

PHÂN LẬP VI KHUẨN *BACILLUS* SPP. TỪ ĐẤT VÀ PHÂN GÀ TẠI TỈNH TRÀ VINH

Nguyễn Thị Đầu
Trường Đại học Trà Vinh

TÓM TẮT

Đề tài đã phân lập được 62 chủng vi khuẩn từ 35 mẫu đất và 35 mẫu phân gà thu thập tại các trại gà thuộc 2 huyện của tỉnh Trà Vinh. Các chủng vi khuẩn này được chọn lọc qua kiểm định sinh lý, sinh hóa với các chỉ tiêu như: âm tính với lecithinase, dương tính với catalase, amylase, cellulase, VP (Voges - Proskauer), và chịu nhiệt cao (phát triển được ở 50°C); kết quả phân tích cho thấy đã chọn ra được 7 chủng vi khuẩn đạt tiêu chuẩn về probiotic.

Kết quả giải trình tự gen 16S rRNA (sử dụng phần mềm BLAST so sánh trình tự gen trên cơ sở dữ liệu NCBI) cho thấy cả 2 chủng P6.N và chủng P21.N đều có tỷ lệ tương đồng nucleotide 100% lần lượt với loài *Bacillus coagulans* và *Bacillus subtilis*.

Từ khóa: *B. subtilis*, gà, phân lập, định danh, probiotic.

***Bacillus* spp. isolation from soil and chicken feces in Tra Vinh province**

Nguyen Thi Dau

SUMMARY

From 35 soil samples and 35 fecal samples of chicken farms collecting at 2 districts in Tra Vinh province, 62 *Bacillus* spp. bacteria strains were isolated. These isolates were analyzed further for *Bacillus* spp. characteristics by physio-biological tests with the following criteria: negative with lecithinase, positive with catalase, amylase, cellulose, VP (Voges-Proskauer) and temperature tolerance (being able to grow at 50°C). The studied results showed that there were 7 isolates met the standards of probiotic criteria.

The result of sequencing 16S rRNA (using BLAST alignment with the known sequences on the NCBI GenBank) indicated that nucleotic similarity level of P6.N and P21.N strains compared to those of *Bacillus coagulans* and *Bacillus subtilis* was 100%, respectively.

Keywords: *B. subtilis*, chicken, isolation, identification, probiotic.

I. MỞ ĐẦU

Sự phát triển mạnh mẽ của ngành chăn nuôi gà trong những thập niên gần đây đã mang lại lợi ích kinh tế to lớn nhưng cũng làm nảy sinh nhiều vấn đề cần được quan tâm xem xét. Việc sử dụng kháng sinh phòng bệnh, chất kích thích tăng trưởng đã làm gia tăng các chủng vi khuẩn kháng thuốc tự nhiên, làm giảm hiệu quả sử dụng kháng sinh trong điều trị các bệnh nhiễm khuẩn ở người (Lê Thị Hải Yến, 2018). Để hạn chế sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi, các nhà khoa

học đã tìm ra nhiều giải pháp khác nhau trong đó có giải pháp sử dụng probiotic - là những vi sinh vật còn sống khi đưa vào cơ thể một lượng đầy đủ sẽ có lợi cho sức khỏe của ký chủ (WHO/FAO, 2001). Các chủng vi sinh vật sử dụng làm probiotic chủ yếu là các chủng vi khuẩn thuộc các chi *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* và *Bacillus*. Khả năng sinh bào tử là ưu thế vượt trội của các loài *Bacillus*, bào tử chịu nhiệt trong quá trình sấy khô của probiotic. Ngoài ra các loài *Bacillus*, đặc biệt là *B. subtilis* còn có khả

năng tiết ra nhiều loại enzyme tiêu hóa giúp cải thiện khả năng hấp thụ thức ăn của vật chủ cũng như khả năng ức chế các vi khuẩn gây bệnh cho vật chủ (Westers *et al.*, 2004; Stein, 2005).

Bacillus subtilis là một vi khuẩn rất phổ biến trong tự nhiên, đa số cư trú trên cơ thể động vật, trong đất, rơm rạ và cỏ khô được gọi là “trực khuẩn cỏ khô” (Euzéby, 1997), hầu như không có độc tính trên người cũng như nhiều loài động vật và có sức đề kháng cao với nhiều tác nhân vật lý và hóa học (Lê Thị Hải Yến, 2018). *Bacillus subtilis* có thể sản xuất thành các sản phẩm thương mại ứng dụng trong y học, nông nghiệp và trong công nghiệp thực phẩm (Trịnh Thành Trung và cs., 2013). Đây cũng chính là một trong những giải pháp thay thế kháng sinh phòng bệnh, cải thiện năng suất vật nuôi và đóng góp vào quy trình chăn nuôi theo hướng an toàn sinh học.

Đề tài “Phân lập vi khuẩn *Bacillus* spp. từ đất và phân gà tại tỉnh Trà Vinh” nhằm chọn lọc những chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. sử dụng trong phòng bệnh đường tiêu hóa trên gà.

II. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung

- Phân lập *Bacillus* spp. bằng phương pháp truyền thống

- Định danh *Bacillus* spp. bằng kỹ thuật giải trình tự gen 16S rRNA.

2.2. Vật liệu

Mẫu được lấy tại 2 huyện Càng Long và Châu Thành của tỉnh Trà Vinh, với tổng số là 70 mẫu (trong đó có 35 mẫu đất và 35 mẫu phân gà tại 35 trại nuôi gà với quy mô trên 100 con, gà đạt tối thiểu 2 tháng tuổi).

Mẫu đưa về phòng thí nghiệm trong 12 giờ, sau đó thực hiện các bước phân lập, thử các đặc tính sinh hóa.

2.3. Dụng cụ, thiết bị

Nồi khử trùng nhiệt ướt Pbi – international, tủ cấy vi sinh vật, tủ ủ vi sinh vật Binder, máy lắc mẫu

Ika, máy quang phổ Spectroquant® Pharo 100.

Hóa chất: dung dịch chuẩn pH, acid clohydric (HCl 1%), glycerol, đệm PBS (Phosphate buffered saline), bile salt (Bio Basic Canada - BB0225), LB (Lauryl Tryptose Broth - Himedia), PCA (Plate Count Agar) theo TCVN 8736:2011 dùng để phân vi khuẩn *Bacillus*.

Môi xuôi 27F: 5’-AGAGTTTGATC MTG-GCTCAG-3’

Môi ngược 1492R: 5’-TACGGYTACCTT-GT TACGA CT T-3’

(Công ty Sigma-Aldrich)

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Lấy mẫu

Mẫu đất (30-50gram): Dùng muỗng gạt bỏ lớp đất mặt, lấy đất ở độ sâu từ 4-5 cm. Mẫu gộp được lấy từ 4 vị trí ở 4 góc cạnh chuồng gà.

Mẫu phân (30-50gram): Lấy phân tươi mới trên nền chuồng được lót thảm nhựa để thu phân tránh cho phân không lẫn chất độn chuồng. Mẫu gộp được lấy từ 4 vị trí ở 4 góc của 1 trại gà.

2.4.2. Số lượng mẫu

Chọn mẫu ngẫu nhiên, tổng cộng có 70 mẫu (35 mẫu đất + 35 mẫu phân) tại 2 huyện Châu Thành (CT1, CT2) và Càng Long.

Bảng 1. Phân bố địa điểm lấy mẫu

Địa điểm lấy mẫu	Mẫu đất	Mẫu phân
Càng Long	10	10
Châu Thành (CT1)	5	5
Châu Thành (CT2)	20	20
Tổng cộng	35	35

2.4.3. Phân lập *Bacillus* spp. bằng phương pháp truyền thống

Chuẩn bị mẫu

Được thực hiện theo phương pháp của Eman *et al.* (2013): cân 10g mẫu cho vào bình tam giác có chứa 90 ml môi trường đệm PBS và lắc đều, được nồng độ pha loãng 10^{-1} , đem đun cách

thủy gia nhiệt ở 80°C/20-25 phút để loại bỏ tế bào sinh dưỡng chỉ giữ lại những chủng có sinh bào tử để làm thuần *Bacillus*.

Phân lập vi khuẩn

Theo hướng dẫn thực hành kỹ thuật xét nghiệm vi sinh lâm sàng (2017) của Bộ Y tế, TCVN 8136:2011, TCVN 8736:2011.

Thử các phản ứng sinh hóa theo Cowan và

Steel (2004), Standard for Microbiology (2015).

2.4.4. Định danh *Bacillus spp.* bằng kỹ thuật giải trình tự gen 16S rRNA

Sau khi kiểm tra 6 đặc tính probiotic, chọn ra các chủng vi khuẩn *Bacillus spp.* đáp ứng tốt đặc tính probiotic và giải trình tự gen 16S rRNA.

Sử dụng cặp môi 27F/1492R để khuếch đại gen 16S rRNA, sau đó đem gửi giải trình tự.

Bảng 2. Thành phần của phản ứng PCR

Thành phần	Nồng độ gốc	Nồng độ/phản ứng	Thể tích/phản ứng (µl)
EZ PCR Mix			1 tube
DEPC water			41
PCR Buffer	10X	1X	5
Môi (27F/1492R)	5 µM	0,2 µM	2
DNA ly trích			2
Tổng thể tích			50

Nguồn: Công ty TNHH DV & TM Nam Khoa

Bảng 3. Chu kỳ nhiệt của phản ứng PCR

Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Chu kỳ
95	5 phút	1
95	30 giây	
58	30 giây	35
72	1 phút 45 giây	
72	5 phút	1
25	2 phút	1

Nguồn: Công ty TNHH DV & TM Nam Khoa

Kết quả được kiểm tra trên gel agarose 2%, hiệu điện thế 90V trong 50 phút. DL2000 (2000bp-1000bp-750bp-500bp-250bp-100bp).

2.4.5. Xử lý số liệu

Dùng phần mềm Minitab 16.0 và Excel 2010 để xử lý số liệu thu được, phần mềm Blast so sánh trình tự gen trên cơ sở dữ liệu NCBI.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập vi khuẩn *Bacillus spp.* bằng phương pháp truyền thống

3.1.1. Kết quả phân lập vi khuẩn *Bacillus spp.* dựa vào đặc điểm hình thái

Từ 70 mẫu (đất, phân) lấy ở 2 huyện Càng Long (CL) và Châu Thành (CT1, CT2), số dòng vi khuẩn *Bacillus spp.* phân lập được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Số dòng vi khuẩn được phân lập tại Càng Long và Châu Thành

Địa điểm	Số lượng	Số lượng dòng vi khuẩn phân lập được	Tỷ lệ (%)
Châu Thành (CT1)	10	10	100
Châu Thành (CT2)	40	35	95
Càng Long (CL)	20	17	85
Tổng cộng	70	62	88,57

Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và hình thái tế bào quan sát dưới kính hiển vi của 62 dòng vi khuẩn được trình bày ở bảng 5.

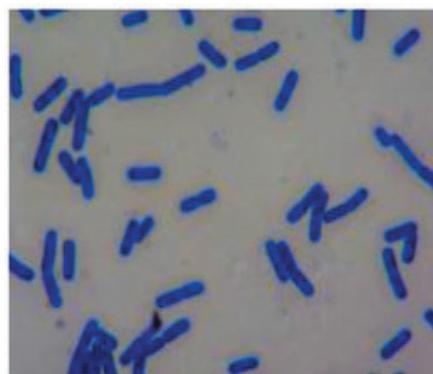
Bảng 5. Đặc điểm khuẩn lạc, hình thái tế bào của 62 dòng vi khuẩn

Đặc điểm	Thể loại	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Màu sắc khuẩn lạc	Trắng đục	39	62,90
	Trắng kem	11	17,74
	Vàng nhạt	2	3,23
	Vàng	4	6,45
	Cam	6	9,68
Hình dạng khuẩn lạc	Bất định, lồi, nhô cao, khô	5	8,06
	Bất định, lồi, nhô cao, ướt	13	20,97
	Bất định, phẳng, khô	5	8,06
	Bất định, phẳng, ướt	2	3,23
	Tròn, lồi, nhô cao, ướt	31	50,00
	Tròn, lồi, nhô cao, khô	4	6,45
	Tròn, phẳng, khô	2	3,23
Đường kính khuẩn lạc	1-3mm	33	53,23
	3-5mm	29	46,77
Hình dạng tế bào	Que, hai đầu bầu	43	69,35
	Que, hai đầu vuông	19	30,65

Theo UK Standards for Microbiology (2015), *Bacillus* có hơn 268 loài nên việc xác định bằng phương pháp truyền thống phức tạp và mất nhiều thời gian. Khuẩn lạc *B. subtilis* có màu trắng đục, khô, ria bất định, kích thước tế bào lớn hơn 3µm (David *et al.*, 2016).

Theo bảng 5 có 62,9% khuẩn lạc có màu trắng đục; đây là đặc điểm đặc trưng để bước đầu xác

định vi khuẩn *B. subtilis*. Bên cạnh đó, kết quả ghi nhận hình thái tế bào quan sát dưới kính hiển vi có nhiều điểm tương đồng với *B. subtilis*. Các khuẩn lạc của 62 chủng được tách dòng bằng phương pháp cấy ria trên môi trường NA (Nutrient agar) ở 37°C/24h sau đó cấy qua ống eppendorf chứa môi trường lỏng NB (nutrient broth) có bổ sung 16% glycerol, tiếp tục ủ tăng sinh ở 37°C/24h, sau đó giữ giống trong tủ âm 80°C.



Hình 1. Khuẩn lạc và hình thái vi khuẩn *Bacillus* spp. độ phóng đại 1000X

3.1.2. Kết quả định danh bằng các phản ứng sinh hóa

Từ 62 chủng, tiến hành kiểm tra các chỉ

tiêu sinh hóa: di động, lecithinase, catalase, VP (Voges-Proskauer), amylase và khả năng phát triển ở 50°C (Cowan và Steel, 2004).

Bảng 6. Kết quả sàng lọc vi khuẩn bằng các test sinh hóa

Chỉ tiêu	Số lượng	Dương tính	Âm tính
Di động	62	44	18
Lecithinase	44	17	27
Catalase	27	27	0
VP	27	15	12
Amylase	15	7	8
Phát triển ở 50°C	7	7	0

Test khả năng di động nhằm loại bỏ các chủng gây độc như *B. anthracis* và *B. mycoides*.

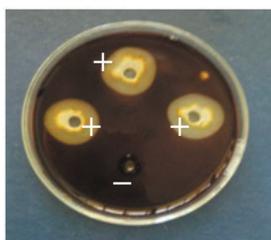
Trong 62 chủng có 44 chủng có khả năng di động làm đục môi trường môi cấy (hình 2).



Khả năng di động



Khả năng phát triển ở 50°C



Amylase

(+) Mất màu thuốc thử *glugol*
(-) Âm tính đối chứng

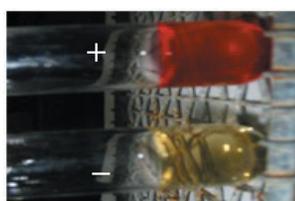


Lecithinase

(+) Môi trường màu hồng
(-) Môi trường không đổi màu



Catalase (+)



VP (+)

Hình 2. Kết quả các phản ứng sinh hóa

Kiểm tra lecithinase nhằm loại bỏ các loài *Bacillus* gây độc. Kết quả trong 44 chủng có 17 chủng dương tính (loại bỏ) và 27 chủng âm tính tiếp tục kiểm tra các chỉ tiêu tiếp theo.

Có 27 chủng cho kết quả dương tính catalase, chúng tỏ chúng có khả năng phát triển trong điều kiện hiếu khí, phản ứng này giúp nhận diện vi khuẩn *Bacillus*.

Phản ứng VP (Voges – Proskauer) dương tính (môi trường chuyển màu đỏ hồng) xác định khả năng lên men đường của vi khuẩn, có 15/27 chủng dương tính.

Phản ứng amylase dương tính, *Bacillus* sinh tinh bột làm mất màu thuốc thử lugol, có 7/15 chủng phản ứng dương tính.

Bacillus có bào tử sẽ chịu nhiệt cao hơn tế bào sinh dưỡng, khả năng này giúp vi khuẩn tồn tại ở những điều kiện khắc nghiệt của môi trường. *Bacillus subtilis* đã được ghi nhận có khả năng phát triển ở 50°C (Cowan và Steel, 2004). Kết quả nuôi cấy có 7/7 chủng có khả năng phát triển ở 50°C.

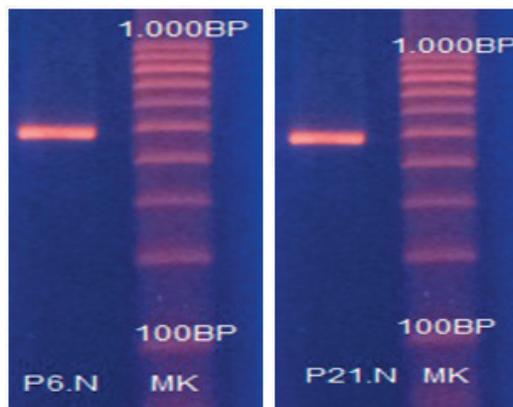
Có 7 chủng *Bacillus* spp. (46,6%) gồm P5.N, P6.N, P18.N, P21.N, Đ3.N, Đ8.N, Đ28.N đạt yêu cầu phản ứng sinh hóa của *Bacillus* spp., trong đó chủng P6.N và P21.N đạt 100% các tiêu chí về probiotic.

Điều đó cho thấy *Bacillus* tạo ra các bào tử có thể tồn tại trong một thời gian dài và chịu được các điều kiện nhiệt độ khắc nghiệt. *B. subtilis* thường được tìm thấy ở rơm, rạ và lớp trên cùng của đất cũng như trong ruột của nhiều loài gia súc, gia cầm. Một nghiên cứu năm 2009 đã cho biết mật độ của quần thể này ở đất là khoảng 10⁶/gram; còn trong phân động vật là khoảng 10⁴/gram (Hong Ha *et al.*, 2009).

3.2. Định danh bằng phương pháp giải trình tự gen 16S rRNA

Để nhận diện chính xác các chủng vi khuẩn đã được phân lập và chọn lọc lại với các đặc tính của probiotic, 2 chủng vi khuẩn chọn lọc sau cùng là P6.N và P21.N được ly trích DNA theo phương pháp của Bai *et al.* (2012) và sử dụng cặp mồi 27F/1492R (Saminathan và Narayanan, 2015) để khuếch đại vùng 16S rRNA của vi khuẩn.

Kết quả khuếch đại gen kiểm tra trên gel agarose 2% được trình bày ở hình 3.



Hình 3. Kết quả thực hiện điện di sản phẩm PCR của 2 chủng P6.N và P21.N

Giải trình tự nucleotide gen 16S rRNA là kỹ thuật sinh học phân tử được ứng dụng phổ biến để xác định các loài vi sinh vật (Patel, 2001). Để xác định danh pháp đến mức loài, các chủng vi khuẩn sau khi thực hiện phản ứng PCR sẽ tiến hành giải trình tự nucleotide ở đoạn gen 16S rRNA. Trình tự nucleotide của 2 chủng P6.N và P21.N được chọn sau khi giải mã tiến hành so sánh với các loài vi khuẩn được lưu trữ từ ngân hàng dữ liệu gen của NCBI. Kết quả được trình bày ở bảng 7.

Bảng 7. Kết quả định danh bằng phương pháp giải trình tự gen 16S rRN

Ký hiệu chủng	Loài vi khuẩn từ ngân hàng dữ liệu gen của NCBI	Mã số lưu trữ trong ngân hàng dữ liệu	Mức độ tương đồng - ID (%)	Tỷ lệ nucleotide tương đồng
P6.N	<i>Bacillus coagulans</i>	CP033687	100	461/461
P21.N	<i>Bacillus subtilis</i>	MT448935	100	499/499

IV. KẾT LUẬN

Trong tổng số 70 mẫu đất và phân gà tại các trại chăn nuôi thuộc tỉnh Trà Vinh, đã phân lập được 7 chủng vi khuẩn *Bacillus* gồm: P5.N, P6.N, P18.N, P21.N, Đ3.M, Đ8.M, Đ28.M

Chủng P6.N và P21.N đáp ứng cao nhất về các đặc tính probiotic.

Kết quả giải trình tự gen 16S rRNA: chủng P6.N có tỷ lệ nucleotide tương đồng 100% với *Bacillus coagulans*; chủng P21.N có tỷ lệ nucleotide tương đồng 100% với *Bacillus subtilis*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bai, S., M. R. Kumar, D. M. Kumar, P. Balashanmugam, M. B. Kumaran and P. Kalaichelvan, 2012. Cellulase production by *Bacillus subtilis* isolated from cow dung. *Arch Appl Sci Res*, 4 (1): 269-279.
- Cowan S. T. and K. J. Steel, 2004. Cowan & Steel's manual for the identification of medical bacteria: *Cambridge university press*.
- David, O., J. Olagunju, A. Adebayo, T. Oluwaniyi & M. Olajide, 2016. Probiotic Properties & antibiotic resistance pattern of *Bacillus* spp. *Isolated from Two Types of Fermented Locust Bean (iru)*.
- Euzé by, J. P., 1997. List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology*, 47 (2): 590-592.
- Hong HA, Khaneja R, Tam NM, Cazzato A, Tan S, Urdaci M, Brisson A, Gasbarrini A, Barnes I, Cutting S, 2009. *Bacillus subtilis* isolated from the human gastrointestinal tract. *Research in Microbiology*. 160 (2):134-43
- Lê Thị Hải Yến, 2018. Tuyển chọn chủng *Bacillus subtilis* ứng dụng trong phòng trị bệnh đường tiêu hóa trên gà. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ* số 2, trang 26-32.
- Lê Thị Hải Yến và Nguyễn Đức Hiền, 2016. Khảo sát đặc tính probiotic các chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* phân lập tại các tỉnh đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. Số chuyên đề: Nông nghiệp (Tập 2): 26-32.
- Patel, J. B., 2001. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Molecular diagnosis*, 6 (4): 313-321.
- Trịnh Thành Trung, Phan Lạc Dũng, Trần Thị Lệ Quyên, Dương Văn Hợp, Đào Thị Lương, 2013. Đặc điểm sinh học và tiềm năng ứng dụng của chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* sp 1901 phân lập tại Rừng Quốc gia Hoàng Liên. *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN, KHTN và Công nghệ*, Tập 29, Số 3 (2013) 59-70.
- FAO/WHO, 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. *London, Ontario: Food & Agriculture Organization of United Nations & World Health Organization Working Group Report*.
- Saminathan, D. & J. S. Narayanan, 2015. Isolation & classical identification of potent extracellular alkaline protease producing alkalophilic *Bacillus* spp. from coastal regions of Tamil Nadu. *African Journal of Microbiology Research*, 9 (12): 847-854.
- Westers L, Westers H, Quax W, 2004. *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. *BBA Mol Cell Res* 1694(1): 299-310.
- TCVN 8136:2011, Thuốc thú y – Phương pháp định lượng tổng số bào tử *Bacillus*

Ngày nhận 27-3-2021

Ngày phản biện 29-4-2021

Ngày đăng 1-9-2021