

QCVN 14:2008/BTNMT. Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về nước thải sinh hoạt

QCVN 62-MT:2016/BTNMT. Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về nước thải chăn nuôi

TCVN 6663:2011 (ISO 5667:2006). Tiêu chuẩn quốc gia về Chất lượng nước - Lấy mẫu.

Dương Đức Tiến, Võ Hành, 1997. *Tảo nước ngọt Việt Nam - phân loại bộ tảo lục*. NXB Nông nghiệp.

Nguyễn Văn Tuyên, 2003. *Đa dạng sinh học tảo trong thủy vực nội địa Việt Nam triển vọng và thử thách*. NXB Nông Nghiệp.

Azim ME., Marc C. J. Verdegem, Anne A. van Dam, Malcolm C. M. Beveridge, 2005. *Periphyton: Ecology, Exploitation and Management*. CABI publishing.

Horner RR., Welch EB., Seeley MR., Jacoby JM., 1990. Responses of periphyton to changes in current velocity, suspended sediment and phosphorus concentration. *Freshwater biology*, 24 (2): 215-232.

Wu Yonghong, 2017. *Periphyton: Functions and Application in Environmental Remediation*, Elsevier Inc.

Application of periphyton for domestic and livestock wastewater treatment

Do Phuong Chi, Dinh Tien Dung,
Vu Pham Thai, Nguyen Thi Thu Ha

Abstract

Domestic and livestock wastewater (contaminated of organic, turbidity, nutrients and microorganisms) was used to create periphyton membranes for initial treatment. Periphyton grew fastest on plastic material, then baked clay, coconut fiber and slower on pebbles and gravel, with a density of about 10-20 million cells per cm² after 9-12 days. Suitable genus for wastewater treatment were *Cyclotella*, *Navicula*, *Nitzschia* (bacilariophyta), *Euglena* (Euglenophyta), *Closterium*, *Pediastrum*, *Ulothrix* (Chlorophyta) and *Aphanothece* (Cyanophyta). These periphyton systems removed pollutant to lower level in comparison with the National Technical Regulations within 3 days (domestic wastewater) or 05 days (livestock wastewater). The treatment efficiency of all environmental parameter was above 65%, especially above 80% for total nitrogen and phosphorus, and above 94% for coliform.

Keywords: Fliter materials, Nitrogen and Phosphorus enriched, periphyton, wastewater treatment

Ngày nhận bài: 5/11/2019

Ngày phản biện: 29/11/2019

Người phản biện: TS. Lê Anh Tuấn

Ngày duyệt đăng: 13/01/2020

ĐẶC TÍNH PROBIOTIC ĐA ENZYME CỦA VI KHUẨN VTCC 12251 ỨNG DỤNG TRONG CHĂN NUÔI

Hà Thị Hằng¹, Dương Văn Hợp¹, Đào Thị Lương¹

TÓM TẮT

Các vi khuẩn tạo bào tử đang được sử dụng như probiotic trong thức ăn chăn nuôi, bổ sung vào chế độ ăn uống cho con người cũng như trong các loại thuốc. Chúng càng trở nên hấp dẫn hơn bởi tính ổn định nhiệt và khả năng sống sót qua dạ dày. Trong nghiên cứu này, các đặc tính probiotic trong điều kiện *in vitro* của chủng vi khuẩn VTCC 12251 phân lập từ đất được đánh giá dựa vào các đặc điểm sinh trưởng và khả năng chống chịu trong môi trường ruột mô phỏng. Chủng vi khuẩn được định danh là *Bacillus subtilis* VTCC 12251 dựa vào phân tích trình tự gen 16S rRNA và *rpoB*. Chủng này mang đầy đủ các đặc tính probiotic như: có khả năng sinh các hoạt chất kháng một số vi sinh vật gây bệnh; chịu muối mật (0,3%), chịu NaCl (10%); sinh trưởng được trong điều kiện vi hiếu khí; tồn tại trong điều kiện khắc nghiệt của dạ dày và ruột; có khả năng bám dính vào các tế bào biểu mô ruột; nhạy cảm với một số kháng sinh thông dụng ở các mức độ khác nhau và bào tử có khả năng chịu nhiệt ở 80°C. Ngoài ra, chủng này còn có khả năng sinh nhiều loại enzyme ngoại bào với hoạt tính cao trong các điều kiện lên men lỏng và lên men xộp. Các kết quả đã chứng minh *Bacillus subtilis* VTCC 12251 là một vi khuẩn probiotic đa chức năng đầy hứa hẹn ứng dụng trong chăn nuôi.

Từ khóa: *Bacillus subtilis*, bào tử, đa enzyme, *in vitro*, probiotic

¹ Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Probiotic là các vi sinh vật sống, khi được dùng đủ lượng sẽ mang lại lợi ích sức khỏe cho vật chủ (FAO/WHO, 2002). Probiotic đang được phát triển và tiêu chuẩn hóa cho cả người và động vật. Probiotic được dùng trong thức ăn chăn nuôi để phòng ngừa nhiễm trùng đường tiêu hóa, với việc sử dụng rộng rãi trong ngành chăn nuôi gia cầm và nuôi trồng thủy sản (Hong *et al.*, 2005). Để giải quyết tình trạng kháng kháng sinh, liệu pháp điều trị bằng probiotic dường như là phương pháp khả thi nhất, với lịch sử tiêu thụ lâu dài và đảm bảo an toàn. *Lactobacillus* spp. và *Bifidobacterium* spp. là hai chi vi khuẩn probiotic được công nhận đang được tiêu thụ trên toàn cầu. Bên cạnh đó, các vi khuẩn thuộc các chi *Enterococcus*, *Streptococcus* và *Bacillus*, cùng với một số chủng *Saccharomyces* spp. cũng được sử dụng như probiotic (Majeed *et al.*, 2016). Một số chủng thuộc chi *Bacillus* đã được kiểm tra các chức năng sinh học trong một số mô hình *in vitro* và *in vivo*. Bên cạnh việc đáp ứng đủ các tiêu chuẩn bắt buộc đối với một probiotic; *Bacillus* spp. còn có khả năng chịu axit cao hơn, ổn định tốt hơn trong quá trình xử lý nhiệt và lưu trữ ở nhiệt độ thấp. Ngoài ra, chúng cũng được chứng minh có khả năng loại trừ mầm bệnh, chống oxy hóa, kháng khuẩn, điều hòa miễn dịch, khả năng lên men thực phẩm và đáng kể nhất là khả năng sản xuất enzyme ngoại bào. *Bacillus* spp. đã được sử dụng để sản xuất các loại enzyme amylase, glucoamylase, protease, pectinase và cellulase trong nhiều loại thực phẩm khác nhau (Elshaghabee *et al.*, 2017).

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Chủng vi khuẩn VTCC 12251 được phân lập từ đất và được lưu giữ tại tủ Bảo tàng Giống chuẩn Việt Nam (VTCC), Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học. Vi sinh vật kiểm định: *Escherichia coli* VTCC 10482, *Micrococcus luteus* VTCC 10644, *Salmonella enterica* VTCC 10480, *Staphylococcus aureus* VTCC 10658, từ Bảo tàng Giống chuẩn Việt Nam.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Phân loại: Dựa vào trình tự DNA, dựng cây phát sinh chủng loại. Tách chiết, khuếch đại và xác định trình tự gene 16S rRNA (Gabor *et al.*, 2003) và gene *rpoB* (Fan *et al.*, 2017). Mức độ tương đồng cao nhất về trình tự đoạn 16S rDNA của chủng vi khuẩn nghiên cứu so với các chủng chuẩn đã công bố được tra cứu bằng công cụ Eztaxon-e (Yoon *et al.*, 2017). Trình tự gene *rpoB* được phân tích bởi phần mềm

CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1997). Trình tự tham khảo từ dữ liệu của GenBank. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng theo phương pháp được mô tả bởi Kimura (1980) và Saitou & Nei (1987).

- Nghiên cứu đặc tính probiotic:

Bào tử của chủng VTC 12251 được chuẩn bị theo mô tả của Gil-Turnes và cộng tác viên (1999) từ dịch nuôi vi khuẩn, được gia nhiệt ở 80°C trong 15 phút, ly tâm, rửa ba lần bằng nước cất và hòa lại thể tích ban đầu trong nước cất.

Khả năng chịu muối mật và chịu NaCl của chủng nghiên cứu dựa vào sinh trưởng trên môi trường thạch NA (g/L: cao thịt-3, peptone-5, NaCl-5, agar-16, pH7) chứa oxgall (0; 0,1; 0,3; 0,5 và 1%) hoặc NaCl (0, 3, 5, 10 và 15%) theo mô tả của Prieto và cộng tác viên (2014). Nuôi vi khuẩn ở điều kiện vi hiếu khí trong bình kỵ khí sau 24 giờ như phương pháp của Cenci và cộng tác viên (2006). Sự tồn tại của bào tử trong điều kiện mô phỏng của dịch dạ dày (pepsin - 1 mg/mL, pH 2) và ruột (pancreatin - 1 mg/mL, muối mật - 0,2%, pH 7,4) được thử nghiệm theo phương pháp của Duc và cộng tác viên (2004). Khả năng kháng một số vi sinh vật kiểm định theo phương pháp phủ thạch (Patel *et al.*, 2009). Khả năng kháng một số chất kháng sinh (ampicillin, amoxicillin, cephalixin, cloramphenicol, erythromycin, gentamycin, penicillin G, streptomycin, tetracycline - 10 µg/mL) được thử nghiệm bằng phương pháp đĩa thạch (Gil-Turnes *et al.*, 1999; Menconi *et al.*, 2013). Tính kỵ nước, tự kết tụ và bám dính của vi khuẩn được kiểm tra trên các dung môi chloroform, ethyl acetate và xylene theo phương pháp của Patel và cộng tác viên (2009). Khả năng chịu nhiệt của bào tử ở nhiệt độ 80°C ở các thời điểm 10 phút và 60 phút được đánh giá theo phương pháp của Gil-Turnes và cộng tác viên (1999).

- Khả năng sinh các enzyme: Enzyme ngoại bào (amylase, cellulase, protease và xylanase) của chủng VTCC 12251 thu được bằng các phương pháp nuôi trên môi trường NA và cơ chất; NB dịch thể; nuôi xộp trên cám gạo. Hoạt tính enzyme được định tính bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch, đo vòng phân giải cơ chất. Định lượng hoạt độ amylase, cellulase và xylanase theo phương pháp DNS (Miller, 1959) được cải tiến bởi Khusro và cộng tác viên (2017) cho phân tích amylase; Kumaran và cộng tác viên (2015) cho phân tích cellulase và xylanase. Hoạt độ protease được xác định theo mô tả của Pouryafar và cộng tác viên (2015) với casein làm cơ chất. Các thí nghiệm đều được lặp lại 3 lần.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Các thực nghiệm được thực hiện từ tháng 7/2018 đến tháng 3/2019 tại Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Các chủng probiotic tiềm năng phải có một số đặc tính điển hình như khả năng điều hòa các đáp ứng miễn dịch và hoạt tính kháng khuẩn. Bên cạnh đó, các chủng probiotic phải an toàn và có khả năng hoạt động trao đổi chất trong đường tiêu hóa, chống chịu được acid dạ dày và mật và phải có khả năng xâm thực trong ruột, ít nhất là tạm thời bằng cách bám dính vào biểu mô ruột. Hiệu quả của chế phẩm probiotic cho vật nuôi cuối cùng phải được chứng minh *in vivo*, nhưng các kiểm tra bước đầu *in vitro* phản ánh được những tác động cụ thể và chọn lựa các chủng tiềm năng từ rất nhiều vi sinh vật đã được phát triển và sử dụng (FAO/WHO, 2002).

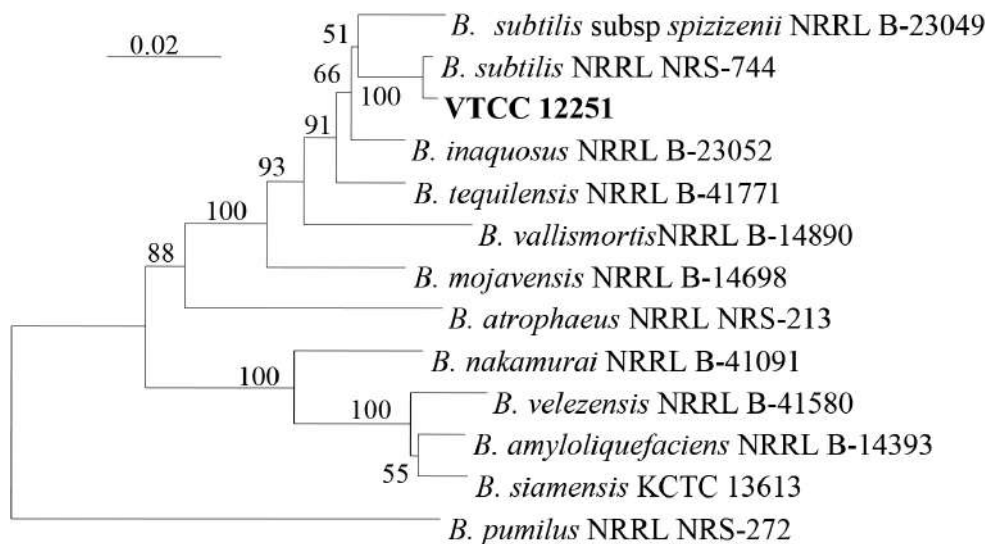
3.1. Phân loại chủng vi khuẩn VTCC 12251

DNA của chủng vi khuẩn VTCC 12251 được tách chiết và trình tự gen 16S rRNA và gene *rpoB* được xác định. Trình tự đoạn gen 16S rRNA chủng VTCC 12251 tương đồng cao nhất với chủng chuẩn *Bacillus subtilis* NRRL NRS-744 là 99,9% (1416/1418 bp) và tương đồng với 10 loài khác (*B. amyloliquefaciens* NRRL B-14393; *B. atrophaeus* NRRL NRS-213; *B. inaquosus* NRRL B-23052; *B. mojavensis* NRRL B-14698; *B. nakamurai* NRRL B-41091; *B. siamensis* KCTC 13613; *B. subtilis* subsp *spizizenii* NRRL

B-23049; *B. tequilensis* NRRL B-41771; *B. vallismortis* NRRL B-14890; *B. velezensis* NRRL B-41580) thuộc tổ hợp *Bacillus subtilis* đều > 99,5% khi được tra cứu bằng công cụ Eztaxon-e, cao hơn ngưỡng khuyến nghị (< 98,65%) cho các loài khác nhau (Fan *et al.*, 2017). Như vậy, các phân tích dựa trên trình tự gen 16S rRNA không thể phân biệt các loài hoặc dưới loài trong tổ hợp loài *B. subtilis*. Để giải quyết vấn đề này, trình tự gen *rpoB* hoàn chỉnh của chủng nghiên cứu được so sánh với các loài thuộc tổ hợp *Bacillus subtilis*.

Cây phát sinh chủng loại dựa vào trình tự gen *rpoB* của chủng VTCC 12251 và 11 loài thuộc tổ hợp *Bacillus subtilis* được xây dựng (Hình 1). Kết quả cho thấy chủng nghiên cứu nằm cùng nhánh với *Bacillus subtilis* NRRL NRS-744. So sánh trình tự gen *rpoB*, chủng VTCC 12251 có quan hệ gần gũi nhất với *Bacillus subtilis* NRRL NRS-744 với độ tương đồng là 99,6%; tương đồng với 10 loài khác từ 97,2 - 89,8%. Trong khi độ tương đồng trình tự *rpoB* được khuyến nghị trong một loài là 98,2 - 100%; giữa các loài > 85,5% và < 85,5% với thành viên thuộc các chi khác nhau (Adekambi *et al.*, 2008).

Từ các kết quả phân tích trình tự gen 16S rRNA và *ropB*, có thể kết luận chủng VTCC 12251 thuộc loài *Bacillus subtilis*. Đây là loài GRAS (Generally Recognized As Safe), được công nhận là an toàn và được cơ quan FDA (U.S Food and Drug Administration - Cơ quan Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ) cho phép sử dụng trong thực phẩm.



Hình 1. Vị trí phân loại của chủng VTCC 12251 và các loài trong tổ hợp loài *Bacillus subtilis* dựa vào trình tự gen *rpoB*

3.2. Đặc tính probiotic của chủng VTCC 12251

Khả năng sống sót trong môi trường khắc nghiệt trong dạ dày và ruột non là một trong những thuộc tính cần thiết của probiotic. Tính chịu mật được nghiên cứu đầu tiên, do mật là một tác nhân diệt khuẩn được tìm thấy trong ruột non (Prieto *et al.*, 2014). Khả năng chịu muối mật đã được coi là một điều kiện tiên quyết cho hoạt động trao đổi chất và xâm chiếm của vi khuẩn trong ruột của vật chủ. Nồng độ trung bình của muối mật ở ruột non khoảng 0,2%

đến 0,3% (w/v), tùy thuộc vào các cá thể, loại và lượng thức ăn được tiêu hóa. Bào tử *Bacillus* gồm nhiều lớp bảo vệ, đã được mô tả là kháng tốt với các điều kiện vật lý và hóa học khác nhau, chúng đã được chứng minh là có thể tồn tại ở nồng độ muối mật cao trên 1% (Menconi *et al.*, 2013). Chủng VTCC 12251 sinh trưởng được ở nồng độ muối mật ở 0,3%, do vậy có khả năng chống chịu tốt trong môi trường ruột (Bảng 1).

Bảng 1. Một số đặc tính probiotic của *B. subtilis* VTCC 12251

| Chịu muối mật và NaCl | Sinh trưởng trên muối mật (%) | | | | | Sinh trưởng trên NaCl (%) | | | | |
|--|--|-----|----------------------|--------------|-----|-----------------------------|---------|-----|-----|----|
| | 0 | 0,1 | 0,3 | 0,5 | 1,0 | 0 | 3,0 | 5,0 | 10 | 15 |
| | + | + | + | - | - | + | + | + | + | - |
| Khả năng tồn tại trong điều kiện đường tiêu hóa nhân tạo | Số lượng tế bào sống sót ($\times 10^5$ CFU/mL) | | | | | | | | | |
| | 0 giờ | | 4 giờ (pepsin + pH2) | | | 20 giờ (pancreatin + pH7,4) | | | | |
| | 25 | | 6,2 | | | 18 | | | | |
| Khả năng kháng vi sinh vật kiểm định | Vòng kháng vi sinh vật kiểm định (mm) | | | | | | | | | |
| | Esc | | Mic | | | Sal | | Sta | | |
| | 14 | | 21 | | | 12 | | 20 | | |
| Khả năng chịu kháng sinh | Vòng kháng chất kháng sinh (mm) | | | | | | | | | |
| | AMP | AMO | CEP | CLO | ERY | GEN | PEN | STR | TET | |
| | 16 | 10 | 24 | 21 | 12 | 17 | 13 | 7 | 7 | |
| Tính kỵ nước | Tỷ lệ kỵ nước (%) | | | | | | | | | |
| | Chloroform | | | Ethylacetate | | | Xylene | | | |
| | 90,3 | | | 12,1 | | | 14,9 | | | |
| Khả năng chịu nhiệt của bào tử ở 80°C | Tỷ lệ bào tử sống sót (%) | | | | | | | | | |
| | 0 phút | | | 10 phút | | | 60 phút | | | |
| | 100 | | | 95,3 | | | 86,5 | | | |

Ghi chú: “+”: sinh trưởng; “-”: không sinh trưởng. Esc-*Escherichia coli* VTCC 10482; Mic-*Micrococcus luteus* VTCC 10644, Sal-*Salmonella enterica* VTCC 10480; Sta-*Staphylococcus aureus* VTCC 10658. AMP- ampicillin; AMO- amoxicillin; CEP- cephalixin; CLO- cloramphenicol; ERY- erythromycin; GEN- gentamycin; PEN- penicillin G; STR- streptomycin; TET- tetracyclin.

Chủng VTCC 12251 có khả năng phát triển ở nồng độ NaCl lên đến 10% và được coi là chịu muối. Tuy nhiên, chủng này không sinh trưởng ở nồng độ muối 15%. Bốn trong số 6 chủng từ biến trong nghiên cứu của Prieto và cộng tác viên (2014), có khả năng phát triển ở 10% NaCl, nhưng không sinh trưởng ở 15% NaCl.

Sinh trưởng vi hiếu khí của bào tử chủng VTCC 12251 được nghiên cứu vì điều kiện này phổ biến ở trong đường tiêu hóa. Số lượng của *B. subtilis* VTCC 12251 ở điều kiện vi hiếu khí tăng

từ $3,1 \times 10^6$ CFU/ml lên $8,9 \times 10^7$ CFU/mL, nhưng vẫn thấp hơn ở điều kiện hiếu khí ($1,3 \times 10^9$ CFU/mL). Điều này cho thấy sự thích ứng của chủng nghiên cứu trong môi trường đường ruột. Kết quả này tương tự kết quả thí nghiệm khi nuôi các chủng *B. subtilis* và *B. clausii* trong điều kiện vi hiếu khí của Cenci và cộng tác viên (2006). Hầu hết các chủng *Bacillus* sinh trưởng tốt ở cả điều kiện hiếu khí và kỵ khí, cả khi bào tử và tế bào sinh dưỡng được sử dụng và các bào tử của chúng đều có khả năng nảy mầm dưới điều kiện kỵ khí (Prieto *et al.*, 2014).

Sự tồn tại của bào tử trong điều kiện dịch dạ dày (pepsin - 1 mg/ml, pH 2) và ruột (pancreatin - 1 mg/ml, muối mật - 0,2%, pH 7,4) mô phỏng được thử nghiệm (Bảng 1). Sau 4 giờ số lượng tế bào của chủng VTCC 12251 trong dạ dày mô phỏng giảm so với ban đầu (từ 25×10^5 CFU/mL còn $6,2 \times 10^5$ CFU/mL). Khi chuyển sang điều kiện ruột mô phỏng, lượng tế bào tăng lên gần với ban đầu sau 20 giờ (đạt 18×10^5 CFU/mL). Trong báo cáo của Prieto và cộng tác viên (2014), bào tử của tất cả các chủng thử nghiệm giảm 10 lần so với ban đầu trong điều kiện dạ dày mô phỏng. Trái lại, trong một số nghiên cứu khác, các chủng *Bacillus* có thể sinh trưởng tốt trong điều kiện đường tiêu hóa mô phỏng (Patel *et al.*, 2009).

Phương pháp khuếch tán trên thạch đã được sử dụng để phát hiện khả năng kháng của chủng VTCC 12251 đối với các vi khuẩn Gram âm và Gram dương. Kết quả cho thấy VTCC 12251 có khả năng kháng được cả 4 chủng kiểm định (Bảng 1). Hoạt tính này được biểu hiện là nhờ khả năng sản sinh bacteriocin, mặc dù bacteriocin từ *Bacillus* thường được công bố là hoạt chất kháng vi khuẩn Gram dương; tuy nhiên một số chủng có phổ hoạt động rộng hơn có thể chống lại cả các vi khuẩn Gram âm (Patel *et al.*, 2009). *B. pumilus* WIT582 có khả năng kháng các chủng *E.coli* và *Salmonella* thử nghiệm (Prieto *et al.*, 2014).

Các vi khuẩn probiotic thể hiện tính kháng với một kháng sinh đặc hiệu có thể được biểu hiện vào thời điểm điều trị bệnh bằng kháng sinh. Vi gen kháng thuốc kháng sinh thường được mang trên plasmid tiếp hợp, chúng có thể được chuyển cho các vi khuẩn khác và có thể dẫn đến vi khuẩn gây bệnh đường ruột kháng thuốc kháng sinh (Menconi *et al.*, 2013). Chủng VTCC 12251 nhạy cảm với tất cả các kháng sinh thử nghiệm ở các mức độ khác nhau ở nồng độ 10 µg/ml (Bảng 1). *B. cereus* CenBiot trong chế phẩm thương mại bị ức chế bởi các kháng sinh streptomycin, erythromycin, gentamycin nhưng không kháng bởi cloramphenicol, tetracycline và kanamycin ở nồng độ 10 µg/ml (Gil-Turnes *et al.*, 1999). Đặc điểm dễ bị tổn thương khi tiếp xúc với thuốc kháng sinh được coi là đặc trưng probiotic tốt nhất. Tính gây bệnh và sản sinh nội độc tố có liên quan chặt chẽ với sự xuất hiện của plasmid (Patel *et al.*, 2009). Chủng VTCC 12251 nhạy cảm với các loại kháng sinh được thử nghiệm, do đó có thể đảm bảo không có khả năng truyền tính kháng kháng sinh.

Tính kỵ nước, tự kết tụ và bám dính vào màng nhày là những thuộc tính quan trọng giúp cho việc bám dính vào các cơ chất khác nhau, điều này giải thích bản chất probiotic của vi sinh vật. Độ bám dính của vi khuẩn cũng có thể xác định khả năng xâm chiếm của vi sinh vật trong đường tiêu hóa, điều này giúp ngăn cản sự đào thải chúng ngay lập tức bởi nhu động ruột và mang lại lợi thế cạnh tranh trong hệ sinh thái này. Thông qua khả năng bám dính và định cư trên các mô, vi sinh vật probiotic có thể ngăn chặn mầm bệnh bằng tương tác hoặc bao vây đặc hiệu trên các thụ thể tế bào (Patel *et al.*, 2009). Chủng VTCC 12251 thể hiện đặc tính tự kết tụ và bám dính tốt trên chloroform (90,3%) nhưng tính kỵ nước trên xylene (14,9%) và ethylacetate (12,1%) ở mức trung bình.

Bào tử không bị ảnh hưởng bởi nhiệt độ được sử dụng trong chế biến thức ăn chăn nuôi. Tác động của nhiệt độ đến bào tử của *Bacillus subtilis* VTCC 12251 được kiểm tra ở nhiệt độ 80°C sau 2 thời điểm 10 phút và 60 phút. Khả năng tồn tại của bào tử chủng *Bacillus subtilis* VTCC 12251 ở 80°C là 95,3% sau 10 phút (số lượng bào tử ban đầu là $6,7 \times 10^9$ CFU/mL) và 86,5% sau 60 phút (Bảng 1). Kết quả cho thấy rằng các bào tử có thể chịu được sấy khô trong máy sấy phun và làm viên trong quá trình sản xuất. Gil-Turnes và cộng tác viên (1999) đã báo cáo bào tử *B. cereus* CenBiot tồn tại được ở 80°C là 94,6% sau 10 phút và 85,7% sau một giờ.

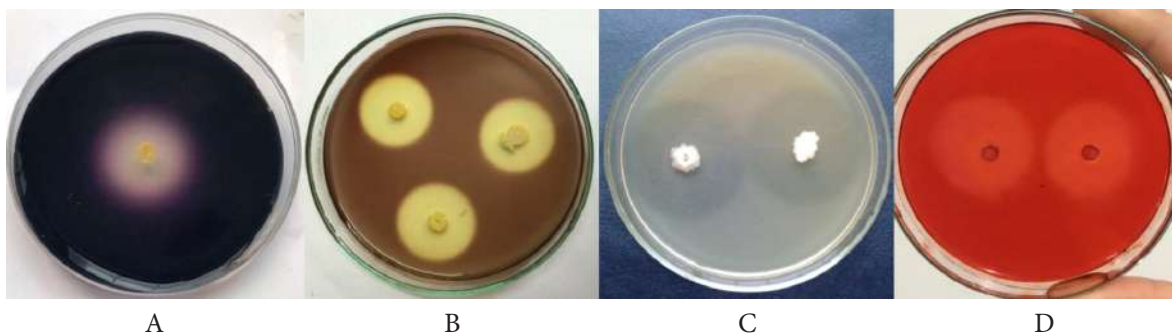
3.3. Khả năng sinh enzyme ngoại bào

Một trong những đặc trưng quan trọng của enzyme - chất xúc tác sinh học là có tính đặc hiệu cao và có thể xúc tác cho các phản ứng hóa sinh trong điều kiện nhiệt độ, pH thường với hiệu suất cao. Việc bổ sung enzyme vào thức ăn có tác dụng tăng cường sức khỏe của vật nuôi do enzyme có tác dụng phân hủy các thành phần độc đối với vật chủ trong thức ăn; tăng khả năng cung cấp năng lượng, protein và khoáng chất có trong thành tế bào giàu chất xơ hoặc liên kết ở dạng mà động vật không thể tiêu hóa (Barletta, 2010).

Trên môi trường chứa các cơ chất, chủng VTCC 12251 có khả năng sinh nhiều loại enzyme ngoại bào và có hoạt tính cao, được thể hiện qua vòng phân giải các cơ chất: casein (protease), CMC (cellulase), tinh bột (amylase), và xylan (xylanase) và hoạt độ của các enzyme nuôi trên môi trường dịch thể và lên men xốp (Bảng 2).

Bảng 2. Khả năng sinh enzyme ngoại bào của *B.subtilis* VTCC 12251

| Hoạt tính enzyme ngoại bào | Amylase | Cellulase | Protease | Xylanase |
|------------------------------|-------------|------------|------------|------------|
| Vòng phân giải cơ chất (mm) | 28 ± 0,4 | 24 ± 0,3 | 25 ± 0,5 | 27 ± 0,2 |
| Hoạt độ của enzyme ngoại bào | | | | |
| Nuôi dịch thể (U/mL) | 136,4 ± 2,6 | 65,3 ± 2,3 | 58,1 ± 1,8 | 42,2 ± 2,4 |
| Lên men xốp (U/g) | 1320 ± 13,2 | 945 ± 10,4 | 396 ± 8,9 | 877 ± 9,5 |



Hình 2. Khả năng sinh enzyme ngoại bào phân hủy các cơ chất của chủng VTCC 12251

Ghi chú: A: amylase; B: cellulase; C: protease; D: xylanase.

Các kết quả trong bảng 2 cũng cho thấy sự khác nhau của hoạt độ enzyme giữa 2 phương pháp nuôi cấy: trong môi trường lỏng và môi trường xốp. Hoạt độ tăng 9,6 lần đối với amylase; 14,4 lần với cellulase; 6,8 lần cho protease và tăng 20,8 lần đối với xylanase khi nuôi xốp so với nuôi lỏng. Lên men xốp cung cấp nhiều lợi thế so với lên men lỏng thông thường như cơ chất đơn giản và rẻ tiền, không cần hòa tan chất dinh dưỡng từ bên trong cơ chất rắn, không cần kiểm soát chặt chẽ nhiều thông số trong quá trình lên men, năng suất sản phẩm cao hơn, yêu cầu năng lượng thấp hơn, sản xuất ít nước thải, không tạo bọt và thu hồi sản phẩm cuối cùng tương đối dễ dàng. Lên men xốp sử dụng được nhiều loại nguyên liệu thô để sản xuất các sản phẩm giá trị gia tăng khác nhau (Manan and Webb, 2017). Vì vậy, phương pháp lên men xốp sẽ được sử dụng để sản xuất probiotic và enzyme của chủng VTCC 12251 trong tương lai.

Từ kết quả này cho thấy khả năng sinh enzyme ngoại bào của chủng *Bacillus subtilis* VTCC 12251 cao và đa dạng, đây là đặc điểm quý với các chủng vi sinh vật sử dụng trong sản xuất các chế phẩm sinh học dùng trong chăn nuôi và thực phẩm chức năng.

IV. KẾT LUẬN

Chủng vi khuẩn VTCC 12251 phân lập từ đất, mang đầy đủ các đặc tính của chủng probiotic - đa enzyme, là loài *Bacillus subtilis* an toàn, có khả năng sinh hoạt chất kháng một số loại vi sinh vật gây bệnh, tồn tại trong các điều kiện khắc nghiệt của đường tiêu hóa, có khả năng bám dính vào tế bào biểu mô

ruột, không kháng kháng sinh và bào tử của nó chịu được nhiệt trong quá trình sản xuất. Ngoài ra, chủng vi khuẩn này còn có khả năng sinh nhiều loại enzyme phân giải các cơ chất giúp chuyển hoá thức ăn trong chăn nuôi và làm giảm ô nhiễm môi trường.

LỜI CẢM ƠN

Các tác giả cảm ơn Dự án FIRST - Tiểu hợp phần 2a của Nhóm hợp tác “Tăng cường năng lực làm chủ công nghệ lên men sản xuất enzyme, probiotic đáp ứng nhu cầu trong nước và nâng cao khả năng tự chủ của Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, ĐHQGHN” và nhiệm vụ “Bảo tồn và lưu giữ nguồn gen vi sinh vật” đã hỗ trợ kinh phí để thực hiện công trình này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Adekambi T., Shinnick T.M., Raoult D. and Drancourt M.,** 2008. Complete rpoB gene sequencing as a suitable supplement to DNA-DNA hybridization for bacterial species and genus delineation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58: 1807-1814.
- Barletta A.,** 2010. Introduction: Current Market and Expected Developments. In *Enzymes in farm animal nutrition*, 2nd Edition. Edited by Bedford M. R. and Partridge G.G. CAB International 2010.
- Cenci G., Trotta F., Caldini G.,** 2006. Tolerance to challenges miming gastrointestinal transit by spores and vegetative cells of *Bacillus clausii*. *Journal of Applied Microbiology*, 101: 1208-1215.

- Duc L.H., Hong H.A., Barbosa T.M., Henriques A.O. and Cutting S.M.**, 2004. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (4): 2161-2171.
- Elshaghabee F.M.F., Rokana N., Gulhane R.D., Sharma C., and Panwar H.**, 2017. *Bacillus* As Potential Probiotics: Status, Concerns, and Future Perspectives. *Frontiers in microbiology*, 8: 1490.
- Fan B., Blom J., Klenk H.P., and Borriss R.**, 2017. “*Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* form an “operational group *B. amyloliquefaciens*” within the *B. subtilis* species complex”. *Frontiers in microbiology*, 8: 22 (1-15).
- FAO/WHO**, 2002. *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report. Rome: Food and Agriculture Organization.
- Gabor E.M., de Vries E.J., Janssen D.B.**, 2003. Efficient recovery of environmental DNA for expression cloning by indirection methods. *FEMS Microbiology Ecology*, 44: 153-163.
- Gil-Turnes C., Santos A.F., Cruz F.W., Monteiro A.V.**, 1999. Properties of the *Bacillus cereus* strain used in probiotic CenBiot. *Revista de Microbiologia*, 30: 11-14.
- Hong H.A., Duc L.H., Cutting S.M.**, 2005. The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, 29: 813-83.
- Khusro A., Barathikannan K., Aarti C. and Agastian P.**, 2017. Optimization of Thermo-Alkali Stable Amylase Production and Biomass Yield from *Bacillus* sp. Under Submerged Cultivation. *Fermentation*, 3 (1): 7.
- Kimura M.**, 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution*, 16 (2): 111-120.
- Kumaran B.M.D., Kalaichelvan P.T. and Santhi R.**, 2015. Exploitation of Agro-Industrial Wastes as Substrates for Cellulase Production by *Bacillus licheniformis* MTCC 429. *Microbiology Journal*, 5 (2): 36-42.
- Majeed M., Majeed S., Nagabhushanam K., Natarajan S., Sivakumar A., Ali F.**, 2016. Evaluation of the stability of *Bacillus coagulans* MTCC 5856 during processing and storage of functional foods. *International Journal of Food Science & Technology*, 51: 894-901.
- Manan M.A. and Webb C.**, 2017. Design Aspects of Solid State Fermentation as Applied to Microbial Bioprocessing. *Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering*, 4 (1): 00094.
- Menconi A., Morgan M.J., Pumford N.R., Hargis B.M., Tellez G.**, 2013. Physiological properties and *Salmonella* growth inhibition of probiotic *Bacillus* strains isolated from environmental and poultry sources. *International Journal of Bacteriology*, 2013: 1-8.
- Miller G.L.**, 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31: 426-428.
- Patel A.K., Ahire J.J., Pawar S.P., Chaudhari B.L., Chincholkar S.B.**, 2009. Comparative accounts of probiotic characteristics of *Bacillus* spp. isolated from food wastes. *International Food Research Journal*, 42: 505-510.
- Pouryafar F., Najafpour G.D., Noshadi N. and Jahanshahi M.**, 2015. Thermostable Alkaline Protease Production via Solid State Fermentation in a Tray Bioreactor Using *Bacillus licheniformis* ATCC 21424. *International Journal of Environmental Research*, 9 (4):1127-1134.
- Prieto M.L., O’Sullivan L., Tan S.P., McLoughlin P., Hughes H., Gutierrez M., Lane J.A., Hickey R.M., Lawlor P.G., Gardiner G.E.**, 2014. *In vitro* assessment of marine *Bacillus* for use as livestock probiotics. *Marine Drugs*, 12: 2422-2445.
- Saitou N. and Nei M.**, 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4 (4): 406-425.
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G.**, 1997. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24: 4876-4882.
- Yoon S.H., Ha S.M., Kwon S., Lim J., Kim Y., Seo H. and Chun J.**, 2017. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67: 1613-1617.

Multi-enzyme probiotic properties of *Bacillus subtilis* VTCC 12251 used in animal feeds

Ha Thi Hang, Duong Van Hop, Dao Thi Luong

Abstract

Spore forming bacteria are being used as probiotic supplements for animal feeds and for human dietary supplements as well as in registered medicines. Their heat stability and ability to survive in the stomach makes them attractive as food additives. The present study was conducted to determine the multi-enzyme probiotic properties *in vitro* of

the VTCC 12251 bacterium isolated from soil based on growth characteristics and tolerance in simulated intestinal conditions. The bacterial strain was identified as *Bacillus subtilis* VTCC 12251 by the sequence analysis of the 16S rRNA and *rpoB* gene. Probiotic properties of this strain were demonstrated on antimicrobial activities against tested pathogenous bacteria, bile salt tolerance (0.3%), NaCl tolerance (10%), growth in microaerophilic conditions; survival in extreme conditions of simulated gastro intestines; adherence to intestinal epithelial cells; sensitive to some common antibiotics at varying degrees and spores were heat-resistant at 80°C. In addition, this strain was highly capable of producing many extracellular enzymes which degrade non-soluble organic compounds in submerged and solid state fermentation. The results demonstrate that *Bacillus subtilis* VTCC 12251 is a potential multifunctional probiotic bacterium used in livestock.

Keywords: *Bacillus subtilis*, multi-enzyme, probiotic, *in vitro* spores

Ngày nhận bài: 25/12/2019

Ngày phản biện: 31/12/2019

Người phản biện: PGS. TS. Nguyễn Văn Giang

Ngày duyệt đăng: 13/01/2020

SO SÁNH HIỆU QUẢ SẢN XUẤT GIỮA MÔ HÌNH NUÔI THÂM CANH TÔM THẺ CHÂN TRẮNG THÔNG THƯỜNG VÀ VietGAP Ở SÓC TRĂNG

Huỳnh Văn Hiến¹, Đặng Thị Phượng¹, Nguyễn Thị Kim Quyên¹,
Lê Nguyễn Đoàn Khôi², Nobuyuki YAGI³

TÓM TẮT

Kết quả nghiên cứu cho thấy những hộ nuôi theo VietGAP có qui mô nhỏ hơn (8.189 m²) so với hộ nuôi thông thường. Mật độ nuôi, thời gian nuôi và FCR không có sự khác biệt giữa hai mô hình. Năng suất tôm ở mô hình VietGAP là 6,1 tấn/ha/vụ, cao hơn mô hình nuôi thông thường (5,3 tấn/ha/vụ). Chi phí sản xuất cho mô hình VietGAP (466 triệu đồng/ha/vụ) cũng cao hơn mô hình thông thường (398 triệu đồng/ha/vụ) nhưng mang lại lợi nhuận cao hơn (192 so với 157 triệu đồng/ha/vụ), khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,5$) và tỉ suất lợi nhuận của hai mô hình là bằng nhau (0,4 lần). Mô hình nuôi tôm theo tiêu chuẩn VietGAP cần được khuyến khích và nhân rộng vì quản lý tốt các chỉ tiêu kỹ thuật và có tiềm năng mang lại hiệu quả tài chính nhờ vào sản xuất tôm với chất lượng cao đáp ứng nhu cầu xuất khẩu và tạo tiền đề để chuyển đổi sang các chứng nhận được quốc tế công nhận, đặc biệt là ASC.

Từ khóa: Tôm thẻ chân trắng, hiệu quả sản xuất, VietGAP, tỉnh Sóc Trăng

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tôm thẻ chân trắng (TCT) là đối tượng nuôi chủ lực của một số tỉnh ven biển vùng Đồng bằng sông Cửu Long. Sự gia tăng mạnh mẽ và khó kiểm soát của mô hình nuôi tôm TCT thâm canh đã dẫn đến một số vấn đề về dịch bệnh, sử dụng kháng sinh và chất lượng tôm thương phẩm (Chanratchakool and Phillips, 2002; Thụy and Ford, 2010). Sóc Trăng là một trong những tỉnh tiên phong áp dụng VietGAP cho nuôi tôm TCT thâm canh từ 2013 - 2015 dưới sự hỗ trợ của dự án Nguồn lợi ven biển vì sự phát triển bền vững (CRSD) thực hiện từ năm 2012 - 2017 do Ngân hàng Thế giới (WB) tài trợ và đạt được những thành công bước đầu đáng kể. Theo Bộ Nông nghiệp và PTNT (2011a) thì nuôi thủy sản tiêu chuẩn VietGAP được triển khai theo Quyết định số 1503/QĐ-BNN-TCTS ngày 05 tháng 7 năm 2011 và Bộ

Nông nghiệp và PTNT (2011b) theo Quyết định số 1617/QĐ-BNN-TCTS ngày 18 tháng 7 năm 2011 về đối tượng áp dụng nuôi VietGAP. Diện tích nuôi tôm TCT tại Sóc Trăng năm 2018 là 32.762 ha (chiếm 58% diện tích nuôi tôm) với năng suất bình quân là 4,0 tấn/ha/vụ. Diện tích tôm được cấp chứng nhận VietGAP là 1.015 ha (chiếm 3% diện tích nuôi tôm TCT của tỉnh) với 15 cơ sở gồm: 7 công ty, 4 tổ hợp tác và 7 hợp tác xã (Sở Nông nghiệp và PTNT tỉnh Sóc Trăng, 2018). Việc áp dụng tiêu chuẩn VietGAP trong nuôi tôm và trong nuôi trồng thủy sản sẽ mang lại nhiều lợi ích và giảm rủi ro trong sản xuất cũng như làm cơ sở để áp dụng các tiêu chuẩn chứng nhận ASC và GlobalGAP (Nguyễn Thanh Hùng, 2017). Mục tiêu nghiên cứu nhằm so sánh khía cạnh kỹ thuật và tài chính giữa mô hình nuôi tôm TCT thâm canh thông thường và VietGAP để làm cơ sở khuyến cáo mô hình nuôi hiệu quả hơn trong tương lai.

¹ Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

² Phòng quản lý Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ; ³ Trường Đại học Tokyo