

**BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

**HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**

---



**Ninh Thị Cẩm Vân**

**NGHIÊN CỨU MỘT SỐ ĐẶC TÍNH SINH HỌC CHỨNG  
PROBIOTIC *Bacillus* sp. CÓ KHẢ NĂNG ỨC CHẾ MẠNH VI  
KHUẨN GÂY HƯ HỎNG THỰC PHẨM**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC**

**Hà Nội-2026**

**BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

**HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**



**Ninh Thị Cẩm Vân**

**NGHIÊN CỨU MỘT SỐ ĐẶC TÍNH SINH HỌC CHỨNG  
PROBIOTIC *Bacillus* sp. CÓ KHẢ NĂNG ỨC CHẾ MẠNH VI  
KHUẨN GÂY HƯ HỎNG THỰC PHẨM**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC**

**Ngành: Sinh học thực nghiệm**

**Mã số: 8420114**

**NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:  
PGS. TS. Vũ Văn Hạnh**

**Hà Nội- 2026**

## **LỜI CAM ĐOAN**

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn là do chính tôi trực tiếp thực hành dưới sự hướng dẫn của PGS. TS Vũ Văn Hạnh. Do đó, các kết quả nghiên cứu trình bày trong bài luận văn đảm bảo tính trung thực và khách quan. Đồng thời, kết quả này chưa từng được công bố trên các tạp chí cũng như hội nghị. Tôi cam kết các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực, nếu sai tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm.

*Hà Nội, ngày tháng năm 2026*

**Tác giả luận văn**

**Ninh Thị Cẩm Vân**

## LỜI CẢM ƠN

Lời đầu tiên, tôi xin gửi lời cảm ơn tới Ban lãnh đạo Viện Sinh học và lòng biết ơn sâu sắc đến PGS. TS Vũ Văn Hạnh là giảng viên hướng dẫn đã tận tình chỉ dạy, đưa ra nhận xét, góp ý giúp em hoàn thành các công việc nghiên cứu và trưởng thành trong cuộc sống.

Tôi xin chân thành cảm ơn các bộ nghiên cứu thuộc Trung tâm ứng dụng công nghệ sinh học biển và hệ gen - Viện Sinh học đã chỉ bảo và truyền đạt nhiều kinh nghiệm thực tiễn quý giá trong hoạt động nghiên cứu khoa học ở lĩnh vực vi sinh vật học.

Tôi xin phép gửi lời cảm ơn đến Ban lãnh đạo, các thầy cô giáo thuộc Khoa Sinh học, Phòng Đào tạo, các phòng chức năng của Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã truyền đạt kiến thức và tạo điều kiện thuận lợi giúp đỡ em trong suốt quá trình học tập tại Học viện.

Cuối cùng, tôi xin gửi lời cảm ơn gia đình, bạn bè và người thân đã luôn động viên, ủng hộ và là điểm tựa vững chắc giúp tôi có kết quả như ngày hôm nay.

*Hà Nội, ngày tháng năm 2026*

**Tác giả luận văn**

**Ninh Thị Cẩm Vân**

## MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN .....	i
LỜI CẢM ƠN .....	ii
MỤC LỤC .....	iii
DANH MỤC BẢNG .....	vi
DANH MỤC HÌNH .....	vii
DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT .....	ix
MỞ ĐẦU .....	1
Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU .....	4
1.1 Tổng quan về probiotic .....	4
1.1.1 Định nghĩa probiotic .....	4
1.1.2 Tiêu chí lựa chọn chủng probiotic.....	4
1.2 Tổng quan về vi khuẩn gây hư hỏng thực phẩm.....	6
1.2.1 Định nghĩa hư hỏng thực phẩm.....	6
1.2.2 Mối quan hệ giữa vi khuẩn gây hư hỏng thực phẩm với việc ngộ độc thực phẩm .....	6
1.2.3 Tình hình ngộ độc thực phẩm do ăn thực phẩm hư hỏng .....	7
1.2 Các vi khuẩn gây bệnh phổ biến .....	9
1.2.1 <i>Salmonella</i> .....	9
1.2.2 <i>E. coli</i> .....	11
1.2.3 <i>Clostridium</i> .....	12
1.3 Tổng quan về chi <i>Bacillus</i> .....	14
1.3.1 Đặc điểm sinh học .....	14
1.3.2 Cơ chế kháng khuẩn.....	15
1.3.3 Ứng dụng của chi <i>Bacillus</i> .....	17
1.3.3.1 Ứng dụng của chi <i>Bacillus</i> trong y sinh và probiotic .....	17
1.3.3.2 Ứng dụng của chi <i>Bacillus</i> trong nông nghiệp .....	18

1.3.3.3 Ứng dụng của chi <i>Bacillus</i> trong công nghiệp.....	18
1.3.3.4 Ứng dụng của chi <i>Bacillus</i> trong xử lý môi trường .....	18
1.3.3 Tình hình nghiên cứu về chi probiotic <i>Bacillus</i> trong nước và thế giới	19
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	22
2.1 Đối tượng nghiên cứu.....	22
2.1.1 Chủng nghiên cứu .....	22
2.1.2 Hoá chất và thiết bị .....	22
2.1.3 Môi trường và dung dịch đệm.....	22
2.2 Phương pháp nghiên cứu.....	23
2.2.1 Hoạt hoá và làm thuần chủng <i>Bacillus</i> phân lập từ ruột lợn.....	23
2.2.3 Đánh giá đặc tính sinh học của vi khuẩn <i>Bacillus</i> sp. chọn lọc trong điều kiện môi trường <i>in vitro</i> .....	26
2.2.4 Nghiên cứu điều kiện và thành phần môi trường lên men ảnh hưởng đến sinh khối và hoạt tính chủng vi khuẩn chọn lọc.....	28
2.2.5 Phương pháp phân tích.....	30
2.2.5.1 Phương pháp kiểm tra hoạt tính kháng khuẩn bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch .....	30
2.2.5.2 Phương pháp kiểm tra hoạt tính sinh enzyme ngoại bào bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch.....	31
2.2.5.3 Xác định mật độ tế bào bằng phương pháp đếm khuẩn lạc .....	31
2.2.6 Phương pháp xử lý số liệu.....	32
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN .....	33
3.1 Sàng lọc chủng có khả năng kháng khuẩn tiềm năng .....	33
3.2 Định danh chủng vi khuẩn lựa chọn .....	35
3.3 Nghiên cứu đặc điểm sinh học probiotic của chủng vi khuẩn lựa chọn trong thí nghiệm <i>in vitro</i> .....	36
3.3.1 Khả năng tan huyết của chủng vi khuẩn chọn lựa .....	37
3.3.2 Khả năng chịu axit và muối mật .....	37

3.3.3 Khả năng bám dính .....	39
3.3.4 Khả năng kháng kháng sinh .....	40
3.4 Đánh giá hoạt tính chủng vi khuẩn <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> BacA10 trong khảo sát điều kiện và thành phần lên men.....	41
3.4.1 Ảnh hưởng của tỷ lệ tiếp giống.....	41
3.4.2 Ảnh hưởng của pH môi trường ban đầu .....	44
3.4.3 Ảnh hưởng của nhiệt độ.....	46
3.4.4 Ảnh hưởng của thời gian lên men.....	49
3.4.5 Ảnh hưởng của nguồn cacbon.....	51
3.4.6 Ảnh hưởng của nồng độ maltodextrin .....	53
3.4.7 Ảnh hưởng của nguồn nitrogen.....	55
3.4.8 Ảnh hưởng của nồng độ peptone .....	58
3.4.9 Ảnh hưởng của nguồn khoáng .....	60
3.4.10 Ảnh hưởng của nồng độ $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	62
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	65
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	66

## DANH MỤC BẢNG

Bảng 2.1. Thành phần môi trường Luria-Bertani (LB-agar) .....	22
Bảng 2.2 Thành phần phản ứng PCR.....	24
Bảng 2.3. Chu trình phản ứng PCR.....	24
Bảng 3.1 Hoạt tính kháng khuẩn của 12 chủng vi khuẩn nghiên cứu .....	33
Bảng 3.2 Thử nghiệm khả năng chịu muối mật và axit dạ dày .....	38
Bảng 3.3 Khả năng kháng kháng của chủng <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> BacA10.....	40
Bảng 3.4 Ảnh hưởng của tỷ lệ tiếp giống đến hoạt tính kháng khuẩn và enzyme .....	42
Bảng 3.5 Ảnh hưởng của nồng độ pH đến hoạt tính kháng khuẩn và enzyme .....	44
Bảng 3.6 Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến hoạt tính kháng khuẩn và enzyme .....	47
Bảng 3.7 Ảnh hưởng của thời gian lên men đến hoạt tính kháng khuẩn và enzyme .....	49
Bảng 3.8 Ảnh hưởng của nguồn cacbon đến hoạt tính kháng khuẩn và enzyme .....	51
Bảng 3.9 Ảnh hưởng của nồng độ maltodextrin đến hoạt tính kháng khuẩn và enzyme .....	53
Bảng 3.10 Ảnh hưởng của nguồn nitrogen đến hoạt tính kháng khuẩn và enzyme .....	56
Bảng 3.11 Ảnh hưởng của nồng độ Peptone đến hoạt tính kháng khuẩn và enzyme ngoại bào.....	58
Bảng 3.12 Ảnh hưởng của nguồn khoáng đến hoạt tính kháng khuẩn và enzyme .....	60
Bảng 3.13 Ảnh hưởng của nồng độ khoáng đến hoạt tính kháng khuẩn và enzyme .....	63

## DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1 Vi khuẩn <i>Salmonella</i> .....	9
Hình 1.2 Chu trình lây truyền <i>Salmonella</i> giữa động vật và con người .....	10
Hình 1.3 Vi khuẩn <i>E. coli</i> .....	11
Hình 1.4 Vi khuẩn <i>Clostridium spp.</i> .....	12
Hình 1.5 Vi khuẩn <i>Bacillus sp.</i> .....	14
Hình 1.6 Hai con đường tổng hợp protein/enzyme của vi khuẩn .....	17
Hình 3.1 Vòng kháng khuẩn của 12 chủng vi khuẩn khảo sát.....	35
Hình 3.2 Cây phát sinh chủng loại chủng vi khuẩn lựa chọn .....	36
Hình 3.3 Hình ảnh khuẩn lạc vi khuẩn không gây tan máu.....	37
Hình 3.4 Khả năng bám dính của chủng <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> BacA10 .....	40
Hình 3.6 Ảnh hưởng của tỷ lệ tiếp giống đến mật độ tế bào .....	44
Hình 3.7 Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính kháng khuẩn và enzyme ngoại bào .....	45
Hình 3.8 Ảnh hưởng của pH ban đầu đến mật độ tế bào .....	46
Hình 3.9 Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính kháng khuẩn và enzyme ngoại bào .....	47
Hình 3.10 Ảnh hưởng của nhiệt độ đến mật độ tế bào .....	48
Hình 3.11 Ảnh hưởng của thời gian lên men đến hoạt tính kháng khuẩn và enzyme ngoại bào.....	50
Hình 3.12 Ảnh hưởng của nhiệt độ đến mật độ tế bào .....	51
Hình 3.13 Ảnh hưởng của nguồn cacbon đến hoạt tính kháng khuẩn và enzyme ngoại bào .....	52
Hình 3.14 Ảnh hưởng của nguồn cacbon đến mật độ tế bào .....	53
Hình 3.15 Ảnh hưởng của nồng độ maltodextrin đến hoạt tính kháng khuẩn và enzyme ngoại bào.....	54
Hình 3.16 Ảnh hưởng của nồng độ maltodextrin đến mật độ tế bào.....	55

Hình 3.17 Ảnh hưởng của nguồn nitrogen đến hoạt tính kháng khuẩn và enzyme ngoại bào .....	56
Hình 3.18 Ảnh hưởng của nguồn nitrogen đến mật độ tế bào .....	58
Hình 3.19 Ảnh hưởng của nồng độ peptone đến hoạt tính kháng khuẩn và enzyme ngoại bào .....	59
Hình 3.20 Ảnh hưởng của nồng độ peptone đến mật độ tế bào.....	60
Hình 3.21 Ảnh hưởng của nguồn khoáng đến hoạt tính kháng khuẩn và enzyme ngoại bào .....	61
Hình 3.22 Ảnh hưởng của nguồn khoáng đến mật độ tế bào.....	62
Hình 3.23 Ảnh hưởng của nồng độ khoáng đến hoạt tính kháng khuẩn và enzyme ngoại bào.....	63
Hình 3.24 Ảnh hưởng của nồng độ $\text{KH}_2\text{PO}_4$ đến mật độ tế bào.....	64

## DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT

Từ viết tắt	Tên đầy đủ	Tên Tiếng Việt
LB	Luria-Bertani	
PBS	Phosphate buffered solution	
DNA	Deoxyribonucleotide acid	
CFU	Colony Forming Units	Đơn vị hình thành khuẩn lạc
VTCC	Vietnam Type Culture Collection	Bảo tàng Giống chuẩn Vi sinh vật
PCR	Polymerase chain reaction	Phản ứng chuỗi Polymerase
rRNA	Ribosome ribonuclease	
ETEC	Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i> sinh độc tố ruột
T3SS	Type III secretion system	
SCV	<i>Salmonella</i> – containing vacuole	
LPS	Lipopolysachride	
STEC	Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i> sản sinh độc tố Shiga
HUS	Hemolytic Uremic Syndrome	Hội chứng tan máu ure huyết
PGPR	Plant growth-promoting rhizobacteria	Vi khuẩn vùng rễ thúc đẩy tăng trưởng thực vật
IAA	Indole-3-acetic acid	

## MỞ ĐẦU

An toàn vệ sinh thực phẩm luôn là một trong những vấn đề được toàn xã hội đặc biệt quan tâm, nhất là trong bối cảnh chất lượng cuộc sống ngày càng được nâng cao. Hiện nay, ngộ độc thực phẩm do ăn phải thực phẩm hư hỏng trong quá trình chế biến, bảo quản và phân phối gây tổn thất nặng nề về kinh tế và sức khỏe người dân. Theo thống kê của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO), mỗi năm trên thế giới (trong đó có Việt Nam) có khoảng 600 triệu người mắc bệnh và 420 nghìn người tử vong do ăn thực phẩm không đảm bảo an toàn. Có nhiều tác nhân gây hư hỏng thực phẩm, trong đó phải kể đến tác nhân gây hư hỏng thực phẩm do bị nhiễm vi khuẩn *Salmonella sp.*, *Escherichia coli* (*E. coli*), *Clostridium spp...* trong quá trình chế biến và bảo quản. Vi khuẩn này sinh độc tố gây ngộ độc thực phẩm khi người ta ăn phải là rất nghiêm trọng và phổ biến hiện nay. Vi khuẩn nêu trên và độc tố của chúng xâm nhập vào cơ thể con người ban đầu có thể gây ra các phản ứng như nôn mửa, tiêu chảy nhiều, đau bụng, mất nước,... Nếu không được cứu chữa kịp thời, cơ chế mất nhiều nước, suy kiệt, mất cân bằng chất điện giải, các độc tố và vi khuẩn gây bệnh tích lũy với số lượng lớn trong cơ thể, nó hủy hoại bào quan gây suy tạng, gây nhiễm trùng máu dẫn tới tử vong.

Hiện nay, để kiểm soát các vi khuẩn độc hại kể trên, sử dụng kháng sinh vẫn là cách phổ biến nhất, tuy nhiên việc sử dụng kháng sinh bừa bãi, sử dụng kháng sinh bị cấm, sử dụng quá liều, sử dụng thường xuyên dài ngày đã gây ra hiện tượng kháng thuốc kháng sinh trên một số vi khuẩn gây bệnh nguy hiểm. Hoặc là sử dụng các chất bảo quản hoá học để kiểm soát vi sinh vật trong thực phẩm trong thực phẩm còn nhiều hạn chế do nguy cơ tồn dư hoá chất. Do đó, việc nghiên cứu chọn lọc và sử dụng các chủng vi khuẩn probiotic có khả năng sinh tổng hợp các chất kháng khuẩn mạnh (không phải là kháng sinh) để ức chế vi khuẩn gây hư hỏng thực phẩm và vi khuẩn gây ngộ độc thực phẩm, có ý nghĩa quan trọng trong bảo quản thực phẩm, phòng tránh vi khuẩn bệnh ở người và động vật, góp phần giảm sử dụng kháng sinh và giảm vi khuẩn gây bệnh kháng kháng sinh.

Các nghiên cứu trong nước và quốc tế đã chỉ ra rằng các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus sp.* được nghiên cứu là nhóm probiotic rất tiềm năng.

*Bacillus* sp. có khả năng tạo sinh bào tử bền vững, thích nghi tốt trong điều kiện môi trường bất lợi (nhiệt độ cao) và có thể sinh tổng hợp ra nhiều hợp chất kháng khuẩn như bacteriocin, lipopeptide, ..., hợp chất kháng khuẩn tương tự bacteriocin (BLIS). Nhờ vào các đặc tính sinh học này giúp *Bacillus* có khả năng ức chế các vi khuẩn gây hư hỏng thực phẩm. Bên cạnh đó, các chủng vi khuẩn *Bacillus* còn có vai trò quan trọng trong việc kích thích hệ miễn dịch, hỗ trợ đường tiêu hoá và sản xuất các enzyme tiêu hóa như protease, cellulase, lipase,... [1].

*Bacillus* được phân lập được từ đất, thực phẩm lên men, hệ tiêu hoá động vật, phân động vật,... Trong đó, phân lập từ ruột của lợn khoẻ mạnh được xem là những nguồn giàu tiềm năng để phát hiện và tuyển chọn các chủng vi khuẩn có giá trị ứng dụng cao. Ruột lợn là môi trường phong phú, chứa nhiều loài vi khuẩn cộng sinh có vai trò duy trì cân bằng hệ vi sinh vật đường ruột và ức chế sự phát triển của vi khuẩn có hại. Việc phân lập các chủng *Bacillus* từ ruột lợn, góp phần bổ sung các chủng vi khuẩn mới có hoạt tính sinh học cao. Trong khuôn khổ luận văn, chúng tôi tập trung nghiên cứu vào việc đặc điểm sinh học như kháng khuẩn và mật độ tế bào của chủng vi khuẩn *Bacillus* có đặc tính probiotic định hướng phát triển chế phẩm sinh học probiotic có ý nghĩa khoa học và thực tiễn.

Từ những lý do trên, tôi tiến hành nghiên cứu đề tài “**Nghiên cứu một số đặc tính sinh học chủng probiotic *Bacillus* sp. có khả năng ức chế mạnh vi khuẩn gây hư hỏng thực phẩm**”.

#### **Mục đích nghiên cứu:**

Tuyển chọn được chủng vi khuẩn *Bacillus* có khả năng ức chế mạnh vi khuẩn gây hư hỏng thực phẩm, định danh được chủng *Bacillus* sp. chọn lọc và nghiên cứu được một số đặc tính sinh học của chủng trong điều kiện *in vitro*.

#### *Mục tiêu cụ thể:*

- Chọn lọc được 01 chủng vi khuẩn *Bacillus* có hoạt tính ức chế mạnh vi khuẩn *Salmonella* sp., *E. coli*, *Clostridium*.

- Nghiên cứu được một số đặc tính sinh học của chủng vi khuẩn *Bacillus* chọn lọc trong điều kiện *in vitro*.

- Chọn được điều kiện và thành phần dinh dưỡng phù hợp cho nuôi cấy chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. chọn lọc.

**Nội dung nghiên cứu:**

**Nội dung 1:** Nghiên cứu sàng lọc và chọn lọc chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. có khả năng kháng khuẩn *Salmonella spp.*, *E. coli*, *Clostridium spp.* gây hư hỏng thực phẩm.

**Nội dung 2:** Định danh chủng *Bacillus* chọn lọc có khả năng kháng mạnh vi sinh vật kiểm định bằng kỹ thuật sinh học phân tử.

**Nội dung 3:** Nghiên cứu một số đặc tính sinh học của chủng *Bacillus* sp. trong điều kiện môi trường *in vitro* (chịu axit, chịu muối mật, kháng kháng sinh, khả năng bám dính,...)

**Nội dung 4:** Nghiên cứu điều kiện lên men (tỷ lệ tiếp giống, nhiệt độ, pH,..) và thành phần môi trường lên men thích hợp (nguồn cacbon, nguồn nitrogen, nguồn khoáng,...) của chủng *Bacillus* chọn lọc để sản xuất cao sản sinh khối bào tử.

## **Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU**

### **1.1 Tổng quan về probiotic**

#### **1.1.1 Định nghĩa probiotic**

Probiotic là các vi sinh vật sống có lợi, khi được sử dụng với nồng độ thích hợp sẽ mang lại lợi ích sức khỏe cho vật chủ. Các chủng probiotic thường thuộc các chi *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* và một số nấm men, có khả năng cải thiện cân bằng hệ vi sinh vật đường ruột, tăng cường đáp ứng miễn dịch và hỗ trợ phòng ngừa một số rối loạn tiêu hóa [2].

#### **1.1.2 Tiêu chí lựa chọn chủng probiotic**

Việc lựa chọn chủng vi khuẩn probiotic đòi hỏi phải đáp ứng đồng thời các yêu cầu về an toàn, khả năng tồn tại trong đường tiêu hóa và hiệu quả sinh học đối với vật chủ [3], [4], [5]. Theo hướng dẫn của FAO/WHO và các nghiên cứu gần đây, một chủng vi khuẩn được xem là probiotic tiềm năng khi đáp ứng các tiêu chí sau:

##### ***1.1.2.1 Định danh và đặc trưng chủng rõ ràng***

Chủng vi khuẩn phải được xác định chính xác đến cấp độ chi (genus), loài (species) và chủng (strain) bằng các phương pháp hình thái, sinh hóa và sinh học phân tử. Đặc tính probiotic mang tính đặc hiệu chủng nên việc định danh chính xác là yêu cầu bắt buộc. Hiện nay, các phương pháp sinh học phân tử như giải trình tự gen 16S rRNA, giải trình tự toàn bộ hệ gen (Whole Genome Sequencing - WGS) và các kỹ thuật định danh phân tử khác được sử dụng để xác nhận danh tính của chủng probiotic [3], [4], [5].

##### ***1.1.2.2 Đánh giá tính an toàn***

Chủng probiotic phải được chứng minh là an toàn cho người sử dụng, không được mang gen độc lực, không tạo độc tố, không gây tan huyết và không mang các gen kháng kháng sinh có khả năng truyền sang vi khuẩn khác. Việc đánh giá tính an toàn cần được thực hiện trước khi ứng dụng trong thực phẩm, thực phẩm bổ sung hoặc chế phẩm sinh học [3], [4], [5].

##### ***1.1.2.3 Khả năng chịu được điều kiện khắc nghiệt của đường tiêu hóa***

Vi sinh vật probiotic cần có khả năng chịu được điều kiện khắc nghiệt của hệ tiêu hóa, bao gồm môi trường acid của dạ dày, enzyme tiêu hóa và muối mật ở ruột non. Khả năng này giúp vi sinh vật đến được vị trí tác động trong đường ruột với số lượng đủ lớn để phát huy hiệu quả sinh học [4].

#### ***1.1.2.4 Khả năng bám dính và định cư trên biểu mô ruột***

Khả năng bám dính lên tế bào biểu mô hoặc lớp chất nhầy đường ruột là một đặc tính quan trọng giúp kéo dài thời gian lưu trú của probiotic trong hệ tiêu hóa. Sự bám dính còn hỗ trợ cạnh tranh vị trí cư trú với vi sinh vật gây bệnh và tăng cường tương tác với vật chủ [4]. Trong quy mô phòng thí nghiệm, khả năng bám dính thường được đánh giá qua các thí nghiệm như tính kỵ nước, khả năng tự đông tụ và kết tụ vi khuẩn gây bệnh.

#### ***1.1.2.5 Hoạt tính đối kháng với vi sinh vật gây bệnh***

Một chủng probiotic cần có khả năng ức chế hoặc hạn chế sự phát triển của vi sinh vật gây bệnh thông qua các cơ chế như sản xuất acid hữu cơ, bacteriocin, BLIS, hydrogen peroxide hoặc cạnh tranh chất dinh dưỡng và cạnh tranh vị trí bám dính. Đây là một trong những cơ chế quan trọng giúp duy trì cân bằng hệ vi sinh vật đường ruột [4].

#### ***1.1.2.6 Chứng minh được có lợi ích sức khỏe***

Tiêu chí quan trọng nhất của probiotic là phải chứng minh được lợi ích sức khỏe cụ thể đối với vật chủ. Các lợi ích này có thể liên quan đến cải thiện sức khỏe đường tiêu hóa, tăng cường miễn dịch, giảm tiêu chảy liên quan đến kháng sinh hoặc hỗ trợ phòng ngừa và điều trị một số bệnh lý. Hiệu quả sức khỏe phải được chứng minh bằng các nghiên cứu khoa học đáng tin cậy. Các lợi ích sức khỏe của chủng probiotic cần được xác nhận bằng các nghiên cứu *in vitro*, *in vivo* và ít nhất một thử nghiệm lâm sàng trên người [3], [5].

#### ***1.1.2.7 Khả năng sống sót và ổn định trong sản phẩm***

Chủng probiotic phải duy trì được số lượng tế bào sống trong suốt quá trình sản xuất, bảo quản và thời hạn sử dụng của sản phẩm mà vẫn đảm bảo khả năng sống và hoạt tính sinh học. Điều này quyết định khả năng ứng dụng thực

tế của chủng probiotic trong thực phẩm, thực phẩm bổ sung hoặc chế phẩm sinh học [3], [4].

Tóm lại, theo FAO/WHO (2002), Binda et al. (2020) và Pereira et al. (2018), một vi sinh vật được công nhận là probiotic khi được định danh rõ ràng, đảm bảo tính an toàn, có các đặc tính chức năng phù hợp và đặc biệt phải mang lại lợi ích sức khỏe đã được chứng minh bằng các nghiên cứu lâm sàng trên người.

## **1.2 Tổng quan về vi khuẩn gây hư hỏng thực phẩm**

### **1.2.1 Định nghĩa hư hỏng thực phẩm**

Hư hỏng thực phẩm là bất kỳ sự thay đổi không mong muốn nào về hình thức, mùi, vị hoặc kết cấu của thực phẩm, khiến nó không còn phù hợp hoặc không an toàn để tiêu thụ. Những thay đổi này là do các quá trình sinh học, hóa học hoặc vật lý làm phân hủy các thành phần của thực phẩm theo thời gian. Nguyên nhân là do sự phát triển của vi khuẩn, nấm men hoặc nấm mốc tồn tại tự nhiên trong môi trường, trên bề mặt thực phẩm hoặc xâm nhập trong quá trình xử lý và chế biến [6].

### **1.2.2 Mối quan hệ giữa vi khuẩn gây hư hỏng thực phẩm với việc ngộ độc thực phẩm**

Vi khuẩn gây hư hỏng thực phẩm không trực tiếp gây bệnh cho con người nhưng sự hiện diện của chúng ở mật độ nhất định cho thấy thực phẩm đã bị suy giảm chất lượng và có nguy cơ mất an toàn. Điều kiện cho phép vi khuẩn gây hư hỏng phát triển như nhiệt độ bảo quản không thích hợp, độ ẩm cao hoặc nhiễm chéo vi sinh vật cũng là điều kiện thuận lợi cho các vi khuẩn gây bệnh như *Salmonella spp.*, *Clostridium spp.*, *Staphylococcus aureus* và *E. coli* phát triển. Do đó, thực phẩm bị hư hỏng thường được xem là có nguy cơ cao gây ngộ độc thực phẩm và không nên sử dụng [7].

Bên cạnh đó, một số vi khuẩn gây hư hỏng có khả năng sinh ra các sản phẩm chuyển hóa độc hại như amin sinh học (histamine, tyramine, putrescine và cadaverine) trong quá trình phân giải protein. Khi tích lũy ở nồng độ cao, các hợp chất này có thể gây ra các triệu chứng ngộ độc như đau đầu, buồn nôn, nôn mửa, tiêu chảy và phản ứng dị ứng ở người dùng. Điển hình là ngộ độc histamine trong cá và các sản phẩm thủy sản bảo quản không đúng cách [8].

Vì vậy, việc kiểm soát điều kiện vệ sinh, chế biến và bảo quản thực phẩm là biện pháp quan trọng nhằm hạn chế đồng thời sự phát triển của cả vi khuẩn gây hư hỏng có khả năng cao gây ngộ độc thực phẩm.

### 1.2.3 Tình hình ngộ độc thực phẩm do ăn thực phẩm hư hỏng

Trong quá trình làm hư hỏng thực phẩm, vi khuẩn được xem là một trong những tác nhân gây hư hỏng chủ yếu và làm suy giảm chất lượng thực phẩm trong thời gian ngắn. Các chủng vi khuẩn *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Clostridium spp.* được xác nhận là nguyên nhân gây ra các bệnh đường tiêu hoá. Chúng là nguyên nhân chính đứng sau hàng loạt vụ gây hư hỏng thực phẩm làm tăng khả năng gây ngộ độc thực phẩm.

#### *Tình hình bệnh trên thế giới*

Năm 2011, tại miền Bắc nước Đức đã phát hiện ra chủng mới thuộc loài *E. coli*, gây ra đợt bùng phát dịch nghiêm trọng với khoảng 4.000 trường hợp mắc bệnh và 53 trường hợp tử vong [9]. Bên cạnh đó, tại Hoa Kỳ, bang Alaska là khu vực có tỷ lệ ngộ độc thực phẩm do *Clostridium botulinum* cao nhất, chiếm khoảng 50% tổng số vụ được ghi nhận. Các trường hợp này chủ yếu liên quan đến việc tiêu thụ thực phẩm có nguồn gốc động vật bị nhiễm độc tố botulinum, đặc biệt là các sản phẩm từ cá và thịt được bảo quản và chế biến không bảo đảm an toàn thực phẩm [9].

Tại Đan Mạch, đã ghi nhận 10 vụ bùng phát dịch liên quan đến việc tiêu thụ thực phẩm nhiễm vi khuẩn *Salmonella spp.* Theo số liệu thống kê, tổng số ca nhiễm *Salmonella* trong năm 2024 là 1.266 trường hợp, tăng nhẹ so với 1.207 trường hợp được ghi nhận trong năm 2023. Trong số các chủng huyết thanh được xác định, *Salmonella enteritidis* là chủng phổ biến nhất với 274 ca bệnh. Đáng chú ý, khoảng 66% số trường hợp nhiễm *Salmonella enteritidis* được xác định có liên quan đến việc phơi nhiễm hoặc mắc bệnh trong thời gian lưu trú ở nước ngoài [10].

#### *Tình hình bệnh tại Việt Nam*

Tại Việt Nam, nhiều vụ ngộ độc thực phẩm do vi khuẩn gây bệnh đã được ghi nhận trong những năm gần đây. Điển hình, ngày 22/8/2020, tại huyện Krông Búk, tỉnh Đắk Lắk, một vụ ngộ độc thực phẩm xảy ra sau khi hàng trăm công

nhân sử dụng bánh mì thập cẩm gồm trứng chiên, chả lụa, bơ và nước sốt. Sau bữa ăn, 36 trường hợp phải nhập viện với các triệu chứng đau bụng dữ dội, nôn mửa và tiêu chảy. Kết quả xét nghiệm xác định thực phẩm nhiễm vi khuẩn *Clostridium perfringens*, được xem là nguyên nhân gây ra vụ ngộ độc [11].

Tiếp đó, vào năm 2023, tại huyện Phước Sơn, tỉnh Quảng Nam, đã ghi nhận 10 trường hợp ngộ độc sau khi sử dụng cá chép muối ủ chua, trong đó có một trường hợp tử vong trong thời gian đầu điều trị. Kết quả phân tích mẫu thực phẩm của ca bệnh đầu tiên cho thấy sự hiện diện của vi khuẩn *Clostridium botulinum*, tác nhân sinh độc tố botulinum có khả năng gây ngộ độc thần kinh nghiêm trọng [12].

Năm 2024, Việt Nam đã ghi nhận nhiều vụ ngộ độc thực phẩm quy mô lớn liên quan đến sự hiện diện của các vi khuẩn gây bệnh trong thực phẩm. Điển hình, vụ ngộ độc bánh mì xảy ra tại tỉnh Đồng Nai đã khiến hơn 550 người mắc bệnh. Tại Thành phố Hồ Chí Minh vào tháng 5 năm 2024 làm hơn 300 người bị. Kết quả điều tra dịch tễ và xét nghiệm thực phẩm cho thấy vi khuẩn *Salmonella* có trong các thành phần như pate, thịt heo và rau ăn kèm. Tháng 3 năm 2024, vụ ngộ độc thực phẩm liên quan đến cơm gà Trâm Anh tại tỉnh Khánh Hòa đã khiến hàng trăm người phải nhập viện điều trị, nguyên nhân được xác định là do nhiễm vi khuẩn *Salmonella*. Theo báo cáo của Sở Y tế tỉnh Đồng Nai, vụ ngộ độc bánh mì tại địa phương là 547 trường hợp mắc, các mẫu thực phẩm được phát hiện nhiễm vi khuẩn *Salmonella spp.* và *E. coli* [13].

Trong năm 2026, một vụ nghi ngộ độc thực phẩm xảy ra sau bữa tiệc tất niên của nhân viên một ngân hàng trên địa bàn phường Bà Rịa. Theo thông tin từ Bệnh viện Đa khoa Bà Rịa, đến ngày 4/2/2026 đã ghi nhận thêm hai trường hợp nhập viện với các triệu chứng đau bụng, tiêu chảy và sốt. Kết quả xét nghiệm bệnh phẩm từ một số bệnh nhân cho thấy dương tính với vi khuẩn *E. coli* [14].

Từ một số thông tin được trình bày ở trên cho thấy, ngộ độc thực phẩm do các vi khuẩn như *Salmonella spp.*, *E. coli* và *Clostridium spp.* đã phản ánh những lỗ hổng trong khâu chế biến, bảo quản và kiểm soát an toàn thực phẩm. Mỗi chủng vi khuẩn mang đặc điểm gây bệnh khác nhau, trong đó *Clostridium*

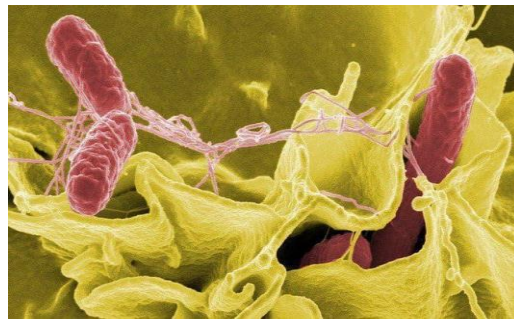
có thể dẫn đến hậu quả đặc biệt nghiêm trọng tới sức khỏe, thậm chí đe dọa trực tiếp tới tính mạng nếu không được xử lý kịp thời.

## 1.2 Các vi khuẩn gây bệnh phổ biến

### 1.2.1 *Salmonella*

#### 1.2.1.1 Đặc điểm sinh học

*Salmonella* là loại vi khuẩn có hình que, gram âm, kỵ khí tùy nghi, không sinh bào tử, có khả năng di chuyển, thuộc họ Enterobacteriaceae sinh sống trong đường ruột người và động vật [15]. *Salmonella* phát triển tốt trên các môi trường nuôi cấy thông thường ở nhiệt độ tối ưu từ 35–37°C và pH thích hợp từ 6,5–7,5. Vi khuẩn có thể phát triển trong khoảng nhiệt độ rộng từ 5–47°C và chịu được pH từ 4,0–9,5. Theo Bell và Kyriakides 2009, sản phẩm có chứa *Salmonella* sẽ bị tiêu diệt khi đun 15-20 phút ở 60°C [16].



Hình 1.1 Vi khuẩn *Salmonella* [17]

#### 1.2.1.2 Cơ chế gây bệnh

Theo Tổ chức Y tế Thế giới (WHO), *Salmonella* là “thủ phạm” quen thuộc trong các vụ tiêu chảy toàn cầu. Mỗi năm, thực phẩm không an toàn khiến 550 triệu người mắc bệnh, trong đó có 220 triệu trẻ nhỏ. Sau khi ăn phải thực phẩm nhiễm khuẩn, các triệu chứng thường âm thầm xuất hiện trong 6-72 giờ: sốt cao, đau quặn bụng, tiêu chảy, buồn nôn. Phần lớn người bệnh có thể hồi phục sau 2-7 ngày, nhưng với trẻ nhỏ, người lớn tuổi hay người có hệ miễn dịch suy yếu, tình trạng mất nước có thể diễn ra rất nhanh và trở nên nguy hiểm.

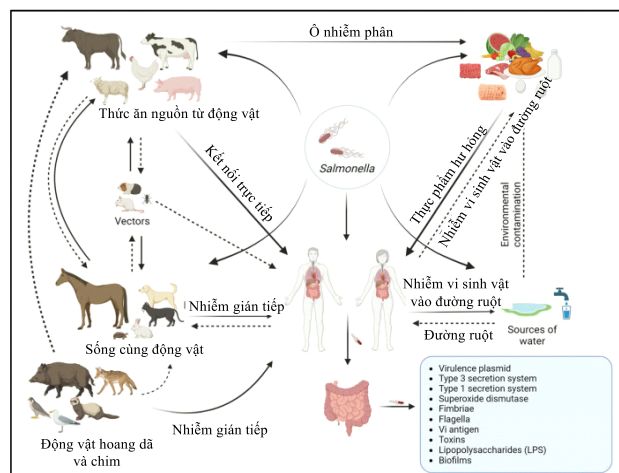
Đầu tiên, vi khuẩn sử dụng các cấu trúc bề mặt fimbriae và nhò roi để bám vào tế bào biểu mô ruột, sau đó vượt qua hàng rào niêm mạc và xâm nhập vào tế bào chủ [18]. Quá trình xâm nhập này chủ yếu được trung gian bởi hệ thống tiết type III (Type III Secretion System – T3SS) mã hóa bởi đảo gen gây bệnh SPI-1 [19], [20].

*Salmonella* sau khi xâm nhập tồn tại trong một không bào *Salmonella*-containing vacuole (SCV) và sử dụng hệ thống T3SS do SPI-2 mã hóa để điều chỉnh môi trường nội bào, ức chế sự hợp nhất giữa SCV và lysosome, từ đó tránh bị tiêu diệt và tiếp tục nhân lên trong tế bào [18], [21]. Các protein hiệu ứng của SPI-2 cũng tham gia duy trì cấu trúc và vị trí của SCV [21], [22].

*Salmonella* kích hoạt và điều hòa đáp ứng miễn dịch bằng cách kích thích sản xuất các cytokine tiền viêm như IL-1, IL-8 và IL-18, dẫn đến viêm tại niêm mạc ruột, tiêu chảy và tổn thương mô [18] [20], [22]. Ngoài ra, vi khuẩn có thể lan truyền qua các tế bào thực bào vào hệ tuần hoàn, gây nhiễm trùng toàn thân ở gan và lách [22].

### 1.2.1.3 Các nguồn lây nhiễm

*Salmonella* là một tác nhân gây bệnh truyền qua thực phẩm. Loại vi khuẩn này có thể tồn tại cả trong cơ thể động vật và ngoài môi trường tự nhiên. Đây là nguyên nhân chính gây ra nhiều bệnh lý đường tiêu hóa như thương hàn, phó thương hàn, viêm dạ dày - ruột cấp tính, nhiễm trùng máu và ngộ độc [23]. Nguồn lây nhiễm *Salmonella* thường xuất phát từ động vật đã mang vi khuẩn trước khi bị giết mổ. Khi bị nhiễm, vi khuẩn có mặt trong máu, thịt và đặc biệt tập trung ở các cơ quan nội tạng như gan, lá lách và ruột. Ở gia cầm nhiễm bệnh, *Salmonella* còn có thể tồn tại trong buồng trứng, khiến trứng bị nhiễm ngay từ khi được hình thành. Bên cạnh đó, đối với các loài như vịt, ngan, ngỗng, nếu trứng được để trong điều kiện vệ sinh kém, vi khuẩn cũng có thể xâm nhập qua vỏ trứng vào bên trong [24].

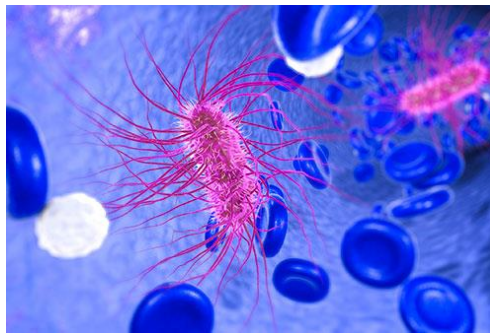


**Hình 1.2** Chu trình lây truyền *Salmonella* giữa động vật và con người [25]

## 1.2.2 *E. coli*

### 1.2.2.1 Đặc điểm sinh học

*E. coli* là vi khuẩn Gram âm, có kích thước trung bình khoảng 2–3  $\mu\text{m}$  x 0,5  $\mu\text{m}$ . Đa số các chủng *E. coli* không tạo nang rõ rệt, mặc dù một số chủng có thể mang kháng nguyên vỏ. Nhiều chủng có tiên mao, nhờ đó có khả năng di động [26]. Loại vi khuẩn này thường cư trú trong đường ruột của người và các loài động vật máu nóng. Một số chủng *E. coli* sinh độc tố Shiga (STEC) có thể gây bệnh truyền qua thực phẩm. Các chủng STEC có thể bị tiêu diệt khi thực phẩm được nấu chín kỹ, đảm bảo toàn bộ đạt nhiệt độ từ 70°C trở lên [27].



**Hình 1.3** Vi khuẩn *E. coli* [28]

### 1.2.2.2 Cơ chế gây bệnh

Trong các chủng gây ngộ độc thực phẩm, nhóm *E. coli* sinh độc tố Shiga (STEC) được nghiên cứu là nguy hiểm nhất do khả năng sản sinh độc tố Shiga – loại độc tố tác động trực tiếp lên các tế bào biểu mô ruột [27].

Bên cạnh đó, một số chủng *E. coli* khác như sinh độc tố ruột (ETEC) gây bệnh thông qua cơ chế tiết enterotoxin, làm tăng bài tiết nước và điện giải vào lòng ruột, từ đó gây tiêu chảy dạng nước và tình trạng mất nước nhanh [29]. Ngoài ra, nhiều chủng *E. coli* còn có khả năng bám dính chặt vào bề mặt tế bào ruột, phá hủy cấu trúc vi nhung mao, làm suy giảm khả năng hấp thu dưỡng chất và gây rối loạn chức năng tiêu hóa [30].

### 1.2.2.3 Các nguồn lây nhiễm

Nguồn lây nhiễm của *E. coli* trong ngộ độc thực phẩm chủ yếu bắt nguồn từ sự ô nhiễm phân trong chuỗi sản xuất và chế biến thực phẩm. Theo World Health Organization, gia súc, đặc biệt là bò, là ổ chứa tự nhiên của nhiều chủng

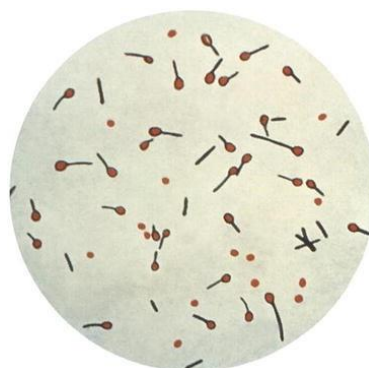
*E. coli* gây bệnh, và vi khuẩn có khả năng xâm nhập vào thực phẩm trong quá trình giết mổ hoặc xử lý thịt. Ngoài ra, rau sống và rau ăn lá cũng có nguy cơ cao khi bị tưới bằng nước nhiễm khuẩn hoặc tiếp xúc với phân bón hữu cơ chưa qua xử lý an toàn [27].

Bên cạnh thực phẩm, nước bị ô nhiễm cũng là một con đường lây truyền quan trọng. Nước uống không đảm bảo vệ sinh hoặc nguồn nước dùng trong chế biến thực phẩm có thể chứa *E. coli*, từ đó gây nhiễm khuẩn cho người tiêu dùng [30].

### 1.2.3 *Clostridium*

#### 1.2.3.1 Đặc điểm sinh học

Chi *Clostridium* bao gồm các vi khuẩn Gram dương, hình que, kỵ khí bắt buộc và có khả năng sinh bào tử. Đặc điểm nổi bật của nhóm vi khuẩn này là khả năng tạo bào tử có sức đề kháng cao với nhiệt, hóa chất và điều kiện bất lợi [31]. Khi gặp điều kiện thuận lợi, đặc biệt là môi trường yếm khí như trong thực phẩm đóng kín hoặc bảo quản không đúng cách, bào tử có thể nảy mầm và phát triển thành dạng hoạt động.



**Hình 1.4** Vi khuẩn *Clostridium spp.* [32]

#### 1.2.3.2 Cơ chế gây bệnh

*Clostridium botulinum* được xem là một trong những tác nhân gây ngộ độc thực phẩm phổ biến hàng đầu, theo Centers for Disease Control and Prevention của Mỹ. Người bệnh thường xuất hiện đau quặn bụng và tiêu chảy sau khi ăn thịt hoặc gia cầm đã nấu chín nhưng để ngoài môi trường quá lâu. Gây ngộ độc thực phẩm chủ yếu thông qua độc tố botulinum đã có sẵn trong thực phẩm. Bào tử của vi khuẩn có khả năng tồn tại trong môi trường khắc nghiệt và nảy mầm trong thực phẩm bảo quản kém hoặc trong môi trường

ky khí như đồ hộp, thực phẩm hút chân không. Khi độc tố được hấp thu vào cơ thể qua đường tiêu hóa, nó không bị phá hủy bởi dịch tiêu hóa. Toxin gắn vào các đầu tận cùng của neuron cholinergic, ngăn cản giải phóng acetylcholine tại synap thần kinh, dẫn đến chặn dẫn truyền xung thần kinh. Hậu quả là liệt mềm cơ, bắt đầu từ các cơ mặt, mắt, cổ rồi lan xuống chi và cơ hô hấp. Trong trường hợp nặng, bệnh nhân có thể tử vong do suy hô hấp nếu không được can thiệp kịp thời. Cơ chế này khiến *C. botulinum* trở thành một trong những tác nhân sinh học nguy hiểm nhất, và liều lượng cực nhỏ của toxin cũng đủ để gây bệnh nặng [33].

Trong khi đó, *C. perfringens* gây bệnh thông qua enterotoxin được sinh ra sau khi vi khuẩn nhân lên trong ruột. Bào tử và vi khuẩn có thể tồn tại trong thực phẩm nấu không kỹ hoặc để lâu ở nhiệt độ phòng. Enterotoxin là một loại protein tạo lỗ trên màng tế bào và gây chết tế bào niêm mạc ruột. Tổn thương này gây tiêu chảy, đau bụng và các triệu chứng viêm ruột. Ngoài enterotoxin (CPE), *C. perfringens* còn sinh ra nhiều loại độc tố khác như CPA, CPB, ETX, ITX, NetB, một số có tác dụng gây hoại tử mô và ảnh hưởng tới hệ miễn dịch bẩm sinh, làm bệnh lý nặng hơn trong các thể bệnh hiếm [34]

### **1.2.3.3 Các nguồn lây nhiễm**

Nguồn lây nhiễm của *C. botulinum* chủ yếu là thực phẩm bảo quản kém, đặc biệt là đồ hộp, thực phẩm hút chân không hoặc các sản phẩm lên men trong môi trường kỵ khí. Vi khuẩn này có thể tồn tại trong đất, nước và phân động vật, đồng thời dễ xâm nhập vào thực phẩm trong các công đoạn như thu hoạch, chế biến hoặc bảo quản. Việc nấu không đủ nhiệt hoặc đóng hộp không đúng quy trình tạo điều kiện cho bào tử nảy mầm và sinh độc tố. Do toxin đã có sẵn trong thực phẩm, người chỉ cần ăn một lượng nhỏ cũng có thể bị ngộ độc nghiêm trọng [33].

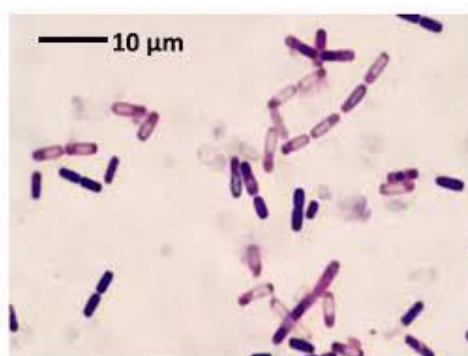
Với *C. perfringens*, nguồn lây thường liên quan đến thực phẩm động vật như thịt, gia cầm, nước sốt hoặc thực phẩm được nấu trước và giữ lâu ở nhiệt độ không an toàn. Bào tử tồn tại qua nấu nướng, khi thực phẩm để nguội hoặc hâm nóng không đúng cách, vi khuẩn sẽ nhân lên và sinh enterotoxin trong ruột người [34].

### 1.3 Tổng quan về chi *Bacillus* trong probiotic

#### 1.3.1 Khái quát về chi *Bacillus*

Chi *Bacillus* là nhóm vi khuẩn Gram dương, hình que, có khả năng sinh bào tử nội sinh và phân bố rộng rãi trong môi trường như đất, nước, không khí và đường tiêu hóa của động vật. Nhờ khả năng tạo bào tử, các loài thuộc chi *Bacillus* có khả năng chống chịu tốt với các điều kiện bất lợi như nhiệt độ cao, pH thấp, áp suất thẩm thấu lớn và tác động của các hóa chất khử khuẩn [35].

Trong những năm gần đây, các chủng *Bacillus* được quan tâm như một nguồn probiotic tiềm năng bên cạnh các vi khuẩn lactic truyền thống như *Lactobacillus* và *Bifidobacterium*. Một số loài được sử dụng phổ biến trong các chế phẩm probiotic bao gồm *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus licheniformis* và *Bacillus amyloliquefaciens* [36].



**Hình 1.5** Vi khuẩn *Bacillus* sp. [37]

#### 1.3.2 Đặc điểm hình thái và sinh lý

Các vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* thường có kích thước từ  $0,5\text{--}2,5\ \mu\text{m} \times 1,2\text{--}10\ \mu\text{m}$ , xuất hiện dưới dạng tế bào đơn lẻ hoặc chuỗi ngắn. Hầu hết các loài là vi khuẩn hiếu khí hoặc kỵ khí tùy nghi. Đặc điểm nổi bật nhất của chi này là khả năng hình thành bào tử nội sinh khi điều kiện môi trường không thuận lợi. Bào tử có cấu trúc đặc biệt giúp vi khuẩn tồn tại trong thời gian dài và phục hồi khi gặp điều kiện thích hợp [38].

Khả năng sinh bào tử mang lại lợi thế lớn cho các chế phẩm probiotic chứa *Bacillus*. Các bào tử có thể vượt qua môi trường acid của dạ dày và tác động của muối mật trong ruột non với tỷ lệ sống sót cao hơn so với nhiều vi khuẩn probiotic không sinh bào tử [39].

### 1.3.3 Cơ chế kháng khuẩn

#### Sinh tổng hợp chất kháng khuẩn

Các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* là nguồn vi sinh vật quan trọng trong nghiên cứu và ứng dụng trong công nghiệp, nông nghiệp, môi trường. *Bacillus* có khả năng sinh tổng hợp nhiều chất kháng khuẩn tự nhiên nhưng không phải kháng sinh, chúng ức chế vi khuẩn và nấm phổ rộng. Dưới đây, là một số loại hợp chất kháng khuẩn phổ biến từ *Bacillus* sp.

#### *Bacteriocin*

Bacteriocin là peptide hay protein được tổng hợp từ ribosome của vi khuẩn Gram dương hoặc Gram âm. Nhìn chung, phần lớn bacteriocin được tổng hợp từ vi khuẩn Gram dương và ghi nhận nhiều ở chi *Bacillus*. Với nguồn gốc tự nhiên, cấu trúc và chức năng đa dạng cùng khả năng bền nhiệt cao, bacteriocin được xem là một trong những “vũ khí” hiệu quả trong việc chống lại vi sinh vật. Bacteriocin làm thay đổi tính thấm của màng tế bào tạo ra lỗ thủng hoặc làm phân giải axit nucleic làm suy giảm chức năng bảo vệ của tế bào. Rất nhiều nghiên cứu, bài báo sử dụng bacteriocin như một chất bảo quản sinh học trong công nghiệp thực phẩm [40] [41] [42], một tác nhân phòng trừ sinh học trong nông nghiệp, hay là một hướng nghiên cứu tiềm năng [43].

#### *Bacitracin*

Bacitracin là loại kháng sinh polypeptid tự nhiên tổng hợp ở ribosome bởi hầu hết các vi khuẩn nhân sơ. Với đặc điểm kháng khuẩn rộng, hoạt tính mạnh và khả năng kháng thuốc thấp, do đó bacitracin được ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp.

Bacitracin, lần đầu tiên được phân lập từ *B. licheniformis* và *B. subtilis*, là một phức hợp kháng sinh cyclopeptide phổ rộng bao gồm các axit amin đa dạng, bao gồm histidine, asparagine, lysine, glutamate, leucine, valine, cysteine,... Kháng sinh chứa các thành phần khác bao gồm A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>. Trong đó, bacitracin A là loại có hoạt tính mạnh nhất, bởi vì ngăn chặn quá trình khử phosphoryl hóa undecaprenyl pyrophosphate (C55-PP) thành undecaprenyl phosphate (C55-P), ngăn chặn sự hình thành lipid I / II và cuối cùng là sự phá vỡ lớp peptidoglycan [44].

Bacitracin ức chế quá trình tổng hợp vỏ tế bào của vi khuẩn bằng cách tác động lên chức năng của các phân tử vận chuyển lipid qua màng tế bào, từ đó ngăn cản sự gắn kết của các amino acid và nucleotid vào cấu trúc vỏ. Ngoài ra, bacitracin còn gây tổn thương màng bào tương của vi khuẩn và, khác với penicilin, nó có khả năng tác động lên cả các thể nguyên sinh. Bacitracin có tác dụng đối với nhiều vi khuẩn Gram dương như *Staphylococcus*, *Streptococcus*, cầu khuẩn kỵ khí, *Corynebacterium* và *Clostridium*.

#### *Bacilysin*

Bacilysin là một loại kháng sinh dipeptide bao gồm L-alanine và L-anticapsin lần đầu tiên được phân lập từ *B. subtilis* A14 và *B. amyloliquefaciens* ZJU-2011. Bacilysin xâm nhập vào tế bào bằng cách liên kết với protein vận chuyển xuyên màng và sau đó được thủy phân thành anticapsin, một chất ức chế enzyme glucosamine-6-phosphate synthetase (G6PS). G6PS là một enzyme xúc tác sản xuất uridine diphosphate N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc), là tiền chất cho tổng hợp peptidoglycan. Do đó, ngăn chặn quá trình hình thành vách tế bào, bacilysin ức chế *E. coli* [45].

#### *Lantibiotics*

Lantibiotics là một kháng sinh peptide, được tổng hợp trên ribosome lớn, kích thước khoảng 3000 kDa, chứa thành phần acid amin đặc biệt như lanthionine và  $\beta$ -methyllanthionine. Lipid II là một chất trung gian peptidoglycan, được hình thành khi glycosyltransferase MurG xúc tác việc bổ sung N-acetylglucosamine (GlcNAc) vào lipid I [46]. Lantibiotics gắn vào lipid II, tạo vách ngăn hoặc lỗ hổng trên màng tế bào [47]. Thường ức chế mạnh trên các vi khuẩn Gram dương như *Staphylococcus aureus*.

#### *Halodurans*

Halodurans một loại kháng sinh loại II được phân lập từ *B. halodurans* C-125, nhắm mục tiêu vào vi khuẩn gram dương, kể cả các chủng kháng methycillin. Cấu trúc gồm có hai peptide đặc trưng hỗ trợ nhau Hal $\alpha$  và Hal $\beta$ . Hal $\alpha$  liên kết với lipid II trong phép đo cân bằng 2:1, ngăn chặn sinh tổng hợp peptidoglycan. Còn Hal $\beta$  liên kết với lipid anion của màng tế bào, dẫn đến sự hình thành kênh ion xuyên màng [48]. Đây là phát triển mới và ứng dụng trong bảo quản thực phẩm.



*Clostridium perfringens* [36]. Ngoài ra, các chủng *Bacillus* còn góp phần duy trì sự cân bằng hệ vi sinh đường ruột, tăng cường chức năng hàng rào biểu mô ruột và giảm nguy cơ mắc các rối loạn tiêu hóa [50].

#### **1.3.4.2 Ứng dụng trong tăng cường hệ miễn dịch**

Các nghiên cứu đã chứng minh rằng nhiều chủng *Bacillus* probiotic có khả năng điều hòa đáp ứng miễn dịch của vật chủ. Chúng kích thích hoạt động của đại thực bào, tế bào lympho và thúc đẩy sản xuất các cytokine tham gia vào cơ chế bảo vệ cơ thể trước các tác nhân gây bệnh [51]. Theo Ramirez-Olea và cộng sự (2022), việc bổ sung *Bacillus licheniformis* giúp cải thiện đáp ứng miễn dịch, giảm phản ứng viêm và hỗ trợ duy trì trạng thái cân bằng miễn dịch ở vật chủ. Nhờ đó, probiotic thuộc chi *Bacillus* được xem là một giải pháp tiềm năng trong việc nâng cao sức đề kháng và phòng ngừa bệnh tật.

#### **1.3.4.3 Ứng dụng trong hỗ trợ tiêu hoá và hấp thu dinh dưỡng**

Một đặc điểm nổi bật của các loài *Bacillus* là khả năng tiết nhiều enzyme ngoại bào như amylase, protease, lipase, cellulase và xylanase [52]. Những enzyme này tham gia vào quá trình phân giải carbohydrate, protein và lipid phức tạp thành các hợp chất đơn giản hơn, từ đó nâng cao hiệu quả tiêu hóa và khả năng hấp thu chất dinh dưỡng của vật chủ. Bên cạnh đó, các chủng *Bacillus* còn có khả năng sản xuất các acid hữu cơ và chất chuyển hóa có lợi, góp phần tạo môi trường thuận lợi cho sự phát triển của hệ vi sinh vật có lợi trong đường ruột [50].

#### **1.3.4.4 Ứng dụng trong thực phẩm chức năng và y học**

Nhờ khả năng tạo bào tử có độ bền cao, nhiều chủng *Bacillus* như *Bacillus clausii*, *Bacillus subtilis* và *Bacillus coagulans* đã được sử dụng trong các chế phẩm probiotic thương mại dành cho người [53]. Các chế phẩm này được ứng dụng trong hỗ trợ điều trị tiêu chảy liên quan đến kháng sinh, hội chứng ruột kích thích và các rối loạn tiêu hóa khác [54]. Ngoài ra, các nghiên cứu gần đây còn cho thấy tiềm năng của *Bacillus* trong việc hỗ trợ phòng ngừa các bệnh viêm nhiễm và duy trì cân bằng hệ vi sinh vật đường ruột ở người [55].

#### 1.3.4.5 Ứng dụng của chi *Bacillus* trong nông nghiệp

Chi *Bacillus* đóng vai trò quan trọng trong nông nghiệp bền vững nhờ khả năng hoạt động như vi khuẩn kích thích sinh trưởng thực vật (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria – PGPR). Các loài *Bacillus* có thể cải thiện sinh trưởng cây trồng thông qua nhiều cơ chế như hòa tan phosphate khó tan, cố định nitơ và sản xuất phytohormone như indole-3-acetic acid (IAA). Ngoài ra, chúng còn giúp cây tăng khả năng chịu stress sinh học và phi sinh học, bao gồm hạn hán, mặn và nhiệt độ cao [56], [57].

#### 1.3.4.6 Ứng dụng của chi *Bacillus* trong công nghiệp

Chi *Bacillus* là nguồn vi sinh vật quan trọng trong công nghệ sinh học và công nghiệp nhờ khả năng sản xuất đa dạng enzyme và các chất có hoạt tính sinh học. Các loài *Bacillus* có thể tiết ra nhiều enzyme ngoại bào như protease, amylase, cellulase và lipase, được ứng dụng rộng rãi trong các ngành công nghiệp thực phẩm, dệt may, sản xuất chất tẩy rửa và dược phẩm. Ngoài ra, chúng còn có khả năng tổng hợp các hợp chất hoạt tính sinh học như kháng sinh, peptide kháng khuẩn và biosurfactant, góp phần vào việc phát triển các sản phẩm sinh học thay thế hóa chất truyền thống. Đặc biệt, khả năng sinh trưởng nhanh và dễ nuôi cấy giúp *Bacillus* trở thành hệ thống sản xuất hiệu quả trong công nghiệp lên men. Những ưu điểm này làm cho chi *Bacillus* trở thành một trong những nhóm vi khuẩn được khai thác nhiều nhất trong sản xuất công nghiệp [58].

### 1.3.5 Tình hình nghiên cứu về chi probiotic *Bacillus* trong nước và thế giới

#### *Tình hình nghiên cứu trên thế giới*

Trong những năm gần đây, nghiên cứu về probiotic thuộc chi *Bacillus* đã có những bước tiến đáng kể, đặc biệt trong các nghiên cứu quốc tế. Nhiều công trình tập trung vào các loài như *B. clausii*, *B. coagulans* và *B. subtilis*, được phân lập từ môi trường tự nhiên như đất, thực phẩm lên men hoặc hệ vi sinh đường ruột người và động vật.

Theo Sadrimovahed và Ulusoy (2024), *B. clausii* là chủng sinh bào tử có khả năng chịu nhiệt, áp suất và môi trường acid, được nghiên cứu rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm và y sinh, tuy nhiên số lượng nghiên cứu chuyên sâu

vẫn còn hạn chế so với các probiotic truyền thống như *Lactobacillus* [59]. Tương tự, nghiên cứu của Liang và cộng sự (2024) cho thấy *B. coagulans* đã được đánh giá từ cấp độ hệ gen, cơ chế sinh học đến thử nghiệm ứng dụng, chứng minh khả năng điều hòa hệ vi sinh và tăng cường miễn dịch [50].

Các thử nghiệm lâm sàng đã được thực hiện, như nghiên cứu về *B. clausii* tổng hợp từ 13 thử nghiệm (2019–2024) cho thấy 10 nghiên cứu ghi nhận hiệu quả cải thiện rối loạn tiêu hóa và độ an toàn cao [60]. Ngoài ra, các nghiên cứu trên động vật *B. coagulans* có hiệu quả trong điều trị tiêu chảy và cải thiện sức khỏe đường ruột trong mô hình thực nghiệm [61].

#### *Tình hình nghiên cứu tại Việt Nam*

Nghiên cứu về vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* đã được quan tâm theo hướng ứng dụng trong bảo quản thực phẩm và kiểm soát vi sinh vật gây bệnh. Nguyễn Thị Thanh Thủy và cộng sự (2016) đã phân lập và nhận dạng các chủng *Bacillus subtilis* từ tương ớt Mường Khương, đồng thời đánh giá khả năng kháng khuẩn của chúng đối với nhiều vi khuẩn gây bệnh thực phẩm như *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Listeria monocytogenes* và *Staphylococcus aureus*. Kết quả cho thấy một số chủng *B. subtilis* có phổ kháng khuẩn rộng, cho thấy tiềm năng ứng dụng trong bảo quản thực phẩm theo hướng sinh học, góp phần hạn chế việc sử dụng chất bảo quản hóa học [62].

Đình Thị Hiền và Vũ Văn Hạnh (2025) đã phân lập và sàng lọc các chủng vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp bacteriocin từ thực phẩm lên men và ruột cá. Nghiên cứu ghi nhận sự hiện diện của các chủng *Bacillus* có khả năng tạo ra các hợp chất kháng khuẩn tự nhiên, ức chế hiệu quả các vi khuẩn gây bệnh như *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*. Kết quả này mở ra triển vọng ứng dụng các chủng *Bacillus* sinh bacteriocin trong bảo quản thực phẩm và phát triển các chế phẩm sinh học an toàn [63].

Đoàn Thị Thanh Lan và cộng sự (2025) đã đánh giá đặc tính an toàn của chủng *Bacillus subtilis* Eramic 25 trong điều kiện *in vitro* nhằm định hướng ứng dụng trong sản xuất thực phẩm bảo vệ sức khỏe. Kết quả nghiên cứu cho thấy chủng vi khuẩn này có các đặc tính an toàn sinh học phù hợp và tiềm năng phát triển thành chế phẩm probiotic [64].

Những nghiên cứu trên cho thấy xu hướng khai thác các chủng *Bacillus* không chỉ nhằm mục đích bảo quản thực phẩm mà còn hướng tới phát triển các sản phẩm thực phẩm chức năng và nâng cao chất lượng, an toàn thực phẩm tại Việt Nam. Tuy nhiên, chưa có bài báo công bố về phân lập các chủng *Bacillus* từ ruột lợn. Vì vậy, nghiên cứu này sẽ góp phần bổ sung các chủng *Bacillus* mới được phân lập có hoạt tính kháng khuẩn mạnh ứng dụng trong bảo quản và chế biến thực phẩm, góp phần thay thế một phần kháng sinh và hóa chất độc hại là hoàn toàn mới, cấp thiết và tính thời sự.

## Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Đối tượng nghiên cứu

#### 2.1.1 Chủng nghiên cứu

Các chủng vi khuẩn *Bacillus*: 12 chủng bacillus có ký hiệu như: Fz1, BSP1, Soma4, STNN5, SP1, BacA10, GM3, BSA, BacA12, M2b, BacB, PB2 thuộc bộ chủng giống vi khuẩn có lợi được phân lập từ ruột lợn được lưu giữ trong bộ chủng giống của phòng thí nghiệm Trung tâm nghiên cứu ứng dụng công nghệ sinh học biển và hệ gen.

Vi sinh vật kiểm định: *Escherichia coli* VTCCB-0482, *Salmonella enterica* VTCC-0480, *Clostridium perfringens* ATCC 13124 từ Bảo tàng Giống chuẩn Việt Nam (VTCC), Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội.

#### 2.1.2 Hoá chất và thiết bị

Các hóa chất sử dụng trong nuôi cấy và định tính, định lượng từ các hãng Sigma, Merk, Oxoid, Wako (Nhật Bản), Ấn Độ, Trung quốc và Việt Nam.

Thiết bị: Máy móc thiết bị sử dụng trong nghiên cứu đều thuộc Viện Sinh học – Viện Hàn Lâm KH và CN Việt Nam: Tủ cấy vô trùng (Mỹ), tủ ẩm (Đức), nồi khử trùng (Hirayama, Nhật Bản), máy lắc ổn nhiệt (Đức), tủ sấy (Trung quốc), máy đo quang phổ (Mỹ), kính hiển vi quang học (Nhật), tủ lạnh (Thái Lan), tủ lạnh -80°C (Nhật Bản), máy ly tâm lạnh (Đức), thiết bị cô mẫu (Mỹ), máy ly tâm lạnh (Mỹ), thiết bị lên men 10 lít (Nhật Bản), máy đông khô (Trung quốc), tủ sấy (Việt Nam) và các thiết bị cần thiết khác.

#### 2.1.3 Môi trường và dung dịch đệm

**Bảng 2.1.** Thành phần môi trường Luria-Bertani (LB-agar) (định lượng 1 lít)

STT	Môi trường LB agar		Môi trường LB – lỏng	
	Thành phần	Khối lượng (g)	Thành phần	Khối lượng (g)
1	Peptone	10	Peptone	10
2	NaCl	10	NaCl	10
3	Cao nấm men	5	Cao nấm men	5
4	Agar	18		

Môi trường thử hoạt tính enzyme amylase: Tinh bột 1%, agar 1,5%

Môi trường thử hoạt tính enzyme cellulase: CMC 1%, agar 1,5%

Môi trường thử hoạt tính enzyme lipase: Tributyrin 200  $\mu$ l, agar 1,5%

Môi trường thử hoạt tính enzyme protease: Casein 0,2%, agar 1,5%

Đệm PBS (Phosphate Buffered Solution):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.

## 2.2 Phương pháp nghiên cứu

### 2.2.1 Hoạt hoá và làm thuần chủng *Bacillus* phân lập từ ruột lợn

Các chủng giống được lấy ra từ tủ âm 20°C và để rã đông tự nhiên ở tủ mát 4°C. Sau khi mẫu rã đông hoàn toàn, tiến hành cấy rìa trên đĩa thạch LB (Luria-Bertani) chứa 1,8% agar để kiểm tra mức độ thuần chủng của giống. Đĩa cấy được ủ trong điều kiện 37°C trong 24 giờ. Sau thời gian nuôi cấy, tiến hành quan sát đặc điểm hình thái khuẩn lạc, màu sắc, mùi. Đồng thời thực hiện nhuộm Gram đối với các khuẩn lạc điển hình và soi dưới kính hiển vi ở vật kính dầu, độ phóng đại 400x, để xác định hình thái và tính chất Gram của vi khuẩn.

### 2.2.2 Định danh chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. chọn lọc bằng kỹ thuật sinh học phân tử

**Chuẩn bị sinh khối vi khuẩn:** Chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. chọn lọc có hiệu quả ức chế vi khuẩn gây bệnh cao nhất được nuôi cấy trong môi trường LB, lắc 180 vòng/phút, ở 37°C, qua đêm.

#### Tách DNA

Dịch huyền phù chủng vi khuẩn nghiên cứu được ly tâm 8.000 vòng/phút trong 5 phút loại bỏ dịch nổi thu sinh khối. Sau đó, cặn sinh khối được rửa lại bằng đệm PBS 1x.

DNA bộ gen được tách bằng kết tủa ethanol sau xử lý phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1 v/v), theo quy trình được mô tả của Sambrook, Psifidi có cải tiến [65], [66]. Hút 1 ml đệm lysis chứa 10 mM Tris HCl (pH = 7,5), 1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 0,2% SDS (w/v) và 1 mg proteinase K (Qiagen) được thêm vào sinh khối của vi khuẩn sau khi loại dịch nuôi, được ủ trong 1,5 giờ ở 56°C. Quá trình chiết của lysate được thực hiện hai lần với 1 ml phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1 v/v). Tiếp theo

bước chiết xuất đầu tiên, dịch nổi được xử lý bằng RNase A (10mg/ml, 4  $\mu$ L; Qiagen) và ủ ở 37°C trong 30 phút. Sau đó, việc chiết với phenol:chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1 v/v) được lặp lại.

Dịch nổi được rửa với 2,5 thể tích ethanol tuyệt đối và 0,1 thể tích natri axetat 3M (pH = 5,2). Hỗn hợp này được làm lạnh ở - 20°C trong 1,5 giờ. Tủa DNA được thu bằng cách ly tâm ở 12.000 x g, 10 phút, ở nhiệt độ phòng, tủa DNA được rửa hai lần bằng etanol 70%. Cuối cùng, DNA được làm khô và hoà lại trong TE buffer 1X.

**Đánh giá DNA:** Tính toàn vẹn của các mẫu DNA thu được kiểm tra thông qua điện di trên gel agarose 1% chạy trong đệm TAE 1x [67]. Thành phần mẫu tra vào giếng là 5  $\mu$ L của mỗi DNA được phân tích trong gel agarose 1% được nhuộm dung dịch EtBr.

**Khuếch đại gen 16S rRNA từ mẫu DNA tổng số:**

Từ khuôn DNA tổng số, bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi 27F & 1492R khuếch đại gen 16S rRNA của chủng chọn lọc. Sản phẩm PCR sau tinh sạch được dùng làm khuôn cho phản ứng đọc trình tự trực tiếp gen 16S rRNA.

Phản ứng PCR khuếch đại đoạn gen 16s rRNA

Trình tự cặp mồi 27F: (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1492R (5'-GGTTACCTTGTAAGACTT-3')

**Bảng 2.2 Thành phần phản ứng PCR**

Dung dịch	Thể tích ( $\mu$ l)
Master Mix	12,5
DNA khuôn (5ng/ $\mu$ l)	3
Primer F (10 ppm)	2
Primer R (10 ppm)	2
dH2O	5,5

**Bảng 2.3. Chu trình phản ứng PCR**

Nhiệt độ (°C)	Thời gian (phút)	Số chu kì
95	3	30
95	0,5	
56	0,25	
72	1	

72	5	
4	$\infty$	

Kiểm tra các sản phẩm PCR bằng điện di trên gel agarose 1% (dung dịch 50X TAE: 2ml, nước cất: 98ml, agarose: 1g) để ấm, bổ sung Redsafe theo tỉ lệ 1 $\mu$ l/15ml gel, đổ vào khuôn, đợi cho nguội và đặt tấm gel vào trong máy điện di, ngập trong 300ml dung dịch 1X TAE. Trộn 1  $\mu$ l dung dịch 6X loading buffer với 5  $\mu$ l mẫu trộn đều, nhỏ vào giếng. Chạy điện di bằng dòng điện một chiều với điện thế 100V, cường độ dòng điện 80mA trong 30 phút. Sau đó, quan sát mẫu trên máy soi gel.

### Giải trình tự gen 16S rRNA

Sản phẩm PCR được tinh sạch sử dụng kit Qiaquick của hãng Qiagen. Nồng độ DNA tinh sạch được đo trên máy quang phổ tại bước sóng 260nm. Với mỗi phản ứng giải trình tự, 2  $\mu$ g sản phẩm PCR tinh sạch được đưa vào các phản ứng khuếch đại sử dụng kit Bigdye terminator v3.1 theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Applied Biosystems). Với sản phẩm PCR, trình tự đoạn 16S DNA được phân tích với cặp mồi:

27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

1492R: 5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3'

Trình tự DNA được đọc trên máy giải trình tự 3100 Avant Genetic Analyzer sử dụng POP-6 polymer. Sắc ký đồ trình tự được kiểm tra và chỉnh sửa trên phần mềm Chrome Lite 2. Trình tự của 4 mồi 27F, 1492R, 780F, 920R được kết nối với phần mềm Clone Manager. Mức độ tương đồng về trình tự gen mã hóa ribosome 16S của các chủng nghiên cứu so với các chủng đã công bố ngân hàng gen được so sánh sử dụng công cụ tra cứu BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Mức độ tương đồng cao nhất về trình tự đoạn 16S rDNA của các chủng nghiên cứu so với chủng chuẩn đã được tra cứu sử dụng cơ sở dữ liệu Eztacon-e (<https://www.ezbiocloud.net/>)

### Xây dựng cây phát sinh chủng loại

Cây phát sinh được xây dựng dựa theo Kimura (1980) phương pháp của Saitou và Nei (1987). Phân hóa bootstrap được thực hiện từ 1000 lần lặp lại sao chép ngẫu nhiên, chỉ có những giá trị trên 50% được thể hiện. Mã số của ngân

hàng gen được ghi sâu tên loài. Phân tích trình tự gen *16S rRNA* dựng cây phát sinh chủng loại dựa trên các trình tự tham khảo của ngân hàng gen (NCBI) và các phần mềm BioEdit, Mega 12.

### 2.2.3 Đánh giá đặc tính sinh học của vi khuẩn *Bacillus* sp. chọn lọc trong điều kiện môi trường *in vitro*

#### ➤ Đánh giá khả năng gây tan huyết

Khả năng tan huyết của vi khuẩn được tiến hành kiểm tra trên môi trường thạch LB chứa 5% máu cừu. Sau 24 giờ nuôi cấy ở 37°C, hoạt tính tan máu của chủng nghiên cứu được đánh giá và phân loại dựa vào sự ly giải hồng cầu trong môi trường xung quanh khuẩn lạc. Tan máu alpha ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ) và gamma ( $\gamma$ ) xuất hiện dưới dạng màu xanh lục, trong và không có vùng rõ ràng xung quanh các khuẩn lạc tương ứng. Chủng tan máu  $\gamma$  được coi là an toàn [68].

#### ➤ Khả năng chịu axit và muối mật

Quy trình đánh giá khả năng chịu axit và muối mật được tiến hành theo phương pháp của Lee et al. có cải tiến [69]. Chủng vi khuẩn được cấy trên đĩa thạch LB, ủ ở 37°C trong 24 giờ. Khuẩn lạc của chủng từ đĩa thạch được cấy trong 10 ml LB lỏng, ủ ở 37°C, nuôi lắc 180v/p, qua đêm. Dịch nuôi cấy được tiến hành ly tâm 8000 vòng trong 10 phút loại bỏ dịch nổi. Rửa 2 lần bằng đệm PBS (pH 7,2), tái huyền phù trong LB pH 2, 3, 4. Pha loãng và cấy ở nồng độ  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  với PBS pH 7,2. Ủ 37°C sau 24 giờ, đếm khuẩn lạc sống sót. Đối với thí nghiệm chịu muối mật, tái huyền phù trong LB có bổ sung muối mật 0,1%; 0,3%; 0,5%. Ủ trong 3 giờ ở 37°C, lấy mẫu ở 1, 2, 3 giờ. Pha loãng và cấy ở nồng độ  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  với PBS pH 7,2. Ủ 37°C sau 24 giờ, đếm khuẩn lạc sống sót. Đối chứng dương là chủng vi khuẩn nghiên cứu nuôi trong môi trường LB lỏng. Chỉ tiêu theo dõi là tỷ lệ phần trăm sống sót của của vi khuẩn theo công thức:

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

#### ➤ Đánh giá độ nhạy cảm với kháng sinh

Thử nghiệm trên 8 loại kháng sinh thông thường để đánh giá độ nhạy cảm của chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. bằng phương pháp cấy quét dịch vi khuẩn ở

nồng độ xấp xỉ  $10^6$  cfu/ml trên đĩa thạch LB 1,8% agar có chứa kháng sinh. Các kháng sinh được sử dụng trong nghiên cứu này là: pencilin G, sulfunamide, oxytetracycline, amoxylin, tylosin, cefotaxin, streptomycin, ampicilin. Thử nghiệm ở các nồng độ là 3, 5, 10, 20  $\mu\text{g/ml}$ . Ủ ở nhiệt độ  $37^\circ\text{C}$  nuôi qua đêm [70].

### ➤ Khả năng bám dính

Khả năng bám dính của các chủng vi khuẩn được đánh giá thông qua các chỉ tiêu gồm tính kỵ nước bề mặt tế bào, khả năng kết tụ tự động và khả năng đồng kết tụ với vi khuẩn gây bệnh. Chuẩn bị chủng vi khuẩn được cấy trên đĩa thạch LB, ủ ở  $37^\circ\text{C}$  trong 24 giờ. Sau đó, một khuẩn lạc đơn được chuyển vào 50 mL môi trường LB lỏng và nuôi lắc qua đêm ở  $37^\circ\text{C}$ . Dịch huyền phù nuôi cấy được sử dụng tiến hành các thí nghiệm đánh giá khả năng bám dính như trình bày dưới đây.

#### *Tính kỵ nước*

Tính kỵ nước thực hiện theo Taheri et. al. [71] và phương pháp sửa đổi của Pérez-Sánchez et. al [72]. Đưa dịch huyền phù tế bào vi khuẩn về giá trị  $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,6$  ( $A_x$ ) bằng dung dịch NaCl 0,9% vô trùng. Cho 0,5 ml xylen vào 1,5 ml huyền phù tế bào vi khuẩn chọn lựa. Vortex mẫu đều trong 3 phút, ủ  $37^\circ\text{C}$  trong 2 giờ. Đo mật độ quang pha nước bước sóng 600 nm ( $A_t$ ).

$$\text{Độ kỵ nước (\%)} = \frac{A_x - A_t}{A_x} \times 100$$

Trong đó:  $A_x$ : Giá trị OD dịch huyền phù ban đầu đưa về 0,6 ở bước sóng 600nm

$A_t$ : Giá trị pha nước vi khuẩn sau khi ủ

#### *Khả năng tự đông tụ*

Khả năng tự đông tụ của chủng vi khuẩn được xác định theo phương pháp của Angmo et. al có cải tiến [73]. Huyền phù tế bào vi khuẩn được điều chỉnh đến mật độ quang  $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,6$  bằng dung dịch NaCl 0,9% vô trùng. Sau đó, lấy 4 mL huyền phù vi khuẩn và vortex trong 20 giây để phân tán đều tế bào. Mẫu được ủ tĩnh ở  $37^\circ\text{C}$  trong 6 giờ. Sau thời gian ủ, nhẹ nhàng hút phần dịch nổi phía trên và đo mật độ quang tại bước sóng 600 nm ( $A_t$ ). Giá trị mật độ quang ban đầu của huyền phù vi khuẩn trước khi ủ được ký hiệu là  $A_x$ .

$$\text{Khả năng tự đông tụ (\%)} = \frac{A_x - A_t}{A_x} \times 100$$

Trong đó:  $A_x$ : mật độ quang ban đầu của huyền phù vi khuẩn tại 600 nm

$A_t$ : mật độ quang của phần dịch nổi sau thời gian ủ tại 600 nm

#### *Khả năng đông kết tụ vi khuẩn*

Thí nghiệm đánh giá khả năng kết tụ vi khuẩn được thực hiện theo mô tả của Rokana N. et. al. [74]. Đưa dịch huyền phù tế bào vi khuẩn *Bacillus* và vi khuẩn gây bệnh nuôi lắ trong 18-20 giờ (*Salmonella* sp., *E. coli* và *Clostridium*) được đưa về giá trị  $OD_{600nm} = 0,6$  bằng dung dịch NaCl 0,9% vô trùng. Hút vào falcon 15 ml dịch huyền phù của hai đối tượng với tỷ lệ 1:1 (2 ml dịch vi khuẩn nghiên cứu : 2 ml dịch vi khuẩn gây bệnh), vortex 30 giây. Ủ  $37^\circ\text{C}$  trong 4 giờ, sau đó đo dịch nổi ở bước sóng 600nm.

$$\text{Đồng kết tụ (\%)} = (1 - 2(A_x + A_y)) * 100 / (A_x + A_y)$$

Trong đó:  $A_x$ : Giá trị OD dịch huyền phù vi khuẩn *Bacillus* ban đầu đưa về 0,6 ở bước sóng 600nm

$A_y$ : Giá trị OD dịch huyền phù vi khuẩn gây bệnh ban đầu đưa về 0,6 ở bước sóng 600nm

$A_{x+y}$ : Giá trị OD dịch nổi hỗn hợp sau khi ủ

### **2.2.4 Nghiên cứu điều kiện và thành phần môi trường lên men ảnh hưởng đến sinh khối và hoạt tính chủng vi khuẩn chọn lọc**

*\* Mục đích: chọn được điều kiện lên men (nhiệt độ, pH, tỷ lệ giống, thời gian,...) và thành phần của môi trường lên men (C, N, khoáng,...) phù hợp để chủng Bacillus chọn lọc cho hoạt tính kháng khuẩn mạnh và sinh khối cao.*

Các điều kiện nuôi cấy ban đầu của chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* BacA10 chọn lọc là trong môi trường lỏng LB pH 7, tỷ lệ tiếp giống 10%, lắ 180 vòng/phút,  $37^\circ\text{C}$ , sau 24 giờ để chọn điều kiện lên men thích hợp cho sinh khối và hoạt tính kháng khuẩn, sinh enzyme ngoại bào cao nhất.

#### **2.2.4.1 Khảo sát tỷ lệ tiếp giống**

Nghiên cứu ảnh hưởng tỷ lệ tiếp giống đến hoạt tính của *Bacillus* sp. tiến hành tiếp giống ở các tỷ lệ giống khác nhau 3%, 5%, 7%, 10%, 15% (v/v). Chúng nghiên cứu được nuôi trong điều kiện ở 37°C trong 24 giờ, pH 7, môi trường LB. Chọn tỷ lệ giống cho khả năng kháng khuẩn và sinh khối cao nhất dùng cho các thí nghiệm tiếp theo.

#### **2.2.4.2 Nghiên cứu pH ban đầu**

Nghiên cứu ảnh hưởng pH môi trường của *Bacillus* sp. khảo sát ở các ngưỡng khác nhau từ 5 đến 9 (bước nhảy là 1). Chúng nghiên cứu được nuôi trong điều kiện ở 37°C trong 24 giờ, pH 7, môi trường LB, tỷ lệ tiếp giống chọn ở mục 2.2.4.1. Chọn pH cho khả năng kháng khuẩn và sinh khối cao nhất dùng cho các thí nghiệm tiếp theo.

#### **2.2.4.3 Nghiên cứu nhiệt độ**

Nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy của *Bacillus* sp. Chúng được lên men ở các nhiệt độ khác nhau trong khoảng 25°C, 30°C, 37°C, 40°C trong 24 giờ. Chúng nghiên cứu được nuôi trong điều kiện ở 37°C trong 24 giờ, môi trường LB, tỷ lệ tiếp giống chọn ở mục 2.2.4.1, pH môi trường ban đầu chọn ở mục 2.2.4.2. Chọn nhiệt độ lên men cho sinh khối và hoạt tính kháng khuẩn cao nhất cho các nghiên cứu tiếp theo.

#### **2.2.4.4 Khảo sát thời gian nuôi**

Thời gian khảo sát ở các ngưỡng thời gian khác nhau từ 6h, 12h, 18h, 24h, 30h, 36h, 42h, 48h. Chúng nghiên cứu được nuôi trong môi trường LB, tỷ lệ tiếp giống chọn ở mục 2.2.4.1, pH môi trường ban đầu chọn ở mục 2.2.4.2, nhiệt độ nuôi cấy chọn ở mục 2.2.4.3. Chọn thời gian lên men cho khả năng kháng khuẩn và sinh khối cao nhất dùng cho các thí nghiệm tiếp theo.

#### **2.2.4.5 Nghiên cứu các nguồn cacbon, nitrogen, khoáng**

Sử dụng điều kiện lên men được lựa chọn ở mục 2.2.4.1, 2.2.4.2, 2.2.4.3, 2.2.4.4 để nuôi cấy chủng vi khuẩn nghiên cứu. Tiếp tục tiếp hành nghiên cứu về thành phần nguồn dinh dưỡng và nồng độ thích hợp.

Nguồn cacbon được khảo sát gồm: glucose, lactose, maltodextrin, tinh bột, saccharose, rỉ mật,... Bổ sung 2% (w/v) các nguồn cacbon khác nhau này vào

môi trường LB cơ bản lỏng. Sau đó, tiến hành khảo sát nồng độ cacbon lựa chọn ở 1%; 1,5%; 2%; 2,5%; 3%.

Các nguồn nitrogen được khảo sát gồm: peptone, trytone, cao nấm men, ure,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,... Bổ sung 1% (w/v) các nguồn nitrogen khác nhau này vào môi trường LB lỏng, bổ sung nồng độ nguồn cacbon đã chọn được. Sau đó, tiến hành khảo sát nồng độ nito lựa chọn ở 0,5%; 1%; 1,5%; 2%.

Các nguồn khoáng được khảo sát gồm:  $\text{NaCl}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MnSO}_4$ . Bổ sung 0,2% (w/v) các nguồn khoáng khác nhau này vào môi trường LB lỏng, bổ sung nồng độ nguồn cacbon và nồng độ nguồn nitrogen đã chọn được. Sau đó, tiến hành khảo sát nồng độ khoáng lựa chọn ở 0,1%; 0,2%; 0,3%; 0,4%; 0,5%.

**Chỉ tiêu theo dõi:** Giá trị mật độ tế bào cfu/ml, OD 600nm, đường kính vòng kháng khuẩn của vi khuẩn gây bệnh và đường kính vòng phân giải cơ chất trong môi trường.

Điều kiện nuôi cấy của chủng chọn lọc trong các thí nghiệm về nghiên cứu ảnh hưởng của nguồn C, N, khoáng được tiến hành tại điều kiện tối ưu nhất đã tìm được như: pH, nhiệt độ, tỷ lệ giống, thời gian lên men, ...

## 2.2.5 Phương pháp phân tích

### 2.2.5.1 Phương pháp kiểm tra hoạt tính kháng khuẩn bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch

Khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh được thực hiện bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch Kirby-Bauer có cải tiến [75]. Dịch nuôi vi khuẩn kiểm định ( $10^6$  CFU/mL) canh đều lên đĩa thạch LB vô trùng. Sử dụng cây đục lỗ giống với đường kính 6 mm đục trên đĩa thạch.

Dịch huyền phù tế bào vi khuẩn nghiên cứu được ly tâm 8000 vòng/phút trong 10 phút. Dùng micropipette hút lấy phần dịch nổi phía trên và nhỏ  $60 \mu\text{l}$  dịch nổi vi khuẩn đã loại bỏ tế bào vào mỗi giếng đã đục ở  $37^\circ\text{C}$  trong 24 giờ. Đường kính vòng kháng khuẩn được đo bằng mm.

Hoạt tính được đánh giá qua hiệu số:

$$D-d \text{ (mm)}$$

Trong đó: D là đường kính vòng kháng khuẩn (mm), d là đường kính lỗ thạch

### 2.2.5.2 Phương pháp kiểm tra hoạt tính sinh enzyme ngoại bào bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch

Đánh giá khả năng kháng khuẩn được thực hiện theo mô tả của Nguyễn Lâm Dũng và cộng sự (2007) [76] có cải tiến. Phương pháp này được thực hiện theo cách nuôi cấy trên môi trường sinh enzyme và khuếch tán dịch nuôi trên đĩa thạch chứa cơ chất tương ứng 0,2% casein, 0,2% CMC, 0,2% tinh bột tan, 0,2% tributyrin. Dịch lên men ly tâm ở 10000 vòng/phút, thu dịch nổi tiến hành khảo sát hoạt tính khả năng thủy phân cơ chất. Hoạt tính sinh tổng hợp enzyme phân giải được kiểm tra bằng phương pháp đục lỗ thạch trên nền môi trường có chứa cơ chất cho từng loại enzyme amylase, cellulase và protease. Dịch nuôi vi khuẩn (50  $\mu$ l) được cho vào giếng đục trên đĩa thạch, ủ qua đêm ở 37°C, nhuộm màu bề mặt môi trường thạch và đo kích thước đường kính vòng thủy phân cơ chất ( $\Delta=D-d$ ) (mm), trong đó D là đường kính vòng thủy phân, d là đường kính giếng đục trên đĩa thạch (6 mm),  $\Delta$  hoạt tính phân giải cơ chất thực.

**Amylase:** Môi trường xác định hoạt tính amylase sử dụng tinh bột tan, agar 1,5%, ủ ở 37°C qua đêm. Sau đó nhuộm màu bằng thuốc thử Lugol (thành phần bao gồm I<sub>2</sub> 0,05 g + KI 2,65 g pha đủ 100 mL nước cất) trong vòng 5 phút và đo đường kính vòng thủy phân.

**Cellulase:** Môi trường xác định hoạt tính cellulase sử dụng CMC, agar 1,5%, ủ ở 37°C qua đêm. Sau đó nhuộm màu bằng thuốc thử Lugol trong vòng 5 phút và đo đường kính vòng thủy phân.

**Protease:** Môi trường xác định hoạt tính protease là casein, agar 1,5%. Casein được hoà tan trong dung dịch đệm PBS pH 7 trước xong thêm agar, ủ ở 37°C qua đêm. Sau đó nhuộm màu bằng TCA 25% trong vòng 10 phút và đo đường kính vòng thủy phân.

**Lipase:** Môi trường xác định hoạt tính lipase là tributyrin, agar 2%, ủ ở 37°C qua đêm. Sau đó nhuộm màu bằng thuốc thử Lugol trong vòng 5 phút và đo đường kính vòng thủy phân.

### 2.2.5.3 Xác định mật độ tế bào bằng phương pháp đếm khuẩn lạc

Phương pháp xác định mật độ (CFU/mL) vi khuẩn *Bacillus* sau khi nuôi cấy ở các điều kiện khác nhau sẽ được chuẩn độ CFU/mL như sau: Chuẩn bị dãy bao gồm 8 ống Effpendoft chứa sẵn 0,9 ml dung dịch nước NaCl 0,9% vô trùng. Hút 0,1 ml dung dịch vi khuẩn cần chuẩn độ đồng nhất trong ống thứ nhất để có

nồng độ pha loãng  $10^{-1}$ . Dùng pipet hút tiếp 0,1 ml mẫu chuyển qua ống tiếp theo để có nồng độ pha loãng  $10^{-2}$ . Thực hiện thao tác tương tự cho đến nồng độ pha loãng  $10^{-8}$ . Tại ba mức pha loãng cuối, mỗi mức pha loãng lần lượt hút 0,1 ml dung dịch và phủ đều lên môi trường thạch đĩa LB (thí nghiệm lặp lại 3 lần), ủ trong tủ ấm ở nhiệt độ  $37^{\circ}\text{C}/24$  giờ. Đếm số lượng khuẩn lạc trong mỗi đĩa, chọn hai đĩa có mức pha loãng gần nhau có số lượng khuẩn lạc đếm được từ 30-300 và tính số CFU/mL có trong dung dịch nuôi cấy tăng sinh ban đầu. Công thức tính CFU/mL theo TCVN 4884-1 (2015).

$$X = \frac{\Sigma C}{(n_1 + 0,1n_2)vd}$$

Trong đó:

X: số lượng vi khuẩn trong 1 ml dịch mẫu

C: tổng số khuẩn lạc đếm được trên đĩa thạch

$n_1, n_2$ : số đĩa nuôi cấy ở hai mức pha loãng liên tiếp xuất hiện khuẩn lạc đếm được ( $n_1$  là pha trước,  $n_2$  là pha sau)

v: thể tích dịch mẫu cấy nhỏ trên 1 đĩa (mL)

d: hệ số pha loãng tương ứng mức pha loãng thấp hơn trong 2 mức pha loãng liên tiếp.

### 2.2.6 Phương pháp xử lý số liệu

Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, dữ liệu thô được xử lý bằng Microsoft Excel. Kết quả được thể hiện ở dạng trung bình (Mean)  $\pm$  sai số (SD) và đồ thị sử dụng trên phần mềm GraphPad Prism 8.

Số liệu được xử lý bằng phương pháp phân tích phương sai một nhân tố (One-way ANOVA). Khi có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $P < 0,05$ ), phép thử Tukey HSD được sử dụng để so sánh trung bình giữa các nghiệm thức.

### Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1 Sàng lọc chủng có khả năng kháng khuẩn tiềm năng

Mười hai chủng vi khuẩn *Bacillus* khả năng kháng *Salmonella enterica* (*S. enterica*), *Escherichia coli* (*E. Coli*), *Clostridium perfringens* (*C.perfringens*) từ ruột lợn được dùng trong nghiên cứu. Các chủng *Bacillus* này có tiềm năng trong việc định hướng phát triển chế phẩm sinh học nhằm kiểm soát vi khuẩn có hại xâm nhập vào thực phẩm và nâng cao hệ miễn dịch đường tiêu hoá cho người tiêu dùng.

Bên cạnh đó, việc phân lập các chủng vi khuẩn từ ruột lợn, góp phần khai thác các chủng mới có khả năng sinh trưởng mạnh và hoạt tính sinh học (kháng khuẩn, sinh enzyme) cao. Trong nghiên cứu này, các chủng vi khuẩn lựa chọn được sàng lọc hoạt tính kháng khuẩn. Kết quả nghiên cứu nhằm mục tiêu chọn ra ít nhất chủng vi khuẩn có có khả năng sinh tổng hợp các chất kháng khuẩn mạnh nhất.

Lựa chọn mười hai chủng vi khuẩn được phân lập từ ruột lợn khoẻ mạnh được nuôi trong môi trường LB lỏng trong điều kiện bao gồm tỷ lệ giống ban đầu là 10% trong 24 giờ ủ ở 37°C. Ly tâm thu dịch nổi nhỏ vào giếng được đục trên đĩa thạch LB đã phủ vi khuẩn gây bệnh *S. enterica*, *E. coli* và *C. perfringens* trên bề mặt đĩa thạch.

**Bảng 3.1** Hoạt tính kháng khuẩn của 12 chủng vi khuẩn nghiên cứu

STT	Kí hiệu chủng	Đường kính vòng kháng khuẩn (D-d, mm)		
		<i>S. enterica</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. perfringens</i>
1	Fz1	10,77±0,04 <sup>c</sup>	-	+
2	BSP1	11,47±0,09 <sup>b</sup>	-	+
3	<b>BacA10</b>	<b>13,17±0,16<sup>a</sup></b>	<b>4,6±0,14<sup>a</sup></b>	<b>1,47±0,2</b>
4	STNN5	-	2,9±0,29 <sup>c</sup>	+
5	SP1	10,07±0,09 <sup>d</sup>	3,03±0,12 <sup>c</sup>	-
6	BacA12	10,73±0,09 <sup>c</sup>	2,63±0,05 <sup>c</sup>	+
7	GM3	+	4±0,05 <sup>b</sup>	-
8	BSA	5,33±0,17 <sup>f</sup>	4±0,05 <sup>b</sup>	-
9	Soma4	5,87±0,09 <sup>e</sup>	4,36±0,09 <sup>ab</sup>	+
10	M2b	5,03±0,05 <sup>f</sup>	-	-

11	BacB	+	-	-
12	PB2	+	1,97±0,12 <sup>d</sup>	+

Ghi chú: (-) không có hoạt tính kháng khuẩn; (+) có dấu hiệu kháng khuẩn, xuất hiện vòng sáng xung quanh lỗ thạch từ 5-7 mm. Trong cùng một cột, các giá trị mang chữ cái khác nhau (a, b, c, ...) biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức  $P < 0,05$  theo phép thử Tukey HSD.

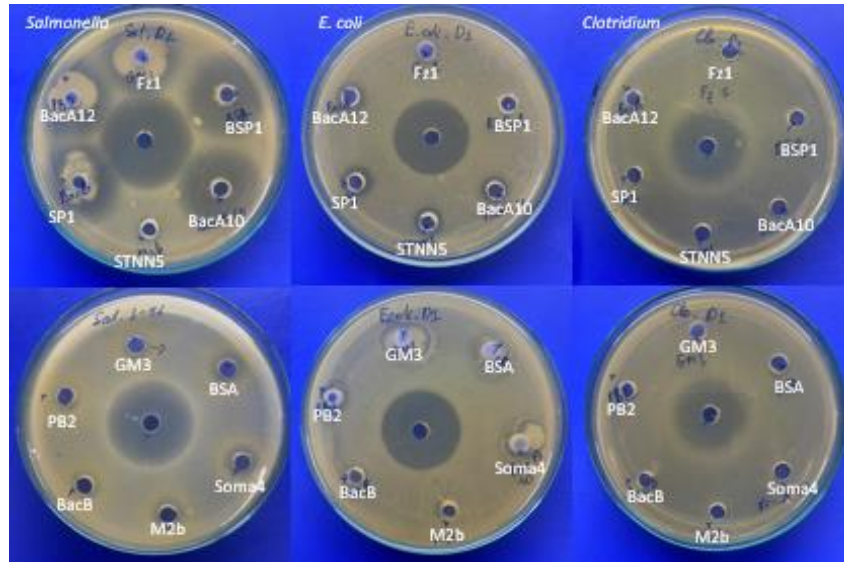
Kết quả từ bảng 3.1 và hình 3.1 cho thấy, có 11/12 chủng kháng *S. enterica*, 8/12 chủng kháng *E. Coli* và đối với *C. perfringen* là 7/12 chủng. Dựa vào kích thước đường kính vòng kháng khuẩn, có thể phân loại các chủng vi khuẩn thành các mức khác nhau.

Đối với kháng *S. enterica*, 2 chủng (BSP1 và BacA10) kháng mức cao (11,47±0,09 đến 13,17±0,16 mm), mức khá có 3 chủng (10,07±0,09 đến 10,77±0,04 mm), mức trung bình có 3 chủng (5,03±0,05 đến 13,17±0,16 mm) và mức thấp chỉ xuất hiện vòng sáng có 3 chủng.

Đối với khả năng kháng *E. coli*, có 4 chủng mức cao (4±0,05 đến 4,6±0,14 mm), có 3 chủng mức trung bình (2,63±0,05 đến 3,03±0,12 mm) và có 1 chủng mức thấp là 1,97±0,12 mm. Chỉ có chủng BacA10 thể hiện vòng kháng khuẩn rõ ràng đối với *C. perfringen* là 1,47±0,2 mm, còn 6 chủng còn lại chỉ có dấu hiệu vòng sáng quanh giếng.

Từ kết quả phân tích, nhận thấy rằng chủng vi khuẩn BacA10 thể hiện hoạt tính tốt nhất trên cả 3 chủng vi khuẩn định. Cụ thể, đường kính vòng ức chế với *S. enterica*, *E. Coli*, *C. perfringen* lần lượt là 13,17±0,16 mm, 4,6±0,14 mm, 1,47±0,2 mm. Kết quả khác biệt có ý nghĩa về thống kê so với các chủng còn lại ( $p < 0,05$ ).

Với mục tiêu chọn ra 01 chủng vi khuẩn có hoạt tính tốt nhất từ thí nghiệm sàng lọc, kiểm tra khả năng kháng khuẩn bước đầu. Từ kết quả nghiên cứu lựa chọn chủng vi khuẩn BacA10 có tiềm năng sinh tổng hợp các hợp chất kháng khuẩn. Chủng vi khuẩn BacA10 được tiếp tục nghiên cứu về một số đặc tính sinh học probiotic.



**Hình 3.1** Vòng kháng khuẩn của 12 chủng vi khuẩn *Bacillus* được dùng trong nghiên cứu

### 3.2 Định danh chủng vi khuẩn lựa chọn

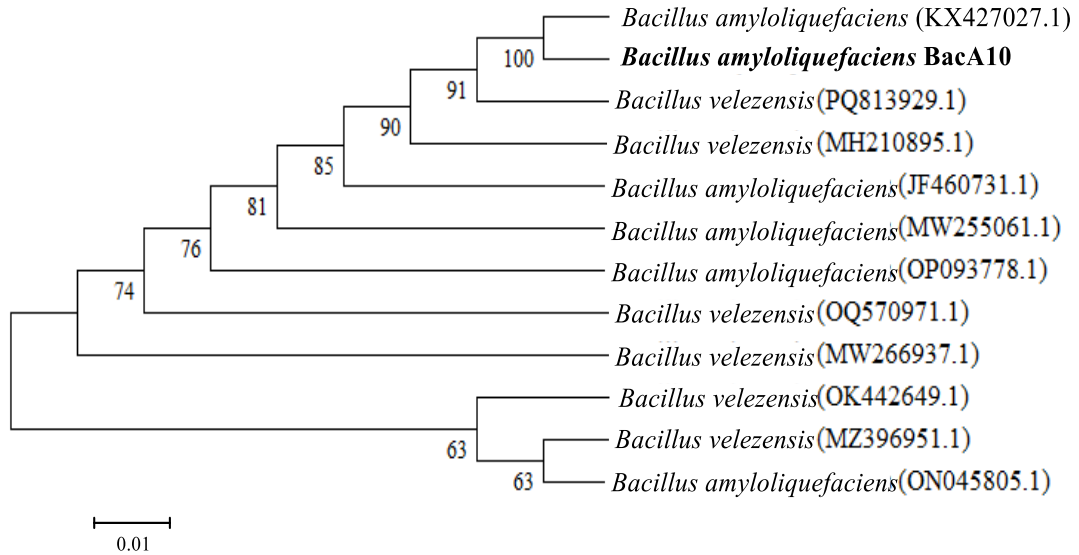
Chủng vi khuẩn BacA10 lựa chọn được định danh bằng giải trình tự 16S rRNA. DNA tổng số của chủng vi khuẩn nghiên cứu được tách chiết và sử dụng cặp mồi đặc hiệu 27F/1492R để khuếch đại gen. Sản phẩm sau khi chạy PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%, kết quả quan sát thấy chỉ có 1 băng duy nhất có kích thước khoảng 1500 bp.

Sử dụng phần mềm BioEdit để cắt nối đoạn bp có phần tín hiệu nhiễm hai đầu mạch. Phân tích và so sánh trình tự 16 rRNA của chủng BacA10 được so sánh với một số trình tự khác đã công bố trên GenBank bằng phần mềm Blast (NCBI) trực tuyến. Kết quả cho thấy chủng BacA10 có quan hệ gần gũi với với chủng *Bacillus amyloliquefaciens* và *Bacillus velezensis*. Đây là 2 chủng thuộc nhóm *Bacillus subtilis species complex*, là nhóm vi khuẩn có mức độ bảo tồn cao về trình tự gen 16S rRNA.

Phân tích số liệu bằng phần mềm Mega 12 cho thấy trình tự nucleotide của chủng BacA10 có độ tương đồng trong khoảng 96,12 đến 99,93% với các chủng thuộc chi *Bacillus* lựa chọn. Cụ thể, chủng BacA10 thể hiện mức độ tương đồng cao nhất 99,93% với chủng *Bacillus amyloliquefaciens* (mã số GenBank: KX427027.1)

Xây dựng cây phân loại của chủng vi khuẩn BacA10 trên phần mềm Mega 12, kết quả thể hiện qua hình 3.2. Sử dụng phương pháp neighbor-joining với số lần sao chép bootstrap = 1000. Trên hình 3.2 cho thấy, chủng BacA10 nằm

cùng nhánh với chủng *Bacillus amyloliquefaciens*, với giá trị bootstrap cao đánh giá được độ tin cậy của kết quả cây phân loại. Đặt tên chủng vi khuẩn BacA10 là *Bacillus amyloliquefaciens* BacA10.



**Hình 3.2** Cây phát sinh chủng loại chủng vi khuẩn lựa chọn

Như vậy, có thể xác định được chủng vi khuẩn nghiên cứu thuộc chi *Bacillus* thông qua đánh giá về đặc điểm hình thái và phân tích trình tự gen 16S rRNA. *Bacillus* là chi được nghiên cứu probiotic ứng dụng rộng rãi nhằm mục đích tạo ra chế phẩm sinh học giúp hỗ trợ và tăng cường hệ miễn dịch hoặc kiểm soát sự xâm nhập của vi khuẩn gây bệnh trong thực phẩm. Nhờ vào khả năng tạo bào tử giúp chúng thích nghi được trong điều kiện môi trường khắc nghiệt. Do đó, để đánh giá tiềm năng của chủng vi khuẩn lựa chọn, nghiên cứu tiếp tục đánh giá một số thí nghiệm probiotic nhằm làm rõ đặc tính của chủng.

### 3.3 Nghiên cứu đặc điểm sinh học probiotic của chủng vi khuẩn lựa chọn trong thí nghiệm *in vitro*

Theo hướng dẫn của FAO/WHO, một chủng probiotic được lựa chọn cần đáp ứng các tiêu chí cơ bản, bao gồm tính an toàn, khả năng tồn tại trong các điều kiện khắc nghiệt của đường tiêu hóa và khả năng bám dính lên biểu mô ruột. Trong khuôn khổ đề tài này, tính an toàn của các chủng được đánh giá thông qua khả năng gây tan huyết và mức độ kháng kháng sinh. Khả năng chịu đựng các điều kiện bất lợi trong đường tiêu hóa được xác định dựa trên tính chịu acid và muối mật. Bên cạnh đó, khả năng bám dính của các chủng được nghiên cứu thông qua các chỉ tiêu như tính kỵ nước bề mặt tế bào, khả năng tự

kết tụ và khả năng đồng kết tụ với vi khuẩn gây bệnh. Kết quả của các thí nghiệm được trình bày chi tiết trong các mục dưới đây.

### 3.3.1 Khả năng tan huyết của chủng vi khuẩn chọn lựa

Thử nghiệm hoạt động tan máu là một chỉ tiêu quan trọng trong đánh giá an toàn sinh học cơ bản của các chủng vi khuẩn, đặc biệt khi định hướng ứng dụng trong probiotic cho con người hoặc động vật. Khả năng gây tan huyết phản ánh mức độ tương tác của vi khuẩn với tế bào hồng cầu, dựa vào đó có thể đánh giá gián tiếp tiềm năng gây độc. Theo kết quả thể hiện ở hình 3.3 cho thấy, chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* BacA10, xung quanh khuẩn lạc không xuất vùng trong suốt hoặc hoặc xanh lục trên đĩa thạch máu. Vì vậy, chủng *Bacillus amyloliquefaciens* BacA10 không gây tan máu, được lựa chọn cho nghiên cứu tiếp theo.



**Hình 3.3** Hình ảnh khuẩn lạc vi khuẩn không gây tan máu

### 3.3.2 Khả năng chịu axit và muối mật

Thử nghiệm chịu axit và muối mật là một trong những tiêu chí quan trọng để đánh giá tiềm năng sản xuất chế phẩm probiotic của vi khuẩn, đặc biệt là các chủng vi khuẩn có lợi thuộc chi *Bacillus*. Trong điều kiện thực tế, vi khuẩn khi đi qua đường tiêu hoá phải đối mặt với môi trường pH rất thấp của dạ dày và sự hiện diện của muối mật tại ruột non, đây là những hàng cản gây tổn thương màng tế bào và làm giảm khả năng sống sót của chủng vi khuẩn. Vì vậy, khả năng chịu axit và muối mật được xem là điều kiện tiên quyết để vi khuẩn có thể tồn tại, định cư và phát huy các chức năng sinh học trong cơ thể vật chủ [77]. Đặc tính của vi sinh vật được thể hiện khi chúng có thể tồn tại và thích nghi với

điều kiện (muối mật, pH acid) sau 3 giờ xử lý. Đây là thời gian thức ăn được tiêu hóa trong ruột non sau ăn.

**Bảng 3.2** Thử nghiệm khả năng chịu muối mật và axit dạ dày

Dịch mô phỏng	Tỷ lệ sống sót sau 1 giờ (%)	Tỷ lệ sống sót sau 2 giờ (%)	Tỷ lệ sống sót sau 3 giờ (%)
Muối mật 0,1%	48,67±1,25	57,63±1,7	61,32±0,47
Muối mật 0,3%	58±1,89	63,45±0,82	66,84±1,25
Muối mật 0,5%	48,67±1,25	38,75±0,94	26,28±0,47
pH 2	41,35±0,47	29,47±2,16	18,54±2,45
pH 3	67,11±0,47	50,42±1,85	26,43±1,46
pH 4	82,7±1,88	71,97±0,97	57,74±0,86
Đối chứng	100±1,63	100±0,47	100±1,24

Dựa vào kết quả bảng 3.2, chủng *Bacillus amyloliquefaciens* BacA10 có tỷ lệ sống tăng dần đến 0,3% và giảm ở 0,5%. Điều này chứng minh rằng, chủng vi khuẩn hoàn toàn có thể thích nghi và sinh trưởng tốt trong hệ tiêu hoá ở 0,3%. Sau 1 giờ ủ, mật độ tế bào tăng chậm, thay đổi không đáng kể. Theo Q. D. Tinh và cộng sự (2013) điều này đúng khi nghiên cứu về vi khuẩn probiotic [78]. Sự hiện diện của muối mật trong mẫu có tác động khác nhau, dữ liệu nghiên cứu được nghiên cứu qua phần trăm tỷ lệ sống sót của vi khuẩn. Những giờ đầu, mật độ vi sinh vật tăng lên chậm là do hệ vi sinh vật đang trong pha thích nghi với môi trường chứa muối mật, nó tác động đến tế bào vi sinh vật làm hạn chế sự phát triển của chúng. Nhưng sau đó, tốc độ phát triển tăng dần do một số enzyme được tiết ra trên màng tế bào vi khuẩn có khả năng trung hoà' thủy phân muối mật bằng cách cắt đứt liên kết N-actyl giữa gốc steroid và chuỗi amino axit bên của axit mật. Ở nồng độ 0,5% muối mật vi khuẩn giảm dần. Điều này cho thấy, 0,5% muối mật là giới hạn của vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* BacA10, kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Minh Tan Pham et al [68].

Về khả năng chịu pH thấp, ở ngưỡng pH 2 chủng vẫn còn tồn tại, tỷ lệ sống sót giảm theo thời gian. Bên cạnh đó, pH 4 chủng khả năng phát triển tốt tỷ lệ sống sót giảm nhẹ sau 3 giờ. Khi dạ dày ở trạng thái nghỉ duy trì mức pH 4, chỉ khi tiêu hoá độ acid của dạ dày mới giảm xuống mức pH 2 và 3. Do đó, có thể khẳng định rằng chủng BacA10 có khả năng thích nghi và sinh trưởng

trong điều kiện môi trường pH (2-4) khắc nghiệt. Là chủng tiềm năng để tiếp tục nghiên cứu và khai thác.

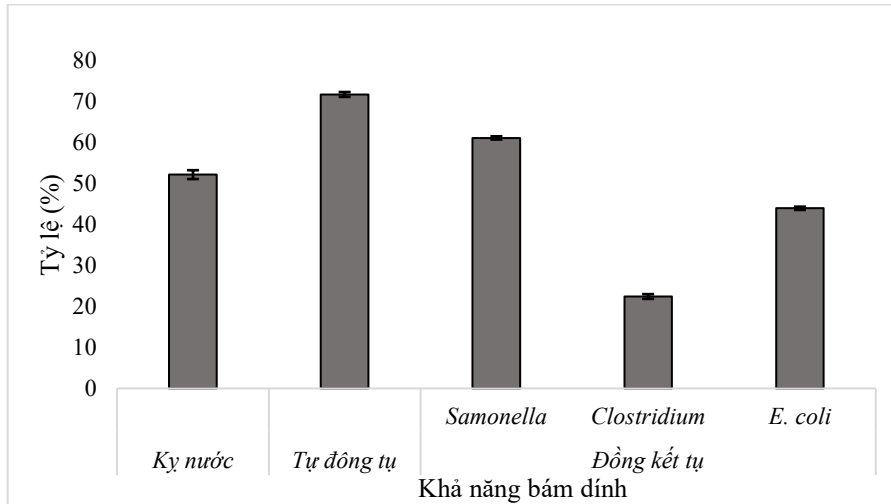
### 3.3.3 Khả năng bám dính

Thử nghiệm về tính kỵ nước là nghiên cứu vi khuẩn có thể được sử dụng để tìm ra khả năng bám dính của chủng thử nghiệm vào tế bào ruột. Đây là một đặc điểm cần thiết giúp nuôi cấy probiotic xâm chiếm và điều chỉnh hệ miễn dịch của vật chủ [79]. Vi khuẩn probiotic phải đối mặt trong đường tiêu hoá như ngăn ngừa bị loại bỏ trong quá trình nhu động ruột và có hiệu quả về chức năng cân bằng đường ruột [80]. Kết quả nghiên cứu thể hiện ở hình 3.4, tỉ lệ kỵ nước của tế bào là  $52,11 \pm 1,07(\%)$  là đạt yêu đối với một chủng probiotic tiềm năng, thể hiện xu hướng ưa lipid hỗ trợ quá trình tương tác với biểu mô. Lee S và cộng sự năm 2017, công bố *Bacillus* sp. từ nước tương truyền thống của Hàn Quốc đã cho thấy khả năng kỵ nước với xylene trong khoảng 25 đến 89% [81]. Cùng năm, Ragul và cộng sự đã báo cáo khả năng kỵ nước của *Bacillus* sp. phân lập từ dưa chua lên men trong khoảng 7 đến 57% [82].

Tự đông tụ là thành phần chính trong quá trình hình thành màng sinh học giúp xâm chiếm đường ruột và bám chắc vào tế bào biểu mô ruột, do đó ngăn ngừa sự bám dính của mầm bệnh. Theo Montoro và cộng sự đã mô tả phạm vi khả năng tự đông tụ chia làm 3 mức thấp (16-35%), trung bình (35-50%) và cao (>50%). Kết quả trong hình thể hiện, chủng *Bacillus amyloliquefaciens* BacA10 đạt  $71,65 \pm 0,58 (\%)$  sau 6 giờ ủ cao hơn so với nhiều nghiên cứu về chủng *Bacillus* sp. đã công bố. *Bacillus* sp. từ dưa chua lên men cho thấy khả năng tự đông tụ từ 12–58% [82].

Khả năng bám dính của chủng *B. amyloliquefaciens* BacA10 đối với các vi khuẩn gây bệnh có sự khác biệt đáng kể. Cụ thể, chủng thể hiện khả năng bám dính với *S. enterica* ở mức cao (61,06%), *E. coli* ở mức trung bình (43,91%) và *C. perfringen* ở mức thấp (22,41%). Kết quả cho thấy chủng *B. amyloliquefaciens* BacA10 có tiềm năng cạnh tranh vị trí bám với các vi khuẩn gây bệnh, đặc biệt là *S. enterica*. Theo Collado và cộng sự, khả năng đồng kết tụ với vi khuẩn gây bệnh là một cơ chế quan trọng giúp probiotic ngăn cản bám dính và xâm nhập của vi khuẩn gây bệnh. Mức độ bám dính khác nhau có thể liên quan đến sự khác biệt về cấu trúc bề mặt tế bào, thành phần polysaccharide ngoại bào hoặc protein bề mặt tham gia vào quá trình nhận diện và liên kết [83].

Tóm lại, từ các kết quả cho thấy chủng *B. amyloliquefaciens* BacA10 đáp ứng được nhiều tiêu chí của một chủng probiotic tiềm năng. Được lựa chọn làm chủng tối ưu điều kiện và thành phần lên men định hướng làm chế phẩm probiotic cho người hoặc động vật.



**Hình 3.4** Khả năng bám dính của chủng *Bacillus amyloliquefaciens* BacA10

### 3.3.4 Khả năng kháng kháng sinh

Nghiên cứu mức độ nhạy cảm với kháng sinh là thí nghiệm tiếp theo kiểm tra tính an toàn của chủng. Chủng probiotic cần phải nhạy cảm với kháng sinh để tránh sự chuyển gen kháng kháng sinh không mong muốn cho hệ vi sinh vật đường ruột. Nó có thể xảy ra do các trasposon, plasmid và vi khuẩn đột biến dẫn đến các chủng kháng kháng mới [84].

**Bảng 3.3** Khả năng kháng kháng của chủng *Bacillus amyloliquefaciens* BacA10

Kháng sinh	Nồng độ kháng sinh			
	3 µg/mL	5 µg/mL	10 µg/mL	20 µg/mL
Penicilin G	I	S	S	S
Sulfunamide	S	S	S	S
Oxytetracycline	S	S	S	S
Amoxylin	R	I	S	S
Tylosin	S	S	S	S
Cefotaxin	S	S	S	S
Streptomycin	I	S	S	S
Ampicilin	R	I	S	S

*Ghi chú: (S) nhạy (khuẩn lạc mọc rõ ràng); (I) trung bình (khuẩn lạc mọc mờ); (R) kháng (khuẩn lạc không mọc)*

Kết quả nghiên cứu trình bày ở bảng 3.3 sau 3 lần lặp lại bằng phương pháp cấy quệt hình dấu thập cho thấy ở nồng độ thấp (3-5 µg/mL), chủng *Bacillus amyloliquefaciens* BacA10 có biểu hiện kháng hoặc trung gian đối với penicilin G, amoxylin, streptomycin, ampicilin. Tuy nhiên, chủng nhạy cảm ở nồng độ từ 10 µg/mL cho thấy khả năng kháng phụ thuộc vào nồng độ. Xét về cơ chế, chủng nghiên cứu đều nhạy cảm với các loại kháng sinh: nhóm ức chế tổng hợp protein (oxytetracycline, streptomycin, tylosin), nhóm  $\beta$  – lactam ức chế tổng hợp vách tế bào (penicilin G, ampicillin, amoxicillin, cefotaxime) và nhóm ức chế chuyển hoá acid folic (sulfunamide). Điều này nhận thấy chủng không tồn tại hiện tượng kháng đa cơ chế, giảm nguy cơ gen kháng kháng sinh di truyền.

### **3.4 Nghiên cứu điều kiện và thành phần môi trường lên men đến hoạt tính chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* BacA10**

Sau khi nghiên cứu được một số đặc tính probiotic ở mục 3.3. Nghiên cứu tiếp các điều kiện và thành phần nguồn dinh dưỡng của chủng vi khuẩn *B. amyloliquefacien* BacA10. Nhằm mục đích nâng cao hoạt tính kháng khuẩn và mật độ tế bào. Bên cạnh đó, nghiên cứu thêm về khả năng sinh enzyme ngoại bào nhằm bổ sung thông tin đặc tính sinh học và tiềm năng ứng dụng của chủng nghiên cứu.

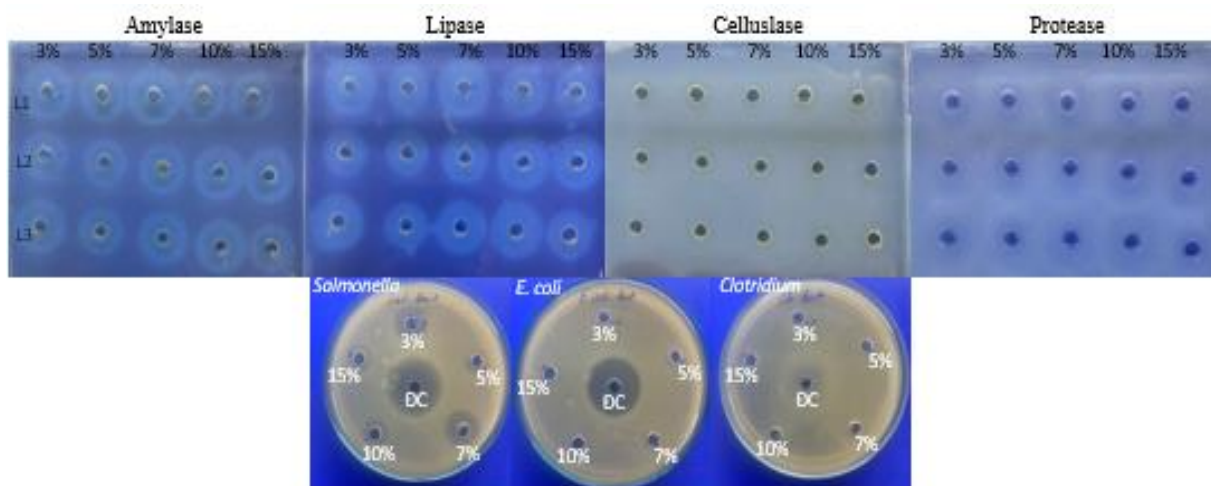
#### **3.4.1 Ảnh hưởng của tỷ lệ tiếp giống**

Bên cạnh các yếu tố môi trường ảnh hưởng trực tiếp đến sự phát triển của vi khuẩn, tỷ lệ tiếp giống ban đầu cũng là một yếu tố quan trọng cần được xác định để đảm bảo hiệu quả sinh trưởng. Mật độ vi khuẩn ảnh hưởng trực tiếp tới quá trình cạnh tranh trong nhu cầu dinh dưỡng và trao đổi oxy. Tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của tỷ lệ tiếp giống đến sự sinh trưởng của chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* BacA10 ở 5 tỷ lệ khác nhau gồm: 3%; 5%; 7%; 10% và 15%. Kết quả về hoạt tính kháng khuẩn và sinh enzyme ngoại bào được trình bày ở bảng 3.4, hình 3.5 và hình 3.6.

**Bảng 3.4** Ảnh hưởng của tỷ lệ tiếp giống đến hoạt tính kháng khuẩn và enzyme

Tỷ lệ tiếp giống (%)	Đường kính vòng kháng khuẩn (D-d, mm)			Đường kính vòng phân giải cơ chất (D-d,mm)			
	SE	EC	CP	Amylase	Cellulase	Lipase	Protease
3	6,43 ±0,4	+	+	13,23 ±0,21	16,87 ±0,09	16,33 ±0,47	8,53 ±0,41
5	11,37 ±0,33	+	+	15,77 ±0,21	17,33 ±0,25	17,13 ±0,19	10,7 ±0,22
7	<b>14,4</b> <b>±0,43</b>	<b>4,83</b> <b>±0,24</b>	<b>2,8</b> <b>±0,19</b>	<b>17,3</b> <b>±0,24</b>	<b>18,27</b> <b>±0,19</b>	<b>18,17</b> <b>±0,12</b>	<b>15,8</b> <b>±0,21</b>
10	12,83 ±0,17	4,27 ±0,21	+	16,67 ±0,24	17,8 ±0,14	17,83 ±0,05	13,5 ±0,34
15	7,4 ±0,43	3,73 ±0,21	+	14,2 ±0,28	16,33 ±0,4	17,47 ±0,29	11,5 ±0,41

Ghi chú: (-) không có hoạt tính kháng khuẩn; (+) có dấu hiệu kháng khuẩn, xuất hiện vòng sáng xung quanh lỗ thạch từ 5-7 mm; các chủng vi khuẩn gây bệnh: *Salmonella enterica* VTCC-0480: SE, *Escherichia coli* VTCCB-0482: EC, *Clostridium perfringens* ATCC 13124: CP.

**Hình 3.5** Ảnh hưởng của tỷ lệ tiếp giống đến hoạt tính kháng khuẩn và enzyme ngoại bào

*Ghi chú: Các giếng 3%, 5%, 7%, 10% và 15% tương ứng với tỷ lệ tiếp giống (v/v) được khảo sát*

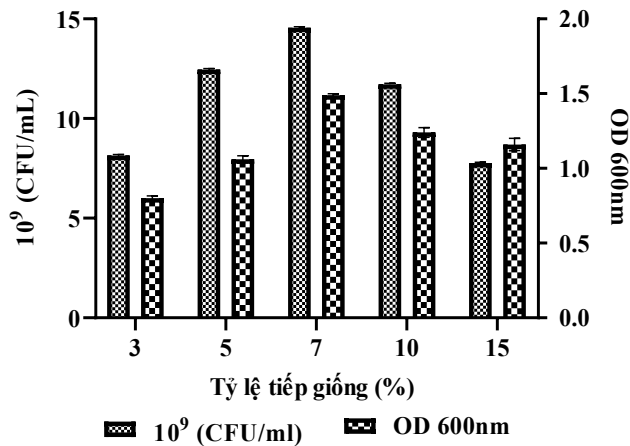
Kết quả nghiên cứu cho thấy tỷ lệ tiếp giống ảnh hưởng rõ rệt đến mật độ tế bào, hoạt tính kháng khuẩn và khả năng sinh enzyme ngoại bào của chủng *Bacillus amyloliquefaciens* BacA10.

Đối với hoạt tính kháng khuẩn, kết quả cho thấy chủng nghiên cứu có khả năng ức chế *S. enterica*, *E. coli* và *C. perfringen*, tuy nhiên mức độ phụ thuộc vào tỷ lệ tiếp giống. Tiếp giống ở tỷ lệ 7%, hoạt tính kháng khuẩn biểu hiện rõ rệt nhất với đường kính vòng vô khuẩn lớn hơn so với các mức khác với *S. enterica* là  $14,4 \pm 0,43$  mm, *E. coli* và *C. perfringen* lần lượt là  $4,83 \pm 0,24$  mm và  $2,8 \pm 0,19$  mm. Trong khi đó, tiếp giống ở tỷ lệ (3–5%) cho mức kháng khuẩn thấp, còn tiếp giống ở (10–15%) hoạt tính kháng khuẩn có xu hướng giảm. Đối chiếu với tỷ lệ tiếp giống 10% ban đầu cho thấy rằng ở 7% thể hiện khả năng kháng khuẩn tốt hơn. Điều này có thể liên quan đến việc tổng hợp các hợp chất kháng khuẩn (như bacteriocin, lipopeptide) thường gắn liền với pha sinh trưởng lũy thừa hoặc đầu pha cân bằng, quá trình sinh tổng hợp các chất kháng khuẩn bị ảnh hưởng bởi mật độ tế bào cũng như điều kiện dinh dưỡng [78], [79].

Với khả năng sinh enzyme ngoại bào (Bảng 3.4 và Hình 3.5). Cụ thể, tại tỷ lệ tiếp giống 7%, đường kính vòng phân giải của các enzyme đạt giá trị cao nhất như: amylase ( $17,3 \pm 0,24$  mm), cellulase ( $18,27 \pm 0,19$  mm), lipase ( $18,17 \pm 0,12$  mm) và protease ( $15,8 \pm 0,21$  mm). Ở các tỷ lệ thấp hơn (3–5%), hoặc ở tỷ lệ cao hơn (10–15%), hoạt tính enzyme có xu hướng giảm.

Về sinh trưởng (Hình 3.6), mật độ tế bào (CFU/mL) và giá trị OD tăng dần khi tỷ lệ tiếp giống tăng từ 3% đến 7%, đạt cực đại tại 7% ( $14,56 \times 10^9$  CFU/mL) kết quả này trùng khớp với nghiên cứu công bố của Phương Thị Hương và Vũ Văn Hạnh (2018) về chủng *Bacillus subtilis* BSVN15 [80]. Sau đó, khi tiếp tục tăng tỷ lệ tiếp giống lên 10% và 15%, cả CFU và OD đều giảm. Như vậy, có thể thấy giá trị CFU/mL và OD có xu hướng tỷ lệ thuận với nhau. Điều này cho thấy ở mức tiếp giống trung bình (7%), quần thể vi khuẩn nhanh chóng thích nghi và bước vào pha sinh trưởng tăng tốc (pha log), trong khi ở tỷ lệ tiếp giống quá cao, sự cạnh tranh dinh dưỡng và tích lũy chất chuyển hóa có thể làm hạn chế sinh trưởng.

Tóm lại, tỷ lệ tiếp giống 7% là tối ưu cho mật độ tế bào cao, hoạt tính enzyme ngoại bào mạnh và khả năng kháng khuẩn mạnh. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đây, trong đó tỷ lệ tiếp giống trung bình (5–10%) được ghi nhận là thích hợp cho các chủng *Bacillus* trong sản xuất enzyme và chất kháng khuẩn, do giúp cân bằng giữa tốc độ sinh trưởng và hiệu suất tổng hợp chất chuyển hóa thứ cấp [88], [89].



**Hình 3.6** Ảnh hưởng của tỷ lệ tiếp giống đến mật độ tế bào

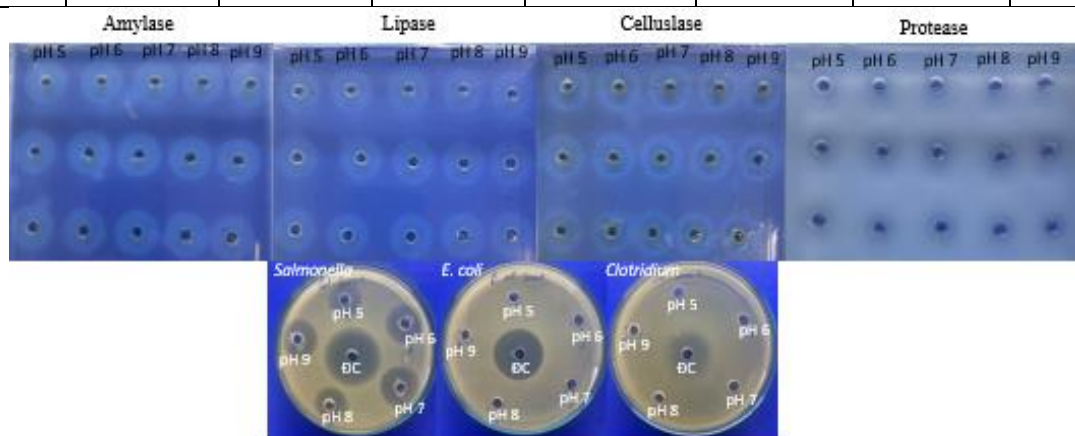
### 3.4.2 Ảnh hưởng của pH môi trường ban đầu

pH ban đầu của môi trường là một trong những yếu tố quan trọng nhất ảnh hưởng đến sinh trưởng của vi khuẩn. Khi pH thay đổi có thể làm thay đổi tính chất hóa học của môi trường, độ hòa tan của các chất dinh dưỡng hay sự cân bằng giữa các phân tử ion. pH môi trường có thể làm tăng hoặc giảm khả năng hấp thu chất dinh dưỡng của vi khuẩn và ảnh hưởng đến hiệu suất quá trình lên men. Để nghiên cứu ảnh hưởng pH môi trường lên men, chúng tôi tiến hành nghiên cứu 6 ngưỡng khác nhau: 4, 5, 6, 7, 8, 9.

**Bảng 3.5** Ảnh hưởng của nồng độ pH đến hoạt tính kháng khuẩn và enzyme

pH	Đường kính vòng kháng khuẩn (D-d, mm)			Đường kính vòng phân giải (D-d,mm)			
	SE	EC	CP	Amylase	Cellulase	Lipase	Protease
5	11,36 ±0,26	-	-	13,17 ±0,24	16,97 ±0,24	16,27 ±0,24	8,7±0,22

6	14,57 ±0,33	3,57 ±0,17	2,37 ±0,28	15,6 ±0,43	17,37 ±0,21	17,03 ±0,05	10,83 ±0,17
7	<b>15,83</b> <b>±0,34</b>	<b>4,7</b> <b>±0,21</b>	<b>2,93</b> <b>±0,09</b>	<b>17,27</b> <b>±0,19</b>	<b>18,27</b> <b>±0,19</b>	<b>18,23</b> <b>±0,21</b>	<b>15,83</b> <b>±0,12</b>
8	11,63 ±0,12	-	-	16,6 ±0,14	17,87 ±0,24	17,83 ±0,05	13,63 ±0,12
9	11,6 ±0,43	-	-	14,3 ±0,24	16,47 ±0,33	17,53 ±0,21	11,2 ±0,28



**Hình 3.7** Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính kháng khuẩn và enzyme ngoại bào

*Ghi chú:* Các giếng pH 5-9 tương ứng với mốc pH ban đầu được khảo sát

Về khả năng kháng khuẩn, chủng nghiên cứu thể hiện hoạt tính ức chế rõ rệt đối với *S. enterica*, *E. coli* và *C. perfringens* trong khoảng pH nghiên cứu. Trong đó, hoạt tính mạnh nhất được ghi nhận tại pH 7 với đường kính vòng vô khuẩn lớn nhất ( $15,83 \pm 0,34$  mm đối với *Salmonella*,  $4,7 \pm 0,21$  mm đối với *E. coli* và  $2,93 \pm 0,09$  mm đối với *Clostridium*).

Ở pH 6, hoạt tính kháng khuẩn cũng khá mạnh nhưng thấp hơn so với pH 7, trong khi ở pH 5 và  $pH \geq 8$ , hoạt tính giảm rõ rệt hoặc không có tính kháng khuẩn. Điều này cho thấy quá trình sinh tổng hợp các hợp chất kháng khuẩn (như bacteriocin hoặc lipopeptide) chịu ảnh hưởng mạnh của pH môi trường và đạt hiệu quả cao nhất trong điều kiện tối ưu cho sinh trưởng.

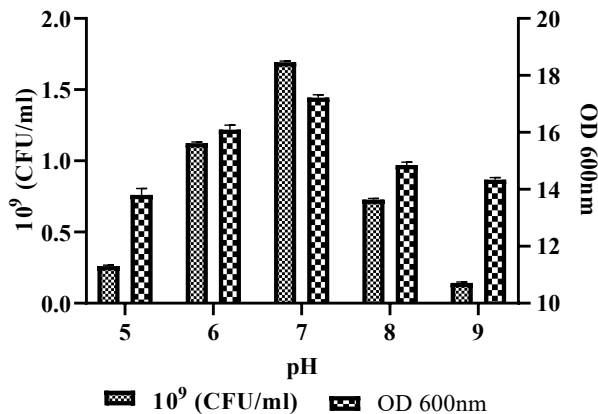
Đối với hoạt tính enzyme ngoại bào, amylase, cellulase, lipase và protease đều đạt hoạt tính cao nhất tại pH 7. Cụ thể, đường kính vòng phân giải tại pH

7 lần lượt là  $17,27 \pm 0,19$  mm (amylase),  $18,27 \pm 0,19$  mm (cellulase),  $18,23 \pm 0,21$  mm (lipase) và  $15,83 \pm 0,21$  mm (protease).

Ở pH 6, hoạt tính enzyme cũng khá cao nhưng thấp hơn so với pH 7, trong khi ở pH 5 và pH 8–9, hoạt tính có xu hướng giảm. Nguyên nhân có thể do pH ảnh hưởng trực tiếp đến cấu trúc không gian của enzyme và khả năng tiết enzyme ra môi trường [83]. Mỗi enzyme có pH tối ưu riêng, tuy nhiên nhìn chung đa số enzyme ngoại bào của *Bacillus* hoạt động tốt trong khoảng pH trung tính đến hơi kiềm [84], [85].

Về sinh trưởng của tế bào (Hình 3.8), mật độ vi khuẩn (CFU/mL) và giá trị OD tăng dần khi pH tăng từ 5 lên 7, đạt cực đại tại pH 7 với giá trị CFU là  $18,46 \times 10^9$  và OD = 1,44, sau đó giảm ở pH 8 và 9. Điều này cho thấy pH trung tính là điều kiện tối ưu cho sự phát triển của chủng, phù hợp với đặc điểm sinh lý chung của nhiều loài *Bacillus* ưa trung tính. Ở pH thấp, sự sinh trưởng bị hạn chế do ảnh hưởng bất lợi của môi trường acid lên cấu trúc màng tế bào và hoạt động enzyme nội bào. Ngược lại, ở pH kiềm nhẹ (pH 8–9), sự mất cân bằng ion và biến tính protein có thể làm giảm tốc độ sinh trưởng.

Như vậy, theo kết phân tích ở trên, pH 7 là lựa chọn phù hợp cho nghiên cứu tiếp theo.



**Hình 3.8** Ảnh hưởng của pH ban đầu đến mật độ tế bào

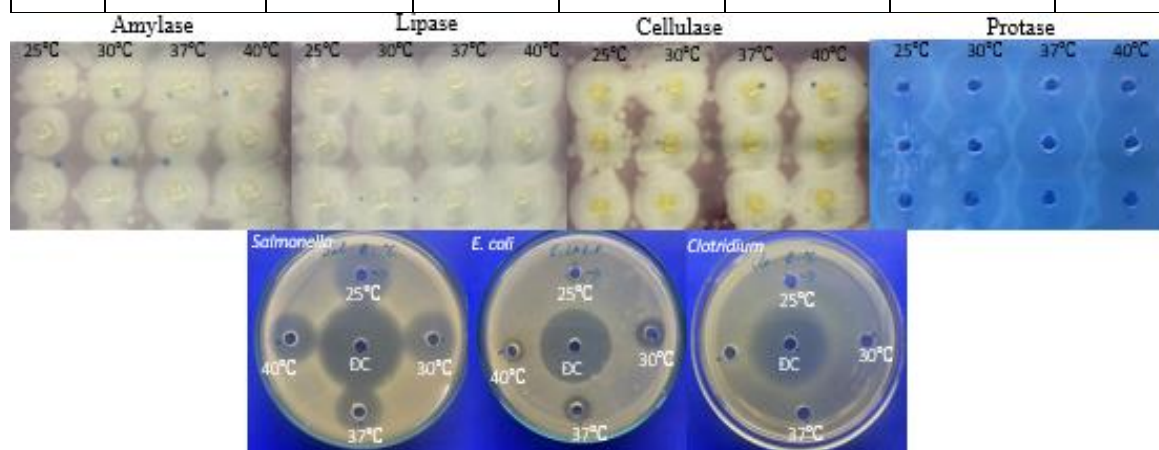
### 3.4.3 Ảnh hưởng của nhiệt độ

Nhiệt độ là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến độ bền và khả năng tồn tại của dịch nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* BacA10 [93]. Để nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ đối với hoạt tính của chủng vi khuẩn tuyển chọn, sau khi nuôi tăng sinh vi khuẩn *B.amyloliquefaciens*

BacA10, ở các nhiệt độ khác nhau (25°C, 30°C, 37°C, 40°C). Tiến hành kiểm tra hoạt tính kháng khuẩn, hoạt tính enzyme phân giải cơ chất và mật độ tế bào của vi khuẩn nghiên cứu.

**Bảng 3.6** Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến hoạt tính kháng khuẩn và enzyme

Nhiệt độ (°C)	Đường kính vòng kháng khuẩn (D-d, mm)			Đường kính vòng phân giải (D-d,mm)			
	SE	EC	CP	Amylase	Cellulase	Lipase	Protease
25	15,07 ±0,09	+	1,26 ±0,16	14,57 ±0,05	17,03 ±0,21	16,7 ±0,14	12,47 ±0,05
30	<b>15,93</b> <b>±0,09</b>	<b>4,9</b> <b>±0,09</b>	2,63 ±0,09	15,6 ±0,16	17,4 ±0,16	17,17 ±0,24	14,13 ±0,62
37	15,76 ±0,49	4,63 ±0,12	<b>3,03</b> <b>±0,05</b>	<b>17,33</b> <b>±0,19</b>	<b>18,3</b> <b>±0,22</b>	<b>18,23</b> <b>±0,21</b>	<b>15,87</b> <b>±0,17</b>
40	14,2 ±0,21	3,2 ±0,21	2,13 ±0,12	16,6 ±0,14	17,87 ±0,24	17,53 ±0,38	15,6 ±0,14



**Hình 3.9** Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính kháng khuẩn và enzyme ngoại bào

*Ghi chú: Các giếng ghi 25°C, 30°C, 37°C, 40°C là nhiệt độ nuôi cấy khảo sát*

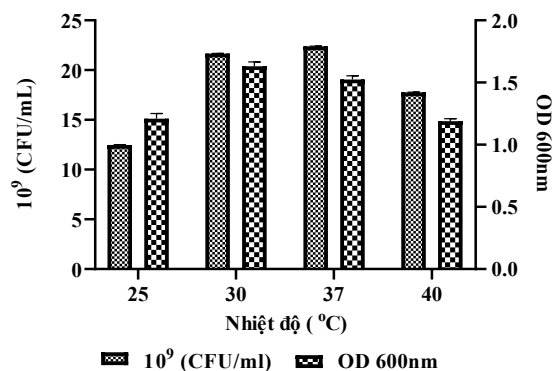
Về khả năng kháng khuẩn, chủng *Bacillus* thể hiện hoạt tính ức chế tốt đối với *S. enterica* ở tất cả các mức nhiệt độ khảo sát, với đường kính vòng vô khuẩn cao nhất tại 30°C (15,93±0,09 mm) và giảm nhẹ khi nhiệt độ tăng. Đối

với *E. coli*, hoạt tính kháng khuẩn đạt cao nhất tại 30°C (4,9±0,09 mm), sau đó giảm ở 37°C (4,63±0,12 mm) và 40°C (3,2±0,21 mm). Trong khi đó, khả năng ức chế *C. perfrigen* có ở tất cả mức nhiệt độ và cao nhất ở nhiệt độ 37°C (3,03±0,05 mm).

Đối với hoạt tính enzyme ngoại bào, các enzyme khảo sát đều có xu hướng tăng khi nhiệt độ tăng từ 25°C lên 37°C, sau đó giảm nhẹ ở 40°C. Cụ thể, tại 37°C, đường kính vòng phân giải đạt giá trị cao nhất đối với amylase (17,33±0,19 mm), cellulase (18,3±0,22 mm), lipase (18,23±0,21 mm) và protease (15,87±0,17 mm). Điều này cho thấy nhiệt độ 37°C thuận lợi cho quá trình tổng hợp và tiết enzyme ngoại bào. Tuy nhiên, khi tăng lên 40°C, hoạt tính enzyme giảm nhẹ, có thể do cấu trúc enzyme bị ảnh hưởng bởi nhiệt độ cao, làm giảm hiệu quả xúc tác.

Về sinh trưởng (Hình 3.10), mật độ tế bào (CFU/mL) và giá trị OD 600nm tăng từ 25°C đến 37°C và đạt cực đại tại 37°C, sau đó giảm dần khi nhiệt độ tăng lên 40°C. Điều này cho thấy 37°C là nhiệt độ tối ưu cho sự phát triển của chủng. Ở 25°C, tốc độ sinh trưởng còn hạn chế do hoạt động enzyme nội bào diễn ra chậm. Ngược lại, ở nhiệt độ cao hơn 40°C, sự giảm mật độ tế bào có thể liên quan đến hiện tượng biến tính protein, rối loạn cấu trúc màng và tích lũy các sản phẩm trao đổi chất gây ức chế.

Kết quả cho thấy nhiệt độ tối ưu cho từng mục tiêu có sự khác biệt: 37°C phù hợp cho sinh trưởng tế bào và thuận lợi cho sinh tổng hợp enzyme ngoại bào, và 30–37°C là khoảng nhiệt độ thích hợp để duy trì hoạt tính kháng khuẩn ổn định. Trong nghiên cứu này chọn 37°C là nhiệt độ phù hợp chọn để nghiên cứu cho thí nghiệm tiếp theo.



**Hình 3.10** Ảnh hưởng của nhiệt độ đến mật độ tế bào

### 3.4.4 Ảnh hưởng của thời gian lên men

Thời gian lên men là một trong những thông số được các nhà sản xuất đặc biệt quan tâm vì nó ảnh hưởng trực tiếp đến quá trình vận hành máy móc, thiết bị cũng như sử dụng nhân công. Trong hầu hết các nghiên cứu, việc xác định thời gian sinh trưởng phù hợp luôn được quan tâm. Tiến hành nuôi cấy chủng và lấy mẫu tại các mốc thời gian: 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 và 48 giờ.

**Bảng 3.7** Ảnh hưởng của thời gian lên men đến hoạt tính kháng khuẩn và enzyme

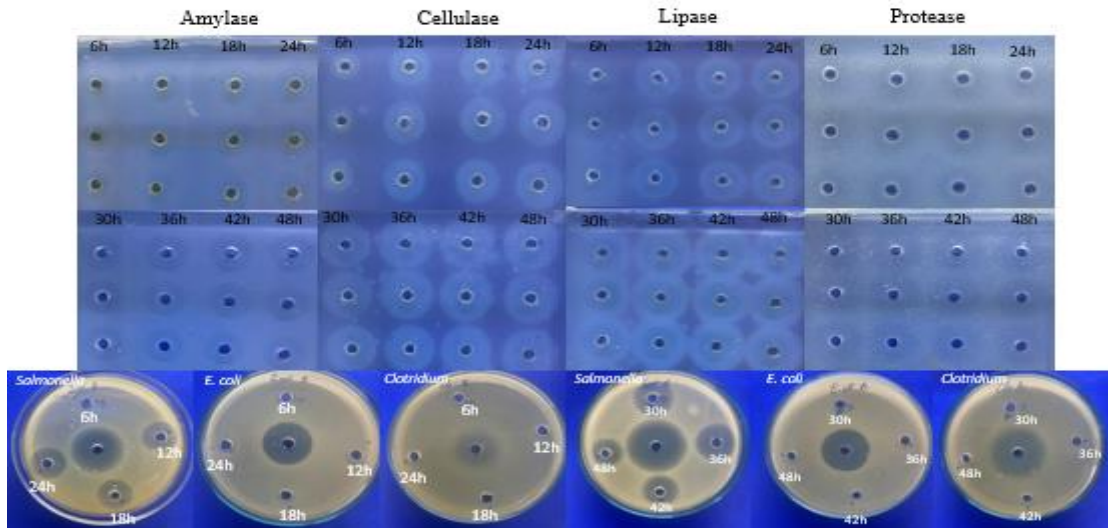
Thời gian (giờ)	Đường kính vòng kháng khuẩn (D-d, mm)			Đường kính vòng phân giải cơ chất (D-d,mm)			
	SE	EC	CP	Amylase	Cellulase	Lipase	Protease
6	-	+	-	16,1 ±0,08	15,7 ±0,22	14,83 ±0,62	10,83 ±0,85
12	10,87 ±0,09	+	-	16,77 ±0,05	16,17 ±0,4	16,17 ±0,47	13,43 ±0,24
18	12,83 ±0,23	2,6 ±0,16	-	17,07 ±0,05	17,83 ±0,2	17,17 ±0,24	15,37 ±0,09
24	15,87 ±0,05	4,47 ±0,09	2,77 ±0,17	17,43 ±0,17	18,03 ±0,22	18,33 ±0,12	15,93 ±0,26
30	19,87 ±0,26	5,17 ±0,05	3,27 ±0,05	19,43 ±0,31	19,77 ±0,21	19,83 ±0,24	16,2 ±0,24
<b>36</b>	<b>21,67</b> <b>±0,47</b>	<b>5,8</b> <b>±0,14</b>	<b>3,77</b> <b>±0,17</b>	<b>21,67</b> <b>±0,62</b>	<b>21,77</b> <b>±0,21</b>	<b>21,8</b> <b>±0,16</b>	<b>18,9</b> <b>±0,1</b>
42	19,37 ±0,26	4,13 ±0,04	2,73 ±0,05	21,33 ±0,47	21,1 ±0,37	21,17 ±0,12	18,5 ±0,41
48	17,67 ±0,47	3,53 ±0,05	+	21,17 ±0,62	19,67 ±0,09	19,53 ±0,05	16,5 ±0,41

Ở giai đoạn đầu (6–12 giờ), hoạt tính kháng khuẩn còn thấp hoặc chưa xuất hiện rõ rệt. Nguyên nhân có thể là do vi khuẩn đang ở pha thích nghi và đầu pha sinh trưởng, lượng chất kháng khuẩn chưa được tích lũy nhiều. Hoạt tính enzyme trong giai đoạn này cũng còn thấp (bảng 3.7 và hình 3.11).

Từ 18–36 giờ, hoạt tính kháng khuẩn tăng mạnh và đạt mức cao, đặc biệt ở 36 giờ. Đồng thời, đường kính vòng phân giải của các enzyme như amylase, cellulase, lipase và protease cũng tăng đáng kể. So sánh với 24 giờ thì 36 giờ

đem lại hoạt tính tốt hơn. Điều này cho thấy vi khuẩn đang ở pha sinh trưởng mạnh và bắt đầu chuyển sang pha cân bằng, khi các sản phẩm trao đổi chất thứ cấp và enzyme ngoại bào được tổng hợp nhiều nhất (bảng 3.7).

Sau 36 giờ (36–48 giờ), hoạt tính kháng khuẩn có xu hướng giảm hoặc không ổn định (đặc biệt với *E. coli*), trong khi hoạt tính enzyme có dấu hiệu giảm nhẹ hoặc chững lại. Nguyên nhân có thể do môi trường nuôi cấy bị suy giảm dinh dưỡng, tích lũy chất ức chế và vi khuẩn bước vào pha suy vong.

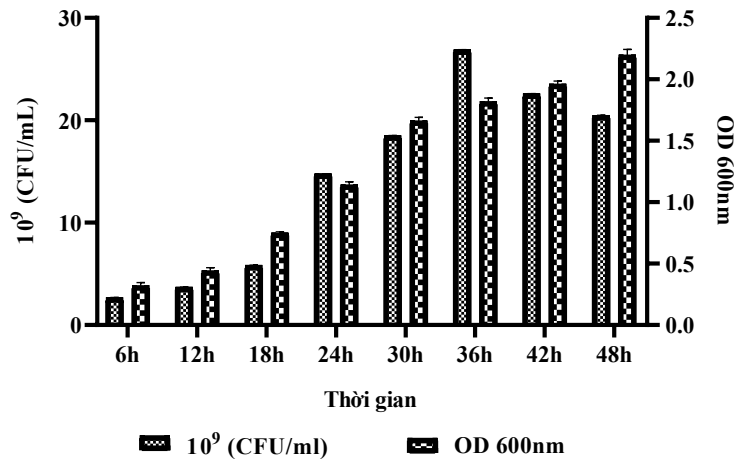


**Hình 3.11** Ảnh hưởng của thời gian lên men đến hoạt tính kháng khuẩn và enzyme ngoại bào

*Ghi chú:* Các giếng ghi 6h, 12h, 24h, ... là thời gian khảo sát theo giờ

Kết quả về sinh trưởng của vi khuẩn nghiên cứu (Hình 3.12), mật độ tế bào (CFU/mL) từ 6 đến 18 giờ mật độ tế bào chỉ dưới  $6 \times 10^9$  (CFU/mL) đây giai đoạn thích nghi (pha tiềm phát), 18 đến 36 giờ mật độ tăng dần và đạt cực đại tại 36 giờ là  $26,85 \times 10^9$  (CFU/mL), sau 36 giờ mật độ giảm dần. Về giá trị OD 600 nm cho thấy giá trị tăng dần thời gian, có thể là do khi ở pha suy vong chứa nhiều xác tế bào làm đục môi trường, gây nhiễu giá trị về mật độ quang.

Từ kết quả nêu trên về kháng khuẩn, khả năng sinh enzyme ngoại bào, mật độ tế bào CFU/mL và OD 600nm. Có thể thấy rằng ở 36 giờ lên men là thời gian thích hợp nhất cho chủng vi khuẩn nghiên cứu *B. amyloliquefaciens* BacA10 (hình 3.12).



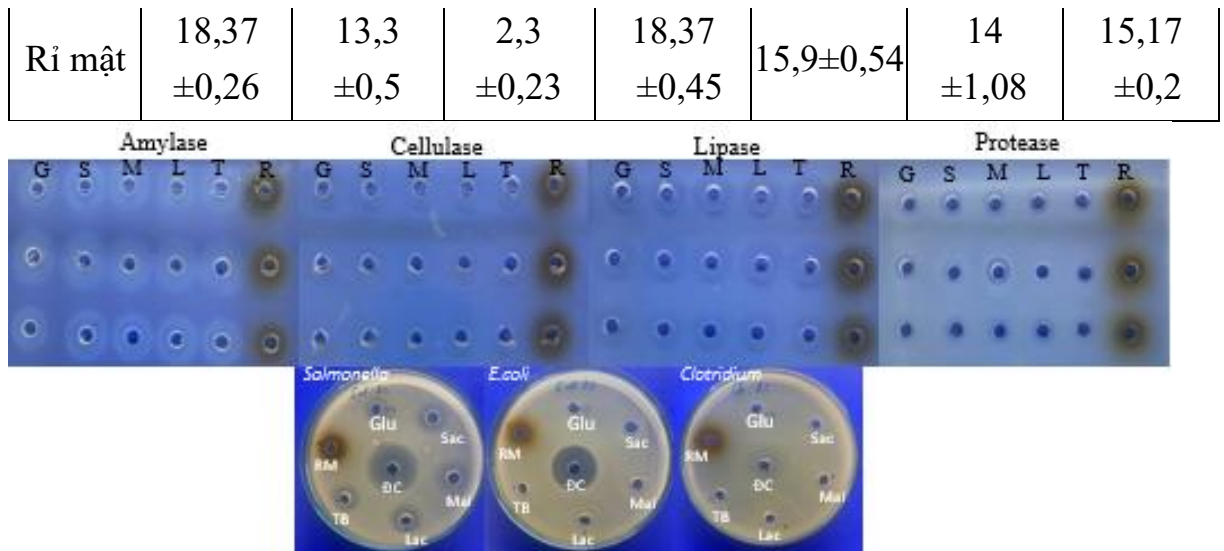
**Hình 3.12** Ảnh hưởng của nhiệt độ đến mật độ tế bào

### 3.4.5 Ảnh hưởng của nguồn cacbon

Bên cạnh các yếu tố điều kiện lên men, thành phần nguồn dinh dưỡng cũng đóng vai trò vô cùng quan trọng trong quá trình phát triển của vi sinh vật. Nguồn cacbon giữ vai trò thiết yếu trong sinh trưởng và hoạt tính sinh hóa của vi khuẩn lên men, vì đây là nguồn cung cấp năng lượng và vật liệu cho quá trình tổng hợp tế bào. Tùy vào bản chất của nguồn cacbon, tốc độ sinh trưởng của vi khuẩn có thể khác nhau. Trong nghiên cứu này, sử dụng 6 nguồn cacbon thử nghiệm: glucose, sacchare, maltodetrxin, lactose, tinh bột, rỉ mật.

**Bảng 3.8** Ảnh hưởng của nguồn cacbon đến hoạt tính kháng khuẩn và enzyme

Nguồn Cacbon	Đường kính vòng kháng khuẩn (D-d, mm)			Đường kính vòng phân giải (D-d,mm)			
	SE	EC	CP	Amylase	Cellulase	Lipase	Protease
Glu	12,87 ±0,28	+	+	18,3 ±0,21	18 ±0,75	13,8 ±0,59	13,67 ±0,5
Sac	15,53 ±0,75	10,33 ±0,47	+	20,4 ±0,29	18,7 ±0,59	15,3 ±0,82	12,83 ±0,24
<b>Ma</b>	<b>22,6</b> <b>±0,17</b>	<b>10,37</b> <b>±0,32</b>	<b>3,76</b> <b>±0,17</b>	<b>22,4</b> <b>±0,33</b>	<b>21,7</b> <b>±0,22</b>	<b>21,93</b> <b>±0,09</b>	<b>19,3</b> <b>±0,2</b>
Lac	16,67 ±0,23	9,5±0,4	+	19,93 ±0,17	17,13 ±0,49	15,27 ±1,3	15,43 ±0,3
TB	13,17 ±0,62	9,6 ±0,43	+	19,6 ±0,37	16,57 ±0,76	14,57 ±0,1	14,77 ±0,2



**Hình 3.13** Ảnh hưởng của nguồn cacbon đến hoạt tính kháng khuẩn và enzyme ngoại bào

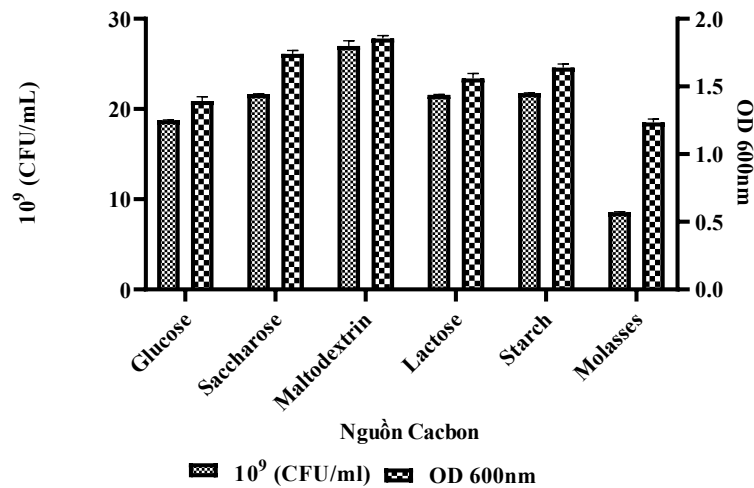
*Ghi chú: Các giếng Glu, Sac, Mal, Lac, TB, RM là nguồn cacbon khảo sát*

Như kết quả thể hiện bảng 3.8 và hình 3.13, cho thấy các nguồn cacbon khác nhau ảnh hưởng đến hoạt tính kháng khuẩn, khả năng sinh enzyme ngoại bào. Nhận thấy rằng maltodextrin là nguồn cacbon tối ưu nhất với đường kính vòng kháng khuẩn *S. enterica* là  $22,6 \pm 0,17$  mm, *E. coli* là  $10,37 \pm 0,32$  mm và *C. perfrigen*  $3,76 \pm 0,17$  mm. Về khả năng sinh enzyme ngoại bào đường kính phân giải đạt  $22,4 \pm 0,33$  mm (Amylase),  $21,7 \pm 0,22$  mm (Cellulase),  $21,93 \pm 0,09$  mm (Lipase) và  $19,3 \pm 0,2$  mm (Protease). Có thể maltodextrin là sản phẩm thủy phân một phần của tinh bột, có cấu trúc chuỗi ngắn, dễ bị phân giải nhưng không quá đơn giản như glucose. Điều này giúp vi khuẩn duy trì trạng thái sinh trưởng ổn định, đồng thời tránh hiện tượng ức chế dị hóa thường xảy ra khi sử dụng glucose ở nồng độ cao [94]. Nhờ đó, các con đường chuyển hóa thứ cấp, bao gồm tổng hợp enzyme ngoại bào và các chất kháng khuẩn, được kích hoạt mạnh hơn. So với các nguồn cacbon khác như lactose hoặc tinh bột, maltodextrin không đòi hỏi hệ enzyme đặc hiệu quá phức tạp để phân giải, giúp tiết kiệm năng lượng cho tế bào và chuyển hướng nguồn lực sang sinh tổng hợp các sản phẩm có hoạt tính sinh học. Trong khi đó, rỉ mật dù giàu dinh dưỡng nhưng thành phần không ổn định và có thể chứa tạp chất ức chế, làm giảm hiệu quả sinh trưởng và hoạt tính sinh học [95], [96].

Tương tự với kết quả mật độ tế bào CFU/mL và giá trị mật độ quang OD thể hiện ở hình 3.14. môi trường bổ sung nguồn maltodextrin cũng thể hiện giá

trị cao nhất với mật độ tế bào là  $26,99 \times 10^9$  (CFU/ml) và giá trị cực đại với OD 600 nm là 1,85 nm.

Nhìn chung, nguồn cacbon có ảnh hưởng quan trọng đến hoạt tính và sinh trưởng của chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* BacA10. Trong nghiên cứu này, lựa chọn maltodextrin là nguồn cacbon thích hợp lựa chọn cho nghiên cứu tiếp theo.



**Hình 3.14** Ảnh hưởng của nguồn cacbon đến mật độ tế bào

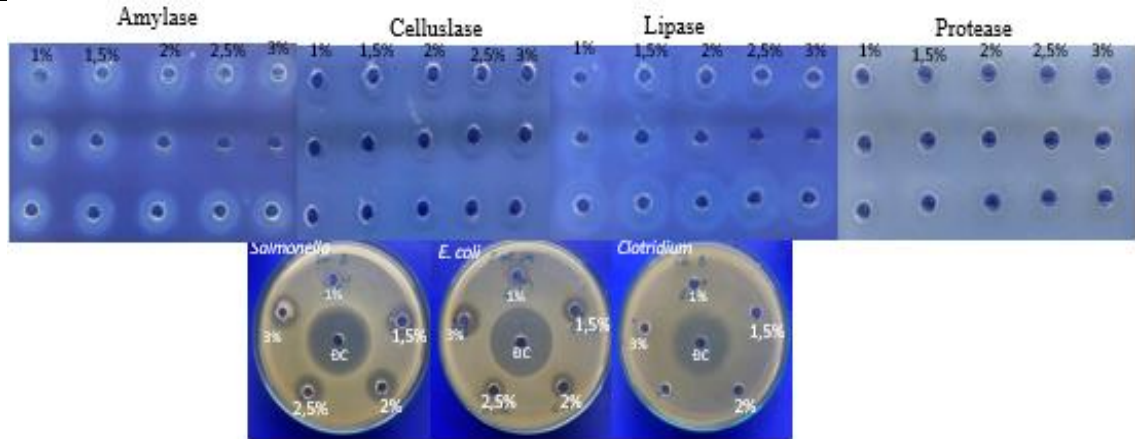
### 3.4.6 Ảnh hưởng của nồng độ maltodextrin

Nồng độ maltodextrin có ảnh hưởng tới quá trình tổng hợp các chất của vi khuẩn nghiên cứu. Trong thí nghiệm nồng độ maltodextrin được khảo sát ở 1%; 1,5%; 2%; 2,5%, 3%. Kết quả được trình bày ở bảng 3.9, hình 3.15 và hình 3.16.

**Bảng 3.9** Ảnh hưởng của nồng độ maltodextrin đến hoạt tính kháng khuẩn và enzyme

Maltodextrin (%)	Đường kính vòng kháng khuẩn (D-d, mm)			Đường kính vòng phân giải cơ chất (D-d,mm)				
	SE	EC	CP	Amylase	Cellulase	Lipase	Protease	
1	+	4,8 ±0,14	+	18,77 ±0,2	14,77 ±0,17	18,4 ±0,29	15,3 ±0,2	
1,5		18,6 ±0,14	7,8 ±0,17	3,43 ±0,12	19,73 ±0,2	21,5 ±0,09	21,5 ±0,09	18,3 ±0,2
2		<b>22,67</b> ±0,12	<b>10,37</b> ±0,19	<b>3,83</b> ±0,05	<b>22,53</b> ±0,19	<b>21,73</b> ±0,19	<b>22±0,1</b> ±0,1	<b>19,4</b> ±0,1

2,5	19,63 ±0,12	10,1 ±0,14	3,07 ±0,05	19,5 ±0,29	19,4 ±0,28	21,83 ±0,12	18,8 ±0,1
3	16,77 ±0,09	9,93 ±0,09	-	18,93 ±0,39	18,83 ±0,17	21,65 ±0,14	18,2 ±0,2



**Hình 3.15** Ảnh hưởng của nồng độ maltodextrin đến hoạt tính kháng khuẩn và enzyme ngoại bào

*Ghi chú:* Các giếng 1%; 1,5%; 2%; 2,5%; 3% là nồng độ maltodextrin khảo sát

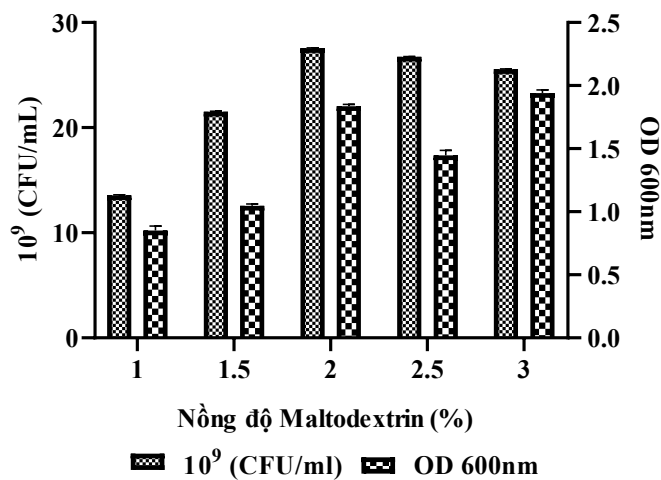
Kết quả trình bày trong bảng 3.9 và hình 3.15–3.16 cho thấy nồng độ maltodextrin có ảnh hưởng rõ rệt đến hoạt tính sinh học của chủng vi sinh vật nghiên cứu, bao gồm khả năng kháng khuẩn, hoạt tính enzyme ngoại bào và mật độ tế bào. Hoạt tính kháng khuẩn thay đổi theo nồng độ maltodextrin và phụ thuộc vào từng chủng vi khuẩn kiểm định. Đối với *S. enterica*, đường kính vòng kháng khuẩn tăng đạt cực đại ở nồng độ 2%  $22,67 \pm 0,12$  mm, sau đó giảm nhẹ ở các nồng độ cao hơn. Tương tự, đối với *E. coli*, hoạt tính kháng khuẩn tăng dần theo nồng độ và đạt giá trị cao nhất tại 2%. Trong khi đó, hoạt tính đối với *C. perfringen* đường kính vòng kháng khuẩn  $3,83 \pm 0,05$  mm. Điều này cho thấy maltodextrin có thể ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp các hợp chất kháng khuẩn, đồng thời mức độ đáp ứng khác nhau giữa các loài vi sinh vật đích.

Bên cạnh đó, hoạt tính enzyme ngoại bào cũng chịu tác động đáng kể của nồng độ maltodextrin. Kết quả cho thấy amylase và cellulase đạt giá trị cao nhất trong khoảng nồng độ 2–2,5%, sau đó có xu hướng giảm khi tăng lên 3%. Hoạt tính lipase duy trì ở mức cao và ít biến động theo nồng độ, trong khi protease chỉ xuất hiện ở khoảng nồng độ trung bình (2–2,5%) và không được ghi nhận

ở các mức còn lại. Xu hướng này cho thấy nồng độ maltodextrin thích hợp có thể kích thích quá trình tổng hợp enzyme ngoại bào, trong khi nồng độ quá cao có thể gây ức chế cho quá trình sinh tổng hợp enzyme.

Ngoài ra, mật độ tế bào, thể hiện qua giá trị CFU/ml và OD 600nm, tăng dần theo nồng độ maltodextrin từ 1% đến 2% và đạt cực đại tại 2%, sau đó giảm nhẹ ở 2,5%. Điều này chứng tỏ maltodextrin đóng vai trò là nguồn carbon hiệu quả, thúc đẩy sự sinh trưởng của vi sinh vật trong khoảng nồng độ tối ưu. Tuy nhiên, ở nồng độ cao hơn, sự gia tăng áp suất thẩm thấu hoặc tích lũy sản phẩm chuyển hóa có thể làm hạn chế sự phát triển của tế bào [97], [98].

Tổng hợp các kết quả cho thấy khoảng nồng độ maltodextrin từ 2% là điều kiện tối ưu, tại đó vừa đảm bảo sinh trưởng tế bào mạnh, vừa nâng cao hoạt tính enzyme và khả năng kháng khuẩn. Những phát hiện này có ý nghĩa quan trọng trong việc tối ưu hóa môi trường nuôi cấy nhằm nâng cao hiệu quả sinh tổng hợp các hợp chất có hoạt tính sinh học. Do đó, lựa chọn sử dụng 2% maltodextrin là nồng độ phù hợp.



**Hình 3.16** Ảnh hưởng của nồng độ maltodextrin đến mật độ tế bào

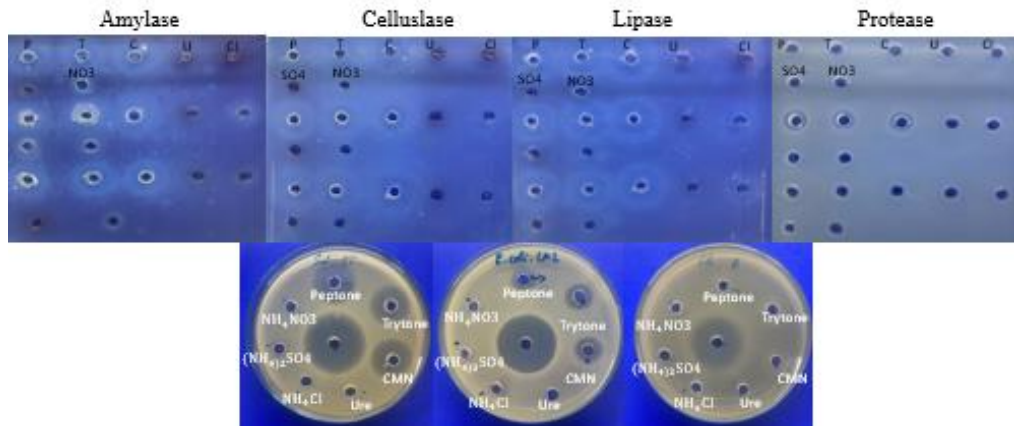
### 3.4.7 Ảnh hưởng của nguồn nitrogen

Nguồn nitơ đóng vai trò quan trọng trong việc tối ưu hóa môi trường nuôi cấy cho các chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* BacA10 ảnh hưởng trực tiếp đến sinh trưởng và khả năng tổng hợp các chất có hoạt tính sinh học của chúng. Việc lựa chọn và điều chỉnh nguồn nitơ phù hợp có thể tăng cường hiệu suất nuôi cấy và sản xuất các sản phẩm mong muốn. Tiến hành khảo sát ảnh hưởng của nguồn nitơ khác nhau như: peptone, trytone, cao nấm men, ure,

$\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ở nồng độ 1% khi bổ sung vào môi trường LB lỏng để lên men chủng *Bacillus amyloliquefaciens* BacA10 (bảng 3.10).

**Bảng 3.10** Ảnh hưởng của nguồn nitrogen đến hoạt tính kháng khuẩn và enzyme

Nguồn nitrogen	Đường kính vòng kháng khuẩn (D-d, mm)			Đường kính vòng phân giải cơ chất (D-d,mm)			
	SE	EC	CP	Amylase	Cellulase	Lipase	Protease
Peptone	22,8 ±0,21	11,27 ±0,22	3,83 ±0,17	22,83 ±0,24	22,03 ±0,26	22,2 ±0,14	19,4 ±0,2
Trytone	20,8 ±0,24	10,13 ±0,24	2,66 ±0,09	17,7 ±0,94	18,16 ±0,9	18,2 ±0,21	10,4 ±0,3
Cao nấm men	21,6 ±0,25	10,27 ±0,25	2,83 ±0,05	18,67 ±0,8	19,76 ±0,3	19,26 ±0,3	9,13 ±0,19
Ure	-	-	-	-	-	-	-
$\text{NH}_4\text{Cl}$	-	-	-	-	-	-	-
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-	-	-	-	-	-	-
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	-	-	-	13,5 ±0,4	+	15,13 ±0,1	-



**Hình 3.17** Ảnh hưởng của nguồn nitrogen đến hoạt tính kháng khuẩn và enzyme ngoại bào

*Ghi chú: Peptone, Trytone, CMN, ... là nguồn nitrogen sử dụng khảo sát*

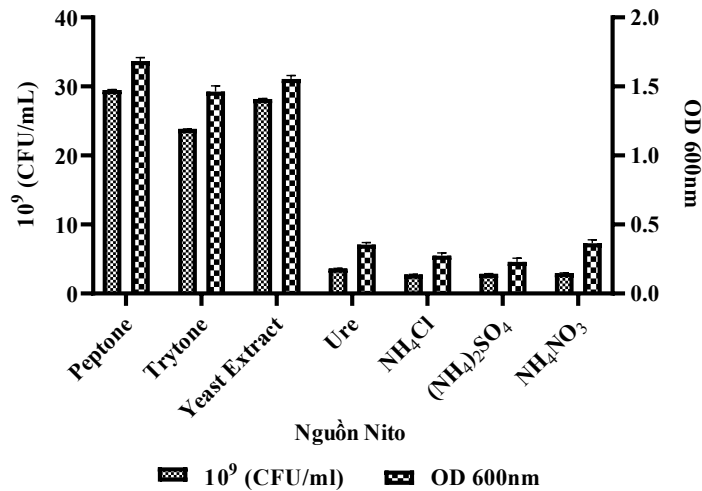
Kết quả trình bày trong bảng 3.10, hình 3.17 và hình 3.18 cho thấy các nguồn nitrogen hữu cơ (peptone, tryptone và cao nấm men) cho hiệu quả vượt trội so với các nguồn nitrogen vô cơ. Về hoạt tính kháng khuẩn, các nguồn nitơ

hữu cơ đều thể hiện khả năng ức chế rõ rệt đối với các chủng vi khuẩn kiểm định. Cụ thể, peptone và cao nấm men cho đường kính vòng kháng khuẩn đối với *S. enterica* đạt  $22,8 \pm 0,21$  mm và  $21,6 \pm 0,25$  mm, trong khi tryptone đạt  $20,8 \pm 0,24$  mm. Đối với *E. coli*, peptone thể hiện hiệu quả cao nhất ( $11,27 \pm 0,22$  mm), tiếp theo là cao nấm men ( $10,27 \pm 0,25$  mm) và trytone ( $10,13 \pm 0,24$  mm). Đối với *C. perfrigen*, cả ba nguồn nitơ hữu cơ đều ghi nhận khả năng kháng khuẩn cao nhất cũng ở peptone là  $3,83 \pm 0,17$  mm. Ngược lại, các nguồn nitơ vô cơ hầu như không cho thấy hoạt tính kháng khuẩn, cho thấy chúng không phù hợp cho quá trình sinh tổng hợp các hợp chất kháng khuẩn của chủng nghiên cứu.

Xét về hoạt tính enzyme ngoại bào, các nguồn nitơ hữu cơ tiếp tục cho kết quả ưu thế. Peptone cho hoạt tính amylase, cellulase và lipase cao nhất (lần lượt đạt  $22,83 \pm 0,24$  mm,  $20,33 \pm 0,26$  mm và  $22,2 \pm 0,14$  mm), trong khi tryptone và cao nấm men cho giá trị thấp hơn nhưng vẫn ở mức cao. Hoạt tính protease được ghi nhận ở tất cả các nguồn hữu cơ, với cao nấm men cho giá trị cao nhất ( $19,4 \pm 0,2$  mm). Đối với các nguồn nitơ vô cơ, hầu như không ghi nhận hoạt tính enzyme, ngoại trừ  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  có biểu hiện yếu đối với amylase ( $13,5 \pm 0,4$  mm) và lipase ( $15,13 \pm 0,1$  mm), trong khi các enzyme khác không được phát hiện. Điều này cho thấy nguồn nitơ hữu cơ không chỉ cung cấp nitơ mà còn bổ sung các yếu tố sinh trưởng cần thiết.

Kết quả về mật độ tế bào (Hình 3.18) các môi trường bổ sung peptone, tryptone và cao nấm men đều cho mật độ tế bào cao. Trong đó, peptone và cao nấm men cho mật độ cao nhất, trong khi tryptone thấp hơn đôi chút. Ngược lại, các nguồn nitơ vô cơ làm giảm mạnh khả năng sinh trưởng của tế bào, thể hiện qua giá trị CFU/ml và OD 600nm rất thấp. Điều này có thể do nguồn nitơ vô cơ không cung cấp đầy đủ các hợp chất hữu cơ cần thiết cho quá trình sinh trưởng và trao đổi chất của vi sinh vật.

Tổng hợp các kết quả cho thấy nguồn nitơ hữu cơ, đặc biệt là peptone là lựa chọn tối ưu cho sự sinh trưởng, hoạt tính enzyme và khả năng kháng khuẩn của chủng nghiên cứu. Ngược lại, các nguồn nitrogen vô cơ không phù hợp và có thể gây hạn chế đáng kể đến các hoạt động sinh học. Kết quả này cung cấp cơ sở khoa học quan trọng cho việc lựa chọn và tối ưu hóa thành phần môi trường nuôi cấy trong các nghiên cứu và ứng dụng tiếp theo.



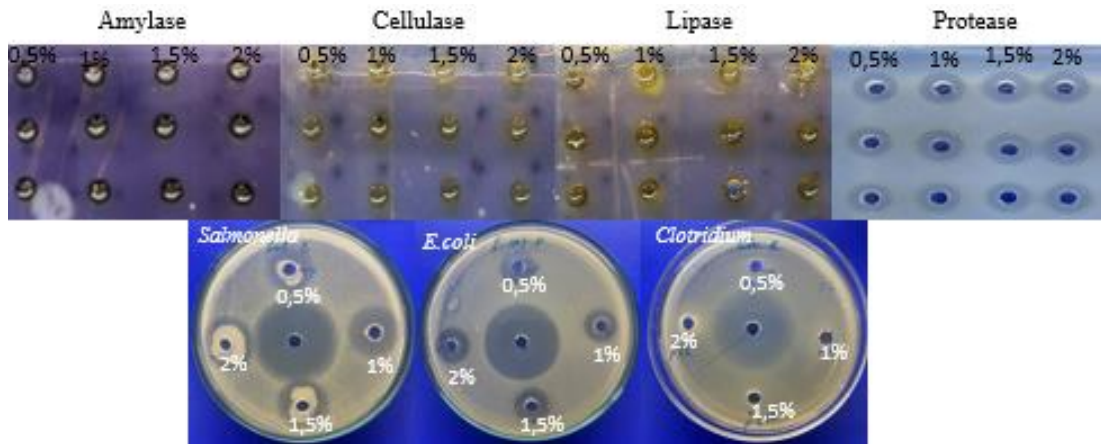
**Hình 3.18** Ảnh hưởng của nguồn nitrogen đến mật độ tế bào

### 3.4.8 Ảnh hưởng của nồng độ peptone

Nguồn nitơ đóng vai trò quan trọng trong quá trình sinh trưởng và tổng hợp các chất chuyển hóa của vi sinh vật, đặc biệt là enzyme và các hợp chất kháng khuẩn. Để đánh giá ảnh hưởng của nồng độ nitơ, thí nghiệm được tiến hành với các mức peptone khác nhau (0,5–2%). Kết quả được trình bày ở Bảng 3.11, Hình 3.19 và Hình 3.20.

**Bảng 3.11** Ảnh hưởng của nồng độ Peptone đến hoạt tính kháng khuẩn và enzyme ngoại bào

Peptone (%)	Đường kính vòng kháng khuẩn (D-d, mm)			Đường kính vòng phân giải cơ chất (D-d, mm)			
	SE	EC	CP	Amylase	Cellulase	Lipase	Protease
0,5	15,77 ±0,12	10,83 ±0,12	+	18,6 ±0,14	16,33 ±0,23	21,17 ±0,23	10,25 ±0,12
1	22,77 ±0,21	11,3 ±0,25	3,73 ±0,17	22,87 ±0,19	22 ±0,21	22,13 ±0,21	19,4 ±0,22
1,5	<b>23,07</b> ±0,17	<b>12,23</b> ±0,17	<b>3,96</b> ±0,05	<b>22,97</b> ±0,05	<b>22,6</b> ±0,14	<b>22,57</b> ±0,14	<b>19,9</b> ±0,1
2	19,37 ±0,26	11,7 ±0,14	+	22,1 ±0,14	20,33 ±0,47	18,63 ±0,18	13,2 ±0,24



**Hình 3.19** Ảnh hưởng của nồng độ peptone đến hoạt tính kháng khuẩn và enzyme ngoại bào

*Ghi chú: Các giếng 0,5%; 1%; 1,5%; 2% là nồng độ peptone khảo sát*

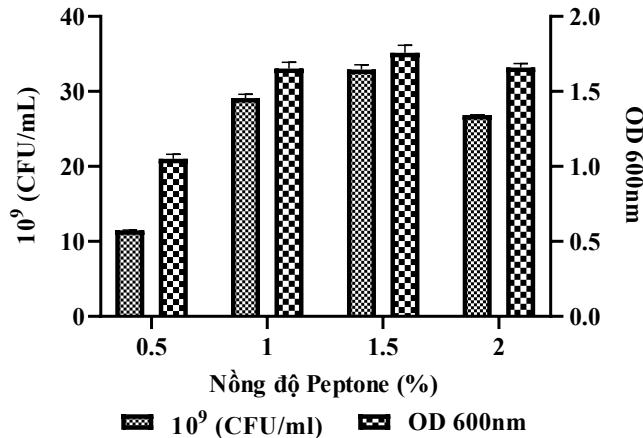
Kết quả (Bảng 3.11) cho thấy nồng độ peptone có ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng kháng khuẩn của chủng nghiên cứu. Cụ thể, đường kính vòng kháng khuẩn đối với *S. enterica* tăng từ  $15,77 \pm 0,12$  mm ở nồng độ 0,5% lên cực đại  $23,07 \pm 0,17$  mm tại 1,5%, sau đó giảm dần. Xu hướng được ghi nhận đối với *E. coli*, với giá trị cao nhất đạt  $12,23 \pm 0,17$  mm tại 1,5% và giảm nhẹ ở các nồng độ cao hơn. Đối với *C. perfrigen*, hoạt tính kháng khuẩn biểu hiện rõ tại nồng độ 1,5% ( $3,96 \pm 0,05$  mm). Điều này cho thấy khả năng tổng hợp các hợp chất kháng khuẩn có thể bị phụ thuộc mạnh vào nồng độ nitơ trong môi trường. Kết quả trên chúng tỏ nồng độ peptone 1,5% là điều kiện tối ưu cho hoạt tính kháng khuẩn.

Nồng độ nitrogen cũng ảnh hưởng đáng kể đến khả năng sinh enzyme ngoại bào của chủng. Kết quả cho thấy hoạt tính amylase tăng từ  $18,6 \pm 0,14$  mm (0,5%) lên  $22,87 \pm 0,19$  mm tại 1,5% và giảm nhẹ ở 2%. Cellulase đạt giá trị cao nhất ( $20,6 \pm 0,14$  mm) tại nồng độ từ 1,5%. Lipase đạt cực đại  $22,57 \pm 0,14$  mm tại 1,5%, sau đó giảm còn  $18,63 \pm 0,18$  mm ở 2%. Protease giữ ổn định ở tất cả nồng độ  $10,25 \pm 0,12$  mm (0,5%) lên  $19,9 \pm 0,1$  mm tại 1,5%. Ở khoảng nồng độ 1,5% peptone đạt hiệu ở cao nhất cho hoạt tính enzyme ngoại bào.

Kết quả thể hiện ở Hình 3.20 cho thấy mật độ tế bào tăng theo nồng độ peptone từ 0,5% đến 1,5%. Cụ thể, mật độ tế bào tăng từ khoảng  $11,48 \times 10^8$  CFU/mL lên cực đại khoảng  $32,93 \times 10^8$  CFU/mL tại 1,5%. Khi tiếp tục tăng nồng độ peptone lên 1,5%, mật độ tế bào giảm nhẹ, cho thấy sự bão hòa dinh

đưỡng có thể gây cản trở đến sinh trưởng. Giá trị OD 600nm cũng có xu hướng tăng tương ứng với mật độ tế bào.

Dựa vào kết quả phân tích, nồng độ peptone thích hợp được đề xuất là 1,5% peptone vì làm tăng cả hoạt tính kháng khuẩn, sinh khối và enzyme ngoại bào.



**Hình 3.20** Ảnh hưởng của nồng độ peptone đến mật độ tế bào

### 3.4.9 Ảnh hưởng của nguồn khoáng

Nguồn khoáng trong môi trường nuôi có ảnh hưởng đáng kể đến hoạt tính kháng khuẩn và khả năng phân giải cơ chất của chủng *B. amyloliquefaciens* BacA10 nghiên cứu. Các khoáng chất không chỉ tham gia vào cấu trúc enzyme mà còn ảnh hưởng đến quá trình trao đổi chất, sinh tổng hợp các hợp chất kháng khuẩn và khả năng phân giải các cơ chất phức tạp.

**Bảng 3.12** Ảnh hưởng của nguồn khoáng đến hoạt tính kháng khuẩn và enzyme

Nguồn khoáng	Đường kính vòng kháng khuẩn (D-d, mm)			Đường kính vòng phân giải cơ chất (D-d,mm)			
	SE	EC	CP	Amylase	Cellulase	Lipase	Protease
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	20,6 ±0,41	14,53 ±0,37	3,13 ±0,12	21,1 ±0,14	20,67 ±0,47	20,33 ±0,24	18,2 ±0,1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	<b>26,83</b> ±0,17	<b>15,37</b> ±0,26	<b>9,47</b> ±0,21	<b>23,07</b> ±0,05	<b>22,87</b> ±0,19	<b>22,8</b> ±0,16	<b>21,1</b> ±0,9
MnSO <sub>4</sub>	23,53 ±0,04	14,53 ±0,04	9,17 ±0,12	22,67 ±0,17	22,7 ±0,14	22,53 ±0,09	19,8 ±0,1

MgSO <sub>4</sub>	23,27 ±0,12	8,83 ±0,12	6,97 ±0,12	21,37 ±0,26	22,17 ±0,24	22,2 ±0,24	12,7 ±0,1
NaCl	21,37 ±0,09	8,57 ±0,09	+	22,27 ±0,19	18,3 ±0,16	16,97 ±0,16	12,8 ±0,1
CaCl <sub>2</sub>	21,53 ±0,09	8,93 ±0,09	3,67 ±0,23	22,5 ±0,71	17,63 ±0,39	16,97 ±0,39	13,3 ±0,2

**Hình 3.21** Ảnh hưởng của nguồn khoáng đến hoạt tính kháng khuẩn và enzyme ngoại bào

*Ghi chú: Các giếng K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>,... là các nguồn khoáng sử dụng khảo sát*

Dữ liệu trình bày dưới dạng bảng 3.12, hình 3.21 và hình 3.22 cho thấy nguồn khoáng có ảnh hưởng đến hoạt tính sinh học và khả năng sinh trưởng của chủng vi sinh vật nghiên cứu. Các nguồn khoáng được khảo sát bao gồm K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub> và NaCl.

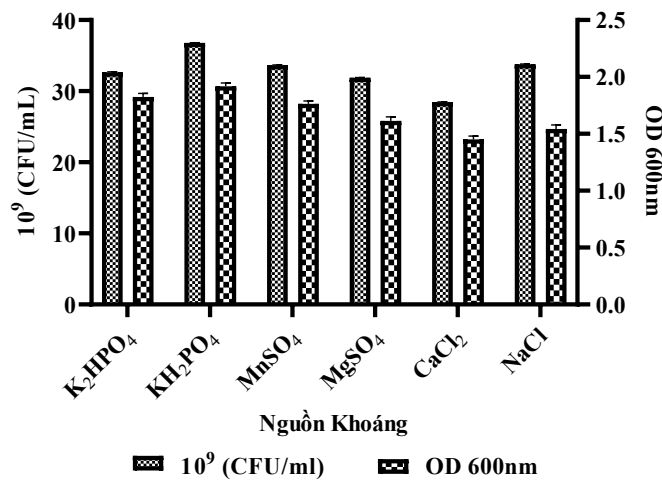
Về hoạt tính kháng khuẩn, kết quả cho thấy KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> và MnSO<sub>4</sub> là hai nguồn khoáng cho hiệu quả nổi bật nhất. Cụ thể, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tạo vòng kháng khuẩn lớn nhất đối với *S. enterica* (22,86±0,17 mm) và *E. coli* (15,37±0,26 mm), đồng thời đạt giá trị cao nhất đối với *C. perfringens* (9,47±0,21 mm). MnSO<sub>4</sub> cũng thể hiện hoạt tính mạnh với các giá trị tương ứng là 23,53±0,04 mm, 14,53±0,04 mm và 9,17±0,12 mm. Trong khi đó, các nguồn khoáng khác như MgSO<sub>4</sub>, NaCl và CaCl<sub>2</sub> cho hiệu quả thấp hơn.

Đối với khả năng sinh enzyme, nguồn khoáng cũng có ảnh hưởng đáng kể đến đường kính vòng phân giải. Muối KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tiếp tục cho kết quả cao nhất ở hầu hết các enzyme (amylase 23,07±0,05 mm; cellulase 22,87±0,19 mm; lipase 22,8±0,16 mm; protease 21,1±0,9 mm). Muối MnSO<sub>4</sub> cũng cho kết quả khá

cao, đặc biệt đối với amylase ( $22,67 \pm 0,17$  mm), cellulase ( $22,7 \pm 0,14$  mm) và lipase ( $19,8 \pm 0,1$  mm). Các nguồn khoáng còn lại cho giá trị enzyme thấp hơn và ít biến động, chúng không có khả năng kích thích tổng hợp enzyme.

Kết quả về sinh trưởng tế bào thể hiện trong Hình 3.22 cho thấy mật độ tế bào (CFU/ml) và giá trị OD thay đổi tùy theo nguồn khoáng. Trong đó,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  cho mật độ tế bào cao nhất ( $36,78 \times 10^9$  CFU/ml) và OD đạt giá trị cực đại (1,917), muối này hỗ trợ sinh trưởng tối ưu.  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  và  $\text{MnSO}_4$  cũng duy trì mật độ tế bào tương đối cao. Ngược lại,  $\text{CaCl}_2$  cho giá trị thấp nhất, cho thấy không phù hợp cho sinh trưởng của chủng *B. amyloliquefaciens* BacA10.

Tổng hợp các kết quả cho thấy  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  là nguồn khoáng tối ưu, vừa thúc đẩy mạnh mẽ sinh trưởng tế bào, kích thích hoạt tính kháng khuẩn và khả năng sinh enzyme. Bổ sung vào môi trường gốc phosphate ( $\text{PO}_4$ )<sup>3-</sup> với vai trò tham gia vào quá trình tổng hợp ATP, các enzyme, sinh tổng hợp ADN và điều hòa chuyển hóa nội bào... Nguồn khoáng khác như  $\text{MnSO}_4$  có thể đóng vai trò hỗ trợ, nhưng hiệu quả không vượt trội so với  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .



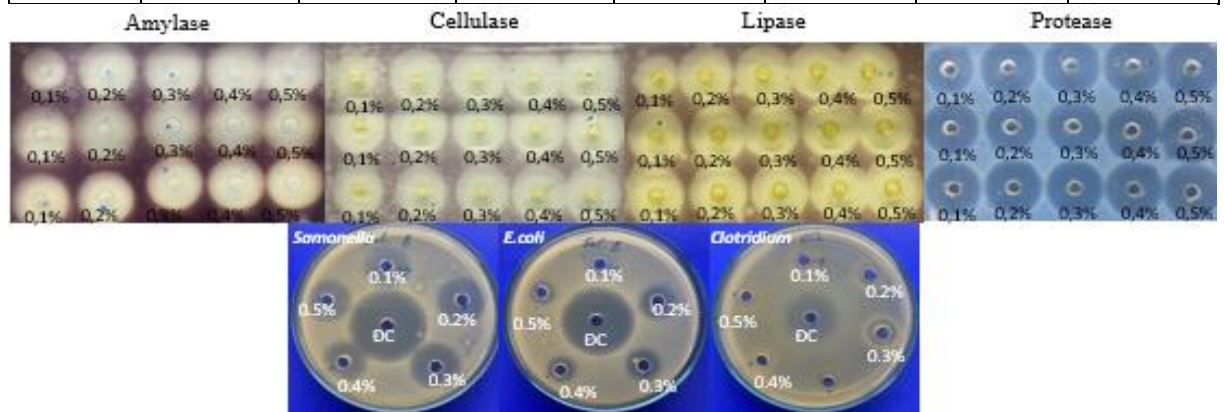
**Hình 3.22** Ảnh hưởng của nguồn khoáng đến mật độ tế bào

#### 3.4.10 Ảnh hưởng của nồng độ $\text{KH}_2\text{PO}_4$

Nồng độ khoáng là yếu tố quan trọng chi phối quá trình sinh trưởng và hoạt tính sinh học của vi sinh vật, trong đó sự thay đổi nồng độ có thể thúc đẩy hoặc ức chế các quá trình trao đổi chất. Trong nghiên cứu này, sử dụng 0,1% đến 0,5% bổ sung vào môi trường nuôi để nghiên cứu hoạt tính kháng khuẩn, khả năng sinh enzyme ngoại bào và sinh trưởng của chủng chọn lọc.

**Bảng 3.13** Ảnh hưởng của nồng độ khoáng đến hoạt tính kháng khuẩn và enzyme

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (%)	Đường kính vòng kháng khuẩn (D-d, mm)			Đường kính vòng phân giải cơ chất (D-d,mm)			
	SE	EC	CP	Amylase	Cellulase	Lipase	Protease
0,1	21,23 ±0,17	+	+	22,33 ±1,1	22,83 ±2,72	19,83 ±2,25	21,33 ±1,7
0,2	26,73 ±0,08	15,2 ±0,21	9,33 ±0,24	23,1 ±0,08	22,93 ±0,19	22,87 ±0,19	21,7 ±0,2
<b>0,3</b>	<b>28,73</b> <b>±0,17</b>	<b>16,3</b> <b>±0,14</b>	<b>12,13</b> <b>±0,14</b>	<b>24,67</b> <b>±1,1</b>	<b>24,67</b> <b>±0,24</b>	<b>24,37</b> <b>±0,09</b>	<b>22,5</b> <b>±0,69</b>
0,4	24,7 ±0,21	13 ±0,37	8,87 ±0,09	23,83 ±1,4	22,5 ±0,41	22,5 ±0,82	22,2 ±0,6
0,5	24,27 ±0,18	12,3 ±0,25	6,27 ±0,21	23,3 ±0,9	24,33 ±0,47	22,33 ±0,62	22 ±0,8



**Hình 3.23** Ảnh hưởng của nồng độ khoáng đến hoạt tính kháng khuẩn và enzyme ngoại bào

*Ghi chú:* Các giếng 0,1%; 0,2%; 0,3%; 0,4%; 0,5% là nồng độ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> khảo sát

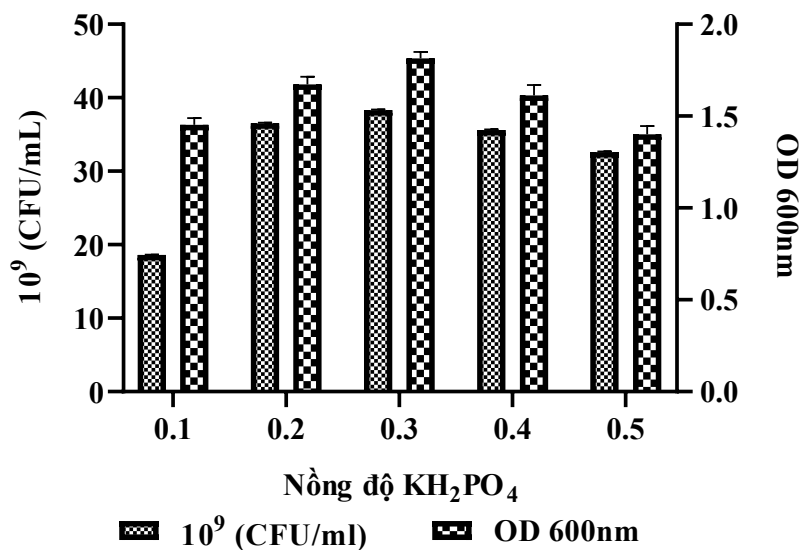
Kết quả trình bày trong bảng 3.13 và hình 3.23 cho thấy nồng độ khoáng (0,1–0,5%) có ảnh hưởng rõ rệt đến hoạt tính kháng khuẩn và khả năng sinh enzyme của chủng nghiên cứu. Về hoạt tính kháng khuẩn, giá trị cao nhất đạt được tại nồng độ 0,3% (28,73±0,17 mm) với *S. enterica*, sau đó giảm dần khi tăng nồng độ khoáng lên 0,4% và 0,5%. Đối với *E. coli*, xu hướng tương tự được ghi nhận, với đường kính vòng vô khuẩn tăng từ 0,1% (không đáng kể)

lên cực đại tại 0,3% ( $16,3 \pm 0,14$  mm), rồi giảm ở các nồng độ cao hơn. Riêng *C. perfringen* cho thấy sự thay đổi rõ ràng vòng kháng khuẩn tăng dần từ 0,1% đến 0,3%, giá trị cao nhất là  $12,13 \pm 0,14$  mm ở nồng độ 0,3%.

Đối với hoạt tính enzyme, kết quả cho thấy enzyme amylase, cellulase, lipase và protease đều chịu ảnh hưởng của nồng độ khoáng. Cụ thể, amylase đạt giá trị cao nhất ( $24,67 \pm 1,1$  mm), cellulase  $24,67 \pm 0,24$  và lipase là  $24,37 \pm 0,09$  tại nồng độ 0,3%. Protease ít biến động, dao động quanh mức 21,33-22,5 mm ở tất cả các nghiệm thức, cao nhất ở nồng độ 0,3% là  $22,5 \pm 0,69$  mm. Điều này cho thấy nồng độ khoáng tối ưu (khoảng 0,3%) có vai trò kích thích mạnh mẽ quá trình sinh tổng hợp enzyme ngoại bào.

Kết quả trong Hình 3.24 phản ánh ảnh hưởng bởi nồng độ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  đến mật độ tế bào (CFU/ml) và độ hấp thụ quang OD 600nm. Mật độ tế bào tăng dần từ 0,1% đến 0,3%, đạt cực đại tại 0,3% ( $38,32 \times 10^9$  CFU/ml), sau đó giảm ở các nồng độ cao hơn. Xu hướng của OD 600nm cũng tương đồng, đạt giá trị cao nhất tại 0,3% (1,813), phản ánh sự sinh trưởng tối ưu của vi sinh vật tại nồng độ này. Khi nồng độ khoáng tiếp tục tăng, mật độ tế bào giảm, có thể do áp suất thẩm thấu hoặc sự mất cân bằng dinh dưỡng gây ức chế sinh trưởng.

Tổng hợp các kết quả cho thấy, nồng độ khoáng 0,3% là điều kiện tối ưu cho cả hoạt tính kháng khuẩn, khả năng sinh enzyme và sinh trưởng tế bào. Việc tăng nồng độ khoáng vượt quá mức này không đem lại hiệu quả cao hơn.



**Hình 3.24** Ảnh hưởng của nồng độ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  đến mật độ tế bào

## KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

### KẾT LUẬN

1. Đã sàng lọc 12 chủng phân lập từ ruột lợn và chọn lọc được 01 chủng *Bacillus* BacA10. Chủng *Bacillus* BacA10 có hoạt tính kháng vi khuẩn *Escherichia coli* VTCCB-0482, *Salmonella enterica* VTCCB-0480 và *Clostridium perfringens* ATCC 13124 mạnh nhất.
2. Chủng BacA10 an toàn, không tạo vết tan trong máu cừu và đã được định danh dựa trên trình tự 16S RNA. Chủng BacA10 tương đồng với *Bacillus amyloliquefaciens* đến 99,9% và được kí hiệu là *Bacillus amyloliquefaciens* BacA10.
3. Chủng *Bacillus amyloliquefaciens* BacA10 có khả năng sinh trưởng và phát triển trong điều kiện pH thấp và muối mật mô phỏng invitro giống hệ tiêu hoá : Tính kỵ nước 52,11%, khả năng tự đông tụ 71,65%, kết tụ vi khuẩn gây bệnh *S. enterica* 61,06% ; *E. coli* 43,91%, *C. perfringens* 22,41% và nhạy cảm với các loại kháng sinh phổ biến được sử dụng cho con người.
4. Đã chọn được điều kiện nuôi cấy và môi trường nuôi thích hợp giúp nâng cao hoạt tính kháng khuẩn, khả năng sinh enzyme ngoại bào và mật độ tế bào bao gồm: tỷ lệ tiếp giống ban đầu 7%, pH ban đầu 7, nhiệt độ 37°C, thời gian lên men 36 giờ ; môi trường nuôi có thành phần dinh dưỡng như Luria-Bertani (LB) được bổ sung thêm maltodextrin 2,5%, peptone 1,5% và KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,3%.

### KIẾN NGHỊ

Tiếp tục nghiên cứu sâu hơn về hệ gen chủng *B. amyloliquefaciens* BacA10 và tính an toàn của chủng. Kế thừa những kết quả đạt được từ luận văn này và phát triển thêm điều kiện nuôi cấy ở qui mô lớn hơn cho sản xuất bào tử *B. amyloliquefaciens* BacA10 cao sản nhằm ứng dụng trọng thực tiễn.

LỜI CẢM ƠN: Luận văn được thực hiện có sự hỗ trợ kinh phí của nhiệm vụ: “Nghiên cứu công nghệ sản xuất và sử dụng chế phẩm sinh học cho lợn nái nuôi con và lợn con sau cai sữa nhằm giảm thiểu sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi trên địa bàn Hà Nội” cấp sở Khoa học và công nghệ Hà nội. Mã số đề tài: CT04/04-2024-3.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

- [1] C. SM, 2011, Bacillus probiotics, *Food Microbiol*, vol. 28, pp. 214-20.
- [2] Salminen S., Collado M.C., Endo A., et al., 2021, The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics, *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, vol. 18, pp. 649-667.
- [3] Binda, S., Hill, C., Johansen, E., Obis, D., Pot, B., Sanders, M. E., Tremblay, A., & Ouwehand, A. C., 2020, Criteria to qualify microorganisms as “probiotic” in foods and dietary supplements., *Frontiers in Microbiology*, vol. 11, p. 1662.
- [4] Pereira, G. V. M., Coelho, B. O., Magalhães Júnior, A. I., Thomaz-Soccol, V., & Soccol, C. R., 2018, How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria, *Biotechnology Advances*, vol. 36(8), pp. 2060-2076.
- [5] *Food and Agriculture Organization of the United Nations & World Health Organization.*, 2002, Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food: Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food.
- [6] A. Notes, 30 Jun 2025. [Online], Agriculture Institute, Food Spoilage: Causes, Types, and Prevention Methods, [Accessed 12 Jun 2026].
- [7] Snyder, A. B., Martin, N. H., & Wiedmann, M., 2024, Microbial food spoilage: Impact, causative agents and control strategies, *Nature Reviews Microbiology*, vol. 22, pp. 315-330.
- [8] Huis in't Veld, J. H. J., 1996, Microbial and biochemical spoilage of foods: An overview, *International Journal of Food Microbiology*, vol. 33(1), pp. 1-18.

- [9] Sức khỏe & đời sống, 2013, Những vụ ngộ độc thực phẩm kinh hoàng trên thế giới.
- [10] J. Whitworth, 2026, *Salmonella* outbreak sickens 14 in Denmark, *Food Safety News*.
- [11] K. Duyên, 2025, Từ vụ ngộ độc ở TP.HCM: Những vi khuẩn nguy hiểm dễ có trong ổ bánh mì, *Tạp chí tri thức*.
- [12] VOV, 2023, Phát hiện thêm vi khuẩn trong vụ ngộ độc ở Quảng Nam.
- [13] X. Quý, Đại biểu nhân dân, 2024, Vụ 547 người bị ngộ độc bánh mì ở Đồng Nai: Phát hiện vi khuẩn *Salmonella*, *E.Coli* trong thực phẩm.
- [14] Quân đội nhân dân, 2026, Phát hiện vi khuẩn *E.coli* trong vụ 46 người ngộ độc sau tiệc tất niên.
- [15] Kurtz J.R.; Goggins J.A.; McLachlan, J.B, 2017, *Salmonella* infection: Interplay between the bacteria and host immune system., *Immunol. Lett*, vol. 190, pp. 42-50.
- [16] Bell C.; Kyriakides A, 2009, *Salmonella*. In Foodborne Pathogens-Hazards, Risk Analysis, *Woodhead Publishing Limited: Oxford, UK*, pp. 627-654.
- [17] Vinmec, 2024, Biểu hiện khi cơ thể nhiễm vi khuẩn *salmonella*, [Online].
- [18] S. M. Jajere, 2019, A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance, *Veterinary World*, vol. 12(4), pp. 504-521.
- [19] Lou, L., Zhang, P., Piao, R., & Wang, Y., 2019, *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI-1) and its complex regulatory network., *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 9, p. 270.

- [20] Fàbrega, A., & Vila, J, 2013, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: Virulence and regulation., *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 26(2), pp. 308-341.
- [21] Jennings, E., Thurston, T. L. M., & Holden, D. W., 2017, *Salmonella* SPI-2 type III secretion system effectors: Molecular mechanisms and physiological consequences, *Cell Host & Microbe*, vol. 22(2), pp. 217-231.
- [22] Galán, J. E., 2021, *Salmonella* Typhimurium and inflammation: A pathogen-centric affair, *Nature Reviews Microbiology*, vol. 19(11), pp. 716-725.
- [23] Rajan K.; Shi Z.; Ricke S.C., 2017, Current aspects of *Salmonella* contamination in the US poultry production chain and the potential application of risk strategies in understanding poultry production chain and the potential application of risk strategies in understanding emerging hazards, *Crit. Rev. Microbiol*, vol. 43, pp. 3710-392.
- [24] Shu-Kee E., Priyia P., Nurul-Syakima A. M., Hooi- Leng S., Kok-Gan C. & Learn-Han L, 2015, *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance, *Frontiers in Life Science*, vol. 8:3, pp. 284-293.
- [25] Lamichhane B, Mawad AMM, Saleh M, Kelley WG, Harrington PJ 2nd, Lovestad CW, Amezcua J, Sarhan MM, El Zowalaty ME, Ramadan H, Morgan M, Helmy YA., 2024, Salmonellosis: An Overview of Epidemiology, Pathogenesis, and Innovative Approaches to Mitigate the Antimicrobial Resistant Infections, *Antibiotics (Basel)*, vol. 13(1), p. 76.
- [26] Lê Huy Chính, 2007, *Vi sinh vật y học*, Nhà xuất bản Giáo dục Hà Nội, p. 395.
- [27] W. H. Organization, 2018, *E. coli*.
- [28] U. F. a. D. Administration, 2019, *Escherichia coli (E. coli)*, <https://www.fda.gov/food/foodborne-pathogens/escherichia-coli-e-coli>.

- [29] C. f. D. C. a. Prevention, 2024, Types of *E. coli*.
- [30] F. a. D. Administration, 2022, *Escherichia coli (E. coli)*.
- [31] W. H. Organization, 2023, Batulism.
- [32] D. I. Johnson, 2018, *Clostridium spp., Bacterial Pathogens and Their Virulence Factors*, Springer, Cham, pp. 51-71.
- [33] Vinmec, 2025, Ngộ độc thực phẩm do clostridium botulinum.
- [34] StatPearls, 2023, *Clostridium perfringens* infection.
- [35] S. M. Cutting, 2011, *Bacillus* probiotic, *Food Microbiology*, vol. 28, no. 2, pp. 214-220.
- [36] Elshagabee, F. M. F., Rokana, N., Gulhane, R. D., Sharma, C., & Panwar, H, 2017, *Bacillus* as potential probiotics: Status, concerns, and future perspectives, *Frontiers in Microbiology*, vol. 8, p. 1490.
- [37] D. S. Zilda, 2023, Characteristics and Substrate Specificity of Semi-Purified Bacterial Protease of *Bacillus thuringiensis* HSFI-12 with Potential as Antithrombotic Agent, *Science & Technology Indonesia*, vol. 8, no. 1, pp. 9-16.
- [38] Logan, N. A., & De Vos, P., 2015, Genus I. *Bacillus*, in *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, p. Wiley Online Library.
- [39] Hong, H. A., Duc, L. H., & Cutting, S. M, 2005, The use of bacterial spore formers as probiotics, *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 29, no. 4, pp. 813-835.
- [40] Zhang Jin Ng, Mazni Abu Zarin, Chee Keong Lee, Joo Shun Tan, 2020, Application of bacteriocins in food preservation and infectious disease treatment for humans and livestock: a review, *RSC Advances*, vol. 10(64), no. doi: 10.1039/d0ra06161a. PMID: 35518417; PMCID: PMC9057404, pp. 38937-38964.

- [41] Nguyễn Thuý Hương, Trần Thị Tường An, 2008, Thu nhận Bacteriocin bằng phương pháp lên men bởi tế bào *Lactococcus lactis* cố định trên chất mang Cellulose vi khuẩn (BC) và ứng dụng trong bảo quản thịt tươi sơ chế tối thiểu, *Tạp chí Phát triển Khoa học & Công nghệ*, tập Tập 11. Số 9.
- [42] Nguyễn Thị Huỳnh Như, Nguyễn Quỳnh Như, Nguyễn Thị Yến Nhi, Nguyễn Hoàng Ngọc Phương, 2019, Màng phân hủy sinh học kháng khuẩn bảo quản thực phẩm sống, *Tạp chí Kiểm nghiệm và An toàn thực phẩm*, Tập 2-Số 3, pp. 114-120.
- [43] Abbasiliasi S., Tan J.S., Ibrahim T.A.T., Bashohouh F., Ramakrishnan N.R., Mustafaab S. & Ariff A.B., 2017, Fermentation factors influencing the production of bacteriocins by lactic acid bacteria: a review, *RSC Advances*, vol. 7, pp. 29395-29420.
- [44] Siewert G., Strominger J.L., 1967, Bacitracin: An inhibitor of the dephosphorylation of lipid pyrophosphate, an intermediate in the biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, vol. 57, pp. 767-773.
- [45] Kenig M., Vandamme E., Abraham E.P., 1976, The mode of action of bacilysin and anticapsin and biochemical properties of bacilysin-resistant mutants., *J. Gen. Microbiol.*, vol. 94, pp. 46-54.
- [46] V. H. J., 2007, Lipid intermediates in the biosynthesis of bacterial peptidoglycan, *Microbiol*, vol. 71, p. 620–635.
- [47] Chugunov A., Pyrkova D., Nolde D., Polyansky A., Pentkovsky V., Efremov R., 2013, Lipid-II forms potential “landing terrain” for lantibiotics in simulated bacterial membrane, *Sci. Rep*, vol. 3, p. 1678.
- [48] Oman T.J., Lupoli T.J., Wang T.S., Kahne D., Walker S., van der Donk W.A., 2011, Haloduracin  $\alpha$  binds the peptidoglycan precursor lipid II with 2:1 stoichiometry, *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 133, p. 17544–17547.

- [49] R. Freudl, 2018, Signal peptides for recombinant protein secretion in bacterial expression systems, *Microbial Cell Factories*.
- [50] Liang, J., Li, C., Chen, Z., Guo, F., Dou, J., Wang, T., & Xu, Z. S., 2024, Progress of research and application of *Bacillus coagulans* as probiotic bacteria, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 14.
- [51] Lee, N. K., Kim, W. S., & Paik, H. D., 2019, *Bacillus* Strains as Human Probiotics: Characterization, Safety, Microbiome, and Probiotic Carrier, *Food Science and Biotechnology*, vol. 28, no. 5, pp. 1297-1305.
- [52] Grant, A., Gay, C. G., & Lillehoj, H. S., 2018, *Bacillus spp.* probiotic strains as a potential tool for limiting the use of antibiotics, and improving the growth and health of pigs and chickens, *Avian Pathol*, vol. 47, no. 4, pp. 339-351.
- [53] Mingmongkolchai, S., & Panbangred, W., 2024, *Bacillus* probiotics: an update on spore-forming bacteria for human health applications.
- [54] Lee Seok-Hoon, Joo, N.-S., Kim, K.-M., & Kim, K.-N., 2018, The Therapeutic Effect of a Multistrain Probiotic on Diarrhea-Predominant Irritable Bowel Syndrome: A Pilot Study, *Gastroenterology Research and Practice*, p. 8791916.
- [55] Hugo Ramirez-Olea, Reyes-Ballesteros, B., & Chavez-Santoscoy, R. A., 2022, Potential application of the probiotic *Bacillus licheniformis* as an adjuvant in the treatment of diseases in humans and animals: A systematic review, *Frontiers in Microbiology*, vol. 13, p. 993451.
- [56] Kumar, A., Singh, R., Yadav, A., & Singh, P., 2024, Plant growth-promoting *Bacillus*: mechanisms and applications in sustainable agriculture, *Plants*, vol. 15(3), p. 516.
- [57] Abriouel, H., Franz, C. M. A. P., Omar, N. B., & Gálvez, A., 2023, The complex and changing genus *Bacillus*: A diverse bacterial powerhouse for many applications, *Microorganisms*, vol. 3(3), p. 17.

- [58] Schallmeyer, M., Singh, A., & Ward, O. P., 2004, Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production, *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 50(1), pp. 1-17.
- [59] Sadrimovahed, M., & Ulusoy, B. H., 2024, *Bacillus clausii*: A review into story of its probiotic success and potential food applications, *Fermentation*, vol. 10(10), p. 522.
- [60] Anonymous, 2024, *Bacillus clausii* probiotic effects beyond gastrointestinal diseases: A scoping review, *Gut (BMJ)*.
- [61] Sohel S Shaikh, Snehal Patel, Anis Malik, Aakash Kumar S , 2024, Efficacy and safety assessment of probiotic *Bacillus coagulans* (Heyndrickxia coagulans) BCP92 for treatment of diarrhea, *NCBI*, vol. 13(6).
- [62] Nguyễn Thị Thanh Thủy, Vũ Thị Huyền Trang, Vũ Quỳnh Hương, Trịnh Thị Thu Thủy, Nguyễn Thị Lâm Đoàn, Trần Thị Na, & Nguyễn Hoàng Anh., 2016, Phân lập, định danh và sơ bộ xác định đặc tính của các chủng *Bacillus subtilis* có phổ kháng khuẩn rộng từ tương ớt Mường Khương, *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, tập 14, số 7, pp. 1009-1015.
- [63] Đinh Thị Hiền & Vũ Văn Hạnh, 2025, Phân lập, nhận dạng và sàng lọc chủng vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp bacteriocin từ mẫu thực phẩm lên men và ruột cá, *Tạp chí Dinh dưỡng và Thực phẩm*, tập 21, số 4, pp. 111-122.
- [64] Đoàn Thị Thanh Lan, Đào Gia Bảo, Lưu Thị Thùy Nga, Ngô Bảo Bảo, Hoàng Thị Thu Hương, Nguyễn Văn Tuấn, & Lê Thị Hồng, 2025, Đánh giá toàn diện đặc tính an toàn in vitro của chủng *Bacillus subtilis* Eramic 25 và tiềm năng ứng dụng trong sản xuất thực phẩm bảo vệ sức khỏe, *Tạp chí Dinh dưỡng và Thực phẩm*, tập 21, số 3, pp. 1-12.
- [65] Psifidi A, DovasCl, Banos G, 2010, A comparison of six methods for genomic DNA extraction suitable for PCR-based genotyping applications using ovine milk sample, *Mol Cell Probes*, pp. 24 (2): 93-8.

- [66] Green, M.R., & Sambrook, J., 2017, Isolation of High-Molecular-Weight DNA from Mammalian Blood Using Proteinase K and Phenol, *Cold Spring Harbor Protocols*.
- [67] Psifidi A, Dovas CI, Bramis G, Lazou T, Russel CL, Arsenos G, et al., 2015, Comparison of Eleven Methods for Genomic DNA Extraction Suitable for Large-Scale Whole-Genome Genotyping and Long-Term DNA Banking Using Blood Samples, *PLoS ONE*, p. 10(1): e0115960.
- [68] Minh Tan Pham, Phung Thao Uyen Nguyen, Tran Hai Yen Nguyen, Khanh Linh Ma & Thi Da Chau, 2025, Evaluation of probiotic properties of *Bacillus aryabhatai* HY1 isolated from Vietnamese pickled mustard greens, *Scientific Reports*, vol. 15(42613).
- [69] Lee, N.-K., Kim, S.-Y. & Paik, H.-D., 2013, Probiotic *Bacillus subtilis* KU201 having antifungal and antimicrobial properties isolated from kimchi, *Food Sci. Biotechnol*, vol. 22, pp. 1-5.
- [70] Vadakedath Nithya & Prakash M. Halami, 2013, Evaluation of the probiotic characteristics of *Bacillus* species isolated from different food sources, *Annals of Microbiology*, tập 63, pp. 129-13.
- [71] Taheri H, Tabandeh F, Moravej H et al, 2009, Potential probiotic of *Lactobacillus johnsonii* LT171 for chicken nutrition, *Afr J Biotech*, vol. 8, pp. 5833-5837.
- [72] Pérez-Sánchez T, Balcázar JL, García Y et al, 2011, Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with inhibitory activity against *Lactococcus garvieae*," *J Fish Dis*, vol. 34, pp. 499-507.
- [73] Angmo, K., Kumari, A. & Bhalla, T. C., 2016, Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented food and beverage of Ladakh, *LWT-Food Sci. Technol*, vol. 66, pp. 428-435.
- [74] Rokana N, Singh BP, Thakur N, Sharma C, Gulhane RD, Panwar H, 2018, Screening of cell surface properties of potential probiotic

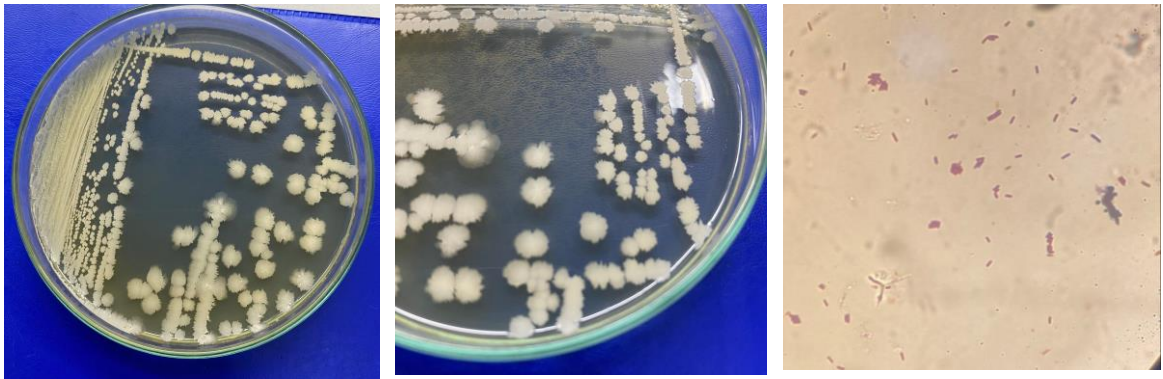
- lactobacilli isolated from human milk, *J Dairy Res*, vol. 85(3), p. 347–354.
- [75] J. Hudzicki, 2009, Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol, *American society for microbiology*.
- [76] Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Đình Quyên, Phạm Văn Ty, 2007, *Vi sinh vật học*, Hà Nội: Nhà xuất bản Giáo dục.
- [77] Tochukwu Nwamaka Nwagu, Chika Jude Ugwudo, Chukwudi O. Onwosi, Ogechukwu Inyima, Oluoma Chizaram Uchendu & Chioma Akpuru, 2020, Evaluation of the probiotic attributes of *Bacillus strains* isolated from traditinal fermented African locust bean seed (*Parkia biglobosa*), *Annals of Microbiology*, vol. 70.
- [78] Q.D. Tinh, T.T.Trung, N.N.Duy, 2013, Survey of some probiotic activity of traditional passionfruit-kefir and *Lactobacillus casei* VTCC 186-supplemented pasionfruit-kefir, *Science and Technology Development*, vol. 16(3), pp. 40-47.
- [79] Shangpliang HNJ, Sharma S, Rai R, Tamang JP, 2017, Some technological properties of lactic bacteria isolated from Dahi and Datshi, naturally fermented milk products of Bhutan, *Front Microbiol*, vol. 8.
- [80] Pedersen K, Tannock GW, 1989, Colonization of the porcine gastrointestinal tract by lactobacili, *Appl Environ Microbiol*, vol. 55, pp. 279-283.
- [81] Lee S, Lee J, Jin YI et al, 2017, Probiotic of *Bacillus* strains isolated from Korean traditional soy sauce," *LWT-Food Sci Technol*, vol. 79, pp. 518-524.
- [82] Ragul K, Syiem I, Sundar K, Shetty PH, 2017, Charaterization of probitic potential of *Bacillus* species isolated from a tradional brine pikle, *J Food Sci Technol*, tập 54, pp. 4473-4483.

- [83] Collado, M. C., et al., 2007, Role of probiotic strains against pathogen adhesion, *Letters in Applied Microbiology*, vol. 45, pp. 454-460.
- [84] M. Teuber, L. Meile, F. Schwarz, 1999, Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food, *Lactic Acid Bacteria: Genetics Metabolism and Applications*, pp. 1115-137.
- [85] Xiaojing Guo, Xinyan Bai, Zhenjia Zheng, Zhichang Qiu, Xuguang Qiao, Yiteng Qiao, 2025, Optimization of Culture Conditions for Bacteriocin Production by *Pediococcus Acidilactici* CCFM18 and Characterization of Its Biological Properties, *Fermentation*, vol. 11, no. 8, p. 470.
- [86] Fengming Liu, Yixuan Lin, Qi Liang, Xuhui Chen, Baotang Zhao, 2026, Co-Culture Reveals the Quorum-Sensing Regulatory Mechanism of Bacteriocin PlnJK Synthesis in *Lactiplantibacillus plantarum* EL2, *Microorganisms*, vol. 14, no. 4, p. 730.
- [87] Phương Thị Hương, Vũ Văn Hạnh, 2018, Lựa chọn điều kiện lên men cho sự sinh trưởng chủng *Bacillus subtilis* BSVN15 ứng dụng sản xuất chế phẩm Probitic trong chăn nuôi, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, tập 16(1), pp. 167-172.
- [88] Shrestha, S., Chio, C., Khatiwada, J. R., Kognou, A. L. M., & Qin, W, 2022, Optimization of multiple enzymes production by fermentation using lipid-producing *Bacillus* sp., *Frontiers in Microbiology*, vol. 13, no. 1048692.
- [89] Zhang, X. et al., 2022, Isolation and production optimization of a novel milk-clotting enzyme *Bacillus velezensis* DB219, *AMB Express*, vol. 12, p. 149.
- [90] Nelson, D. L., & Cox, M. M., 2017, Lehninger principles of biochemistry, *Freeman and Company*.

- [91] Chu, W. H. , 2007, Optimization of extracellular alkaline protease production from *Bacillus* species, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, vol. 34, no. 3, p. 241–245.
- [92] Joo, H. S., & Chang, C. S. , 2005, Production of an oxidant and SDS-stable alkaline protease from *Bacillus horikoshii*, *Process Biochemistry*, vol. 38, no. 2, pp. 155-159.
- [93] Enrique Hurtado-Bautista, Africa Islas-Robles, Gabriel Moreno-Hagelsieb, Gabriela Olmedo-Alvarez, 2024, Thermal Plasticity and Evolutionary Constraints in *Bacillus*: Implications for Climate Change Adaptation, *Biology*, vol. 13, no. 12, p. 1088.
- [94] Ray, R. R., Jana, S. C., & Nanda, G., 1996, Induction and carbon catabolite repression in the biosynthesis of  $\beta$ -amylase by *Bacillus megaterium* B6, *Biochemistry and Molecular Biology International*, vol. 38, no. 2, pp. 223-230.
- [95] Brückner, R., & Titgemeyer, F., 2002, Carbon catabolite repression in bacteria: Choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization, *FEMS Microbiology Letters*, vol. 209, no. 2, pp. 141-148.
- [96] Jung, M. Y., Jung, H. M., Lee, J., & Oh, M. K. , 2015, Alleviation of carbon catabolite repression for efficient utilization of sugarcane molasses, *Biotechnology for Biofuels*, vol. 8, p. 106.
- [97] Hunt, S. M., et al., 2016, Maltodextrin-based osmotic effects on bacterial biofilms, *Scientific Reports*, vol. 6, pp. 1-10.
- [98] Malakar, P., Singh, V. K., Karmakar, R., & Venkatesh, K. V., 2014, Effect of osmotic stress on growth and enzyme synthesis in *Escherichia coli*, *SpringerPlus*, vol. 3, p. 748.

## PHỤ LỤC

Hình thái khuẩn lạc và tế bào của chủng vi khuẩn Bac10



Trình tự gen 16S rRNA chủng vi khuẩn BacA10

>BacA10

```

AGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACAC
GTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCG
GATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTA
CAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGA
CGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC
CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGA
CGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGTCTGTGTTA
GGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAA
AGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTG
TCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAA
GCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAATTGGAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAA
GAGGAGAGTGGAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACA
CCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGT
GGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCT
AAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGC
CTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCAC
AAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCT
TGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCTTCGGGGGCAGAGTGACA
GGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAA
CGAGCGCAACCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGCACTCTAAGGTGACT
GCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTAT
GACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCAGCGAAACCGCG
AGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGA
CTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGT
TCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCAGAGAGTTTTGTAACACCCGAAG
TCGGTGAGGTATACCTTTTAGGAGCCAGCCGCCGAA

```