

Phân lập, tuyển chọn và đánh giá đặc tính các chủng *Bacillus* tiềm năng ứng dụng cho chế phẩm probiotic

Đào Gia Bách¹, Đoàn Thị Thùy Linh², Lưu Thị Thủy Ngân², Lê Thị Hội^{1*}

¹Trường Đại học Y Hà Nội, 1 Tôn Thất Tùng, phường Trung Tự, quận Đống Đa, Hà Nội, Việt Nam

²Công ty Cổ phần Kỹ nguyên Công nghệ Eramic, xã Ngọc Hòa, huyện Chương Mỹ, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 28/2/2024; ngày chuyển phân biện 1/3/2024; ngày nhận phân biện 12/3/2024; ngày chấp nhận đăng 15/3/2024

Tóm tắt:

Trong ống tiêu hóa của người có thường trú một hệ vi sinh vật với số lượng rất lớn, trong đó có hơn 400 loài vi khuẩn khác nhau. Probiotic được định nghĩa là các vi khuẩn sống khi đưa vào cơ thể với số lượng đủ sẽ sinh ra các hiệu quả có lợi cho sức khỏe; các chế phẩm probiotic (thường được gọi là men tiêu hóa) không phải là thuốc, mà được xếp vào nhóm chất bổ sung dinh dưỡng. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm khảo sát các đặc tính probiotic của 2 chủng vi khuẩn *Bacillus* phân lập từ mẫu phân của người khỏe mạnh, không sử dụng kháng sinh hay các chế phẩm probiotic trong vòng ít nhất 1 tháng. Các đặc tính cơ bản được khảo sát bao gồm khả năng gây tan máu của vi khuẩn, khả năng chịu axit dạ dày và muối mật, mức độ nhạy cảm với kháng sinh. Kết quả, trong tổng số 72 chủng phân lập được, chọn ra được 2 chủng *Bacillus* tiềm năng không gây tan máu, có khả năng sống sót và tồn tại trong môi trường khắc nghiệt của hệ tiêu hóa, nhạy cảm với các loại kháng sinh được sử dụng phổ biến cho người. Từ đó, bước đầu đánh giá được độ an toàn và tiềm năng ứng dụng của 2 chủng *Bacillus* này vào các chế phẩm probiotic.

Từ khóa: *Bacillus clausii*, *Bacillus subtilis*, kháng sinh, muối mật, pH, probiotic.

Chỉ số phân loại: 3.5

1. Đặt vấn đề

Các loài *Bacillus* được tìm thấy ở khắp mọi nơi, chúng có hình que (trực khuẩn), bắt màu gram dương, thuộc dạng hiếu khí, sinh catalase, có khả năng di động và tạo bào tử gần như hình cầu để tồn tại trong trạng thái “ngủ đông” giúp chúng sống trong điều kiện môi trường không thuận lợi. Chúng được tìm thấy ở trong đất, các nguyên liệu thực vật như cỏ, rơm, các sản phẩm lên men và đặc biệt là trong đường ruột của các loài động vật và con người. Các nghiên cứu cho thấy, vi khuẩn *Bacillus* là một trong những lợi khuẩn có khả năng tổng hợp nhiều loại enzyme tiêu hóa hỗ trợ hiệu quả trong việc hấp thu thức ăn ở người. Lợi khuẩn *Bacillus* còn tiết ra các enzyme giúp tiêu hóa những phần thức ăn khó tiêu hóa, nhằm khai thác triệt để nguồn dinh dưỡng có trong thức ăn. Không những thế, triển vọng từ các chế phẩm probiotic còn giúp phòng và điều trị bệnh nhằm thay thế cho một số loại thuốc kháng sinh, giải quyết các vấn đề mà kháng sinh không thể khắc phục được. Chính vì vậy, việc sử dụng các loài *Bacillus* làm chế phẩm sinh học probiotic đang được quan tâm đáng kể nhờ tiềm năng cải thiện sức khỏe, cân bằng hệ vi sinh vật đường ruột, tăng cường miễn dịch, nâng cao hiệu quả sử dụng thức ăn, hỗ trợ điều trị các bệnh lý liên quan đến hệ tiêu hóa.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Mẫu phân được thu thập từ người khỏe mạnh, không sử dụng kháng sinh và các chế phẩm probiotic trong vòng ít

nhất 1 tháng. Mẫu phân được gửi về phòng thí nghiệm ngay trong ngày.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tiêu chuẩn lựa chọn

Người cho mẫu là người khỏe mạnh, không mắc các bệnh đường tiêu hóa, không sử dụng bất kỳ loại kháng sinh hay các chế phẩm probiotic trong vòng tối thiểu 1 tháng. Mẫu phân sau khi được lấy sẽ chuyển về phòng thí nghiệm trong vòng 2 giờ ở điều kiện nhiệt độ thường hoặc phải được bảo quản ở 4-8°C trong vòng 12 giờ.

2.2.2. Nuôi cấy, phân lập vi khuẩn

Chuẩn bị: Chuẩn bị dãy 3 ống Eppendorf có chứa 900 µl đệm PBS 1x vô trùng được đánh dấu thứ tự 1, 2 và 3. Môi trường LB: Peptone 10 g/l, pH 7,5.

Quy trình phân lập: Lấy một lượng phân khoảng bằng hạt đỗ cho vào ống 1, vortex đều mẫu. Ủ ống 1 trong bể ôn nhiệt ở 80°C trong 30 phút. Hút 100 µl mẫu từ ống 1 sang ống 2, vortex đều. Tiếp tục hút 100 µl mẫu từ ống 2 sang ống 3, vortex đều. Hút 100 µl mẫu trong ống 3 trải lên đĩa môi trường LB, đậy kín và ủ ở 37°C trong 24-48 giờ. Sau 24-48 giờ, quan sát và chọn các khuẩn lạc có hình thái điển hình của vi khuẩn *Bacillus clausii* và *Bacillus subtilis* để tiến hành cấy chuyển sang đĩa môi trường LB khác. Quá trình cấy chuyển được lặp lại cho đến khi trên đĩa thạch chỉ xuất hiện một loại vi khuẩn thuần nhất.

*Tác giả liên hệ: Email: lethihoi@hmu.edu.vn

Isolation, selection, and evaluation of characteristics of potential *Bacillus* strains for probiotic products

Gia Bach Dao¹, Thi Thuy Linh Doan²,
Thi Thuy Ngan Luu², Thi Hoi Le^{1*}

¹Hanoi Medical University, 1 Ton That Tung Street,
Trung Tu Ward, Dong Da District, Hanoi, Vietnam

²Eramic Technology JSC,

Ngoc Hoa Commune, Chuong My District, Hanoi, Vietnam

Received 28 February 2024; revised 12 March 2024; accepted 15 March 2024

Abstract:

In the human digestive tract, there resides a very large number of microorganisms, including more than 400 different species of bacteria. Probiotics are defined as live bacteria that when introduced into the body in sufficient quantities will produce beneficial health effects. Probiotics (commonly known as digestive enzymes) are not drugs but are classified as nutritional supplements. In this study, we aim to investigate the probiotic properties of 2 strains of *Bacillus* bacteria isolated from fecal samples of healthy people, without the use of antibiotics or probiotic products for at least 1 month. The basic properties investigated include the hemolytic ability of bacteria, tolerance to artificial gastric acid and bile salt, and sensitivity to antibiotics. Out of a total of 72 isolates, 2 potential *Bacillus* strains were selected that did not cause hemolysis, were able to survive and survive in the harsh environment of the digestive system, and were sensitive to antibiotics commonly used for humans. On that basis, we initially evaluated the safety and potential application of these 2 strains to probiotic products.

Keywords: antibiotic, *Bacillus clausii*, *Bacillus subtilis*, bile salt, pH, probiotic.

Classification number: 3.5

Lưu giữ chủng vi khuẩn vừa phân lập được trong ống Eppendorf có chứa 1 ml glycerol 20%, bảo quản trong tủ -30°C.

2.2.3. Định danh vi khuẩn: Quan sát, nhận định hình thái khuẩn lạc điển hình. Nhuộm gram. Thử nghiệm catalase và oxidase. Định danh trên hệ thống định danh vi sinh vật MALDI-TOF.

2.2.4. Đánh giá khả năng tan máu: Thử nghiệm tan máu của các chủng *Bacillus* được xác định bằng cách sử dụng môi trường thạch Columbia chứa 5-7% máu cừu. Sau 24 giờ, ủ ở 37°C, hoạt tính tan máu của các chủng được

đánh giá và phân loại dựa trên sự ly giải hồng cầu trong môi trường xung quanh khuẩn lạc. Tan máu alpha (α), beta (β) và gamma (γ) xuất hiện dưới dạng màu xanh lục, trong và không có vùng rõ ràng xung quanh các khuẩn lạc tương ứng. Chủng *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 được sử dụng để làm đối chứng dương [1]. Các chủng tan máu γ được coi là an toàn.

2.2.5. Đánh giá khả năng chịu axit dạ dày và muối mật: Khả năng chịu axit dạ dày và muối mật được tiến hành theo GRAS Notice [2]. Theo đó, sẽ tiến hành tạo ra huyền phù vi khuẩn bằng cách hòa một khuẩn lạc tươi (dưới 24 giờ nuôi cấy) từ đĩa thạch DSM vào 2 ml canh thang LB vô trùng trong ống nghiệm và ủ 37°C trong 6 giờ. Sau đó, chuyển 200 μ l huyền phù đó vào ống nghiệm mới chứa 2 ml nước dùng DSM (để tạo bào tử), ủ qua đêm ở 37°C trong máy lắc. Ngày hôm sau, mẫu cấy được kiểm tra dưới kính hiển vi quang học để tìm sự hiện diện của bào tử. Sau đó, môi trường nuôi cấy được làm nóng trước ở 65°C trong 45 phút để tiêu diệt tất cả các tế bào sinh dưỡng. Môi trường nuôi cấy được làm nóng trước rồi pha loãng theo thứ tự và đặt lên các đĩa thạch DSM thành 2 bản sao để tiếp cận được gần nhất với số lượng bào tử ban đầu. Sau đó, cho chúng vào trong các dung dịch thử nghiệm trong 3 giờ: Nước muối 0,2% (2 mg NaCl/ml d H₂O); nước muối 0,3% (3 mg NaCl/ml d H₂O); muối mật 0,2% (1 mg NaClO₃ + 1 mg C₂₄H₃₉NaO₄/ml nước muối 0,2%); muối mật 0,3% (1 mg NaClO₃ + 1 mg C₂₄H₃₉NaO₄/ml nước muối 0,3%); dịch ruột mô phỏng (1 mg pancreatin/ml nước muối 0,2%); dịch dạ dày mô phỏng (3,5 mg pepsin/ml nước muối 0,2%); pH được điều chỉnh về 2, 3 và 4 sử dụng HCl đậm đặc.

Chỉ tiêu theo dõi là tỷ lệ sống tương đối được tính toán là tỷ lệ phần trăm của bào tử sau khi phát triển so với ban đầu theo công thức sau:

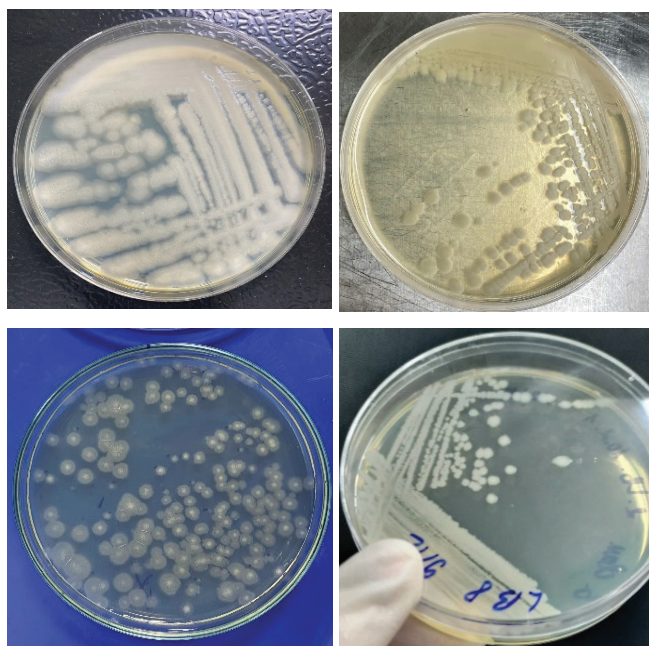
$$\text{Tỷ lệ sống (\%)} = \frac{\text{số lượng bào tử sau khi phát triển}}{\text{số lượng bào tử ban đầu}} \times 100\%$$

2.2.6. Đánh giá mức độ nhạy cảm với kháng sinh: Độ nhạy cảm của các chủng *Bacillus* được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán đĩa Kirby Bauer theo hướng dẫn của GRAS Notice đối chiếu dựa trên tiêu chuẩn CLSI 2021 (Clinical Laboratory Standards Institute) [3]. 11 loại kháng sinh được thử nghiệm là Ampicilin sulbactam 20 μ g, Gentamycine 10 μ g, Clindamycine 2 μ g, Chloramphenicol 30 μ g, Erythromycine 15 μ g, Rifampicine 5 μ g, Vancomycin 30 μ g, Tetracycline 30 μ g, Linezolid 30 μ g, Trimethoprin 25 μ g, Xiprofloxacin. Kết quả được đọc bằng thước kẻ có chia vạch đến milimet hoặc thước kẹp đo đường kính vùng ức chế hoàn toàn (bao gồm cả đường kính khoanh giấy) tính theo milimet. Đường kính vùng ức chế tỷ lệ thuận với mức độ nhạy cảm của vi khuẩn.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Nuôi cấy và phân lập các chủng vi khuẩn

Trên môi trường LB, từ 50 mẫu phân của người khoẻ mạnh đã phân lập được 72 chủng vi khuẩn có đặc điểm hình thái khuẩn lạc giống với vi khuẩn *Bacillus* như: khuẩn lạc màu trắng đục, dạng hình tròn, rìa răng cưa không đều (hình 1).



Hình 1. Các dạng khuẩn lạc đặc trưng trên môi trường LB.

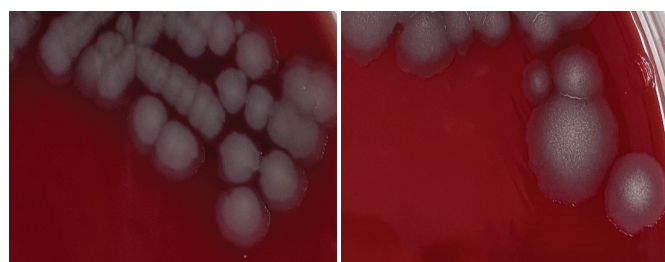
Từ 72 chủng có dạng đặc trưng của vi khuẩn *Bacillus*, tiến hành một số thử nghiệm để sàng lọc thông qua các đặc điểm của *Bacillus* như tế bào hình que, sinh bào tử, gram dương, catalase dương tính, oxidase dương tính và có khả năng di động, đã chọn được 59 chủng. Tiếp tục tiến hành định danh trên hệ thống MALDI-TOF, kết quả thu được có 7 chủng *Bacillus subtilis*, 1 chủng *Bacillus clausii* và còn lại là các chủng *Bacillus* khác trong 59 chủng (bảng 1).

Bảng 1. Kết quả định danh MALDI-TOF.

Loài	Số lượng
<i>Bacillus subtilis</i>	7
<i>Bacillus clausii</i>	1
<i>Bacillus flexus</i>	5
<i>Bacillus licheniformis</i>	11
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	6
<i>Bacillus megaterium</i>	2
<i>Bacillus pumilus</i>	3
<i>Bacillus sibiricus</i>	1
<i>Bacillus cereus</i>	23

3.2. Khả năng tan máu

Biểu hiện của hoạt động tan máu được coi là yếu tố độc lực và được bao gồm một trong các thử nghiệm đánh giá mức độ an toàn cơ bản để sàng lọc một chủng trước khi tiến hành khảo sát các đặc tính probiotic khác. Dựa theo EFSA (European Food Safety Authority) [4, 5], thử nghiệm tan máu được khuyến cáo bắt buộc để đảm bảo rằng chủng vi khuẩn không có khả năng gây độc ngay cả khi chúng được công nhận GRAS (Generally Recognized as Safe) hay QPS (Qualified Presumption of Safety) [6]. Các chủng cho thấy hoạt động gây tan máu có thể được coi là không an toàn cho các ứng dụng về chăm sóc sức khỏe con người hoặc động vật cho đến khi tác dụng của yếu tố độc lực này bị loại bỏ, chỉnh sửa hoặc được xác nhận không gây hại cho vật chủ là các sinh vật nhân thực. Trong nghiên cứu này, kết quả hình 2 cho thấy các chủng thử nghiệm không có vùng trong suốt hoặc xanh lục xung quanh khuẩn lạc của chúng trên đĩa thạch máu. Vì vậy, chúng được đánh giá không gây tan máu, đảm bảo an toàn. Nhóm nghiên cứu đặt tên cho 2 chủng *Bacillus clausii* và *Bacillus subtilis* này lần lượt là Eramic 24 và Eramic 25 để tiếp tục tiến hành các thử nghiệm tiếp theo.



Hình 2. Khuẩn lạc *Bacillus* trên thạch máu.

3.3. Khả năng chịu axit dạ dày và muối mật

Những đặc tính quan trọng và cần thiết trong việc lựa chọn các chủng vi khuẩn sản xuất chế phẩm probiotic là khả năng sống sót của vi khuẩn dưới tác dụng của pH thấp ở hệ tiêu hóa. Tại đây, ở người, sau bữa ăn dạ dày có thể giảm pH xuống mức 1 hoặc 2. Tuy nhiên, bộ đệm nhanh chóng tăng độ pH lên mức 3 hoặc 4 và sau bữa ăn pH dạ dày trở về mức nghỉ ngơi khoảng 4 hoặc 5. Theo một số nghiên cứu trước, các chủng có tiềm năng probiotic phải có khả năng chịu pH thấp giúp chúng vượt qua hàng rào pH trong dạ dày, giới hạn pH 2 và pH 3 và trong thời gian 3 giờ là giới hạn quyết định sàng lọc của các chủng [7]. Chính vì vậy mà chủng vi khuẩn được lựa chọn làm vi sinh vật tiềm năng probiotic được khảo sát khả năng chịu pH thấp với mức pH là 2, 3 và 4. Kết quả thí nghiệm đánh giá khả năng chịu pH thấp của chủng vi khuẩn được trình bày ở bảng 2. Kết quả các chủng được thử nghiệm đều cho thấy khả năng kháng dịch dạ dày, chịu được pH thấp. Ở điều kiện pH 2, các chủng đều có khả năng sống sót đã phản ánh được độ bền của bào tử vì dạ dày hiếm khi có pH ở mức 2 và thường phổ biến ở mức pH

3 và 4. Ở điều kiện pH 3 và 4, các chủng đều cho thấy độ bền và khả năng thích nghi cao để tồn tại trong môi trường axit của dạ dày và điều kiện pH 3 cũng là mức có tỷ lệ sống sót cao nhất của các chủng. So sánh kết quả giữa 2 chủng thử nghiệm cho thấy chủng Eramic 25 có khả năng sống sót cao hơn và có độ bền tốt hơn so với chủng Eramic 24. Kết quả trên cũng tương tự với nghiên cứu của N.T. Huyen và cs (2014) [8], nhóm tác giả đã chỉ ra rằng 54 dòng vi khuẩn probiotic đều thể hiện sự chống chịu cao khi được ủ trong dịch mô phỏng axit dạ dày. Ngoài ra, nghiên cứu của N.P. Hien và cs (2014) [9] đã chứng minh hầu hết các dòng vi khuẩn probiotic phân lập từ sữa dê và chế phẩm men tiêu hóa đều có khả năng chịu đựng được pH 3.

Bảng 2. Khả năng sống sót trong các dịch mô phỏng.

Thử nghiệm	Eramic 24 (%)	Eramic 25 (%)
Mô phỏng dịch ruột	65	70
Mô phỏng dịch dạ dày pH 2	47	67
Mô phỏng dịch dạ dày pH 3	76	90
Mô phỏng dịch dạ dày pH 4	68	78

Các chủng vi khuẩn *Bacillus* có khả năng chịu pH thấp là kết quả của thí nghiệm trước đã được lựa chọn và tiếp tục kiểm tra khả năng chịu muối mật. Thử nghiệm được tiến hành trên môi trường muối mật ở 37°C trong 3 giờ tương ứng với thời gian lưu thức ăn trong ruột non [10]. X.X. Zhou và cs (2007) [11] cũng đã chỉ ra rằng, vi sinh vật probiotic chỉ phát huy tác dụng có lợi lên vật chủ khi chúng định cư và tồn tại trong ruột non, đây là môi trường chứa thành phần muối mật là các yếu tố ức chế sinh trưởng của vi sinh vật. Kết quả bảng 3 cho thấy, các chủng *Bacillus* đều có thể tồn tại và phát triển dưới tác động của nồng độ muối mật. Thực tế khi quan sát, trong những giờ đầu, mật độ vi sinh vật tăng lên rất chậm. Tuy nhiên, sau đó mật độ vi sinh vật tăng lên một cách nhanh chóng. Kết quả này tương tự và được giải thích bởi Q.D. Tinh và cs (2013) [12] khi nghiên cứu về vi khuẩn probiotic. Theo đó, trong 2 giờ đầu, mật độ vi sinh vật tăng lên chậm vì đây là giai đoạn hệ vi sinh vật thích nghi với môi trường có muối mật, muối mật tác động đến tế bào vi sinh vật làm hạn chế sự phát triển của chúng. Nhưng bắt đầu từ giờ tiếp theo, tốc độ phát triển của vi sinh vật tăng lên đáng kể do một số protein và enzyme trên màng tế bào vi khuẩn có khả năng trung hòa tác động của muối mật bằng cách cắt đứt liên kết N-actyl giữa gốc steroid và chuỗi amino axit bên của axit mật. Ngoài ra, kết quả bảng 3 cũng chỉ ra rằng, ở nồng độ muối mật 0,3%, tỷ lệ sống sót của các chủng vi khuẩn cao hơn so với nồng độ muối mật 0,2%. Theo S.E. Gilliland và cs (1984) [13], 0,3% được xem là nồng độ quyết định để sàng lọc các chủng vi sinh vật có khả năng chống chịu muối mật. Kết quả này giống với nghiên cứu của T.Q. Viet và cs (2009) [14], các chủng vi sinh vật thử nghiệm đều có khả năng tồn tại trong môi trường muối

mật 0,3%. Kết quả này cao hơn so với nghiên cứu của D.N. Linh và cs (2011) [15] ở nồng độ muối mật 0,3% sau 3 giờ hầu hết các chủng có tỷ lệ sống 90-116%. Điều này rất quan trọng đối với các vi sinh vật probiotic vì muốn phát huy tác dụng có lợi lên vật chủ khi chúng định cư và tồn tại trong ruột non [16].

Bảng 3. Khả năng sống sót trong môi trường muối mật.

Nồng độ muối mật	Eramic 24	Eramic 25
Muối mật 0,2%	91%	102%
Muối mật 0,3%	94%	118%

3.4. Độ nhạy cảm với kháng sinh

Mức độ nhạy cảm với kháng sinh của 2 chủng *Bacillus* được thử nghiệm bằng phương pháp khuếch tán đĩa Kirby Bauer theo hướng dẫn của GRAS Notice dựa trên tiêu chuẩn CLSI 2021 sử dụng 11 loại kháng sinh. Kết quả bảng 4 chỉ ra rằng, chủng Eramic 24 kháng lại 3 loại kháng sinh, nhạy cảm với 7 loại và có 1 loại không tìm thấy tham chiếu. Trong khi đó, chủng Eramic 25 kháng lại 1 loại kháng sinh, nhạy cảm với 8 loại, 1 loại trung gian và có 1 loại không tìm thấy tham chiếu. Có thể thấy, chủng Eramic 25 cho kết quả với mức độ an toàn cao hơn so với chủng Eramic 24. Tuy nhiên, chủng Eramic 24 cũng được đánh giá là an toàn vì các loại kháng sinh mà chủng này nhạy cảm đều là các loại kháng sinh phổ biến sử dụng rộng rãi cho con người. Mức độ nhạy cảm với kháng sinh của chủng phải được thử nghiệm vì mục đích an toàn. Truyền gen kháng kháng sinh có thể xảy ra do các transposon, plasmid và vi khuẩn đột biến gen dẫn đến các chủng kháng kháng sinh mới [17]. Tuy nhiên, vấn đề này vẫn đang gây tranh cãi và được nghiên cứu thêm. Hơn nữa, khả năng đề kháng với một loại kháng sinh nhất định có thể là vốn có của một loài hoặc chỉ vi khuẩn. Ví dụ, một nghiên cứu được thực hiện bởi D.B.

Bảng 4. Đánh giá độ nhạy cảm với kháng sinh.

Tên kháng sinh	Đường kính vùng ức chế (mm)			
	Eramic 24		Eramic 25	
Ampicilin sulbactam 20 µg	32	Ø	44	Ø
Gentamycine 10 µg	36	S	20	S
Clindamycine 2 µg	0	R	26	S
Chloramphenicol 30 µg	0	R	24	S
Erythromycine 15 µg	0	R	22	I
Rifampicine 5 µg	44	S	28	S
Vancomycin 30 µg	22	S	12	R
Tetracycline 30 µg	28	S	16	S
Linezolid 30 µg	44	S	32	S
Trimethoprin 25 µg	40	S	32	S
Xiprofloxacine	32	S	30	S

S: nhạy cảm; I: trung gian; R: kháng; Ø: không có tham chiếu.

Adimpong và cs (2012) [18] đã cho thấy trong số 85 loài *Bacillus* được người dân Sudan sử dụng làm bánh mì *B. subtilis* subsp. *subtilis* (n=29), *B. licheniformis* (n=38) và *B. sonorensis* (n=18) tất cả đều kháng streptomycin. Tình trạng kháng kháng sinh ở mức vừa phải có thể được coi là một đặc điểm tích cực cụ thể những trường hợp như khi điều trị sử dụng kết hợp probiotic - kháng sinh. Hơn nữa, theo G.H. Choi và cs (2021) [19], nếu chế phẩm sinh học được đánh giá nhạy cảm với tất cả kháng sinh, khả năng sống sót và tồn tại của chúng sẽ bị can thiệp và mất hiệu lực.

4. Kết luận

Từ 50 mẫu phân ban đầu, chúng tôi phân lập được 72 chủng có các đặc điểm giống với vi khuẩn *Bacillus*. Qua quá trình nuôi cấy, phân lập, tuyển chọn và định danh vi sinh vật thu được 2 chủng là *Bacillus clausii* và *Bacillus subtilis*. Sau đó chúng tôi tiến hành thử nghiệm các đặc tính cơ bản probiotic của 2 chủng này. Kết quả cả 2 chủng được đánh giá an toàn, không gây tan máu, có khả năng sống sót, tồn tại trong môi trường khắc nghiệt của hệ tiêu hóa và nhạy cảm với các loại kháng sinh phổ biến được sử dụng cho con người. Các chủng này đang được tiếp tục tiến hành thử nghiệm để đánh giá độ an toàn và các đặc tính probiotic khác, từ đó ứng dụng và phát triển các chế phẩm probiotic.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được tài trợ bởi Công ty Cổ phần Kỹ nguyên Công nghệ Eramic. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] N.P. Mangia, L. Saliba, P. Deiana (2019), "Functional and safety characterisation of autochthonous *Lactobacillus paracasei* FS103 isolated from sheep cheese and its survival in sheep and cow fermented milks during cold storage", *Annals of Microbiology*, **69**, pp.161-170, DOI: 10.1007/s13213-018-1416-1.

[2] GRAS Associates, LLC (2020), *GRAS Notice No. 955*, <https://www.fda.gov/media/146438/download>, accessed 1 February 2024.

[3] European Food Safety Authority (2012), "Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance", *EFSA Journal*, **10(6)**, DOI: 10.2903/j.efsa.2012.2740.

[4] European Food Safety Authority (2014), "Guidance on the assessment of the toxigenic potential of *Bacillus* species used in animal nutrition", *EFSA Journal*, **12(5)**, DOI: 10.2903/j.efsa.2014.3665.

[5] Clinical and Laboratory Standards Institute (2021), *M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, pp.36-46.

[6] I. Yasmin, M. Saeed, W.A. Khan, et al. (2020), "In vitro probiotic potential and safety evaluation (hemolytic, cytotoxic activity) of *Bifidobacterium* strains isolated from raw camel milk", *Microorganisms*, **8(3)**, DOI: 10.3390/microorganisms8030354.

[7] N.T.D. Huong, D.T.B. Thuy (2012), "Identification and investigation of some beneficial properties of strain of *Lactobacillus fermentum* DC1 isolated from Hue sauerkraut products", *Hue University Journal of Science*, **71(2)**, pp.175-185 (in Vietnamese).

[8] N.T. Huyen, N.T.T. Huong, T.T.T. Linh, et al. (2014), "Investigation of microbial composition and probiotic properties of commercial probiotic products", *Journal of Science and Development*, **12(1)**, pp.65-72 (in Vietnamese).

[9] N.P. Hien, N.H. Hiep (2014), "Evaluation of probiotic potential and identification of lactic acid bacteria isolated from human milk and enzyme preparations", *Can Tho University Journal of Science*, **31**, pp.21-31 (in Vietnamese).

[10] H. Kumura, Y. Tanoue, M. Tsukahara, et al. (2004), "Screening of dairy yeast strains for probiotic applications", *Journal of Dairy Science*, **87(12)**, pp.4050-4056, DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73546-8.

[11] X.X. Zhou, Y.J. Pan, Y.B. Wang, et al. (2007), "In vitro assessment of gastrointestinal viability of two photosynthetic bacteria, *Rhodospseudomonas palustris* and *Rhodobacter sphaeroides*", *Journal of Zhejiang University Science B*, **8(9)**, pp.686-692, DOI: 10.1631/jzus.2007.B0686.

[12] Q.D. Tinh, T.T. Trung, N.N. Duy, et al. (2013), "Survey of some probiotic activity of traditional passionfruit-kefir and *Lactobacillus casei* VTCC 186 - supplemented passionfruit-kefir", *Science and Technology Development*, **16(3)**, pp.40-47 (in Vietnamese).

[13] S.E. Gilliland, T.E. Staley, L.J. Bush (1984), "Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct", *Journal of Dairy Science*, **67(12)**, pp.3045-3051, DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(84)81670-7.

[14] T.Q. Viet, N.T. Len, L.V. Huyen, et al. (2009), "Effects of supplementation of probiotics into diet and drinking water on growth performance and feed efficiency in broiler chicken", *Journal of Animal Science and Technology*, **20**, pp.32-35 (in Vietnamese).

[15] D.N. Linh, N.V. Minh, T.T.K. Sa, et al. (2011), "Probiotic potential of some lactic bacteria isolated from breast milk", *Science Journal of Open University of Ho Chi Minh City*, **6(1)**, pp.67-73 (in Vietnamese).

[16] R. Havenaar, J.H.J.H.I. Veld (1992), "Probiotics: A general view", *The Lactic Acid Bacteria*, **1**, pp.151-170, DOI: 10.1007/978-1-4615-3522-5_6.

[17] M. Teuber, L. Meile, F. Schwarz (1999), "Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food", *Lactic Acid Bacteria: Genetics Metabolism and Applications*, pp.115-137, DOI: 10.1007/978-94-017-2027-4_5.

[18] D.B. Adimpong, K.I. Sørensen, L. Thorsen, et al. (2012), "Antimicrobial susceptibility of *Bacillus* strains isolated from primary starters for African traditional bread production and characterisation of the bacitracin operon and bacitracin biosynthesis", *Applied and Environmental Microbiology*, **78(22)**, pp.7903-7914, DOI: 10.1128/aem.00730-12.

[19] G.H. Choi, J.I.I. Fugaban, C.M. Dioso, et al. (2021), "Selection of bacteriocinogenic *Bacillus* spp. from traditional fermented Korean food products with additional beneficial properties", *Fermentation*, **7(4)**, DOI: 10.3390/fermentation7040271.