phân như protease, amylase, cellulase và kháng khuẩn gây bệnh

như *E. coli*, *Salmonella* (Patil AK et al., 2015).

### 3.2. Tuyển chọn các vi sinh vật có đặc tính probiotic

#### 3.2.1. Một số đặc điểm probiotic của nhóm vi khuẩn *Lactobacillus*



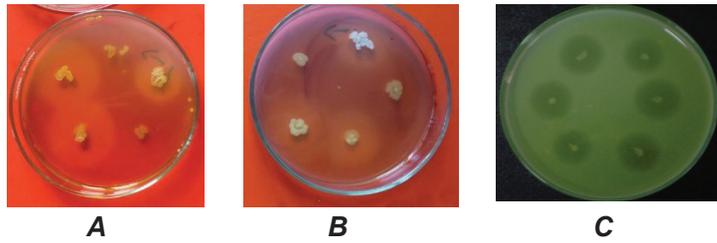
**Hình 2. Khả năng phân hủy  $\text{CaCO}_3$  (A), hoạt tính kháng vi khuẩn *E. coli* (B) và khả năng sinh trưởng ở môi trường có pH 2-7 của các chủng vi khuẩn *Lactobacillus* (C)**

Kết quả thu được cho thấy khả năng sinh acid của 10 chủng vi khuẩn lactic là khá khác nhau, số chủng có vòng phân hủy  $\text{CaCO}_3$  lớn hơn 15mm có 3 chủng, chiếm 30%, trong khi đó số chủng có vòng phân hủy  $\text{CaCO}_3$  nhỏ hơn 15mm và lớn hơn 10mm có 4 chủng, chiếm 40%, số chủng có khả năng phân hủy  $\text{CaCO}_3$  nhỏ hơn 10mm chiếm 30% (hình 2A). Trong số 10 chủng, số chủng có hoạt tính kháng cả 2 chủng vi khuẩn *Salmonella* và *E. coli* là 2 chủng, số chủng có khả năng kháng 1 chủng *E. coli* là 5 chủng và số chủng có khả năng kháng *Salmonella* sp. là 5 chủng. Tuy nhiên, mức độ kháng các vi khuẩn kiểm định của các chủng rất khác nhau. Chủng

ký hiệu AH3 và AH4 có vòng kháng khuẩn lớn (đối với cả 2 loại vi khuẩn kiểm định) (hình 2B), đồng thời có khả năng sinh trưởng trong điều kiện pH  $\geq 2$  (hình 2C). Vì vậy, 2 chủng AH3 và AH4 được dùng trong các nghiên cứu tiếp theo.

#### 3.2.2. Một số đặc điểm probiotic của nhóm vi khuẩn *Bacillus*

Tổng số 15 chủng vi khuẩn *Bacillus* phân lập được đều có khả năng phân giải với cả 3 cơ chất, tuy nhiên 2 chủng có ký hiệu H9 và H11 có vòng thủy phân cơ chất lớn hơn ( $D-d \geq 16$  mm) (hình 3 A, B và C và hình 4A).



**Hình 3. Khả năng sinh enzyme cellulase (A), amylase (B) và protease (C) của các chủng vi khuẩn Bacillus**

Đánh giá khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh có trong đường ruột là vi khuẩn *E. coli* và *Salmonella sp.*, trong 15 chủng được lựa chọn, có 11 chủng có khả năng kháng các vi khuẩn kiềm định, và 2 chủng H9 và H11 có khả năng kháng các vi khuẩn kiềm định tạo ra vòng vô

khuẩn to, rõ nét trên với vòng kháng khuẩn D-d từ 13-16 mm (hình 4A). Ngoài ra, khi kiểm tra khả năng phát triển ở pH 2-5 (hình 4C), 2 chủng H9 và H11 đều cho thấy khả năng tồn tại ở pH này, do vậy sẽ được lựa chọn cho nghiên cứu định hướng tiếp theo.



**Hình 4. Khả năng sinh enzyme ngoại bào có trong dịch sau lên men (A), khả năng kháng vi khuẩn *Salmonella sp.* (B) và khả năng sinh trưởng ở điều kiện pH 2-7 (C) của 2 chủng vi khuẩn Bacillus**

### 3.2.3. Một số đặc điểm probiotic của nấm men

Từ 6 chủng nấm men đã được phân lập (hình 5), đã đánh giá ảnh hưởng của pH ban đầu đến khả năng sinh trưởng, kết quả ở hình 6 cho thấy với dải pH rộng: 2; 3; 4; 5; 6 và 7, chỉ có chủng ký hiệu V1 có thể phát triển tốt từ pH 3-7, và 5 chủng còn lại chỉ sinh trưởng tốt trong môi trường có độ pH >4. Như vậy chủng V1 có thể sống sót được khi qua môi trường pH acid ở dạ dày, do vậy chủng này đã được chúng tôi chọn cho nghiên cứu tiếp theo.

Khả năng tồn tại trong môi trường acid của dạ dày vật chủ là nơi có môi trường acid pH thấp, từ 2-4 và có mặt các enzym tiêu hoá.



**Hình 5. Hình thái khuẩn lạc của 6 chủng nấm men**

Các chủng vi sinh vật tồn tại được ở các điều kiện như vậy bước đầu có thể coi là nguồn probiotic (Patil *et al.*, 2015), với kết quả trên của 5 chủng vi sinh vật được chúng tôi lựa chọn

đã được nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ muối mật đến khả năng sinh trưởng.

### 3.2.4. Ảnh hưởng của muối mật đến sự phát triển của các chủng vi sinh vật lựa chọn

**Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ muối mật đến sự phát triển của các chủng vi sinh vật lựa chọn**

Ký hiệu chủng	Nồng độ muối mật (%)						
	0,2	0,5	1	2	3	4	5
AH3	+	+	+	+	+	+	+
AH4	+	+	+	+	+	+	+
H9	+	+	+	+	+	+	+
H11	+	+	+	+	+	+	+
V1	+	+	+	+	+	-	-

(+): biểu thị khả năng sinh trưởng; (-): biểu thị khả năng không sinh trưởng.

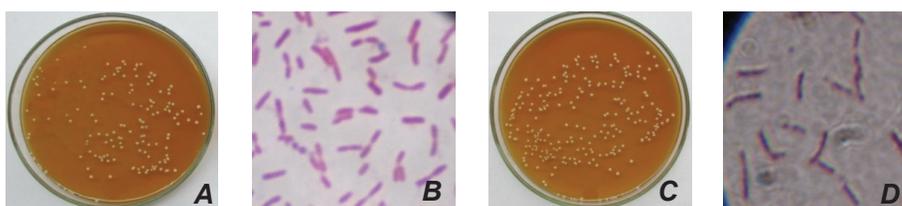
Kết quả bảng 1 cho thấy, cả 5 chủng đều chịu được nồng độ muối mật 0,2-3%, đó là nồng độ muối mật bình thường trong dịch chất của ruột non. Riêng chủng nấm men V1 không cho thấy khả năng phát triển ở nồng độ muối mật 4 và 5%. Theo Patil và cs. (2015), một trong những tiêu chuẩn của các chủng probiotic là phải có khả năng sống sót trong điều kiện muối mật tối thiểu 2%. Các chủng vi sinh vật được coi như là nguồn probiotic phải tồn tại được trong điều

kiện này, như vậy cả 5 chủng lựa chọn bước đầu đã đáp ứng các điều kiện đề ra.

### 3.3. Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học, phân loại các chủng vi sinh vật được lựa chọn

#### 3.3.1. Các chủng vi khuẩn lactic

Để nghiên cứu đặc điểm hình thái của 2 chủng vi khuẩn lactic, đã nuôi cấy chủng trên môi trường đặc trưng, kết quả thể hiện ở hình 7 và bảng 2.



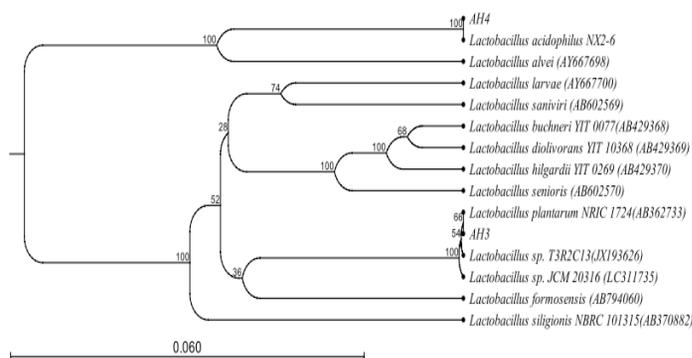
**Hình 7. Hình thái khuẩn lạc và tế bào các chủng vi khuẩn lactic**

Thực hiện theo các phương pháp mô tả trong khoá phân loại của Bergeys (1984), cho nghiên cứu đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa cho chi vi khuẩn *Lactobacillus* trong khoá phân loại cho kết quả ghi ở bảng 2. Khi đối chiếu với cơ sở dữ liệu có trong khoá phân loại kết hợp với phân loại phân tử dựa trên trình tự gen 16S rRNA sử dụng cặp mồi đặc hiệu 27F và 1492R cho 2 chủng vi khuẩn (hình 8), sau khi đối chiếu gen 16S rRNA sau phản ứng PCR (hình 9), được

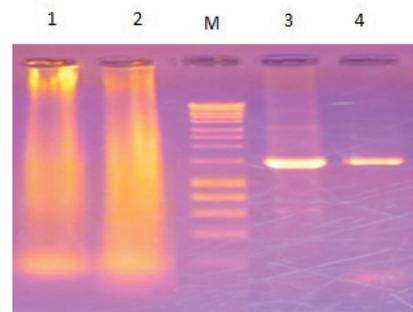
giải, phân tích và so sánh với trình tự nucleotide tương ứng trên cơ sở dữ liệu GenBank cho thấy, chủng AH4 có độ tương đồng cao với các chủng vi khuẩn *Lactobacillus acidophilus* NX26 (EU 878007)(100%) và chủng AH3 có độ tương đồng cao với các chủng *Lactobacillus plantarum* NRIC 1724 (AB362733) (99%) (hình 8). Đề tài đặt tên 2 chủng vi khuẩn trên là *Lactobacillus plantarum* AH3 và *Lactobacillus acidophilus* AH4.

**Bảng 2. Các đặc điểm sinh hoá của 2 chủng vi khuẩn lactic**

Đặc điểm	Đặc điểm sinh học của hai chủng vi khuẩn lactic	
	AH3	AH4
Đặc điểm khuẩn lạc trên môi trường MRS đặc và lỏng	Phát triển tốt, hình tròn, màu trắng sữa, mép tròn, d < 0,5 mm. Ở trên môi trường lỏng sinh khối lắng chặt.	Phát triển tốt, hình tròn, màu trắng sữa, mép tròn, d < 0,5 mm. Ở trên môi trường lỏng, sinh khối ở dạng kết bông.
Đặc điểm hình thái tế bào	Không di động, Gram (+), Trục khuẩn ngắn, đứng theo cặp, không bào tử	Không di động, Gram (+), Trục khuẩn ngắn, đứng riêng rẽ hoặc đôi, không bào tử
Kiểu hô hấp	Kỵ khí tùy tiện	Kỵ khí tùy tiện
Sinh khí	+	-
Phản ứng catalase	-	-
Khả năng phát triển ở nồng độ NaCl (%)	≤ 6	≤ 5
Khả năng phát triển ở nhiệt độ (°C)	18-40	18-40
Khả năng đồng hoá nguồn hydrat cacbon		
D- xylose	-	-
D-arabinose	+	-
L-rhamnose	+	-
D-trehalose	+	+
D-lactose	+	+
D-manitol	+	-
Saccharose	+	+
D-galactose	-	-
D-fructose	+	+
D-glucose	+	+



**Hình 8. Mức độ tương đồng di truyền giữa chủng vi khuẩn AH3 và AH4 với một số chủng vi khuẩn *Lactobacillus* có họ hàng gần gũi**



**Hình 9. Điện di đồ sản phẩm DNA tổng số và PCR**  
Giếng M: Thang DNA chuẩn; Giếng 1, 2: DNA tổng số của chủng AH3 và AH4; giếng 3, 4: sản phẩm PCR từ DNA tổng số của chủng AH3 và AH4.

### 3.3.2. Các chủng vi khuẩn *Bacillus*

Tương tự như đối với vi khuẩn lactic, việc phân loại các chủng vi khuẩn *Bacillus*, được nghiên cứu về đặc điểm hình thái, sinh lý,

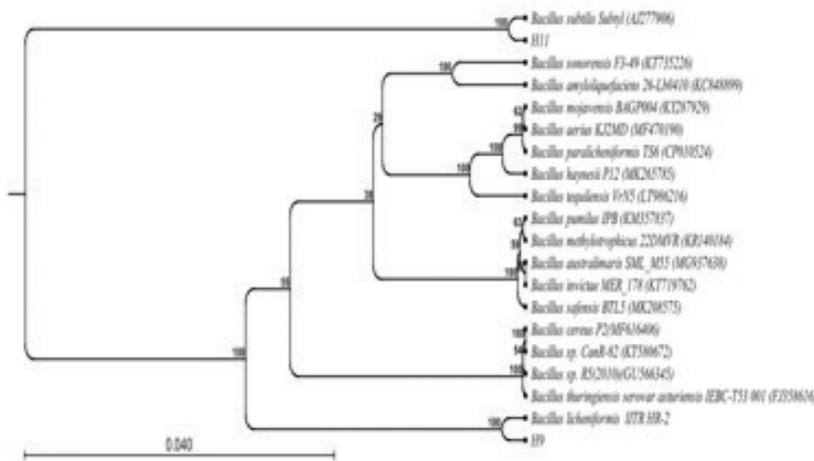
sinh hoá theo các phương pháp mô tả và thực hiện cho các chủng vi khuẩn *Bacillus* trong khóa phân loại Bergeys (1984) và so sánh đối chiếu trình tự gen 16sRNA (bảng 3, hình 10 và hình 11).

**Bảng 3. Đặc điểm sinh học của 2 chủng vi khuẩn H9 và H11**

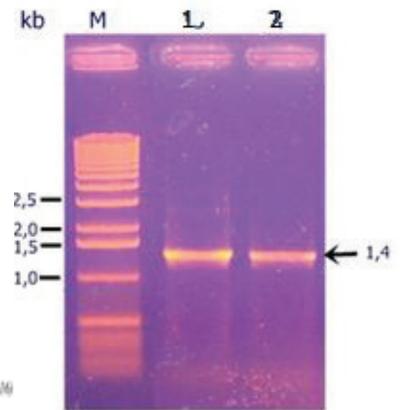
Đặc điểm	Đặc điểm sinh học của hai chủng vi khuẩn <i>Bacillus</i>	
	H11	H9
Khả năng phát triển	Tốt	Tốt
Hình dạng khuẩn lạc	Không tròn, lồi, nhẵn	Tròn, lồi
Mép khuẩn lạc	Răng cưa	Không răng cưa
Màu sắc khuẩn lạc	Trắng hơi nâu	Trắng sữa
Bề mặt khuẩn lạc	Khô	Ướt
Mặt dưới khuẩn lạc	Vàng nhạt	Vàng nhạt
Sắc tố tiết ra môi trường	Không	Không
Hình thái tế bào	Tế bào hình que, đơn và nhỏ	Tế bào hình que, nối lại thành sợi dài
Khả năng sinh bào tử	Bào tử hình bầu dục, gần tâm	Bào tử hình bầu dục, lệch tâm
Nhuộm Gram	+	+
Phản ứng catalase	+	+
Khả năng phát triển ở nồng độ NaCl (%)	≤ 5	≤ 5
Khả năng phát triển ở nhiệt độ (°C)	18-45	18-45
Khả năng đồng hoá nguồn hydrat cacbon		
D- xylose	+	±
D-arabinose	-	-
L-rhamnose	±	±
D-trehalose	+	+
D-lactose	+	+
D-manitol	+	+
Saccharose	+	+
D-galactose	+	±
Potassium gluconate	-	-
D-fructose	+	+
D-glucose	+	+



**Hình 10. Hình thái khuẩn lạc và tế bào của 2 chủng vi khuẩn *Bacillus***



**Hình 11. Mức độ tương đồng di truyền giữa chủng vi khuẩn H11 và H9 với một số chủng vi khuẩn *Bacillus* có họ hàng gần gũi**



**Hình 12. Điện di đồ sản phẩm PCR (Giếng M: Thang DNA chuẩn; Giếng 1: sản phẩm PCR từ DNA tổng số của chủng H9; giếng 2: sản phẩm PCR từ DNA tổng số của chủng H11)**

Căn cứ vào kết quả đối chiếu với cơ sở dữ liệu có trong khoá phân loại của Bergeys (1984) về các đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa (bảng 3), 2 chủng trên được xác định thuộc chi *Bacillus*. Kết quả phân loại dựa trên trình tự gen 16S rRNA sau khi đối chiếu với cơ sở dữ liệu GenBank cho thấy, chủng H11 có độ tương đồng cao với các chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* Subtyl (AJ277906)(100%) và chủng H9 có độ tương đồng cao với các chủng *Bacillus licheniformis* IITR HR (FJ447354)(100%)

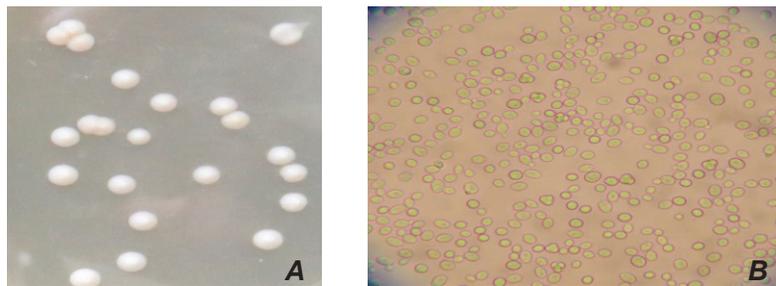
(hình 11). Kết hợp với các đặc điểm sinh học, đề tài đặt tên 2 chủng vi khuẩn *Bacillus* sử dụng trong nghiên cứu là *Bacillus licheniformis* H9 và *Bacillus subtilis* H11.

### 3.3.3. Chủng nấm men

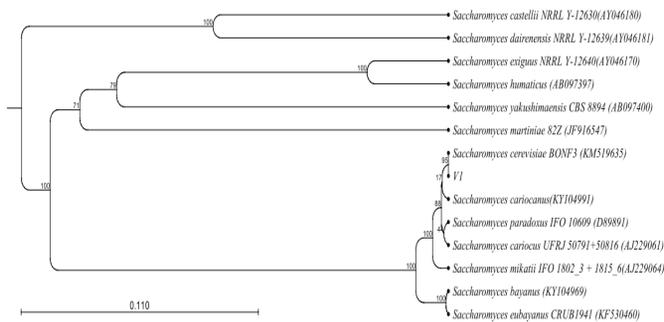
Tương tự như đối với vi khuẩn, việc phân loại các chủng nấm men được thực hiện theo các phương pháp có trong khóa phân loại Kurtzman, Fell (1998) và Barnett *et al.* (1990), kết quả thể hiện ở bảng 4 và hình 13.

**Bảng 4. Một số đặc điểm sinh học của chủng nấm men V1**

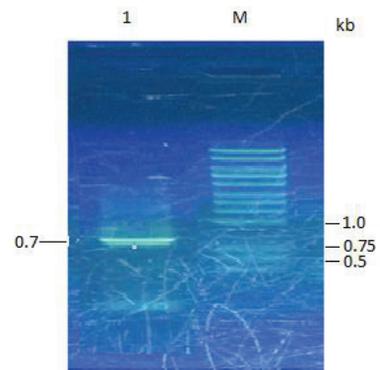
Đặc điểm	Chủng V1
Hình dạng tế bào	Hình trứng, elíp, nảy chồi 1 phía
Hình thái khuẩn lạc	Trắng sữa, tròn, nhẵn bóng, lồi
Khả năng đồng hoá nguồn cacbohydrat	
L-sorbose	-
D-xylose	-
D-arabinose	-
L-rhamnose	-
D-trehalose	+
D-lactose	-
Saccharose	+
D-cellobiose	-
D-raffinose	+
D-galactose	+
D-glucose	+



**Hình 13. Hình thái khuẩn lạc (A) và hình thái tế bào chủng nấm men V1 (x400) (B)**



**Hình 14. Mức độ tương đồng di truyền giữa chủng nấm men V1 với một số chủng nấm men có họ hàng gần gũi**



**Hình 15. Điện di đồ sản phẩm DNA tổng số và PCR sử dụng cặp mồi ITS1 và ITS4**

Khi phân loại phân tử dựa trên trình tự gen vùng 5,8S rRNA (hình 15), giải và phân tích trình tự nucleotit khi đối chiếu với cơ sở dữ liệu GenBank cho thấy, chủng V1 có độ tương đồng cao với các chủng nấm *Saccharomyces cerevisiae* IBONF3 (KM519635) (100%) (hình 14). Kết hợp với các đặc điểm sinh học đã nghiên cứu, chúng tôi đặt tên cho chủng nấm men V1 sử dụng trong nghiên cứu là *Saccharomyces cerevisiae* V1.

Các kết quả phân loại trên cho thấy các chủng được lựa chọn đều là những chủng vi sinh vật lành tính, không phải là các vi sinh vật gây bệnh và được sử dụng rất phổ biến để tạo ra các chế phẩm probiotic (Ohashi, Ushida, 2009).

#### IV. KẾT LUẬN

Từ các mẫu thu thập ở một số trang trại nuôi lợn tại huyện Gia Lâm, Hà Nội, đã phân lập được 31 chủng vi sinh vật, trong đó có 6 chủng nấm men. Đã tuyển chọn 5 chủng, ký hiệu AH3, AH4, H11, H9 và V1 để nghiên cứu một số đặc điểm sinh học, kết quả chúng thuộc nhóm ưa ẩm, sinh trưởng tốt ở pH thấp 2-5 và ở nồng độ muối mật 3% và có khả năng ức chế *E. coli*, *Salmonella* sp. Chủng H9 và H11 thuộc chi *Bacillus* có khả năng sinh ra một số enzyme ngoại bào mạnh như protease, amylase và cellulase; chủng AH3 và AH4 thuộc chi *Lactobacillus* sinh acid cao. Phân loại dựa trên trình tự gen 16S rRNA của 4 chủng vi khuẩn trên cho kết quả với mức độ tương đồng trình tự gen 16S rRNA cao (> 99%) thuộc loài *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus licheniformis* và *Bacillus subtilis*. Phân loại chủng nấm men V1 dựa trên trình tự gen 5,8S rRNA cho kết quả tương đồng cao (99%) với loài *Saccharomyces cerevisiae*. Cả 5 chủng đều thuộc nhóm vi sinh vật không gây bệnh cho người và vật nuôi, có thể được sử dụng làm vi sinh probiotic.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Barnett JA., Payne RW., Yarrow DY (1990), *Yeasts: Characteristics and identification*, Cambridge Univer. Press.
2. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1984), *Williams & Wilkins*:158-168.
3. Corcoran B, Stanton C, Fitzgerald G, Ross R (2005), Survival of probiotic lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars. *Appl Environ Microbiol* 71(6): 3060-3067.
4. Czerucka D, Rampal P (2002), Experimental effects of *Saccharomyces boulardii* on diarrheal pathogens. *Microbes and infection* 4:733-739.
5. Moore T, Globa L, Barbaree J, Vodyanoy V, Sorokulova I (2013), Antagonistic activity *Bacillus* bacteria against food borne pathogens. *Prob Health* 1:110.
6. Patil AK, Kumar S, Verma AK, Baghel RPS (2015), Probiotic as Feed additives in weaned pigs: A review. *Livestock Research International* 3 (2): 31-39
7. Sambrook J, Russell DW (2001), *Molecular cloning. A laboratory manual*, 3rd ed. Cold spring harbor laboratory press, Cold spring harbor, NewYork: 133-135.
8. Sanders ME, Klaenhammers TR (2001), The scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. *J Dairy Sci* 84: 319-321.
9. Ohashi Y, Ushida U (2009), Health-beneficial effects of probiotics: Its mode of action. *Animal Science J* 80: 361-371.

Ngày nhận 18-1-2019

Ngày phản biện 16-5-2019

Ngày đăng 1-7-2019