

ĐẶC TÍNH PROBIOTIC CỦA BÀO TỬ VI KHUẨN *SHOUCHELLA CLAUSII* (*BACILLUS CLAUSII*) BCLA

Nguyễn Hoàng Minh Đức, Nguyễn Văn Năm, Đào Thị Lương

Công ty Cổ phần Công nghệ Hóa sinh Việt Nam

TÓM TẮT

Vi khuẩn hình thành bào tử thuộc chi *Bacillus* đã chứng tỏ tiềm năng trở thành probiotic dùng cho con người. *Shouchella clausii* (*Bacillus clausii*) đã được công nhận là tác nhân hiệu quả và an toàn để ngăn ngừa và điều trị bệnh tiêu chảy ở trẻ em và người lớn, với đặc tính điều hòa miễn dịch rõ rệt trong một số nghiên cứu lâm sàng và *in vitro*. Trong nghiên cứu này, các đặc tính probiotic trong điều kiện *in vitro* của chủng vi khuẩn BCLA phân lập từ đất được đánh giá. Chủng *Shouchella clausii* BCLA được định danh dựa vào phân tích trình tự gen 16S rRNA, là loài được công nhận là an toàn (GRAS). Chủng này mang các đặc tính probiotic như: chịu muối mật (0,3%), tồn tại tốt trong điều kiện khắc nghiệt của dạ dày và ruột mô phỏng; có khả năng bám dính cao. Nó đáp ứng các tiêu chí an toàn, bao gồm hoạt tính tan máu, kháng với nhiều loại kháng sinh (amoxicillin, cloramphenicol, erythromycin, gentamycin và metronidazole) và kháng với vi khuẩn gây bệnh ở người (*Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Salmonella enterica* và *Staphylococcus aureus*). Ngoài ra, chủng BCLA còn có khả năng sinh các enzyme có lợi phân giải nhiều loại cơ chất (carboxymethyl cellulose, casein, chitin, pectin, tinh bột và xylan) và bào tử của nó chịu được nhiệt trong quá trình chế biến. Kết hợp những đặc tính có lợi này, đã cung cấp bằng chứng thuyết phục cho thấy *Shouchella clausii* BCLA là một probiotic tiềm năng đầy hứa hẹn.

Từ khóa: Bào tử, enzyme, *in vitro*, probiotic, *Shouchella clausii* (*Bacillus clausii*).

MỞ ĐẦU

Việc sử dụng *Bacillus* và các vi khuẩn liên quan làm probiotic ở người đã được thừa nhận trong những năm qua. Trục khuẩn mang bào tử có một số lợi thế tiềm năng so với các dạng không tạo bào tử khác như *Lactobacillus* spp., vì bào tử có khả năng chịu nhiệt ổn định, có khả năng tồn tại ở độ pH thấp của hàng rào dạ dày và các sản phẩm tạo ra, chúng có thể được bảo quản ở nhiệt độ phòng mà không có bất kỳ ảnh hưởng có hại nào đến khả năng tồn tại (Srinivas *et al.*, 2020).

Shouchella clausii là vi khuẩn hình que, di động, Gram dương, hiếu khí, hình thành bào tử, ưa kiềm tùy nghi. Các chủng *S. clausii* có mặt khắp nơi trong tự nhiên và đã được phân lập từ đất, nước biển, sữa... (Khokhlova *et al.*, 2023). *S. clausii* là một trong những probiotic của con người, có khả năng tồn tại trong quá trình vận chuyển qua đường tiêu hóa nhờ khả năng chịu nhiệt, acid và muối mật; tăng cường chức năng hàng rào ruột; và xâm chiếm đường ruột ngay cả khi có kháng sinh (Ahire *et al.*, 2021). Nó có khả năng kháng kháng sinh phổ rộng không thể chuyển gen sang loài khác và tổng hợp vitamin B2 (Ghelardi *et al.*, 2022). Các nghiên cứu tiền lâm sàng đã xác định được một số phương thức tác dụng của *S. clausii*, bao gồm tăng cường chức năng rào cản và cân bằng nội môi trong ruột, và ngược lại, hoạt động kháng khuẩn, ức chế độc tố đường ruột và hoạt động điều hòa miễn dịch (Ghelardi *et al.*, 2022). Các nghiên cứu lâm sàng cho thấy *S. clausii* có hiệu quả trong điều trị tiêu chảy, nhiễm trùng đường hô hấp tái phát và viêm dạ dày ruột cấp tính (Ahire *et al.*, 2021).

Ngoài các đặc tính sinh lý có liên quan trực tiếp đến việc sử dụng chúng làm probiotic, các chủng *S. clausii* còn thể hiện một loạt các đặc tính khác cho phép chúng được sử dụng rộng rãi trong các ngành công nghiệp khác nhau: sử dụng trong sản xuất laccase công nghiệp; sản xuất terpene một loại hydrocarbon hữu ích như thuốc trừ sâu tự nhiên và có nhiều lợi ích cho sức khỏe; tạo ra β -1,3-glycanase ổn định với kiềm ngoại bào để khử polymer hóa laminarin thành β -1,3-glycan; xúc tác cho quá trình oxy hóa meso-butane-2,3-diol thành acetoin là chất phụ gia hương vị quan trọng đối với ngành công nghiệp thực phẩm; tạo ra CGTase trong quá trình chuyển đổi tinh bột thành cyclodextrin được sử dụng trong ngành dược phẩm (Ghelardi *et al.*, 2022).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi thực hiện các nghiên cứu trong mô hình *in vitro*, đánh giá đặc tính probiotic tiềm năng, khả năng an toàn, khả năng tạo enzyme ngoại bào và chịu nhiệt của bào tử chủng vi khuẩn *Shouchella clausii* BCLA phân lập từ đất vườn ở Nho Quan, Ninh Bình.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng nghiên cứu

Chủng vi khuẩn BCLA được phân lập từ đất vườn ở Nho Quan, Ninh Bình và được lưu giữ tại Công ty CP Công nghệ Hóa sinh Việt Nam.

Vi sinh vật kiểm định: *Bacillus cereus* VTCC10613, *Escherichia coli* VTCC 10482, *Micrococcus luteus* VTCC 10644, *Salmonella enterica* VTCC 10480, *Staphylococcus aureus* VTCC 10658, nhận từ Bảo tàng Giống chuẩn Việt Nam (VTCC), Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội.

Phương pháp

Phân loại

Xác định trình tự gen 16S rRNA: Tách chiết, khuếch đại và xác định trình tự gen 16S rRNA theo phương pháp của Gabor và đồng tác giả (2003). So sánh mức độ tương đồng cao nhất về trình tự gen 16S rRNA của chủng vi khuẩn nghiên cứu so với các chủng chuẩn đã công bố trên Genbank bằng công cụ Blast. Trình tự gen 16S rRNA của chủng vi khuẩn được gửi lên trang web của Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia (NCBI).

Đánh giá đặc tính probiotic của bào tử được thực hiện theo mô tả của Ahire và đồng tác giả (2021)

Bào tử chủng BCLA được chuẩn bị trong môi trường dịch LB (HiMedia, Ấn Độ) sau nuôi 4 ngày ở nhiệt độ 37°C và được xử lý nhiệt ở 80°C trong 20 phút. Khả năng chịu muối mật của huyền phù bào tử chủng BCLA dựa vào sinh trưởng trên đĩa thạch môi trường LB chứa oxgall 0; 0,1; 0,3; 0,5 và 1% (w/v); Sự tồn tại của bào tử trong điều kiện mô phỏng của dịch dạ dày tổng hợp [g/L: pepsin (≥ 3000 NFU/mg)-0,0133; lysozyme (≥ 40.000 U/mg)-0,1; oxgall-0,05; proteose peptone-8,3; glucose-3,5; KCl-0,37; NaCl-2,05; CaCl_2 -0,11; KH_2PO_4 -0,6; pH 2,5] và dịch ruột tổng hợp [pancreatin-1 mg/mL (amylase-100 U/mg; lipase-8 U/mg; protease-100 U/mg) được hòa trong NaCl 0,85% (w/v) bổ sung 0,3% oxgall (w/v); pH 8,0]; Khả năng bám dính của bào tử chủng BCLA được thử nghiệm trên các dung môi xylene, cloroform và ethyl acetate.

Đánh giá an toàn

Khả năng làm tan máu được kiểm tra bằng cách cấy ria chủng BCLA lên bề mặt đĩa thạch máu cừu, ủ ở 40°C trong 48 giờ (Kharwar *et al.*, 2022). Khả năng kháng các vi sinh vật kiểm định được thực hiện theo phương pháp thổi thạch trên 5 loại vi sinh vật kiểm định (Patel *et al.*, 2009). Thử nghiệm độ nhạy cảm với kháng sinh được tiến hành bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch LB với các kháng sinh của HiMedia theo mô tả của Kharwar và đồng tác giả (2022), bao gồm ampicillin (10 μg), amoxicillin (10 μg), chloramphenicol (30 μg), erythromycin (15 μg), gentamycin (10 μg), kanamycin (30 μg), metronidazole (5 μg), neomycin (30 μg), rifampicin (5 μg), penicillin G (10 μg), streptomycin (10 μg) và tetracycline (30 μg).

Khả năng sinh enzyme ngoại bào và chịu nhiệt của bào tử

Khả năng sinh enzyme ngoại bào (amylase, chitinase, cellulase, pectinase, protease và xylanase) được xác định bằng phương pháp thổi thạch chứa 0,1% cơ chất (tinh bột, chitin, carboxymethyl cellulose, pectin, casein và xylan) theo mô tả của Eldy và đồng tác giả (2021). Khả năng chịu nhiệt của bào tử trong quá trình thanh trùng được đánh giá ở 45°C, 75°C và 90°C trong nồi cách thủy 3 phút (Khoklova *et al.*, 2023).

Các kết quả là trung bình cộng của 3 lần thí nghiệm.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân loại chủng vi khuẩn BCLA

Chủng vi khuẩn BCLA phân lập từ đất vườn ở Nho Quan, Ninh Bình, được phân loại dựa vào phân tích trình tự gen 16S rRNA. Phân tích Blast với các trình tự đã công bố trên Genbank tại NCBI cho thấy trình tự đoạn gen 16S rRNA của chủng BCLA tương đồng cao nhất (99,54 %) và có quan hệ họ hàng gần nhất với chủng chuẩn *Shouchella clausii* DSM 8716. Do đó, chủng BCLA được định danh là *Shouchella clausii*. Đoạn trình tự 1.092 bp gen 16S rRNA của *Shouchella clausii* BCLA đã được lưu giữ trên Genbank với mã số PP776597 tại NCBI. Đây là loài an toàn (GRAS) và sản phẩm của loài này được liệt kê vào danh mục các chất an toàn được dùng trong thực phẩm do Cơ quan quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) và Cơ quan quản lý an toàn thực phẩm châu Âu (EFSA) cho phép sử dụng.

Bacillus clausii được Nielsen và đồng tác giả đặt tên vào năm 1995 (tên của nhà vi khuẩn học người Đức Dieter Claus). Sau đó Patel và Gupta, (2020) phân loại các loài thuộc chi *Bacillus* thành các chi mới dựa trên các nghiên cứu phát sinh gen, *Bacillus clausii* được chuyển sang chi *Alkalihalobacillus*. Năm 2021, Joshi và đồng tác giả phân loại lại chi *Alkalihalobacillus* thành bảy chi mới dựa trên phân tích phát sinh gen, chỉ số bộ gen và đặc điểm kiểu hình, đưa *Alkalihalobacillus clausii* về chi *Shouchella* và loài chuẩn là *Shouchella clausii* (Joshi *et al.*, 2021).

Các bào tử *Bacillus clausii* được biết là tồn tại trong môi trường pH dạ dày, xâm chiếm niêm mạc đường ruột và phát triển thành dạng sinh dưỡng. Hơn nữa, vi khuẩn này có khả năng kháng hầu hết các loại kháng sinh do có các gen kháng kháng sinh, do đó nó dễ dàng xâm chiếm đường tiêu hóa ngay cả khi có kháng sinh. Ngoài ra, vi khuẩn này cũng có khả năng kháng lại khả năng chịu đựng cao đối với acid dạ dày, muối mật và các tình trạng đường ruột (Kharwar *et al.*, 2022).

Đặc tính probiotic của chủng BCLA

Có một số yếu tố góp phần vào sự thành công của probiotic, chẳng hạn như tính ổn định ở các quy trình sản xuất công nghiệp khác nhau và khả năng chịu đựng stress đường tiêu hóa. Việc sử dụng bào tử probiotic có lợi hơn so với các tế bào sinh dưỡng vì cấu tạo nội tại độc đáo của bào tử (acid dipicolinic, protein, lipid và carbohydrate) và khả năng thẩm cực thấp mang lại khả năng chịu đựng cao đối với acid dạ dày, muối mật và các tình trạng đường ruột (Ahire *et al.*, 2021).

Acid mật là thành phần chính của mật, hoạt động như một chất nhũ hóa giúp tiêu hóa lipid và các vitamin tan trong lipid ở ruột. Ở nồng độ cao hơn, acid mật gây độc cho tế bào vi khuẩn bằng cách gây tổn thương màng tế bào, biến tính protein và tổn thương oxy hóa DNA. Vì vậy, việc nghiên cứu vi khuẩn probiotic có khả năng tồn tại trong acid mật là rất quan trọng để dự đoán sự tồn tại của chúng trong ruột. Trong nghiên cứu này, bào tử chủng *S. clausii* BCLA sinh trưởng tốt ở nồng độ muối mật ở 0,3%. Bào tử chủng *Bacillus clausii* UBBC07 có khả năng sống sót cao ở muối mật 0,1 -1,0% và ở nồng độ muối mật 2,0% còn thúc đẩy tăng trưởng (Ahire *et al.*, 2021). Các nghiên cứu về khả năng chịu muối mật hầu hết được thực hiện bằng cách sử dụng dung dịch mật oxgal 0,3% vì nó giống với dịch mật của con người và 0,3% còn được coi là nồng độ quan trọng để đánh giá một probiotic chịu muối mật. Hơn nữa, khả năng chịu đựng mật là một đặc điểm đặc trưng của từng chủng (Ahire *et al.*, 2021).

Trong dịch dạ dày tổng hợp, số lượng bào tử này mầm *S. clausii* BCLA giảm không nhiều từ $52,3 \times 10^8$ CFU/mL còn $13,40 \times 10^8$ CFU/mL sau 3 giờ. Số lượng tăng lên $78,5 \times 10^8$ CFU/mL sau 6 giờ của quá trình ủ trong dịch ruột tổng hợp (Bảng 1). Bào tử *Bacillus clausii* UBBC07 có tỷ lệ sống sót là 95,75% ở điều kiện dịch dạ dày tổng hợp (pH 2,5); số lượng tăng 110,66 % trong dịch ruột tổng hợp (Ahire *et al.*, 2021). Tương tự, số lượng bào tử *B. clausii* CSI08 không giảm sau khi tiếp xúc với các dịch dạ dày và ruột non mô phỏng (Khokhlova *et al.*, 2023). Gần đây, nghiên cứu in vitro về sự nảy mầm của bào tử *B. clausii* trong Mô phỏng Hệ sinh thái Vi khuẩn Đường ruột Con người (SHIME) đã chỉ ra sự sống sót của các bào tử và đi kèm tế bào sinh dưỡng trong mô phỏng dạ dày được nuôi bằng SHIME. Những kết quả chứng minh in vitro và vivo cho thấy bào tử *B. clausii* nảy mầm và nhân lên trong điều kiện đường ruột của con người (Ahire *et al.*, 2021). Những dữ liệu trên cho thấy khả năng tiềm tàng của bào tử *S. clausii* BCLA có thể tồn tại một cách hiệu quả khi di chuyển qua đường tiêu hóa.

Bảng 1. Một số đặc tính probiotic của *S. clausii* BCLA

Chịu muối mật	Sinh trưởng trên muối mật (%)				
	0	0,1	0,3	0,5	1,0
	+	+	+	-	-
Khả năng tồn tại trong điều kiện đường tiêu hóa nhân tạo	Số lượng tế bào sống sót ($\times 10^8$ CFU/mL)				
	0 giờ	3 giờ (Dịch dạ dày tổng hợp)		6 giờ (Dịch ruột tổng hợp)	
	52,3	13,4		78,5	
Tính kỵ nước	Tỷ lệ kỵ nước (%)				
	Cloroform	Ethyl acetate		Xylene	
	95,86	90,35		51,24	

Ghi chú: "+": Sinh trưởng; "-": Không sinh trưởng.

Khả năng bám dính của probiotic là một đặc tính quan trọng giúp vi khuẩn xâm nhập thành công vào ruột. Trong nghiên cứu này, đánh giá khả năng bám dính của *S. clausii* BCLA bằng cách sử dụng khả năng bám dính với dung môi. Độ bám dính với xylene là dấu hiệu cho thấy tính chất bề mặt kỵ nước. Độ bám dính của bào tử với chloroform và ethyl acetate cho thấy đặc tính cho và nhận điện tử của của vi khuẩn. 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 *S. clausii* BCLA có độ bám dính cao hơn với chloroform (95,86%) và ethyl acetate (90,35%) so với xylene (51,24%). Tương tự, *Bacillus clausii* UBBC07 có độ


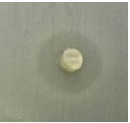

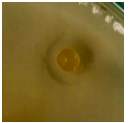

bám dính 98,33% với chloroform; 94,66% với ethyl acetate và 65,66% với xylene (Ahire *et al.*, 2021). Những kết quả này cho thấy bào tử chủng *S. clausii* BCLA có tính kỵ nước cao và có khả năng bám vào lớp biểu mô ruột.

Tóm lại, bào tử *S. clausii* BCLA thể hiện khả năng sống sót tốt, độ bám dính cao và nảy mầm trong điều kiện mô phỏng đường ruột của con người đảm bảo cung cấp lượng probiotic được khuyến nghị vào ruột.

Đánh giá an toàn

Kết quả nuôi bào tử *S. clausii* BCLA trên đĩa thạch máu cừu ở bảng 2 cho thấy không có vòng sáng ở các vùng máu xung quanh khuẩn lạc, được coi là tan máu gamma (không có khả năng làm tan máu). Trong xét nghiệm hoạt tính tan máu của Kharwar và đồng nghiệp (2022) trên 7 sản phẩm probiotic bán trên thị trường (β -LOCK[®], BACIPRO[®], ENTEROGERMINA[®], PROALANA-B[®], BENEGUT[®], PROCILLUS[®] và TUFPRO[®]), sáu sản phẩm cho hoạt tính tan máu gamma, ngoại trừ β -LOCK[®] có dấu hiệu tan máu β . Điều này đảm bảo bản chất không độc lực của chủng *S. clausii* BCLA.

Bảng 2. Đánh giá an toàn

Hoạt tính tan máu	α				β				γ			
	-				-				+			
Khả năng chịu kháng sinh	Vòng kháng chất kháng sinh (mm)											
	AMP	AMO	CLO	ERY	GEN	KAN	MET	NEO	RIF	PEN	STR	TET
	20	0	0	0	0	19	0	17	31	19	20	18
Khả năng kháng vi sinh vật kiểm định	Vòng kháng vi sinh vật kiểm định (mm)											
	Bac			Esc			Mic		Sal		Sta	
	11			20			25		14		10	
												

Ghi chú: “+”: Dương tính; “-”: Âm tính; Bac-*Bacillus cereus* VTCC10613, Esc-*Escherichia coli* VTCC 10482, Mic-*Micrococcus luteus* VTCC 10644, Sal-*Salmonella enterica* VTCC 10480, Sta-*Staphylococcus aureus* VTCC 10658; AMP- ampicillin; AMO- amoxicillin; CLO- chloramphenicol; ERY- erythromycin; GEN- gentamycin; KAN-Kanamycin; MET-Metronidazole; NEO- Neomycin; RIF-Rifampicin; PEN- penicillin G; STR- streptomycin; TET- tetracyclin.

Trong thời đại kháng sinh, việc sử dụng probiotic ngày càng được sử dụng cùng với liệu pháp kháng sinh để bảo tồn hệ vi sinh vật đường ruột do tình trạng kháng kháng sinh. Khả năng kháng kháng sinh là một đặc điểm mong muốn ở probiotic. Trong nghiên cứu này, chủng *S. clausii* BCLA kháng với 5/12 loại kháng sinh thử nghiệm, gồm amoxicillin, chloramphenicol, erythromycin, gentamycin và metronidazole; nhạy cảm với ampicillin, kanamycin, neomycin, rifampicin, penicillin G, streptomycin và tetracyclin ở các mức độ khác nhau với các vòng kháng từ 17-31 mm (Bảng 2). Nghiên cứu thử nghiệm trên Enterogermina (chứa bốn chủng của *S. clausii* O/C, N/R, T và SIN) cho thấy các chủng khác nhau có độ nhạy cảm khác nhau đối với các loại kháng sinh khác nhau. Chủng O/C được phát hiện kháng với chloramphenicol, N/R kháng với rifampicin, T kháng với tetracycline và SIN kháng với streptomycin. Tính kháng của các chủng *B. clausii* O/C, N/R, SIN và/hoặc T đối với các loại kháng sinh được mô tả ở trên không thể được chuyển giao bằng cách liên hợp với các loài vi khuẩn khác, do các gen kháng kháng sinh của *B. clausii* chỉ giới hạn ở loài này (Acosta-Rodríguez-Bueno *et al.*, 2022; Ghelardi *et al.*, 2022). Bào tử *B. clausii* (Benegut[®]) được phát hiện kháng amoxycylav, ampicillin, cefaloridine, ciprofloxacin, chloramphenicol, kanamycin, rifampicin, penicillin, streptomycin, và tetracycline, nhạy cảm với norfloxacin, ofloxacin và macrolide azithromycin (Srinivas *et al.*, 2020). Phân tích toàn bộ trình tự bộ gen của *B. clausii* đã tiết lộ rằng các gen kháng kháng sinh hiện diện trong DNA nhiễm sắc thể vốn là bản chất và không thể chuyển giao. Các gen độc tố cũng được phát hiện là không có. Những kết quả này cho thấy việc tiêu thụ *B. clausii* là an toàn cho con người (Lakshmi *et al.*, 2017).

Hoạt động kháng khuẩn là một tính năng thiết yếu khác của các chủng probiotic. Phương pháp thổi thạch đã được sử dụng để phát hiện khả năng kháng khuẩn của chủng *S. clausii* BCLA. Kết quả cho thấy *S. clausii* BCLA có khả năng kháng được cả 5 chủng kiểm định (*Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Salmonella enterica* và *Staphylococcus aureus*) với vòng kháng từ 10-25 mm (Bảng 2). Trong báo cáo khác, *B. clausii* CS108 ức chế sự phát triển của *E. coli*, *S. aureus* và *Pseudomonas aeruginosa* khi đồng nuôi cấy trên môi trường nuôi cấy lỏng (Khokhlova *et al.*, 2023). Các nghiên cứu *in vitro* đã chỉ ra rằng các chủng *B. clausii* có hoạt tính kháng khuẩn, các chất kháng khuẩn được giải phóng trong giai đoạn tăng trưởng ổn định, trùng hợp với quá trình hình

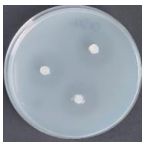
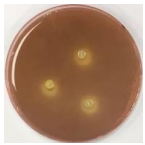
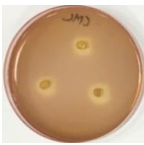
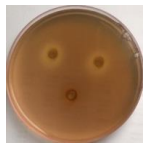
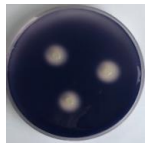

thành bào tử. Hoạt tính kháng lại nhiều loại vi khuẩn Gram dương đã được quan sát, chất chống khuẩn này được xác định là clausin, một loại lantibiotic loại A mới gây cản trở quá trình tổng hợp thành tế bào vi khuẩn (Acosta-Rodri'guez-Bueno *et al.*, 2022). Nuôi trong váng sữa, *B. clausii* sản xuất ra các peptide kháng khuẩn có tác dụng ức chế sự phát triển của *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* và *Enterococcus faecalis*. Hai chủng *B. clausii* UBBC07 và O/C cũng được chứng minh là có khả năng sản sinh ra clausin. Việc sản xuất các chất kháng khuẩn như lantibiotic clausin là con đường quan trọng giúp probiotic ngăn chặn sự phát triển của vi khuẩn gây bệnh trong đường tiêu hóa; điều này có liên quan về mặt lâm sàng khi sử dụng probiotic cùng với liệu pháp kháng sinh (Ghelardi *et al.*, 2022). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi chỉ ra rằng hoạt động kháng khuẩn của bào tử *S. clausii* BCLA có thể mang lại những tác dụng có lợi và có thể là một nguồn hữu ích trong việc cải thiện sự mất cân bằng đường ruột của hệ vi khuẩn và an toàn cho con người.

Khả năng sinh enzyme ngoại bào và chịu nhiệt của bào tử chủng *S. clausii* BCLA

Chủng *S. clausii* BCLA có khả năng sinh nhiều loại enzyme ngoại bào được thể hiện qua vòng phân giải các cơ chất: casein (protease), chitin (chitinase), carboxymethyl cellulose (cellulase), pectin (pectinase), tinh bột (amylase) và xylan (xylanase) với vòng phân giải các cơ chất từ 9-20 mm (bảng 3). Khả năng sinh các enzyme khác nhau của *B. clausii* CSI08 cũng được phát hiện bằng bộ API ZYM (Khokhlova *et al.*, 2023). Quá trình sản xuất các enzyme liên quan đến quá trình tiêu hóa các loại đại phân tử khác nhau như polysaccharide, lipid, protein... Việc sản xuất tại chỗ các enzyme này trong ruột vật chủ có thể đóng một vai trò tích cực trong việc cải thiện quá trình tiêu hóa thức ăn.

Độ ổn định nhiệt độ của bào tử *S. clausii* BCLA được đánh giá ở các điều kiện 45°C, 75°C và 90°C trong 3 phút. Kết quả thể hiện trong bảng 3 cho thấy có thay đổi rất ít về khả năng sống sót được phát hiện ở 45°C và 75°C. Tuy nhiên, số lượng bào tử giảm sau khi xử lý ở 90°C từ $52,3 \times 10^8$ CFU/mL còn $16,6 \times 10^8$ CFU/mL. Kết quả này cũng tương tự khi đánh giá độ ổn định nhiệt độ của bào tử *B. clausii* CSI08 ở các điều kiện khác nhau. Không có thay đổi nào về khả năng tồn tại được phát hiện ở 45°C hoặc 75°C; số lượng bào tử giảm sau khi xử lý ở 90°C từ $6,87 \times 10^9$ xuống còn $3,01 \times 10^9$ CFU/mL (Khokhlova *et al.*, 2023). Như vậy, bào tử *S. clausii* BCLA không bị ảnh hưởng nhiều bởi nhiệt độ được sử dụng trong quá trình chế biến.

Bảng 3. Khả năng sinh enzyme ngoại bào và chịu nhiệt của bào tử chủng *S. clausii* BCLA

Khả năng sinh các enzyme phân giải cơ chất	Vòng phân giải cơ chất (mm)					
	Casein	Chitin	CMC	Pectin	Tinh bột	Xylan
	20	9	11	10	12	13
						
Khả năng chịu nhiệt của bào tử	Số lượng bào tử sống sót ($\times 10^8$ CFU/mL)					
	25 °C	45°C	75°C	90°C		
	52,3	48,2	42,4	16,6		

KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã trình bày về chủng vi khuẩn BCLA mới được phân lập từ đất vườn ở Nho Quan, Ninh Bình, với các đặc tính probiotic nổi bật. Chủng BCLA được định danh là *Shouchella clausii* dựa vào phân tích trình tự gen 16S rRNA, là loài được công nhận là an toàn (GRAS). Các bào tử của *S. clausii* BCLA có khả năng sống sót cao, độ bám dính tốt và nảy mầm trong điều kiện đường tiêu hóa mô phỏng của con người, đảm bảo cung cấp lượng probiotic được khuyến nghị vào ruột. Là chủng an toàn, không làm tan máu, sinh hoạt chất kháng vi sinh vật gây bệnh kiểm định, kháng với nhiều kháng sinh. Ngoài ra, *S. clausii* BCLA còn có khả năng sinh nhiều loại enzyme có lợi phân giải các hợp chất hữu cơ. Bào tử của nó có thể tồn tại tốt trong quá trình thanh trùng mô phỏng. Tuy nhiên, việc sử dụng hiệu quả chủng này ở người cần thêm các nghiên cứu về probiotic *in vivo*.

Lời cảm ơn: Các tác giả cảm ơn Công ty CP Hóa Sinh Việt Nam đã hỗ trợ kinh phí để thực hiện công trình này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Acosta-Rodríguez-Bueno CP, Abreu y Abreu AT, Guarner F, Guno MJV, Pehlivanoglu E, Perez III M (2022). *Bacillus clausii* for Gastrointestinal Disorders: A Narrative Literature Review. *Adv Ther*, 39:4854–4874.
- Ahire JJ, Kashikar MS, and Madempudi RS (2021). Comparative accounts of probiotic properties of spore and vegetative cells of *Bacillus clausii* UBBC07 and in silico analysis of probiotic function. *Biotech*, 11(3):116.
- Eldy J, Daquioag L and Penuliar GM (2021). Isolation of Actinomycetes with Cellulolytic and Antimicrobial Activities from Soils Collected from an Urban Green Space in the Philippines. *Int J Microbiol*, Vol 2021, 14 pages.
- Garbor EM, de Vries EJ, Janssen DB (2003). Efficient recovery of environmental DNA for expression cloning by indirection methods. *FEMS Microbiol Ecol*, 44:153-163.
- Ghelardi E, Abreu y Abreu AT, Marzet CB, Calatayud GÁ, Perez III M, and Castro APM (2022). Current Progress and Future Perspectives on the Use of *Bacillus clausii*. *Microorganisms*, 10(6): 1246.
- Joshi A, Thite S, Karodi P, Joseph N, Lodha T (2021). *Alkalihalobacterium elongatum* gen. nov. sp. nov.: An Antibiotic-Producing *Bacterium* Isolated From Lonar Lake and Reclassification of the Genus *Alkalihalobacillus* Into Seven Novel Genera. *Front Microbiol*, 12:722369.
- Kharwar A, Bazaz MR and Manoj P. Dandekar (2022). Quantitative and qualitative characterization of commercially available oral suspension of probiotic products containing *Bacillus clausii* spores. *BMC Microbiology*, 22:217.
- Khokhlova E, Joan Colom J, Simon A, Mazhar S, García-Lainez G, Llopis S, Gonzalez N, Enrique-López M, Álvarez B, Martorell P, Tortajada M, Deaton J and Rea K (2023). Immunomodulatory and Antioxidant Properties of a Novel Potential Probiotic *Bacillus clausii* CSI08. *Microorganisms*, 11(2): 240.
- Lakshmi SG, Jayanthi N, Saravanan M, Ratna MS (2017). Safety assessment of *Bacillus clausii* UBBC07, as spore forming probiotic. *Toxicol Rep*, 4:62-71.
- Patel AK, Ahire JJ, Pawar SP, Chaudhari BL, Chincholkar SB (2009). Comparative accounts of probiotic characteristics of *Bacillus* spp. isolated from food wastes. *Food Res Internat*, 42: 505–510.
- Sreenadh M, Kumar KR and Nath S (2022). In Vitro Evaluation of *Weizmannia coagulans* Strain LMG S-31876 Isolated from Fermented Rice for Potential Probiotic Properties, Safety Assessment and Technological Properties. *Life*, 12(9): 1388.
- Srinivas A (2020). Anti-microbial susceptibility pattern of spores used in *Bacillus clausii* suspension: an in vitro study. *Int J Contemp Pediatr*, 7(5): 980-984.

PROBIOTIC PROPERTIES OF BACTERIAL SPORES *SHOUCHELLA CLAUSII* (*BACILLUS CLAUSII*) BCLA

Nguyen Hoang Minh Duc*, Nguyen Van Nam, Dao Thi Luong

Vietnam Biochemical Technology Joint Stock Company

SUMMARY

Spore-forming bacteria of the *Bacillus* genus have demonstrated potential as probiotics for human use. *Shouchella clausii* (*Bacillus clausii*) have been recognized as efficacious and safe agents for preventing and treating diarrhea in children and adults, with pronounced immunomodulatory properties during several *in vitro* and clinical studies. In this study, the *in vitro* probiotic properties of BCLA strain isolated from soil were evaluated. Based on 16S rRNA gene sequence analysis, the BCLA strain was identified as *Shouchella clausii* (*Bacillus clausii*), which is on the Generally Recognized As Safe (GRAS). Probiotic properties of this strain were demonstrated: bile salt tolerance (0.3%), good survival in harsh conditions of simulated stomach and intestine; has high adhesion ability. It meets safety criteria, including hemolytic activity, resistance to many antibiotics, and antagonistic activity against human pathogenic bacteria. In addition, the BCLA strain also has the ability to produce beneficial enzymes that assimilate a variety of substrates and its spores withstand heat during processing. Taken together, these beneficial properties provide strong evidence for *Shouchella clausii* BCLA as a promising potential probiotic.

Keywords: Spore, enzyme, *in vitro*, probiotic, *Shouchella clausii* (*Bacillus clausii*).

* Author for correspondence: Tel: 0902254556; Email: duc.nhm@bccgroup.com.vn