

NGHIÊN CỨU TỐI ƯU MỘT SỐ ĐIỀU KIỆN SINH TRƯỞNG VÀ SINH BÀO TỬ CỦA CHỦNG LỢI KHUẨN *BACILLUS SUBTILIS*-B23 SỬ DỤNG TRONG CHĂN NUÔI GIA CẦM

Hoàng Thị Anh Phương¹, Phan Vũ Hải², Lê Thị Hoài Chúc¹,
Nguyễn Đình Thủy Khương², Phan Thị Hằng², Nguyễn Thị Hoa², Trần Quang Vui²,
Đoàn Thị Hân Hạnh², Nguyễn Thị Thu Thủy³, Nguyễn Xuân Hoà^{2*}

¹Trường Đại học Tây Nguyên;

²Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế;

³Chi cục Nông nghiệp Đà Nẵng.

*Tác giả liên hệ: nguyensexuanhoa@huaf.edu.vn

Nhận bài: 23/04/2024 Hoàn thành phản biện: 12/07/2024 Chấp nhận bài: 23/08/2024

TÓM TẮT

Nghiên cứu được tiến hành nhằm tối ưu một số điều kiện sinh trưởng và phát triển để đạt được số lượng tế bào sinh dưỡng và bào tử lớn nhất của chủng *Bacillus subtilis*-B23. Kỹ thuật chuẩn độ khuẩn lạc được sử dụng để định lượng CFU/mL. Kết quả cho thấy, ở nồng độ tiếp giống 1% sẽ đạt được số lượng tế bào *B. subtilis*-B23 lớn nhất sau 14 giờ ($9,25 \pm 0,04$ log CFU/mL). Trong dải nhiệt từ 37 đến 40°C thì ở nhiệt độ 37°C là thích hợp nhất cho *B. subtilis*-B23 phát triển ($9,45 \pm 0,06$ log CFU/mL). Ở nồng độ tiếp giống 1%, nhiệt độ nuôi cấy 37°C, và tốc độ lắc 80 vòng/phút đã thu được số lượng tế bào vi khuẩn lớn nhất ($9,61 \pm 0,02$ log CFU/mL). Không có sự khác biệt đáng kể ($P > 0,05$) về số lượng tế bào thu được khi thử nghiệm nuôi với 3 môi trường MT1, MT2, MT3; tuy nhiên, kết quả ghi nhận trong môi trường MT1 cho số lượng tế bào vi khuẩn đạt cao nhất ($9,64 \pm 0,079$ log CFU/mL). Số lượng bào tử được hình thành tối ưu sau nuôi cấy 2 giờ trong môi trường LB có bổ sung KCl và MgSO₄. Việc tối ưu hoá được các điều kiện nuôi cấy *B. subtilis*-B23 sẽ cho kết quả nuôi cấy đạt số lượng tế bào sinh dưỡng lớn nhất và bào tử *B. subtilis*-B23 thu được nhiều nhất.

Từ khóa: *Bacillus subtilis*, Tỷ lệ tiếp giống, Nhiệt độ nuôi cấy, Tốc độ lắc, Bào tử

STUDY OF OPTIMIZATION GROWTH CONDITIONS AND SPORE PRODUCTION OF *BACILLUS SUBTILIS*-B23 USED IN POULTRY PRODUCTION

Hoang Thi Anh Phuong¹, Phan Vu Hai², Le Thi Hoai Chuc¹,
Nguyen Dinh Thuy Khuong², Phan Thi Hang², Nguyen Thi Hoa², Tran Quang Vui²,
Doan Thi Han Hanh, Nguyen Thi Thu Thuy³, Nguyen Xuan Hoa^{2*},

¹Tay Nguyen University;

²University of Agriculture and Forestry, Hue University;

³Da Nang Department of Agriculture and Rural Development.

*Corresponding author: nguyensexuanhoa@huaf.edu.vn

Received: April 23, 2024 Revised: July 12, 2024 Accepted: August 23, 2024

ABSTRACT

The study was conducted to optimize some growth and development conditions to achieve the maximum number of vegetative cells of the *Bacillus subtilis*-B23 strain. The colony titration technique was used to quantify CFU/mL. The results showed that at 1% seeding concentration, the largest number of *B. subtilis*-B23 cells will be achieved after 14 hours (9.25 ± 0.04 log CFU/mL). The temperature of 37°C was the most suitable for the growth of *B. subtilis*-B23 (9.45 ± 0.06 log CFU/mL). At a seeding rate of 1% and a cultivation temperature of 37°C, the optimal shaking speed was 80 rpm/min, achieving an average bacterial density of 9.61 ± 0.02 log CFU/mL. There is no obvious difference in the number of cells obtained when tested with 3 environments MT1, MT2, MT3; however, the results recorded in MT1 environment showed the highest number of bacterial cells (9.64 ± 0.079 log CFU/mL). The optimal number of spores formed after 2 hours of culture in LB medium supplemented with KCl and MgSO₄. Therefore, optimizing the culture conditions for *B. subtilis*-B23 will result in the highest number of vegetative cells and the greatest yield of *B. subtilis*-B23 spores.

Keywords: *Bacillus subtilis*, Seeding rate, Culture temperature, Shaking speed, Spores

1. MỞ ĐẦU

Sự phát triển mạnh mẽ của ngành chăn nuôi nói chung và chăn nuôi gà nói riêng đã mang lại những lợi ích kinh tế to lớn. Tuy nhiên, để đáp ứng sự tăng nhanh về nhu cầu sản phẩm của người tiêu dùng, ngành chăn nuôi gà phải nâng cao hiệu quả sản xuất bằng cách nâng cao tốc độ tăng trưởng và mật độ chăn nuôi. Điều này dẫn đến việc sử dụng không kiểm soát kháng sinh trong phòng bệnh và chất kích thích tăng trưởng đã làm gia tăng các chủng vi khuẩn kháng thuốc, làm giảm hiệu quả sử dụng kháng sinh trong điều trị các bệnh nhiễm khuẩn ở người (Kheiri và cs., 2016). Để hạn chế việc sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi, các nhà khoa học đã nghiên cứu để tìm ra giải pháp. Trong đó, giải pháp sử dụng lợi khuẩn (probiotic) đã trở thành một giải pháp tiềm năng giúp hạn chế việc sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi.

Vi khuẩn *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) là trực khuẩn Gram dương có nha bào, thường tồn tại lâu trong đất, thông qua thức ăn nước uống *B. subtilis* có mặt trong đường tiêu hóa của động vật. Khi cộng sinh trong đường tiêu hóa *B. subtilis* thể hiện một số tính chất có lợi cho cơ thể vật chủ như: cạnh tranh vị trí bám với các vi khuẩn có hại; sản sinh ra các chất ức chế sự phát triển của các vi khuẩn có hại và sản sinh ra các enzyme tăng cường các quá trình tiêu hóa hấp thu dinh dưỡng (Lee và cs., 2012). Khi những đặc tính có lợi của *B. subtilis* được phát hiện, con người đã ứng dụng lợi khuẩn này trong chăn nuôi như phòng trị bệnh tiêu chảy do nhiễm khuẩn và tăng cường chức năng tiêu hóa, từ đó nâng cao được năng suất chăn nuôi (Westers và cs., 2004; Stein, 2005). Theo Leser và cs. (2008), lợi khuẩn để có thể sử dụng buộc phải có đặc tính như khả năng sinh enzyme ngoại bào, khả năng

đối kháng với các vi khuẩn gây bệnh đường ruột, khả năng chịu acid, muối mật và các yếu tố an toàn. Nghiên cứu của Krysiak và cs. (2021) cho thấy sử dụng lợi khuẩn trong chăn nuôi gà thịt đã giúp tăng cường chuyên hóa mà và tăng khả năng miễn dịch cho vật nuôi.

Nghiên cứu của Nguyễn Xuân Hoà và cs. (2024) cho thấy chủng *B. subtilis*-B23 được phân lập từ cơ quan tiêu hóa của gà thịt bản địa có trình tự gene 16S tương đồng 100% với dòng vi khuẩn *B. subtilis* strain H1 khi tham chiếu trên ngân hàng GenBank. *B. subtilis*-B23 có một số đặc tính sinh học quý như có khả năng sản sinh lactose và glucose, không sinh hơi, có khả năng phân giải tinh bột và protein và ức chế vi khuẩn đường ruột. Khảo sát đường cong sinh trưởng của *B. subtilis*-B23 cho thấy sinh trưởng đạt số lượng cực đại sau 10 đến 14 h trong điều kiện nuôi cấy tĩnh.

Nghiên cứu này nhằm chọn lựa tối ưu một số điều kiện lên men trong điều kiện nuôi cấy tĩnh để có thể thu được sinh khối, bào tử lớn nhất phục vụ cho sản xuất chế phẩm phục vụ chăn nuôi gia cầm.

2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung nghiên cứu

- Xác định nồng độ tiếp giống tối ưu cho sự phát triển của *Bacillus subtilis*
- Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự phát triển của *Bacillus subtilis*
- Tốc độ lắc ảnh hưởng đến sự phát triển của *Bacillus subtilis*
- Ảnh hưởng thành phần môi trường nuôi cấy đến sự phát triển của *Bacillus subtilis*
- Tối ưu hoá môi trường nuôi cấy để đạt tối đa số lượng bào tử *Bacillus subtilis*.

2.2. Vật liệu nghiên cứu

Chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis*-B23 (*Bacillus subtilis* strain H1, GenBank No: CP026662.1) được phân lập từ cơ quan tiêu hóa của gà bản địa (Nguyễn Xuân Hoà và cs., 2024) và lưu trữ tại Phòng thí nghiệm Khoa Chăn nuôi Thú y, Đại học Nông Lâm, Đại học Huế. Môi trường nuôi cấy Luria Bertani agar (LB, Himedia India), có thành phần gồm Casein hydrolyzing enzyme 10.000 Gms/L, Yeast extract 5.000 Gms/L, NaCl 10.000 Gms/L, Agar 15.000 Gms/L. Trang thiết bị tại Phòng thí nghiệm Vi sinh truyền nhiễm, Khoa Chăn nuôi Thú y, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp chuẩn độ vi khuẩn CFU/mL

Vi khuẩn *B. Subtilis*-B23 sau khi nuôi cấy ở các điều kiện khác nhau sẽ được chuẩn độ CFU/mL như sau: Chuẩn bị dãy 7 ống effpendoft chứa sẵn 0,9 mL dung dịch nước muối sinh lý. Hút 0,1ml dung dịch vi khuẩn cần chuẩn độ đồng nhất trong ống thứ nhất để có nồng độ pha loãng 10^{-1} . Hút tiếp 0,1ml chuyển qua ống tiếp theo để có nồng độ pha loãng 10^{-2} . Tiếp tục như thế cho đến nồng độ pha loãng 10^{-7} . Tại ba mức pha loãng cuối, mỗi mức pha loãng lần lượt hút 0,2 mL dung dịch và phủ đều lên môi trường thạch đĩa LB (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 mức pha loãng gần nhau có số lượng khuẩn lạc đếm được từ 30-300 và tính số CFU/mL có trong dung dịch tăng sinh ban đầu. Công thức tính CFU/mL theo TCVN 4884-1 (2015).

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

X: số lượng vi khuẩn trong 1 ml dịch mẫu

C: tổng số khuẩn lạc trong các đĩa đếm được

n_1, n_2 : số đĩa ở hai mức pha loãng liên tiếp xuất hiện khuẩn lạc đếm được

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

d: hệ số pha loãng tương ứng mức pha loãng thứ nhất trong 2 mức pha loãng liên tiếp

2.3.2. Xác định tỷ lệ tiếp giống tối ưu nhất cho sự phát triển của vi khuẩn *B. subtilis* - B23

Sử dụng môi trường 100 mL LB lỏng vào ba bình tam giác, nuôi cấy *B. subtilis*-B23 (nồng độ 10^9 CFU/mL) với tỷ lệ tiếp giống ở các mức 0,5 % ($0,5 \times 10^9$ CFU/100 mL), 1% ($1,0 \times 10^9$ CFU/100 mL) và 1,5% ($1,5 \times 10^9$ CFU/100 mL). Tỷ lệ tiếp giống là tỷ lệ ban đầu giữa môi trường và huyền phù vi khuẩn. Theo nghiên cứu trước đây của Nguyễn Xuân Hòa và cs. (2024), thời gian sinh trưởng tối đa của *B. subtilis*-B23 là sau 14 giờ nuôi cấy trong môi trường nuôi LB. Do đó, vi khuẩn sau khi nuôi 14 h sẽ tiến hành chuẩn độ (3 lần lặp lại).

2.3.3. Khảo sát nhiệt độ tối ưu cho sự phát triển của vi khuẩn *B. subtilis*-B23

Sau thí nghiệm thứ nhất, tỷ lệ tiếp giống thu được chỉ số CFU/mL cao nhất sẽ được sử dụng cho thí nghiệm thứ hai này. Vi khuẩn *B. subtilis*-B23 (nồng độ 10^9 CFU/mL) được dùng để cấy vào bình chứa 100 ml môi trường LB lỏng vô trùng với tỷ lệ tiếp giống 1%. Dung dịch được ủ ở các mức nhiệt 37°C , 38°C , 39°C và 40°C , tiến hành chuẩn độ vi khuẩn (CFU/mL) sau 14h nuôi cấy (3 lần lặp lại).

2.3.4. Khảo sát tốc độ lắc tối ưu cho sự phát triển của vi khuẩn *B. subtilis* -B23

Sử dụng bình tam giác chứa 100 mL môi trường LB lỏng, cho vào bình tam giác *B. subtilis*-B23 (nồng độ 10^9 CFU/mL) với tỷ lệ tiếp giống tối ưu ở thí nghiệm 1 và

nhệt độ tối ưu ở thí nghiệm 2. Dung dịch nuôi cấy được lắc với các tốc độ 60 lần/phút, 80 lần/phút và 100 lần/phút, tiến hành chuẩn độ vi khuẩn 14h nuôi cấy (3 lần lặp lại).

2.3.5. Khảo sát môi trường nuôi cấy tối ưu cho sự phát triển của vi khuẩn *B. subtilis* -B23

Sử dụng các kết quả tối ưu về nồng độ tiếp, nhiệt độ nuôi cấy và tốc độ lắc để

Môi trường	Tryptone (g/L)	Peptone (g/L)	NaCl (g/L)	Bột nấm men (g/L)
MT1	10	20	10	5
MT2	0	30	10	0
MT3	10	20	10	0

2.3.6. Tối ưu thời gian sinh bào tử của *Bacillus subtilis* -B23

Sau khi xác định được các điều kiện tối ưu để thu số lượng tế bào lớn nhất của chủng vi khuẩn *B. subtilis* -B23, tiếp tục xác định thời gian thu bào tử đảm bảo cho quá trình bảo quản của chế phẩm. Nuôi cấy vi

Môi trường	Tryptone (g/L)	Peptone (g/L)	NaCl (g/L)	Bột nấm men (g/L)	KCl (g/L)	MgSO ₄ (g/L)
MT4 (kích thích bào tử)	10	20	10	5	2	0,5

Quy trình thu bào tử: Tiến hành nuôi cấy tăng sinh chủng *B. subtilis* -B23 trong bình tam giác chứa 500 mL môi trường MT1 ở 37°C, tốc độ lắc 80 vòng/phút, tỷ lệ tiếp giống 1% trong 14 giờ tăng sinh; sau đó ly tâm dung dịch thu sinh khối. Chuyển sinh khối vào môi trường kích thích bào tử MT4 tạo bào tử và ủ ở nhiệt độ 45°C, lắc 80 vòng/phút trong 14 giờ. Cứ mỗi 2 h lại chuẩn độ số lượng bào tử 1 lần sau đó đánh giá số lượng bào tử lớn nhất sau khi ủ. Phương pháp chuẩn độ bào tử dựa trên nguyên lý mỗi tế bào sinh dưỡng của vi khuẩn *Bacillus* khi gặp điều chất cảm ứng như KCl, MgSO₄ sẽ hình thành 1 bào tử, bào tử của *Bacillus* có thể chịu được nhiệt độ 80°C/15 phút, trong khi các tế bào sinh dưỡng chưa hình thành bào tử sẽ bị nhiệt độ này tiêu diệt. Bào tử khi gặp môi trường

tiến hành thí nghiệm chọn môi trường nuôi cấy tối ưu khi nuôi cấy vi khuẩn *B. subtilis* -B23 trên các môi trường MT1, MT2, MT3. Thành phần chính của các môi trường MT1, MT2, MT3 là môi trường LB có bổ sung thêm một số thành phần dinh dưỡng khác được trình bày trong bảng (Tian và cs., 2022), tiến hành chuẩn độ vi khuẩn 14 h nuôi cấy.

khuẩn *B. subtilis* -B23 ở các điều kiện được xác định ở các thí nghiệm trên tiến hành thu sinh khối và cho vào môi trường kích thích sinh bào tử MT4. Môi trường được sử dụng ở đây là môi trường có bổ sung yếu tố kích thích sinh bào tử (KCl và MgSO₄) và nuôi cấy ở nhiệt độ cao 45°C sau đó đánh giá thời gian nuôi cấy đạt số lượng bào tử lớn nhất.

nhệt độ, ẩm độ, dinh dưỡng thích hợp sẽ phát triển thành thành 1 tế bào sinh dưỡng, và tính số tế bào sinh dưỡng thông qua phương pháp đếm khuẩn lạc, số khuẩn lạc hình thành chính là số bào tử trước đó. Mẫu xử lý nhiệt ở 80 °C/15 phút sau đó tiến hành chuẩn độ để tính CFU/mL (thí nghiệm được lặp lại 3 lần).

2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Số lượng tế bào và bào tử của vi khuẩn được tính ở dạng ogarism cơ số 10 của số đơn vị hình thành khuẩn lạc; log CFU (colony forming unit)/mL. Số liệu trình bày là trung bình ± độ lệch chuẩn (SD) và được xử lý thống kê bằng phần mềm SPSS 20 (IBM, Inc. Chicago, Mỹ). Kiểm tra sự khác biệt giữa các giá trị trung bình được tiến hành với One-way so sánh sự khác

nhau giữa các cặp bằng kiểm định Tukey với $p < 0,05$ được coi là có ý nghĩa thống kê.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Lựa chọn tỷ lệ tiếp giống thích hợp tới sự phát triển của chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* -B23

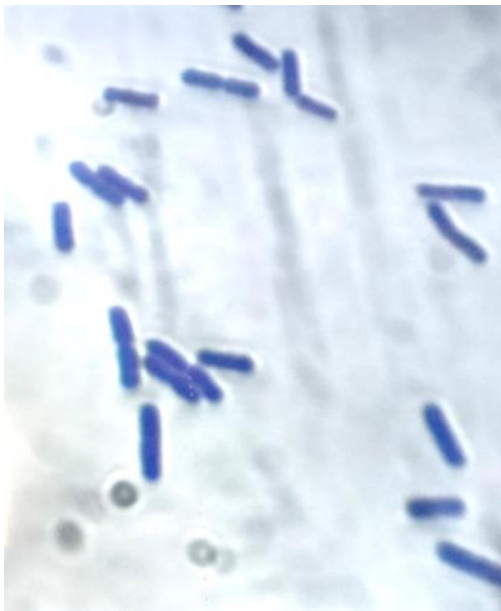
Nghiên cứu trước đây (Nguyễn Xuân Hòa và cs., 2024) đã phân lập định danh phân tử được chủng *B. subtilis*-B23, và kết

quả cho thấy thời gian sinh trưởng tối đa của vi khuẩn là sau 14 giờ nuôi cấy trong môi trường nuôi LB. Đây là cơ sở ban đầu để khảo sát về tỷ lệ tiếp giống thích hợp. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần với 3 mức tiếp giống khác nhau 0,5%, 1% và 1,5 %, sau 14 h khi nuôi cấy trong môi trường LB, kết quả chuẩn độ số lượng *B. subtilis*-B23 CFU/mL kết quả thể hiện qua Bảng 1.

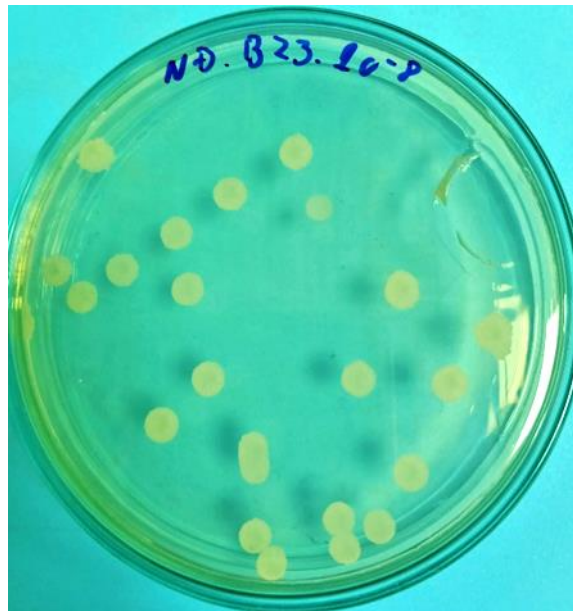
Bảng 1. Số lượng vi khuẩn liên quan tỷ lệ tiếp giống

Nồng độ tiếp giống (%)	0,5	1	1,5	<i>p</i>
Số lượng vi khuẩn (log CFU/mL)	8,52 ^b ± 0,05	9,25 ^a ± 0,04	8,19 ^b ± 0,25	< 0,05

Các giá trị trung bình trong cùng một hàng có chữ cái (a, b) khác nhau thể hiện sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$), giá trị sau ± là độ lệch tiêu chuẩn.



(A)



(B)

Hình 1. Hình ảnh vi khuẩn *Bacillus subtilis*-23 nhuộm Gram (A) ở độ phóng đại x1000 và khuẩn lạc (B) trong quá trình chuẩn độ

Qua Bảng 1 cho thấy, vi khuẩn sau 14h nuôi, tỷ lệ tiếp giống 1% cho mật độ tế bào sống cao nhất ($9,25 \pm 0,04$ log CFU/mL) trong khi nồng độ tiếp giống 0,5% chỉ đạt $8,52 \pm 0,05$ log CFU/ mL và 1,5% tiếp giống chỉ đạt $8,19 \pm 0,25$ log CFU/mL ($p < 0,05$). Điều này có thể do trong cùng nồng độ về dinh dưỡng và thể tích chỉ lượng tiếp giống tối ưu mới có thể tạo ra được sinh khối lớn nhất, nếu tỷ lệ tiếp giống thấp quá thì vi khuẩn sẽ cần thêm thời

gian để sinh trưởng, trong khi tỷ lệ tiếp giống cao quá sẽ dẫn đến dinh dưỡng nhanh bị cạn kiệt từ đó dẫn đến quá trình lão hoá (chết tế bào) cho nên số lượng tế bào sống sẽ giảm. Sahu và cs. (2019) cũng cho biết mật độ vi khuẩn ảnh hưởng đến tốc độ phát triển của chúng, khi mật độ quá cao sẽ tạo ra sự tương tác nhiệt và làm giảm khả năng sinh trưởng của vi khuẩn. Như vậy, với chủng vi khuẩn *B. subtilis*-B23 tỷ lệ tiếp

giống 1% là thích hợp cho thời gian nuôi cấy 14h để thu được sinh khối lớn nhất.

3.2. Kết quả lựa chọn nhiệt độ tối ưu cho sự phát triển của vi khuẩn *Bacillus subtilis*-B23

Bảng 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến sự phát triển của vi khuẩn *B. subtilis*-B23

Nhiệt độ	37°C	38°C	39°C	40°C	<i>p</i>
Số lượng vi khuẩn (log CFU/mL)	9,45 ^a ±0,06	8,52 ^b ±0,11	8,63 ^{ab} ±0,03	7,61 ^c ±0,35	<0,05

Các giá trị trung bình trong cùng một hàng có chữ cái (*a, b, c*) khác nhau thể hiện sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$), giá trị sau \pm là độ lệch tiêu chuẩn.

Qua Bảng 2 cho thấy, mật độ tế bào chủng vi khuẩn *B. subtilis*-B23 đạt giá trị cao nhất ở 9,45 ±0,06 log CFU/mL khi nuôi ở mức nhiệt độ 37°C, trong khi đó các mức nhiệt còn lại mật độ tế bào chỉ đạt 7,61 – 8,63 log CFU/mL ($p < 0,05$). Trong ngưỡng sinh trưởng của vi sinh vật, nhiệt độ càng cao sẽ tăng cường trao đổi chất và tăng sinh số lượng, tuy nhiên nhiệt cao quá sẽ tăng nhanh quá trình lão hoá và nhanh cạn kiệt

Bảng 3. Ảnh hưởng của tốc độ lắc đến số lượng vi khuẩn *B. subtilis*-B23

Tốc độ lắc/phút	60V	80V	100V	<i>p</i>
Số lượng vi khuẩn (log CFU/mL)	9,16 ^a ±0,09	9,61 ^b ±0,02	9,32 ^a ±0,05	<0,05

Các giá trị trung bình trong cùng một hàng có chữ cái (*a, b*) khác nhau thể hiện sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$), giá trị sau \pm là độ lệch tiêu chuẩn.

Qua Bảng 3 chúng ta thấy, sau khi tiếp giống tối ưu (1%), nhiệt độ nuôi cấy tối ưu (37°C) và với tốc độ lắc tối ưu (80 vòng/phút) thu được mật độ trung bình là 9,61 ±0,02 log CFU/mL, trong khi ở tốc độ lắc 60 và 100 vòng/phút thì thu được mật độ vi khuẩn tương ứng là 9,16 – 9,32 log CFU/mL ($p < 0,05$). Trong nuôi cấy vi sinh, tốc độ khuấy lắc nó tỷ lệ thuận với sự tiếp xúc của vi khuẩn và cơ chất từ đó tăng cường được quá trình trao đổi chất của vi khuẩn từ đó thúc đẩy được quá trình tăng sinh. Tuy nhiên, cùng lượng dinh dưỡng

Trên cơ sở chọn được tỷ lệ tiếp giống tối ưu nhất, tiến hành khảo sát ở những mức nhiệt khác nhau, kết quả thể hiện qua Bảng 2.

dinh dưỡng. Như vậy nhiệt độ thích hợp cho nuôi cấy chủng *B. subtilis*-B23 là 37°C.

3.3. Lựa chọn tốc độ lắc tối sự phát triển của vi khuẩn *Bacillus subtilis*-B23

Trên cơ sở chọn được tỷ lệ tiếp giống tối ưu nhất, nhiệt độ thích hợp, tiến hành khảo sát ở các mức tốc độ khác nhau, kết quả thể hiện qua Bảng 3.

như nhau và thời gian nuôi cấy như nhau thì tốc độ lắc cao nó dẫn đến dinh dưỡng sớm bị cạn kiệt từ đó tăng tỷ lệ lão hoá giống vi khuẩn. Như vậy, khi nuôi cấy lắc, tốc độ lắc thích hợp cho chủng *B. subtilis* -B23 phát triển là 80 vòng/phút.

3.4. Lựa chọn thành phần môi trường nuôi cấy tối sự phát triển của vi khuẩn *Bacillus subtilis* -B23

Trên cơ sở chọn được nhiệt độ thích hợp, tốc độ lắc và tỷ lệ tiếp giống thích hợp, tiến hành khảo sát trên một số môi trường nuôi cấy, kết quả thể hiện qua Bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy với các điều kiện tối ưu đến số lượng *B. subtilis* -B23

Môi trường	MT1	MT2	MT3	<i>p</i>
Số lượng vi khuẩn (log CFU/mL)	9,64 ± 0,079 ^a	9,20 ± 0,2 ^b	9,41 ± 0,06 ^b	0,122

Các giá trị trung bình trong cùng một hàng có chữ cái (a, b) khác nhau thể hiện sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$), giá trị sau ± là độ lệch tiêu chuẩn.

Kết quả qua Bảng 4 cho thấy môi trường MT1 là môi trường nuôi cấy đạt mật độ vi khuẩn sinh trưởng sau 14 h cao nhất với mật độ vi khuẩn trung bình đạt 9,64±0,079 log CFU/mL, trong khi đó hai môi trường MT2 và MT3 chỉ đạt 9,20 – 9,41 log CFU ($p > 0,05$). Xét về mặt chi phí sản xuất thì môi trường MT2 (30 g/L Peptone, 10g/L NaCl) đạt được mật độ vi khuẩn 9,20±0,2 log CFU/mL, vì vậy khi sử dụng sản xuất chế phẩm số lượng lớn sẽ giảm được giá thành sản xuất. Việc thay thế peptone bằng tryptone và yeast extract giúp giảm chi phí sản xuất do giá thành của tryptone cao hơn so với peptone nhưng vẫn đảm bảo cho vi khuẩn phát triển tốt cho yêu cầu nghiên cứu và sản xuất. Việc thay thế peptone cho tryptone và yeast extract giúp giảm chi phí sản xuất do giá thành của peptone thấp hơn so với tryptone. Mặt khác, số lượng vi khuẩn tạo ra ở các điều kiện môi trường khác nhau ở trên không có sự sai khác về mặt thống kê ($p > 0,05$). Tương tự, nghiên cứu của nhóm tác giả Ming và cs.

(2019) cũng cho thấy trong môi trường nuôi cấy *B. megaterium* không có thành phần tryptone, chỉ chứa peptone, thịt bò xay, NaCl vẫn giúp vi khuẩn phát triển rất tốt. Chính vì vậy, chọn môi trường MT2 để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

3.5. Tối ưu môi trường và số lượng bào tử *Bacillus subtilis* -B23

Tế bào sinh dưỡng của vi khuẩn *B. subtilis* sau khi sinh ra chỉ tồn tại được một thời gian ngắn, đặc biệt trong môi trường khô hạn tế bào sinh dưỡng bị chết nhiều. Về nguyên lý mỗi tế bào sinh dưỡng đều có thể trở thành một bào tử khi có điều kiện thích hợp và bào tử sẽ giúp chống lại các điều kiện vật lý và hoá học (sấy khô, chịu nhiệt, chịu dịch dạ dày), bào tử khi gặp điều kiện thuận lợi sẽ phát triển thành một tế bào sinh dưỡng. Vậy nên việc nghiên cứu để tối ưu số lượng bào tử *B. subtilis* sẽ có ý nghĩa rất quan trọng trong sản xuất chế phẩm sinh học phục vụ chăn nuôi. Kết quả đánh giá số lượng bào tử sinh ra được thể hiện qua Bảng 5.

Bảng 5. Số lượng bào tử được chuẩn độ được qua các thời gian nuôi cấy khác nhau

Thời gian nuôi cấy (h)	2	4	6	8	10	12	14	<i>p</i>
Số lượng bào tử = Số lượng vi khuẩn (log CFU/mL) chuẩn độ được	9,28 ± 0,29	9,15 ± 0,02	9,35 ± 0,03	9,58 ± 0,01	9,54 ± 0,01	9,44 ± 0,03	9,45 ± 0,02	0,161

Giá trị sau ± là độ lệch tiêu chuẩn.

Qua Bảng 5 cho thấy số lượng bào tử nuôi trong môi trường MT1, là môi trường LB có bổ sung KCl và MgSO₄, đạt cao nhất (9,58 ± 0,01 log CFU/mL) sau khi nuôi 8 giờ trong điều kiện 45°C, lắc 80 vòng/phút. Tuy nhiên, sự khác nhau về số lượng vi khuẩn ở những thời gian nuôi cấy khác nhau sai khác

không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Từ kết quả nghiên cứu cho thấy muốn thu bào tử vi khuẩn *B. subtilis*-B23 chỉ cần cho thêm chất cảm ứng (KCl và MgSO₄) vào môi trường LB và nuôi vi khuẩn sau 2 giờ ở 45°C và lắc 80 vòng/phút. Phát hiện này giúp tiết

kiệm thời gian và công sức cho quy trình sản xuất công nghiệp.

4. KẾT LUẬN

Chủng vi khuẩn *B. subtilis*-B23 đạt sinh khối tối đa ở các điều kiện: tỷ lệ tiếp giống 1%, ở nhiệt độ 37°C, tốc độ lắc 80 vòng/phút và môi trường MT1 để thu được số lượng sinh khối vi khuẩn lớn nhất ($9,64 \pm 0,079 \log \text{CFU/mL}$).

Số lượng bào tử của vi khuẩn *B. subtilis*-B23 được tối ưu khi nuôi trong môi trường LB bổ sung KCl và MgSO_4 , lắc 80 vòng/phút ở 45°C trong 2 giờ.

Kết quả nghiên cứu về tối ưu hoá các điều kiện sinh trưởng để có thể thu được CFU/mL lớn nhất là cơ sở khoa học cho nghiên cứu sản xuất chế phẩm sinh học sau này.

LỜI CẢM ƠN

Nguồn kinh phí cho việc thực hiện nghiên cứu này từ quỹ nghiên cứu khoa học hàng năm của trường Đại Học Nông Lâm, Đại Học Huế và sự hỗ trợ thêm hoá chất từ công ty Công ty Cổ phần Công nghệ sinh học R.E.P (R.E.P Biotech JSC).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tài liệu tiếng Việt

Nguyễn Xuân Hòa, Phạm Thái Bình, Phan Thị Hằng, Lê Minh Đức, Phan Vũ Hải, Lê Thị Hoài Chúc và Hồ Khả Hồng Đức. (2024). Phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* tiềm năng sử dụng sản xuất chế phẩm sinh học. *Khoa học kỹ thuật thú y*, 31(1), 1-8.

Tiêu chuẩn Việt Nam (TCVN) 4884-1. (2015). Phương pháp định lượng vi sinh vật - Đếm khuẩn lạc bằng kỹ thuật đổ đĩa.

2. Tài liệu tiếng nước ngoài

Kheiri, R., & Akhtari, L. (2016). Antimicrobial resistance and integron gene cassette arrays in commensal *Escherichia coli* from human and animal sources in IRI. *Gut Pathog*, 8(1), 1-10. DOI: 10.1186/s13099-016-0123-3

Krysiak, K., Konkol, D. & Korczyński M. (2021). Overview of the Use of Probiotics in Poultry Production. *Animals*, 11(6), 2-24. DOI: 10.3390/ani11061620.

Lee, J., Park, I., Choi, Y., & Cho, J. (2012). *Bacillus* strains as feed additives: *In vitro* evaluation of its potential probiotic properties. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 25(4), 577-585.

Leser, T., Knarreborg, A., & Worm, J. (2008). Germination and outgrowth of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* spores in the gastrointestinal tract of pigs. *Journal of Applied Microbiology*, 104(4), 1025–1033. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03633.x

Ming, S., Zhang, Y., Tao, R., Xiao, N., Zhou, W., Rong, J., & Li, G. (2019). Experimental study on optimization of culture medium and culture environment of *Bacillus megaterium*. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. 612 (2) pp. 022113). IOP Publishing. DOI: 10.1016/B978-0-08-102491-1.00013-7.

Sahu, O., & Singh, N. (2019). Significance of bioadsorption process on textile industry wastewater. In *The impact and prospects of green chemistry for textile technology* (pp. 367-416). Woodhead Publishing. DOI: 10.1016/B978-0-08-102491-1.00013-7.

Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 56(4): 845-857. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x

Tian, Z., Hou, L., Hu, M., Gao, Y., Li, D., Fan, B., & Li, S. (2022). Optimization of sporulation conditions for *Bacillus subtilis* BSNK-5. *Processes*, 10(6), 2-10. DOI: 10.3390/pr10061133.

Westers, L., Westers, H., & Quax, W. J. (2004). *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. *Biochimica et biophysica acta*, 1694(1-3), 299–310. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2004.02.01.