

ẢNH HƯỞNG CỦA ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY ĐẾN KHẢ NĂNG ỨNG CHẾ *Bacillus cereus* CỦA *Bacillus subtilis* NN12 VÀ *Bacillus licheniformis* KN12

NGUYỄN NGỌC AN, ĐINH THỊ NGỌC NGÂN, TRỊNH TIỀN KIM NGÂN, NGUYỄN PHÚC THẠNH, LÊ THỊ VY HIỀN, VÕ THỊ CẨM GIANG, NGUYỄN THỊ DIỆU HẠNH, PHẠM TẤN VIỆT*

Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh,

* Tác giả liên hệ: phamtanviet@iuh.edu.vn

DOIs: <https://doi.org/10.46242/jstih.v59i05.4588>

Tóm tắt: Việc lạm dụng các thuốc kháng vi sinh vật có bản chất tự nhiên lẫn hóa học đã và đang là nguyên nhân tạo nên các chủng vi sinh vật kháng thuốc. Thêm vào đó, tình trạng cạn kiệt nguồn kháng sinh mới là một trong những mối lo ngại hàng đầu của thế giới. Do đó, đề tài nghiên cứu này đã được tiến hành với mục đích bước đầu khai thác nguồn hợp chất kháng vi sinh vật tiềm năng từ các loài *Bacillus*. Khả năng ức chế các vi khuẩn gây bệnh, ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến khả năng sản xuất các hợp chất kháng vi sinh vật từ hai chủng *Bacillus subtilis* NN12 và *Bacillus licheniformis* KN12 đã được khảo sát. Thử nghiệm đối kháng invitro cho thấy chủng *B. subtilis* NN12 và *B. licheniformis* KN12 có khả năng ức chế mạnh đối với chủng vi khuẩn *B. cereus*. Ngoài ra, kết quả khảo sát ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến sự sinh tổng hợp các hợp chất kháng khuẩn *B. cereus* của 2 chủng nghiên cứu đã cho thấy môi trường chứa 1,0% glucose, 0,5% peptone hoặc cao nấm men, pH 6,0, tốc độ lắc 150 vòng/phút trong 18 giờ, ở 33°C là điều kiện thích hợp đối với *B. subtilis* NN12 và môi trường bổ sung 1,0% glucose hoặc tinh bột, 0,5% ure, pH 5,0, tốc độ lắc 150 vòng/phút trong 18 giờ ở 37°C-45°C là điều kiện thích hợp đối với *B. licheniformis* KN12. Hoạt tính đối kháng của dịch nuôi cấy *B. subtilis* NN12 nhạy cảm với nhiệt độ và proteinase K, trong khi dịch nuôi cấy *B. licheniformis* KN12 thì thể hiện sự bền nhiệt và bền với proteinase K. Các kết quả đạt được sẽ là tiền đề cho các nghiên cứu hợp chất kháng vi sinh vật gây bệnh trong tương lai gần, góp phần vào các phương pháp hỗ trợ điều trị bệnh nhiễm trùng, các ngành nông nghiệp và công nghiệp thực phẩm.

Từ khóa: *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*, kháng khuẩn.

1. GIỚI THIỆU

Những năm gần đây sự xuất hiện vi sinh vật kháng thuốc là một tình trạng đáng báo động trên toàn thế giới. Theo báo cáo của WHO, việc lạm dụng các thuốc kháng vi sinh vật, mà chủ yếu là kháng sinh (antibiotic) trong cả y tế lẫn nông nghiệp đã dẫn đến khoảng 700.000 ca chết trên toàn thế giới mỗi năm do nhiễm vi sinh vật kháng thuốc. Ngoài ra, tính đến nay, có hơn 1 triệu người tử vong do nhiễm siêu vi khuẩn kháng kháng sinh [1, 2]. Ngoài ra việc lạm dụng kháng sinh trong điều trị có thể dẫn đến việc tiêu diệt các vi sinh vật có ích sống cộng sinh trong cơ thể người, rối loạn đường tiêu hóa, miễn dịch, thần kinh và tăng nguy cơ béo phì [3]. Sự khan hiếm các loại kháng sinh mới là một trở ngại và đe dọa lớn trong việc điều trị các bệnh nhiễm trùng kháng thuốc tuy nhiên cũng là động lực thúc đẩy các giải pháp thay thế, bổ sung và an toàn chẳng hạn như các bacteriocin và bacteriocin-like substances (BLS) [4, 5].

Chi *Bacillus* là tập hợp các vi khuẩn Gram dương, có khả năng sinh bào tử phân bố rộng rãi trong tự nhiên. *Bacillus* từ lâu đã được ứng dụng rất nhiều trong các ngành công nghiệp khác nhau, trong xử lý môi trường, công nghệ thực phẩm, và như các probiotics cho con người và vật nuôi [6]. Nhiều loài *Bacillus* có thể tạo ra một số lượng lớn và đa dạng các hợp chất kháng vi sinh vật có bản chất hóa học và cấu trúc khác nhau, chẳng hạn như các ribosomal và non-ribosomal peptide, polyketide, và các hợp chất bay hơi với vai trò chính là duy trì, thậm chí giảm số lượng vi sinh vật cạnh tranh trong cùng môi trường sống [7, 8]. Một số hợp chất này, được sản xuất bởi các loài *Bacillus* được xem là an toàn (GRAS, generally recognized as safe) có phổ ức chế rộng đối với các vi khuẩn Gram âm, Gram dương và cả nấm mốc, nấm men [8]. Với những đặc điểm trên, các hợp chất kháng sinh vật từ *Bacillus* đã và đang được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau như công nghiệp sản xuất và bảo quản thực phẩm; ức chế hay tiêu diệt các vi khuẩn, nấm, virus gây bệnh ở người và động vật; ức chế tế bào ung thư [5, 9]. Một số nghiên cứu cho thấy sự sinh tổng

hợp các hợp chất kháng vi sinh vật từ *Bacillus* chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố môi trường dinh dưỡng, thời gian nuôi cấy [10-12]; thành phần môi trường, pH, nhiệt độ [13, 14].

Với những tiềm năng lớn trong việc sản xuất các hợp chất kháng vi sinh vật của chi *Bacillus* được đề cập ở trên, khả năng kháng vi khuẩn, kháng nấm mốc gây bệnh và các điều kiện nuôi cấy thích hợp cho sự sản xuất các hợp chất kháng vi sinh vật của hai chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* NN12, *Bacillus licheniformis* KN12 đã được nghiên cứu, làm tiền đề cho các giải pháp bổ sung, hỗ trợ hoặc thay thế đối với những kháng sinh hay chất diệt vi sinh vật tổng hợp hóa học đã, đang, và có nguy cơ bị đề kháng trong tương lai.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nhân giống và bảo quản các chủng vi khuẩn

Hai chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* NN12 và *Bacillus licheniformis* KN12 được phân lập từ đất, định danh ở mức phân tử bằng phương pháp giải trình tự đoạn gen 16S-rRNA và kết quả giải trình tự được so sánh với cơ sở dữ liệu 16S-rRNA của vi khuẩn có sẵn trên National Center for Biotechnology Information (NCBI) bằng công cụ BLASTN (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (thuộc bộ sưu tập giống của Phòng thí nghiệm Công nghệ Vi sinh, Viện Công nghệ sinh học Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh) được sử dụng làm đối tượng nghiên cứu và 6 chủng vi khuẩn được sử dụng để xác định hoạt tính kháng khuẩn gây bệnh trong nghiên cứu này gồm 2 chủng Gram dương là *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (ATCC 11778) và 4 chủng Gram âm gồm *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076); *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311). Các chủng này được lưu giữ tại Bộ môn Công nghệ Sinh học, Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp Tp. HCM ở điều kiện -70°C và được hoạt hoá qua đêm trong môi trường Luria-Bertani broth (LB broth) ở 37°C trước khi thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.

2.2. Đánh giá khả năng đối kháng vi khuẩn kiểm định của *B. subtilis* và *B. licheniformis*

Các chủng vi khuẩn được sử dụng để xác định hoạt tính kháng khuẩn được hoạt hoá qua đêm trong môi trường Luria-Bertani broth (LB broth) (Tryptone 10,0 g; cao nấm men 5,0 g; NaCl 10,0 g; nước cất đủ 1.000 ml; pH 7,0-7,2) ở 37°C. Việc xác định khả năng kháng khuẩn được thực hiện theo phương pháp khuếch tán giếng thạch [15]. Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường LB broth đến khi đạt được độ đục là 0,5 theo tiêu chuẩn McFarland. Dịch vi khuẩn (0,1 ml) được trải trên đĩa môi trường MHA (Mueller Hinton Agar). Các đĩa Petri sau đó được đục các giếng có đường kính 6 mm, 20 µl dịch vi khuẩn *B. subtilis* NN12/*B. licheniformis* KN12 (thu sau 24 giờ nuôi cấy trên môi trường LB broth, ly tâm 14.000 vòng/phút ở 4°C trong 15 phút, và lọc qua màng lọc 0,45 µm) được thêm vào các giếng thạch, để yên ở 4°C trong 2 giờ cho dịch thấm vào môi trường. Mẫu đối chứng âm được thực hiện với môi trường LB broth vô trùng. Khả năng đối kháng của *B. subtilis* NN12/*B. licheniformis* KN12 đối với vi khuẩn kiểm định được xác định bằng đường kính vòng vô khuẩn sau 16-18 giờ nuôi ủ ở 37°C.

2.3. Khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố môi trường lên khả năng đối kháng *B. cereus*

Hai chủng vi khuẩn được nuôi trong môi trường LB lỏng ở 37°C, 150 vòng/phút trong 24 giờ và được sử dụng như nguồn giống tăng sinh cho các thí nghiệm khảo sát điều kiện sinh tổng hợp các hợp chất đối kháng như ảnh hưởng của nguồn carbon, nitơ, điều kiện nhiệt độ, pH khác nhau. Khả năng đối kháng *B. cereus* của dịch nuôi cấy vi khuẩn được kiểm tra sau khi loại bỏ tế bào (ly tâm 14.000 vòng/phút ở 4°C và lọc qua màng lọc 0,45 µm) bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch và so sánh đường kính vòng đối kháng ở các điều kiện thí nghiệm khác nhau.

Để khảo sát ảnh hưởng của các nguồn carbon, môi trường LB lỏng với thành phần bao gồm 5,0 g cao nấm men; 5,0 g pepton; 5,0 g NaCl; nước cất vừa đủ 1.000 ml; pH 7,2-7,4 và bổ sung 10,0 g một trong các nguồn carbon khác nhau như glucose, sucrose, lactose, dextrin, tinh bột. Nguồn carbon cho kết quả đối kháng cao nhất được sử dụng cho các thí nghiệm khảo sát tiếp theo.

Ảnh hưởng của nguồn nitơ lên sự sinh tổng hợp các chất đối kháng được kiểm tra trong môi trường LB lỏng với thành phần carbon cho kết quả cao nhất trong thí nghiệm trên và bổ sung 5,0 g một trong các nguồn nitơ bao gồm: peptone, cao nấm men, NaNO₃, NH₄NO₃, NH₄Cl, ure.

Kết quả chọn lọc từ các điều kiện thích hợp sẽ được sử dụng trong khảo sát ảnh hưởng của pH môi trường lên sự sinh tổng hợp các hợp chất đối kháng. Môi trường thử nghiệm được điều chỉnh ở các giá trị pH ban đầu khác nhau 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 \pm 0,1 bằng dung dịch NaOH và HCl ở 2 nồng độ 0,1N, 1,0N và sau đó vi khuẩn được nuôi ủ trong môi trường có nguồn carbon, nitơ thích hợp đã được chọn lọc.

Nguồn carbon và nitơ cho kết quả dịch nuôi cấy có hoạt tính đối kháng *B. cereus* cao nhất sẽ được chọn để tiếp tục khảo sát sự ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy lên sự đối kháng của vi khuẩn. Chúng vi khuẩn được nuôi trong môi trường thử nghiệm có nguồn carbon, nitơ, pH thích hợp và được nuôi ủ ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau 25°C; 28°C; 33°C; 37°C; 45°C \pm 0,1°C và kiểm tra hoạt tính đối kháng.

2.4. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ và proteinase K lên hoạt tính kháng *B. cereus* của dịch nuôi cấy *B. subtilis* và *B. licheniformis*

Dịch nuôi cấy của các chủng *B. subtilis* NN12 và *B. licheniformis* KN12 trong điều kiện thích hợp đã được khảo sát và lựa chọn được loại bỏ tế bào bằng phương pháp ly tâm 14.000 vòng/phút ở 4°C và lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

Ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt tính kháng khuẩn của dịch nuôi cấy vô bào được khảo sát bằng cách ủ 1 ml dịch ở các mốc nhiệt độ: 55°C; 65°C; 75°C; 85°C; 95°C \pm 0,1°C trong 15 phút, sau đó kiểm tra hoạt tính bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch.

Ảnh hưởng của proteinase K lên hoạt tính kháng khuẩn của dịch nuôi cấy vô bào được khảo sát bằng cách ủ dịch với proteinase K ở nồng độ 1 mg/ml trong 2 giờ ở 37°C, sau đó kiểm tra hoạt tính bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch.

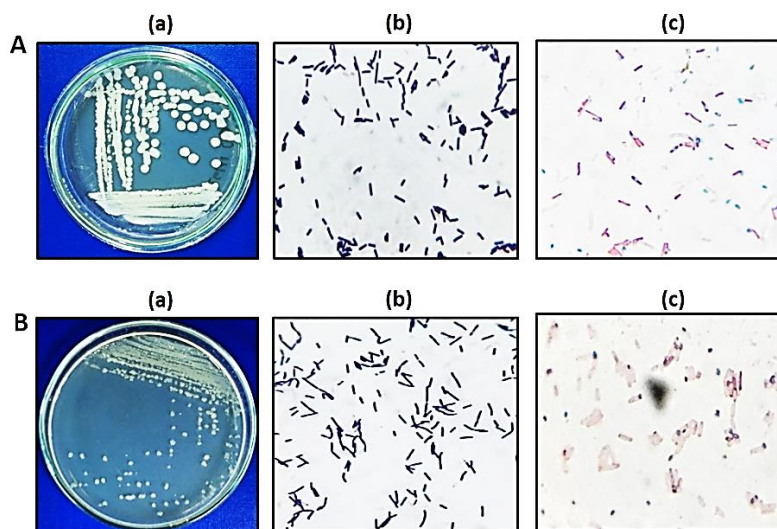
2.5. Phương pháp thống kê và xử lý số liệu

Tất cả các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Số liệu được tính toán, vẽ biểu đồ trên Microsoft Excel 2013 và được xử lý thống kê bằng công cụ ANOVA của phần mềm Statgraphics Centurion 18.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kiểm tra các chủng *B. subtilis* NN12 và *B. licheniformis* KN12

Nhằm xác định hai chủng vi khuẩn *B. subtilis* NN12 và *B. licheniformis* KN12 được sử dụng trong nghiên cứu không tạp nhiễm và có các tính chất đặc trưng, hai chủng vi khuẩn này được kiểm tra hình thái khuẩn lạc, hình thái vi thể với các đặc tính nhuộm Gram và nhuộm nội bào tử (Hình 1).



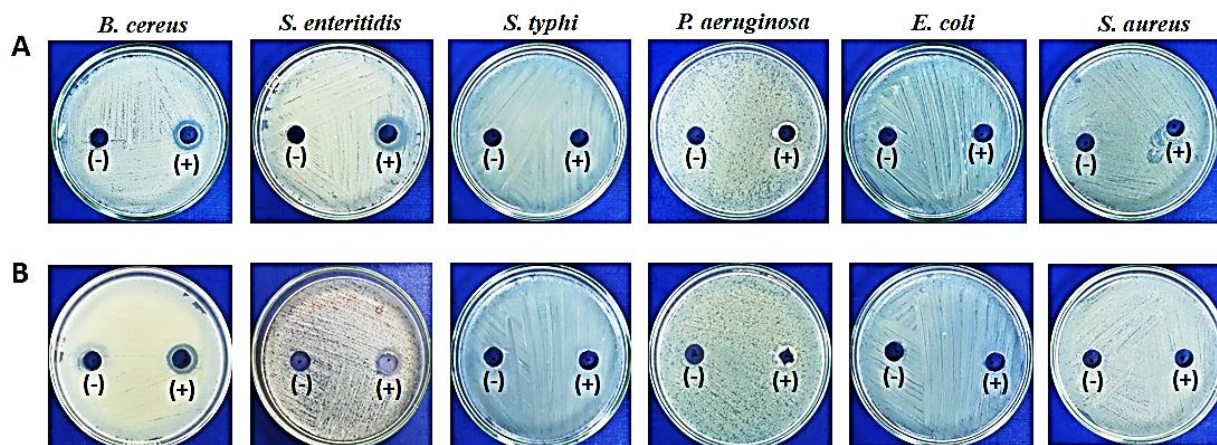
Hình 1: Hình thái khuẩn lạc sau 72 giờ nuôi ủ trên môi trường LB (a), nhuộm Gram (b) và nhuộm bào tử (c) của các chủng *B. subtilis* NN12 (A) và *B. licheniformis* KN12 (B) (X400)

Hình thái khuẩn lạc trên môi trường nuôi cấy thạch LB sau 2 ngày nuôi ủ cho thấy cả hai chủng thể hiện các đặc điểm điển hình của chi *Bacillus* với khuẩn lạc tròn, rìa khuẩn lạc nhẵn, bề mặt gồ ghề, nhẵn nheo như tạo các mảng bám, màu trắng đục đến vàng sáng. Kết quả nhuộm Gram cho thấy cả hai chủng vi khuẩn là Gram dương, hình dạng đồng nhất, không có sự nhiễm tạp các vi sinh vật khác trong mẫu nhuộm. Cả hai chủng đều thể hiện khả năng hình thành nội bào tử. Sau khi kiểm tra độ thuần của vi khuẩn nghiên cứu, khuẩn lạc đặc trưng của hai chủng vi khuẩn được chọn lọc, tăng sinh và sử dụng trong các nghiên cứu tiếp theo.

3.2. Khả năng đối kháng vi khuẩn kiểm định của *B. subtilis* và *B. licheniformis*

Khả năng sinh tổng hợp các chất đối kháng của hai chủng vi khuẩn sẽ được khảo sát trên các vi sinh vật kiểm định gồm 6 chủng vi khuẩn gây bệnh trong thực phẩm. Dịch nuôi cấy *B. subtilis* NN12 và *B. licheniformis* KN12 sau 24 giờ nuôi ủ trong môi trường lỏng LB được kiểm tra khả năng đối kháng theo phương pháp khuếch tán giếng thạch và kết quả được trình bày trong Hình 2.

Trong điều kiện thí nghiệm, dịch nuôi cấy *B. subtilis* NN12 thể hiện khả năng đối kháng lên hai vi khuẩn kiểm định là *Bacillus cereus* và *Salmonella enteritidis* với đường kính vòng đối kháng là $3,0 \pm 0,1$ mm và $4,5 \pm 0,2$ mm, và không thể hiện hoạt tính đối kháng trên bốn chủng vi khuẩn còn lại *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* (Hình 2A). Khochamit và cộng sự (2015) đã ghi nhận khả năng đối kháng của *B. subtilis* KKU213 với các chủng vi khuẩn *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* [16]. Trong nghiên cứu của Ouoba và cộng sự (2007), chủng *B. subtilis* B7 thể hiện khả năng đối kháng *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, [17]. Kết quả cho thấy tiềm năng đối kháng các vi khuẩn gây bệnh của chủng *B. subtilis* NN12.



Hình 2: Khả năng đối kháng với các vi khuẩn kiểm định của *B. subtilis* NN12 (A) và của *B. licheniformis* KN12 (B). (-) đối chứng; (+) mẫu dịch vi khuẩn.

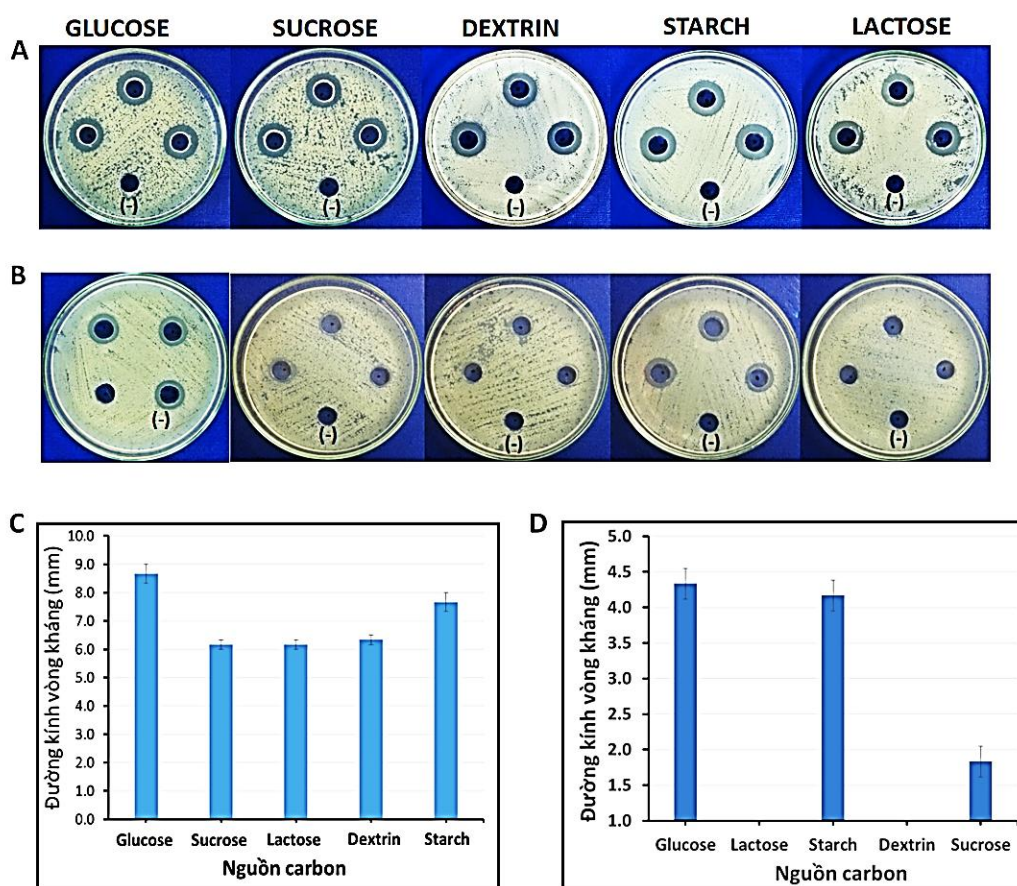
Tương tự như kết quả đạt được trong thử nghiệm với dịch nuôi cấy vi khuẩn *B. subtilis* NN12, dịch nuôi cấy *B. licheniformis* KN12 cũng thể hiện hoạt tính đối kháng với vi khuẩn kiểm định *Bacillus cereus* và *Salmonella enteritidis* và không đối kháng với các vi khuẩn kiểm định khác. Tuy nhiên, dịch nuôi cấy *B. licheniformis* KN12 thể hiện hoạt tính đối kháng với *B. cereus* mạnh hơn so với hoạt tính đối kháng *Salmonella enteritidis* với đường kính vòng đối kháng tương ứng là $3,0 \pm 0,1$ mm và $1,5 \pm 0,1$ mm (Hình 2B). Trong nghiên cứu của Sharma và cộng sự (2010), vi khuẩn *B. licheniformis* IITRHR2 cũng thể hiện hoạt tính đối kháng với *Bacillus cereus* và một số loại vi khuẩn kiểm định khác như *Listeria monocytogenes* MTCC1143, *Pediococcus pentosaceus* NCDC273, *Shigella flexneri* MTCC1457, đồng thời *B. licheniformis* IITRHR2 trong nghiên cứu này cũng không thể hiện hoạt tính đối kháng với *Salmonella typhi* [18].

3.3. Ảnh hưởng của nguồn carbon trong môi trường nuôi cấy lên khả năng kháng *B. cereus*

Thành phần môi trường nuôi cấy ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp của vi sinh vật, đặc biệt là các hợp chất có khả năng kháng khuẩn hoặc kháng mốc. Carbon là thành phần không thể thiếu trong các môi trường nuôi cấy vi sinh vật. Do đó, chúng tôi tiến hành khảo sát ảnh hưởng của các

nguồn carbon khác nhau (glucose, sucrose, lactose, dextrin và tinh bột) lên quá trình sinh tổng hợp. Kết quả thể hiện ảnh hưởng của nguồn carbon đến khả năng kháng *B. cereus* của dịch nuôi cấy hai chủng vi khuẩn được trình bày trong Hình 3.

Kết quả khảo sát nguồn carbon trong môi trường nuôi cấy cho thấy chủng vi khuẩn *B. subtilis* NN12 có khả năng hình thành các chất đối kháng với *B. cereus* trong cả năm nguồn carbon. Trong số đó, trên môi trường có bổ sung glucose và tinh bột đường kính vòng kháng khuẩn lớn nhất lần lượt là $8,7 \pm 0,3$ mm và $7,7 \pm 0,3$ mm (Hình 3A và 3C). Sự đối kháng cao trong môi trường có bổ sung glucose có thể do glucose là nguồn carbon dễ sử dụng cho sự sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật, giúp vi sinh vật tăng trưởng nhanh và tích lũy sinh khối cao hơn các nguồn carbon khác, điều này có thể gián tiếp giúp cho việc hình thành các chất trao đổi thứ cấp có khả năng đối kháng *B. cereus* nhiều hơn trong các loại môi trường có chứa nguồn carbon khác. Ngoài ra, kết quả không có sự khác biệt khi nuôi cấy chủng *B. subtilis* NN12 trong môi trường chứa lactose, sucrose và dextrin với đường kính vòng đối kháng là 6,2-6,3 mm (ANOVA, $n=3$, độ tin cậy 95%). Như vậy, glucose là nguồn carbon phù hợp cho quá trình nuôi cấy *B. subtilis* NN12 sinh tổng hợp được các hợp chất đối kháng *B. cereus* và được chọn để sử dụng trong môi trường nuôi cấy cho các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 3: Ảnh hưởng của nguồn carbon trong môi trường nuôi cấy lên khả năng kháng *B. cereus* của *B. subtilis* NN12 (A, C) và *B. licheniformis* KN12 (B, D). (-) đối chứng.

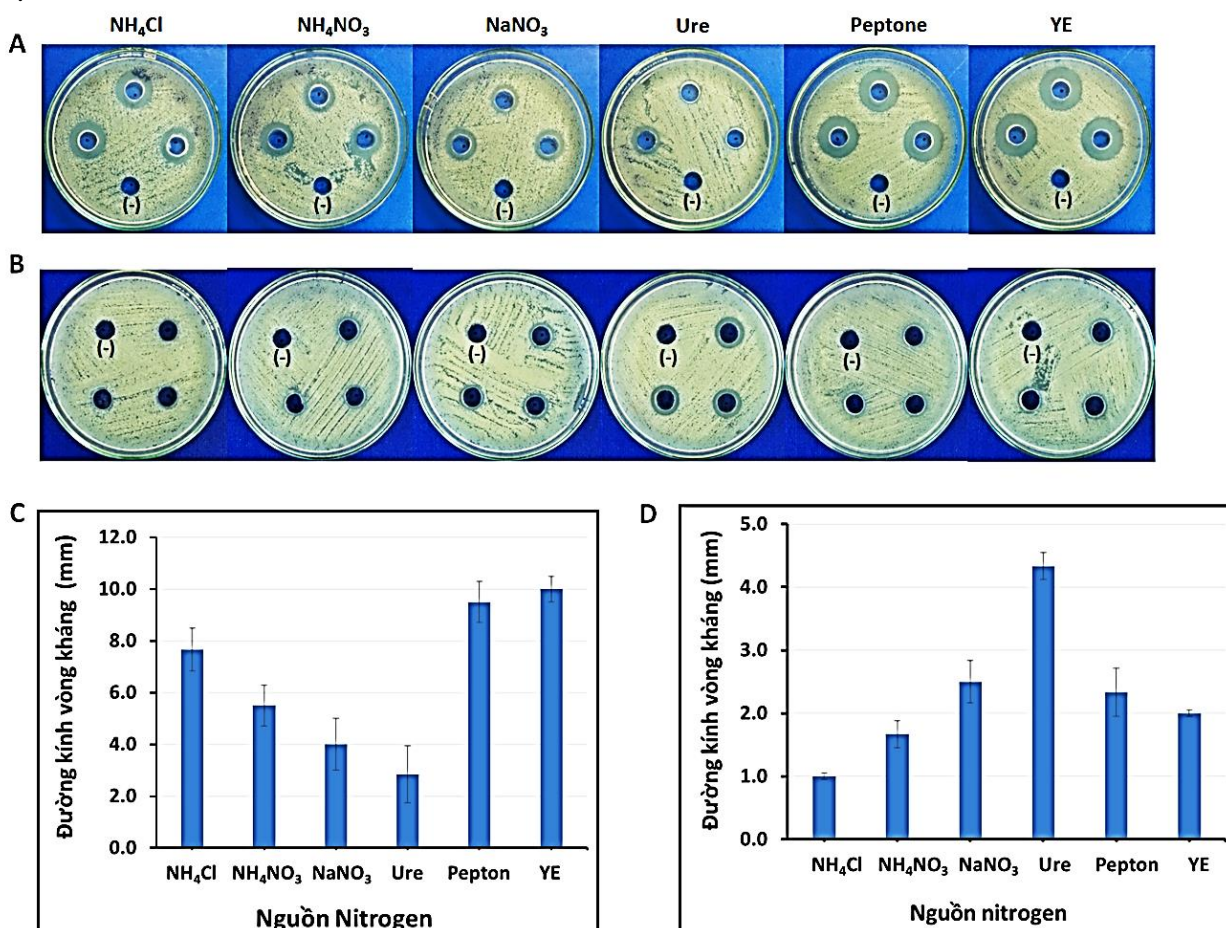
Trong trường hợp *B. licheniformis* KN12, chủng vi khuẩn này chỉ thể hiện khả năng sinh tổng hợp được các hợp chất đối kháng khi được nuôi cấy trong môi trường có nguồn carbon là glucose, tinh bột và sucrose. Trong môi trường có bổ sung lactose và dextrin, chủng vi khuẩn vẫn tăng trưởng sinh khối nhưng trong điều kiện thí nghiệm thì không thể hiện được khả năng đối kháng với *B. cereus*. Nguồn carbon là glucose được sử dụng trong môi trường nuôi cấy cho kết quả thể hiện hoạt tính kháng khuẩn cao nhất với đường kính vòng ức chế là $4,3 \pm 0,2$ mm, trong khi nguồn carbon tinh bột cho đường kính vòng ức chế là $4,2 \pm 0,2$ mm (Hình 3B và 3D). Kết quả phân tích thống kê cho thấy không có sự khác biệt về hoạt tính đối kháng khi sử dụng hai nguồn carbon này trong môi trường nuôi cấy (ANOVA, $n=3$, độ tin cậy 95%). Ngoài ra,

ẢNH HƯỞNG CỦA ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY ĐẾN...

việc bổ sung sucrose vào môi trường nuôi cấy làm cho khả năng kháng khuẩn trong dịch nuôi cấy giảm 50% với đường kính vòng ức chế là $1,8 \pm 0,2$ mm. Trong nghiên cứu của Olivera và cộng sự, nhóm tác giả đã bổ sung thêm glucose trong môi trường BHI nuôi cấy *B. licheniformis* P40 giúp gia tăng sự sinh hợp chất tương tự bacteriocin (BLS) [19]. Bên cạnh đó, Kayalvizhi và cộng sự đã bổ sung sorbitol vào môi trường để tăng khả năng sinh peptide kháng khuẩn MKU3 cao nhất [20]. Kết quả cho thấy tùy thuộc bản chất của các hợp chất đối kháng của từng loại vi sinh vật, nhu cầu về nguồn carbon để sinh tổng hợp hợp chất đối kháng khác nhau. Như vậy, căn cứ vào kết quả đạt được, nguồn carbon thích hợp cho sự sinh tổng hợp các hợp chất đối kháng *B. cereus* cho cả hai chủng vi khuẩn *B. subtilis* NN12 và *B. licheniformis* KN12 là glucose và tinh bột, trong đó glucose có sự nổi trội hơn trong trường hợp của vi khuẩn *B. subtilis* NN12. Do đó, glucose được chọn làm nguồn carbon bổ sung cho môi trường sinh tổng hợp chất đối kháng *B. cereus*.

3.4. Ảnh hưởng của nguồn nitơ trong môi trường nuôi cấy lên khả năng kháng *B. cereus*

Bên cạnh nguồn cơ chất carbon, nitơ là thành phần không thể thiếu trong sự sinh trưởng và phát triển của các loại sinh vật. Sự sinh tổng hợp các hợp chất trao đổi thứ cấp trong môi trường nuôi cấy của các vi sinh vật cũng bị ảnh hưởng bởi thành phần này. Do đó, để xác định ảnh hưởng của nitơ lên sự sinh tổng hợp các hợp chất đối kháng *B. cereus* của *B. subtilis* NN12 và *B. licheniformis* KN12, chúng tôi tiến hành khảo sát các nguồn nitơ khác nhau là NH_4NO_3 , NH_4Cl , NaNO_3 , ure, cao nấm men, peptone lên sự sinh tổng hợp chất đối kháng. Hoạt tính đối kháng *B. cereus* của dịch nuôi cấy được kiểm tra sau 24 giờ nuôi ủ và được thể hiện ở Hình 4.



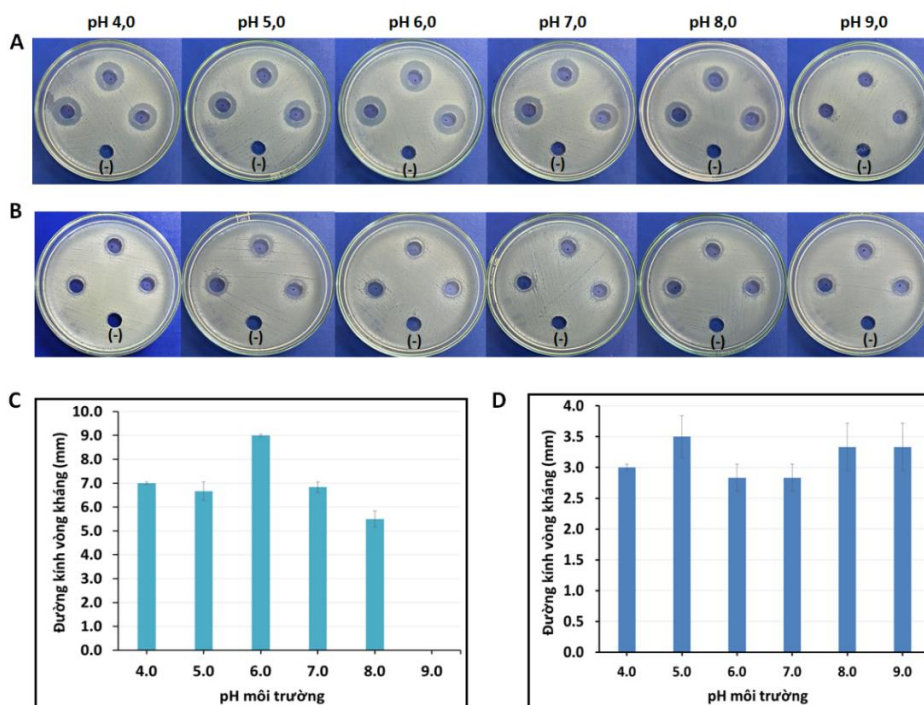
Hình 4: Ảnh hưởng của nguồn nitrogen trong môi trường nuôi cấy lên khả năng kháng *B. cereus* của *B. subtilis* NN12 (A, C) và *B. licheniformis* KN12 (B, D). (-) đối chứng.

Cả hai chủng vi khuẩn *B. subtilis* NN12 và *B. licheniformis* KN12 đều cho thấy khả năng sinh tổng hợp các hợp chất đối kháng sự sinh trưởng của *B. cereus* bị ảnh hưởng bởi thành phần nitrogen bổ sung vào môi

trường nuôi cấy. Trong môi trường nuôi cấy có bổ sung các nguồn nitơ khác nhau, khả năng ức chế *B. cereus* của hai chủng vi khuẩn thể hiện khác nhau. Chủng *B. subtilis* NN12 thể hiện khả năng đối kháng cao nhất trong môi trường có bổ sung cao nấm men và pepton với đường kính vòng đối kháng thể hiện tương ứng là $10,0 \pm 0,1$ mm và $9,5 \pm 0,3$ mm. Sự khác biệt về khả năng đối kháng trong hai môi trường này không đáng kể sau khi phân tích thống kê (ANOVA, $n=3$, độ tin cậy 95%) (Hình 4A và 4C). Ảnh hưởng của nitơ trong môi trường nuôi cấy lên khả năng sinh tổng hợp bacterocin của *B. subtilis* cũng được chứng minh trong các nghiên cứu Đỗ Thị Hiền và Asma Ansari với nguồn nitơ thích hợp tương ứng là yeast extract và peptone [21, 22]. Kết quả tương tự cũng được quan sát thấy trong nghiên cứu của Anthony và cộng sự (2009), khả năng sản xuất peptide kháng khuẩn (ABP) của *B. licheniformis* AnBa9 đã được tăng cường khi môi trường được bổ sung cao nấm men và NH_4NO_3 [13], và chủng vi khuẩn *B. licheniformis* MKU3 thể hiện khả năng sinh tổng hợp hợp chất kháng khuẩn khi môi trường có nguồn nitơ là cao nấm men và pepton [20]. Tuy nhiên, chủng *B. licheniformis* KN12 lại thể hiện hoạt tính đối kháng tốt nhất trong môi trường có nguồn nitơ là ure với hoạt tính $4,3 \pm 0,2$ mm, và cao hơn đáng kể so với điều kiện môi trường chứa các nguồn nitơ khác (hình 4B và 4D). Kết quả thu được có sự khác biệt so với một số nghiên cứu khác về khả năng kháng khuẩn của chủng vi khuẩn *B. licheniformis*, cho thấy sự đa dạng trong việc sinh tổng hợp các chất kháng khuẩn của các chủng thuộc chi *Bacillus*. Căn cứ trên các kết quả thu được, nguồn nitơ được sử dụng cho môi trường nuôi cấy các chủng *B. subtilis* NN12 và *B. licheniformis* KN12 tương ứng là cao nấm men và ure, môi trường này sẽ được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.5. Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy lên khả năng kháng *B. cereus*

Ngoài việc chịu ảnh hưởng bởi các thành phần cơ chất như carbon và nitơ, pH môi trường nuôi cấy ban đầu cũng ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng cũng như sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp. Để khảo sát ảnh hưởng của yếu tố pH lên sự sinh tổng hợp các hợp chất kháng khuẩn của vi khuẩn *B. subtilis* NN12 và *B. licheniformis* KN12, môi trường dinh dưỡng với thành phần carbon và nitơ thích hợp được điều chỉnh ở các giá trị pH ban đầu khác nhau 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; $9,0 \pm 0,1$ và vi khuẩn được nuôi cấy tại nhiệt độ 37°C trong điều kiện lắc 150 vòng/phút. Dung dịch nuôi cấy được thu nhận và kiểm tra khả năng đối kháng sau 24 giờ nuôi cấy.

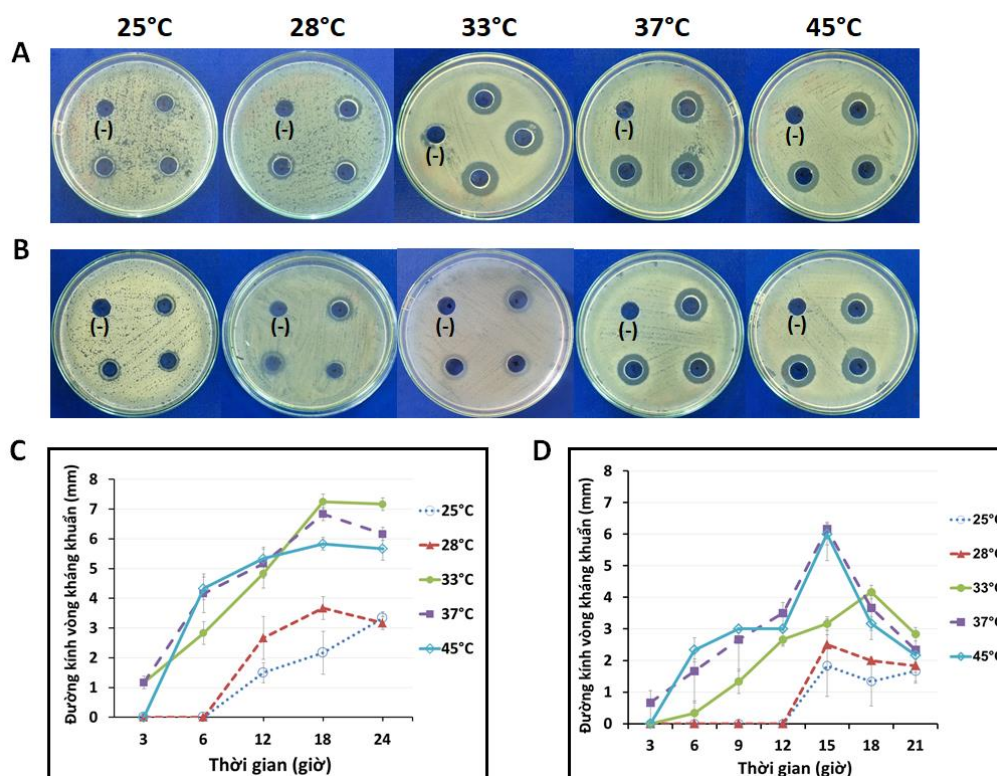


Hình 5. Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy lên khả năng sinh tổng hợp chất đối kháng *B. cereus* của *B. subtilis* (A, C) và *B. licheniformis* (B, D). (-) đối chứng.

Kết quả thể hiện ở Hình 5 cho thấy chủng vi khuẩn *B. subtilis* NN12 có khả năng kháng khuẩn trong các môi trường có giá trị pH ban đầu 4,0-8,0, trong đó khả năng đối kháng cao nhất đạt được tại pH 6,0 với đường kính vòng kháng khuẩn $9,0 \pm 0,05$ mm. Trong các môi trường có giá trị pH 4,0, 5,0 và 7,0, đường kính vòng kháng khuẩn đạt $6,7 \pm 0,4$ mm đến $7,0 \pm 0,1$ mm. Kết quả phân tích thống kê cho thấy, khả năng đối kháng *B. cereus* của dịch nuôi cấy *B. subtilis* NN12 trong môi trường có pH 4,0, 5,0 và 7,0 thì không có sự khác biệt có ý nghĩa (ANOVA, $n=3$, độ tin cậy 95%). Trong môi trường có tính kiềm (pH 8,0-9,0), khả năng đối kháng giảm rõ rệt với đường kính vòng kháng khuẩn là $5,5 \pm 0,3$ mm tại pH 8,0 và không thể hiện khả năng đối kháng khi pH là 9,0 (Hình 5A và 5C). Bên cạnh đó, chủng vi khuẩn *B. licheniformis* KN12 thể hiện khả năng sinh tổng hợp các chất kháng khuẩn trong các môi trường có pH khác nhau là tương tự nhau với đường kính vòng đối kháng trong khoảng $2,83 \pm 0,22$ mm đến $3,5 \pm 0,36$ mm. Kết quả phân tích thống kê cũng thể hiện không có sự khác biệt đáng kể của đường kính vòng kháng khuẩn khi nuôi cấy chủng *B. licheniformis* KN12 trong môi trường có pH 4,0-9,0 (ANOVA, $n=3$, độ tin cậy 95%), thể hiện khả năng sinh trưởng trong phổ pH rộng của chủng vi khuẩn này (Hình 5B và 5D). Như vậy, pH môi trường 6,0 và 5,0 được chọn tương ứng cho môi trường nuôi cấy các chủng *B. subtilis* NN12 và *B. licheniformis* KN12.

3.6. Ảnh hưởng của điều kiện nhiệt độ lên khả năng kháng *B. cereus*

Nhiệt độ lên men là một trong những yếu tố ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và khả năng sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp của vi sinh vật. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên sự sinh tổng hợp các hợp chất đối kháng *B. cereus* của hai chủng vi khuẩn cũng được kiểm tra trong các điều kiện nhiệt độ 25°C; 28°C; 33°C; 37°C; 45°C $\pm 0,2$ °C. Dịch nuôi cấy được thu nhận và kiểm tra khả năng kháng khuẩn sau mỗi 3 giờ và kết quả được thể hiện trong Hình 6.



Hình 6: Ảnh hưởng của nhiệt độ môi trường nuôi cấy lên khả năng kháng *B. cereus* của *B. subtilis* NN12 (A, C) và *B. licheniformis* KN12 (B, D). Khả năng kháng *B. cereus* tại nhiệt độ khác nhau sau 18 giờ nuôi cấy (A, B) và sau các khoảng thời gian khác nhau (C, D). (-) đối chứng.

Kết quả cho thấy rằng nhiệt độ và thời gian có ảnh hưởng lớn đến khả năng sinh các hợp chất kháng khuẩn của *B. subtilis* NN12 và *B. licheniformis* KN12 lên vi khuẩn kiểm định *B. cereus*. Dịch nuôi cấy ở 5 điều kiện nhiệt độ khác nhau đều có khả năng sinh tổng hợp các chất đối kháng với *B. cereus*, tuy nhiên tùy thời

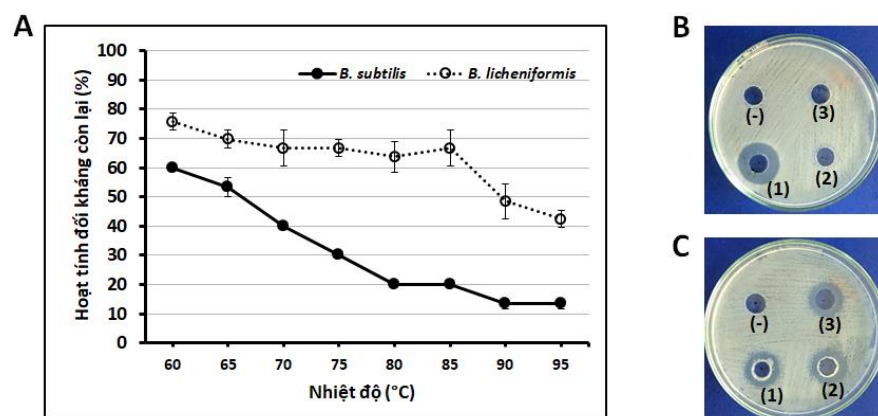
điểm nuôi cấy mà có hoạt tính khác nhau. Sau 6 giờ nuôi cấy ở 25°C và 28°C, dịch nuôi cấy vẫn chưa thể hiện hoạt tính kháng khuẩn, tuy nhiên, sau 12 giờ nuôi cấy, hoạt tính kháng *B. cereus* tại 2 điều kiện nhiệt độ này tương ứng $1,5 \pm 0,3$ mm và $2,7 \pm 0,7$ mm, sau đó hoạt tính tăng dần với vòng đối kháng cao nhất tại thời điểm 18 giờ nuôi cấy là $2,2 \pm 0,7$ mm tại 25°C và $3,7 \pm 0,3$ mm tại 28°C. Trong khi đó ở các nhiệt độ 33°C, 37°C và 45°C, dịch nuôi cấy đã thể hiện hoạt tính đối kháng tại thời điểm sau 3 giờ nuôi cấy. Hoạt tính đối kháng tăng dần và đạt giá trị cao nhất cũng tại thời điểm 18 giờ nuôi cấy với đường kính vòng kháng khuẩn lần lượt là $7,3 \pm 0,2$ mm, $6,8 \pm 0,2$ mm và $5,8 \pm 0,2$ mm tương ứng điều kiện nhiệt độ 33°C, 37°C và 45°C. Như vậy, điều kiện nhiệt độ 33°C thích hợp nhất cho sự sinh tổng hợp các chất đối kháng *B. cereus* và thời gian thích hợp được chọn là sau 18 giờ nuôi cấy (Hình 6A và 6C). Kết quả cho thấy thời gian nuôi cấy chủng *B. subtilis* trong nghiên cứu này ngắn hơn so với nghiên cứu trên cùng đối tượng chủng *B. subtilis* KIBGE IB-17 của Asma Ansari năm 2012 với thời gian là 24 giờ tại 37°C. [21]

Dịch nuôi cấy vi khuẩn *B. licheniformis* KN12 tại thời điểm 3 giờ ở nhiệt độ 37°C đã có sự ức chế trên vi khuẩn kiểm định, tăng dần đến 15 giờ và giảm dần sau đó. Khả năng ức chế *B. cereus* cũng có sự tương đương đối với dịch nuôi cấy ở 45°C, tuy nhiên khả năng ức chế chỉ xuất hiện ở thời điểm bắt đầu từ 6 giờ sau khi nuôi cấy. Tại nhiệt độ 25°C và 28°C, sự ức chế vi khuẩn đối kháng bắt đầu có hoạt tính và cao nhất ở 15 giờ sau khi nuôi cấy và giảm dần theo thời gian nuôi cấy tiếp theo. Ở nhiệt độ 33°C, khả năng ức chế *B. cereus* tăng dần qua các thời điểm nuôi cấy nhưng cao nhất ở 18 giờ và giảm dần từ thời điểm 21 giờ. Tại 15 giờ, sự ức chế *B. cereus* cao nhất ở 37°C và 45°C gấp 1,5 lần so với 33°C và gấp 3 lần so với 25°C và 28°C. Theo kết quả thống kê với mức tin cậy 95%, nhiệt độ 37°C và 45°C tại 15 giờ có khả năng kháng *B. cereus* của dịch nuôi cấy *B. licheniformis* KN12 là cao nhất và không có sự khác biệt giữa hai điều kiện nhiệt độ này. Do đó, nhiệt độ 37°C và 45°C là nhiệt độ thích hợp để nuôi cấy *B. licheniformis* KN12 cho sự sinh tổng hợp các chất kháng khuẩn với thời gian nuôi cấy là 15 giờ (Hình 6B và 6D). Trong nghiên cứu của Olivera và cộng sự (2004) cũng đã cho thấy ở nhiệt độ 30°C trong 24 giờ thì BLS (Bacteriocin Like Substance) từ *B. licheniformis* P40 có hoạt tính kháng tốt lên các vi khuẩn kiểm nghiệm [19], trong khi chủng *B. licheniformis* AnBa9 tạo ra các hợp chất kháng khuẩn cao nhất khi được nuôi ở nhiệt độ 43°C trong 24 giờ [13]. Như vậy, thời gian nuôi cấy của chủng *B. licheniformis* KN12 ngắn hơn, cho thấy tiềm năng và hiệu quả ứng dụng ở nhiệt độ cao của chủng vi khuẩn này trong thực tiễn.

3.7. Ảnh hưởng của nhiệt độ và proteinase K lên hoạt tính đối kháng *B. cereus* của dịch nuôi cấy *B. subtilis* và *B. licheniformis*

Hoạt động kháng khuẩn của các hợp chất trong dịch nuôi cấy các chủng vi khuẩn thuộc chi Bacillus được ghi nhận do nhiều cơ chế tác động khác nhau, trong đó các chất thuộc bản chất bacteriocin với mạch peptide ngắn được báo cáo trong nhiều nghiên cứu. Để hiểu hơn về cơ chế đối kháng vi khuẩn kiểm định cũng như khả năng bảo quản, dịch nuôi cấy vi khuẩn *B. subtilis* NN12 và *B. licheniformis* KN12 được kiểm tra tính bền dưới tác động của protease (proteinase K) cũng như tính bền nhiệt bằng cách xử lý ở các nhiệt độ khác nhau (60-95°C) và kiểm tra hoạt tính đối kháng với *B. cereus* còn lại sau xử lý. Kết quả được thể hiện trong Hình 7.

Sau khi được xử lý ở các nhiệt độ khác nhau, hoạt tính của dịch nuôi cấy vi khuẩn *B. subtilis* NN12 bị ảnh hưởng nghiêm trọng, hoạt tính còn lại đạt ~50% được ghi nhận tại nhiệt độ xử lý 65°C và ~20% tại nhiệt độ 80°C. Nhiệt độ xử lý càng cao càng làm giảm hoạt tính đối kháng của dịch nuôi cấy, cho thấy sự nhạy cảm với nhiệt độ của các hợp chất đối kháng có trong dịch nuôi cấy. Tuy nhiên, dịch nuôi cấy của chủng *B. licheniformis* KN12 thể hiện độ bền nhiệt nổi trội với hoạt tính duy trì ~50% khi xử lý với 90°C, thể hiện độ bền nhiệt của các hợp chất đối kháng trong dịch nuôi cấy (Hình 7A). Khi dịch nuôi cấy được xử lý với proteinase K, hoạt tính đối kháng không được quan sát thấy trong trường hợp của vi khuẩn *B. subtilis* NN12 nhưng được duy trì trong trường hợp của *B. licheniformis* KN12. Kết quả tương tự khi đồng thời xử lý dịch nuôi cấy với proteinase K và nhiệt độ (75°C) (Hình 7B và 7C).



Hình 7: Ảnh hưởng của nhiệt độ (A) và proteinase K (B, C) lên khả năng kháng *B. cereus* của dịch nuôi cấy các chủng *B. subtilis* NN12 và *B. licheniformis* KN12. (B) dịch nuôi cấy *B. subtilis* NN12, (C) dịch nuôi cấy *B. licheniformis* KN12. (-) đối chứng, (1) dịch nuôi cấy không xử lý, (2) dịch nuôi cấy xử lý với proteinase K, (3) dịch nuôi cấy xử lý với proteinase K và 75°C.

Kết quả thu được cho thấy các hợp chất đối kháng *B. cereus* có trong dịch nuôi cấy *B. subtilis* NN12 nhạy cảm với nhiệt độ và proteinase K, thể hiện bản chất là protein, có thể là các hợp chất bacteriocin mạch peptide ngắn hoặc các enzyme ngoại bào. Ngoài ra, sự bền nhiệt và bền với protease của dịch nuôi cấy *B. licheniformis* KN12 cho thấy khả năng bảo quản cao cũng như khả năng ứng dụng của các chế phẩm từ vi khuẩn này. Bên cạnh đó, bản chất của các hợp chất đối kháng *B. cereus* có trong dịch nuôi cấy *B. licheniformis* KN12 có thể không thuộc nhóm bacteriocin mà thuộc các nhóm chất BLIS (Bacteriocin Like Inhibitory Substance), tương tự như kết quả được ghi nhận trong nghiên cứu của Sharma trên chủng *Bacillus licheniformis* IITRHR2 [18].

2. KẾT LUẬN

Việc xuất hiện nhiều vi sinh vật đề kháng kháng sinh ngày càng gia tăng và đang là một vấn đề báo động trên toàn thế giới, nhằm góp phần khai thác các chủng vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp các hợp chất kháng khuẩn để thay thế việc lạm dụng kháng sinh hiện nay, đề tài nghiên cứu này đã được tiến hành để xác định các điều kiện sinh tổng hợp các hợp chất đối kháng vi khuẩn gây bệnh *B. cereus* từ *B. subtilis* NN12 và *B. licheniformis* KN12, bao gồm nguồn nitơ, nguồn carbon, pH ban đầu của môi trường, nhiệt độ nuôi cấy. Kết quả cho thấy chủng vi khuẩn *B. subtilis* NN12 sinh tổng hợp các hợp chất đối kháng trong môi trường chứa 1,0% glucose, 0,5% peptone hoặc cao nấm men, pH môi trường 6,0 trong điều kiện nhiệt độ 33°C tại tốc độ lắc 150 vòng/phút trong thời gian 18 giờ. Trong khi đó, môi trường thích hợp cho chủng vi khuẩn *B. licheniformis* KN12 bao gồm 1,0% glucose hoặc tinh bột, 0,5% Ure, pH 5,0 trong 37°C hoặc 45°C tại tốc độ lắc 150 vòng/phút trong thời gian 18 giờ. Hoạt tính đối kháng với *B. cereus* của dịch nuôi cấy chủng *B. subtilis* NN12 bị ảnh hưởng bởi nhiệt độ cao và xử lý enzyme proteinase K, cho thấy bản chất protein của các hợp chất kháng khuẩn. Tuy nhiên, hoạt tính đối kháng của *B. licheniformis* KN12 thể hiện sự bền nhiệt và bền dưới tác động proteinase K, cho thấy tiềm năng ứng dụng của chủng vi khuẩn này.

LỜI CẢM ƠN: Nghiên cứu này được thực hiện tại phòng thí nghiệm Công nghệ Vi sinh, Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp TP. HCM. Chúng tôi xin chân thành cảm ơn Ban Giám hiệu Trường Đại học Công nghiệp TP. HCM, Ban lãnh đạo Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm đã tạo điều kiện thuận lợi cho chúng tôi thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Available from: <https://www.who.int/news/item/29-04-2019-new-report-calls-for-urgent-action-to-avert-antimicro-bial-resistance-crisis>.

- [2] Nhung, N.T., et al., *Antimicrobial Usage and Antimicrobial Resistance in Animal Production in Southeast Asia: A Review*. Antibiotics (Basel, Switzerland), 2016. **5**(4): p. 37.
- [3] Ramirez, J., et al., *Antibiotics as Major Disruptors of Gut Microbiota*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2020. **10**: p. 731.
- [4] León-Buitimea, A., et al., *The Demand for New Antibiotics: Antimicrobial Peptides, Nanoparticles, and Combinatorial Therapies as Future Strategies in Antibacterial Agent Design*. Frontiers in Microbiology, 2020. **11**: p. 1669.
- [5] Ahmad, V., et al., *Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation*. Int J Antimicrob Agents, 2017. **49**(1): p. 1-11.
- [6] Feto, N.A., *Bacillus spp. and Their Biotechnological Roles in Green Industry*, in *Bacilli and Agrobiotechnology*, M.T. Islam, et al., Editors. 2016, Springer International Publishing: Cham. p. 143-162.
- [7] Sumi, C.D., et al., *Antimicrobial peptides of the genus Bacillus: a new era for antibiotics*. Can J Microbiol, 2015. **61**(2): p. 93-103.
- [8] Caulier, S., et al., *Overview of the Antimicrobial Compounds Produced by Members of the Bacillus subtilis Group*. Front Microbiol, 2019. **10**: p. 302.
- [9] Soltani, S., et al., *Bacteriocins as a new generation of antimicrobials: toxicity aspects and regulations*. FEMS Microbiol Rev, 2021. **45**(1).
- [10] Liu, X., et al., *Properties of a Bacteriocin Produced by Bacillus subtilis EMD4 Isolated from Ganjiang (Soy Sauce)*. J Microbiol Biotechnol, 2015. **25**(9): p. 1493-501.
- [11] Singha, I.M., et al., *Identification and characterization of Fusarium sp. using ITS and RAPD causing fusarium wilt of tomato isolated from Assam, North East India*. J Genet Eng Biotechnol, 2016. **14**(1): p. 99-105.
- [12] Perumal, V., et al., *Purification and Characterization of a Bacteriocin, BacBS2, Produced by Bacillus velezensis BS2 Isolated from Meongge Jeotgal*. J Microbiol Biotechnol, 2019. **29**(7): p. 1033-1042.
- [13] Anthony, T., et al., *Influence of medium components and fermentation conditions on the production of bacteriocin(s) by Bacillus licheniformis AnBa9*. Bioresour Technol, 2009. **100**(2): p. 872-7.
- [14] Mizumoto, S. and M. Shoda, *Medium optimization of antifungal lipopeptide, iturin A, production by Bacillus subtilis in solid-state fermentation by response surface methodology*. Appl Microbiol Biotechnol, 2007. **76**(1): p. 101-8.
- [15] Lim, K.B., et al., *Isolation and Characterization of a Broad Spectrum Bacteriocin from Bacillus amyloliquefaciens RX7*. Biomed Res Int, 2016. **2016**: p. 8521476.
- [16] Khochamit, N., et al., *Antibacterial activity and genotypic-phenotypic characteristics of bacteriocin-producing Bacillus subtilis KKU213: potential as a probiotic strain*. Microbiol Res, 2015. **170**: p. 36-50.
- [17] Ouoba, L.I., et al., *Antimicrobial activity of Bacillus subtilis and Bacillus pumilus during the fermentation of African locust bean (Parkia biglobosa) for Soubala production*. J Appl Microbiol, 2007. **102**(4): p. 963-70.
- [18] Sapna Sharma, R.L.S.a.P.K., *Bacillus licheniformis IITRHR2: A novel source of antimicrobial proteinaceous food substance*. Journal of Microbiology and Antimicrobials, 2010. **2**(9): p. 127-133.
- [19] Cladera-Olivera, F., G.R. Caron, and A. Brandelli, *Bacteriocin-like substance production by Bacillus licheniformis strain P40*. Lett Appl Microbiol, 2004. **38**(4): p. 251-6.
- [20] Kayalvizhi, N. and P. Gunasekaran, *Production and characterization of a low-molecular-weight bacteriocin from Bacillus licheniformis MKU3*. Lett Appl Microbiol, 2008. **47**(6): p. 600-7.
- [21] Ansari, A., et al., *Bacteriocin (BAC-IB17): screening, isolation and production from Bacillus subtilis KIBGE IB-17*. Pak J Pharm Sci, 2012. **25**(1): p. 195-201.
- [22] Hiền, Đ.T., *Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp bacteriocin của vi khuẩn Bacillus subtilis và thử nghiệm khả năng đối kháng trên chủng Vibrio spp.* Tạp chí Đại học Thủ Dầu Một, 2018. **2**: p. 1-7.

EFFECTS OF GROWTH CONDITIONS ON ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF *Bacillus subtilis* NN12 AND *Bacillus licheniformis* KN12 AGAINST *Bacillus cereus*

NGUYEN NGOC AN, DINH THI NGOC NGAN, TRINH TIEN KIM NGAN, NGUYEN PHUC THANH, LE THI VY HIEN, VO THI CAM GIANG, NGUYEN THI DIEU HANH, PHAM TAN VIET*

Institute of Biotechnology and Food technology, Industrial University of Ho Chi Minh City

*Corresponding: phamtanviet@iuh.edu.vn

Abstract: Overuse/misuse of natural and chemical-synthesized antimicrobials has contributed to the development of resistant microorganisms. In addition, the shortage of new antimicrobials is one of the top

concerns around the world. This study, therefore, was conducted with the aim of initial exploiting potential sources of antimicrobial compounds from *Bacillus* species. The antimicrobial activity against pathogenic bacteria and the effect of culture conditions on the production of antimicrobial compounds from *Bacillus subtilis* NN12 and *Bacillus licheniformis* KN12 were investigated. The invitro antagonistic test showed that these two strains were able to strongly inhibit *B. cereus*. In addition, the effect of culture conditions on the biosynthesis of *B. cereus* antibacterial compounds of the two studied strains was identified. The results showed that the medium containing 1.0% glucose, 0.5% peptone or yeast extract, at pH 6.0, shaking rate 150rpm for 18 hours, at 33°C is suitable conditions for *B. subtilis* and the one supplemented with 1.0% glucose or starch, 0.5% urea, pH 5.0, shaking rate 150rpm for 18 hours at 37°C-45°C is the right condition for *B. licheniformis* KN12. Interestingly the antagonistic activity of *B. subtilis* culture was sensitive to high temperature and proteinase K, whereas *B. licheniformis* KN12 culture exhibited thermal stability and proteinase K resistance properties. The results obtained will be the premise for antimicrobial compound research in the near future, contributing to therapeutic methods to fight infectious diseases, the agriculture, and the food industry.

Keywords: *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*, antibacterial.

Ngày gửi bài: 29/03/2021

Ngày chấp nhận đăng: 16/07/2021