

Xây dựng phương pháp phát hiện và định lượng vi khuẩn *Bacillus subtilis* bằng kỹ thuật realtime PCR

Đặng Thị Hương^{1*}, Trần Hồng Ba, Lê Thành Long, Nguyễn Văn Cường,
Ninh Thị Hạnh, Nguyễn Thành Trung, Nguyễn Thị Xuân Hương, Lê Thị Hồng Hảo
Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia, Hà Nội, Việt Nam

(Ngày đến tòa soạn: 08/08/2022; Ngày chấp nhận đăng: 21/09/2022)

Tóm tắt

Bacillus subtilis là loài vi khuẩn được ứng dụng rộng rãi trong sản xuất probiotic. Các chủng thuộc loài này có khả năng tạo nội bào tử, chịu được điều kiện pH acid của dạ dày và nhiều chủng đã được chứng minh có khả năng sản xuất các enzyme hỗ trợ tiêu hóa thức ăn và ức chế các loại vi khuẩn gây bệnh. Trong nghiên cứu này, phương pháp phát hiện và định lượng *Bacillus subtilis* đã được xây dựng dựa trên việc nhân gen *aprE* bằng kỹ thuật realtime PCR. Gen *aprE* mã hóa tiền chất của độc tố subtilisin và là một gen đặc hiệu, có tính bảo tồn cao của *B. subtilis*. Phương pháp được đánh giá có độ nhạy cao với giới hạn phát hiện là 10^2 CFU/mL, giới hạn định lượng là 10^2 CFU/mL, độ đặc hiệu và độ chính xác đều đạt 100%. Các đường cong chuẩn được xây dựng bằng cách sử dụng chu kỳ ngưỡng (Ct) so với mật độ vi khuẩn *B. subtilis* thể hiện tương quan tuyến tính ($R^2 = 1$, độ dốc = -3,584).

Từ khoá: realtime PCR, *Bacillus subtilis*, *aprE*, probiotic.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bacillus subtilis, một loại vi khuẩn probiotic sinh bào tử, thường được tìm thấy trong đất và đường tiêu hóa của một số động vật có vú. Vi khuẩn này có thể giúp duy trì sự cân bằng thuận lợi của hệ vi sinh vật trong đường tiêu hóa. *B. subtilis* tạo ra chất nền ngoại bào có tác dụng bảo vệ và có lợi với các vi khuẩn probiotic khác [1]. Việc sử dụng các vi khuẩn thuộc loài *Bacillus* và đặc biệt là *B. subtilis* làm chế phẩm sinh học đã thu hút được sự quan tâm lớn của các nhà khoa học. Các chủng *B. subtilis* đã được báo cáo là có hiệu quả trong việc ngăn ngừa nhiễm trùng đường hô hấp và rối loạn tiêu hóa, khắc phục các triệu chứng liên quan đến hội chứng ruột kích thích [2-3]. Sự hiện diện của *B. subtilis* giúp duy trì hệ vi sinh vật cân bằng thuận lợi trong đường ruột và tăng cường khả năng sinh trưởng và tồn tại của vi khuẩn *Lactobacillus* và chủng probiotic khác [4]. Những đặc tính probiotic này của *B. subtilis* được cho là có liên quan đến khả năng kích thích hệ thống miễn dịch [5] và sản xuất chất kháng khuẩn [6-7], hoặc ức chế vi sinh vật gây bệnh [8]. *B. subtilis* đã được chứng minh có khả năng tạo ra nhiều chất kháng vi khuẩn, trong đó, các chất thuộc nhóm

* Điện thoại: 0988359487 Email: danghuong243@gmail.com

lipopeptide như iturin và fengycin có hoạt tính tương đối tốt. Ngoài ra, chúng còn sinh nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học rất đa dạng như kháng nấm, kháng virus và ức chế khối u [9]. Chúng có thể hoạt động theo các cơ chế khác nhau, như phá vỡ cấu trúc của các vi sinh vật khác hay làm giảm sức căng bề mặt của màng sinh học [10]. Do chi *Bacillus* có số lượng loài lớn và các mô tả thường không đầy đủ về một số loài mới được báo cáo nên việc định danh còn gặp nhiều khó khăn. Việc phát hiện và định lượng nhanh các loài vi sinh vật là rất quan trọng trong đảm bảo an toàn thực phẩm nhằm kiểm tra nhanh và chính xác số lượng vi khuẩn. Trong thập kỷ qua, nhiều nhà nghiên cứu đã phát triển phương pháp PCR thời gian thực (realtime PCR) sử dụng thuốc nhuộm SYBR Green, để phát hiện và định lượng vi khuẩn với độ nhạy cao, đơn giản và ít tốn kém hơn [11]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi xây dựng phương pháp realtime PCR nhân gen *aprE*, gen đích mã hóa tiền chất độc tố subtilisin và là gen đặc hiệu, có tính bảo tồn cao của *B. subtilis* nhằm phát hiện và định lượng nhanh *B. subtilis*.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Chủng vi sinh vật

Các chủng vi sinh vật sử dụng trong nghiên cứu bao gồm:

- Các chủng chuẩn được cung cấp từ ATCC bao gồm: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis ATCC 13076.

- Các chủng phân lập và được định danh bằng kỹ thuật MALDI-TOF đang được lưu giữ tại Viện kiểm nghiệm An toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia bao gồm: *Bacillus clausii* (714), *Bacillus fastidiosus* (404), *Bacillus amyloliquefaciens* VTCC 11041, *Bacillus coagulans* (669), *Bacillus pamilus* (571), *Bacillus licheniformis* (402), *B. subtilis* (mã ký hiệu 400, 401, 407, 434, 435, 484, 509, 515, 548.)

2.2. Hóa chất và thiết bị

2.2.1. Hóa chất chính

Proteinase K 20 mg/mL (Sigma), Luminaris HiGreen qPCR master mix, 2X (Thermo), kit tách ADN Gene JET genomic ADN purification (Thermo), Primer (IDT), dải ống real time PCR (Thermo), TSA / MYP agar (BD), Peptone water (BD), Primer (IDT).

2.2.2. Thiết bị

Real time PCR QuantStudio 6 Flex (Thermo), máy đo nồng độ DNA/protein Nanodrop 1000 (Thermo), máy li tâm lạnh Mikro 200 (Hettich), máy phá vỡ tế bào (Labnet), tủ âm (Đức), máy lắc xoáy vortex (IKA), spindown (Gene Reach) và các thiết bị phụ trợ khác.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp nuôi cấy truyền thống: Pha loãng thập phân ở các dải nồng độ thích hợp từ huyền phù ban đầu và hút pipet cho vào mỗi đĩa môi trường TSA 0,1 mL mẫu thử. Dùng que dàn mẫu, dàn đều dịch lỏng khắp bề mặt thạch càng nhanh càng tốt. Để các đĩa có độ ẩm nắp khoảng 15 phút ở nhiệt độ phòng lật ngược đĩa. Ủ ở tủ ẩm có nhiệt độ 30°C từ 18-24 h. Nếu không thấy các khuẩn lạc ủ thêm 24 h nữa. Đếm khuẩn lạc và tính kết quả.

Phương pháp tách chiết DNA: sinh khối vi khuẩn được đồng nhất, tách chiết theo kit tách ADN Gene JET genomic ADN purification (Thermo). Dung dịch sau tách chiết có mật độ quang OD₂₆₀ từ 1,8 - 2,0 được sử dụng để phân tích realtime PCR.

Phương pháp realtime PCR khuếch đại gen đích:

Primer được thiết kế dựa trên trình tự gen *aprE* theo Sadeghi và cộng sự [11]. Trình tự môi được trình bày trong Bảng 1 và thành phần phản ứng và chu trình nhiệt được trình bày ở Bảng 2

Bảng 1. Trình tự cặp môi đặc hiệu nhân vào gen *aprE*

| <i>Trình tự môi</i> | <i>Kích thước sản phẩm</i> | <i>Gen đích</i> | <i>Tài liệu tham khảo</i> |
|--|----------------------------|-----------------|---------------------------|
| Bs F: 5'-ACCATTGCGGTAGGTGCG-3' Bs R: 5'-GCGTTTGTCCAAGTCGGG-3' | 212 bp. | <i>aprE</i> | [11] |

Bảng 2. Thành phần phản ứng và quy trình nhiệt

| | | |
|----------------------------|---------------------------------------|----------------|
| <i>Thành phần phản ứng</i> | Luminaris HiGreen qPCR master mix, 2X | 10 µL |
| | ADN khuôn (100 - 200 ng) | 1,0 µL |
| | Môi xuôi (10µM) | 3 µL |
| | Môi ngược (10µM) | 3 µL |
| | Thêm nước đến | 20 µL |
| <i>Chu trình nhiệt</i> | | |
| Bước 1 | Biến tính ban đầu | 10 phút ở 95°C |
| Bước 2 | 40 chu kì tiếp theo gồm: | |
| | Biến tính | 30 giây ở 95°C |
| | Gắn môi | 30 giây ở 55°C |
| | Kéo dài | 45 giây ở 72°C |
| Bước 3 | Phân tích đường cong nóng chảy | 65°C - 95°C |

Thẩm định phương pháp: Các thông số bao gồm giới hạn phát hiện (LOD), độ chính xác (accuracy-AC, ≥ 90%), độ đặc hiệu (Specificity- SP, ≥ 90%), độ nhạy (sensitivity-SE, ≥ 90%), giới hạn định lượng (LOQ), độ lặp lại (≤ 25), độ tái lập (≤ 35) được xác định dựa trên các công thức sau [12-14]:

$$AC = \frac{TP + TN}{N} \times 100$$

$$SE = \frac{TP}{TP + FN} \times 100$$

$$SP = \frac{TN}{TN + FP} \times 100$$

Trong đó: AC (Accuracy): độ chính xác
SE (Sensitivity): độ nhạy
SP (Specificity): độ đặc hiệu
TP (True positive): dương tính đúng
TN (True negative): âm tính đúng
FP (False positive): dương tính giả
FN (False negative): âm tính giả
N: tổng số mẫu phân tích

Độ lặp lại đánh giá thông qua độ lệch chuẩn tương đối (RSD_r), tính theo công thức:

$$x_i = \frac{\log a_i + \log b_i}{2}$$
$$RSD_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [(\log a_i - \log b_i) / x_i]^2}{2n}}$$

Trong đó: a_i, b_i : Các kết quả phân tích song song của kiểm nghiệm viên.
 x_i : Kết quả trung bình của hai lần thí nghiệm song song.
 n : Số kết quả phân tích song song của kiểm nghiệm viên.

Độ tái lập nội bộ phòng thử nghiệm đánh giá thông qua độ lệch chuẩn tương đối (RSD_R) theo công thức:

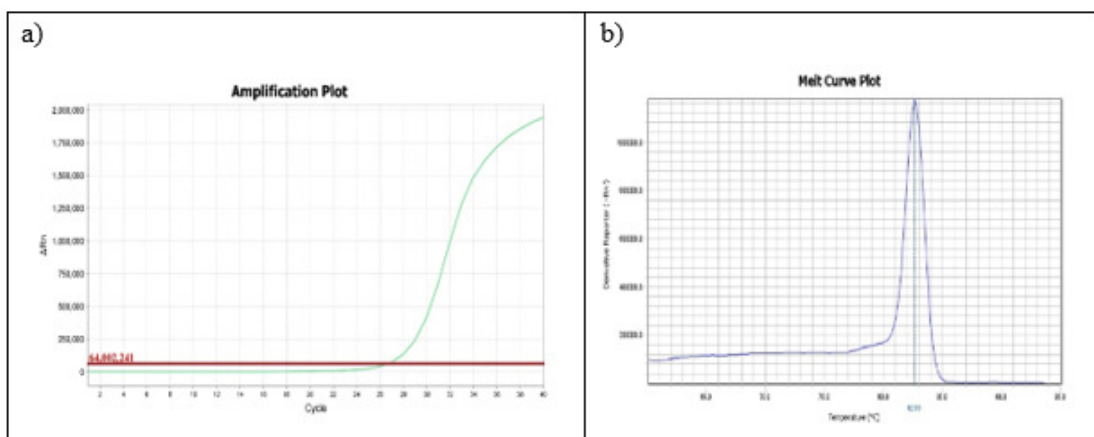
$$x_i = \frac{\log a_i + \log b_i}{2}$$
$$RSD_R = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [(\log a_i - \log b_i) / x_i]^2}{2n}}$$

Trong đó: a_i, b_i : Các kết quả phân tích song song của cả hai kiểm nghiệm viên A và B.
 x_i : Kết quả trung bình của hai lần phân tích song song.
 n : Số kết quả phân tích song song của cả hai kiểm nghiệm viên A và B.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1 Kiểm tra sự khuếch đại cặp mồi *B.subtilis*

Chủng chuẩn *B. subtilis* ATCC được nuôi cấy trên môi trường TSA ở 30°C, 24h. Khuẩn lạc điển hình có màu trắng đục, hình dạng dẹt, bề mặt nhám và khô, viền nhẵn, đường kính từ 2-4 mm. Chủng *B. subtilis* ATCC 6633 được tách chiết theo mục 2.3 và DNA của chủng được kiểm tra sự khuếch đại cặp mồi trên. Kết quả được thể hiện ở Hình 1.

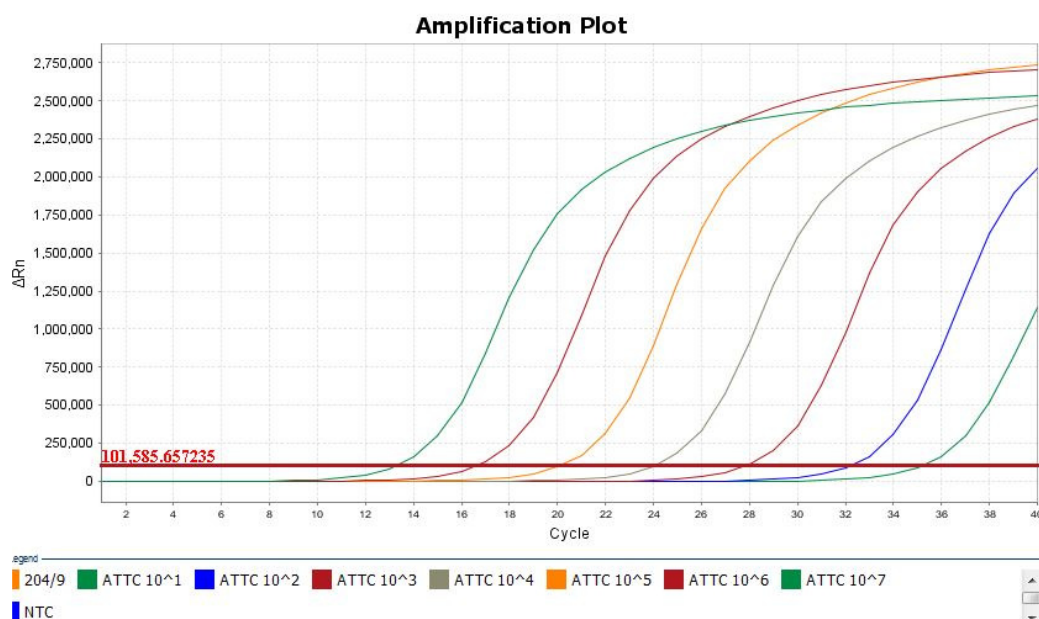


Hình 1. Đường khuếch đại điển hình và nhiệt độ nóng chảy của chủng chuẩn *B. subtilis* ATCC 6633.

Dựa vào kết quả đường cong khuếch đại huỳnh quang chủng chuẩn *B. subtilis* có dạng của một đường cong điển hình với giá trị $C_t \approx 27$ (Hình 1a). Kết quả phân tích nhiệt độ nóng chảy được thể hiện ở (Hình 1b) cho thấy T_m của sản phẩm phản ứng là $82,6^\circ\text{C}$ tương tự như nghiên cứu của Alieza Sadeghi và cộng sự năm 2014 với $T_m = 82,2^\circ\text{C}$ [11].

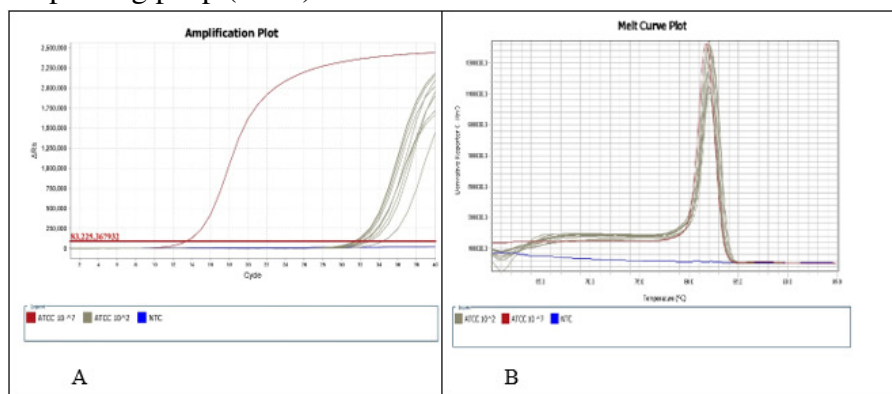
3.2. Giới hạn phát hiện của phương pháp (LOD)

LOD của phương pháp là mật độ vi sinh vật trong mẫu thấp nhất, tại đó có tối thiểu 90% mẫu cho kết quả dương tính. Để xác định LOD, DNA từ 1mL mẫu có mật độ *B. subtilis* khác nhau: 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 CFU/mL được dùng làm khuôn trong phản ứng realtime PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu nhân gen *aprE*. Kết quả thu được thể hiện trong Hình 2.



Hình 2. Kết quả khảo sát giới hạn phát hiện của phương pháp với các mẫu có mật độ *B. subtilis* khác nhau ($10^1 - 10^7$ CFU/mL)

Kết quả từ Hình 2 cho thấy, tại mật độ vi khuẩn 10^1 CFU/mL ngưỡng chu kỳ Ct xấp xỉ 36. Vì vậy mật độ vi khuẩn 10^1 CFU/mL được dự đoán là mật độ thấp nhất mà phương pháp có thể phát hiện được vi sinh vật đích. Để xác định giới hạn phát hiện, phản ứng được lặp lại 10 lần tại mật độ vi khuẩn là 10^1 CFU/mL. Tuy nhiên số phản ứng phát hiện được vi sinh vật đích tại mật độ vi khuẩn 10^1 CFU/mL không đạt $\geq 90\%$. Vì thế, thí nghiệm được lặp lại 10 lần với mật độ vi khuẩn 10^2 CFU/mL. Kết quả thu được trong Hình 3. Kết quả ở Hình 3 cho thấy, tỉ lệ % dương tính tại mật độ vi khuẩn 10^2 CFU/ mL là 100%. Do vậy, giới hạn phát hiện của phương pháp (LOD) là: 10^2 CFU/ mL.



Hình 3. Đường khuếch đại điển hình (A) và nhiệt độ nóng chảy (B) trong 10 lần thí nghiệm với mẫu chứa 10^2 CFU/mL vi khuẩn *B. Subtilis*

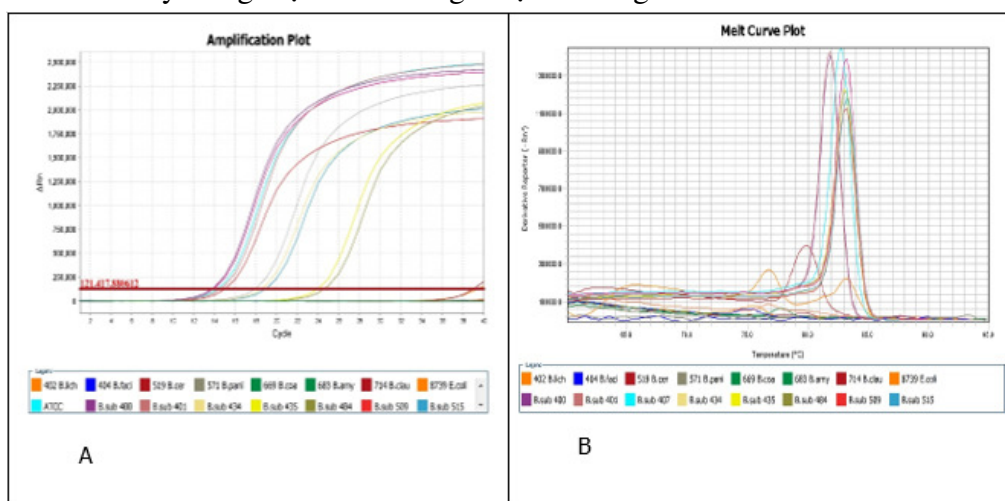
3.3. Độ chính xác (AC), độ đặc hiệu (SP) và độ nhạy (SE) của phương pháp

Phản ứng realtime PCR với cặp mồi nhân gen đích *aprE* được thực hiện với 02 nhóm mẫu như sau: nhóm 1 bao gồm các chủng *B. subtilis* (chủng *B. subtilis* phân lập từ 9 nền mẫu khác nhau đã được định danh bằng kỹ thuật MALDI-TOF hoặc giải trình tự gen và 1 chủng chuẩn ATCC); nhóm 2 bao gồm các chủng vi khuẩn không thuộc loài *B. subtilis* bao gồm: *Bacillus amyloliquefaciens* (VTCC 11041), *Bacillus cereus* (ATCC 10876), *Bacillus licheniformis* (402), *Bacillus pamilus* (571), *Bacillus clausii* (714), *Bacillus fastidiosus* (404), *Bacillus coagulans* (669), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076) và *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213).

Đường khuếch đại và đường cong nóng chảy của 2 nhóm mẫu trên được thể hiện trong Hình 4. Giá trị Ct được thể hiện trong Bảng 4.

Kết quả trong Hình 4 và Bảng 4 cho thấy: đối với nhóm chủng *B. subtilis*: 10 mẫu khác nhau chứa *B. subtilis* đều có đường cong khuếch đại điển hình và nhiệt độ nóng chảy (T_m) của các mẫu là $82,3 \pm 0,60^\circ\text{C}$. Giá trị T_m này tương tự như nghiên cứu của Alieza Sadeghi và cộng sự (2014) với $T_m = 82,2$ [11]. Trong khi đó, đối với nhóm khác loài *B. subtilis*: 8/10 mẫu không có đường cong khuếch đại điển hình (Hình 4a), 2/10 mẫu (*B. clausii* và *E. coli*) có Ct cao hơn nhiều (> 38) so với giá trị Ct ở mẫu *B. subtilis* (Bảng 4). Đồng thời, nhiệt độ nóng chảy của các loài không phải *B. subtilis* không trùng với nhiệt độ nóng chảy của *B. subtilis* cho thấy sản phẩm khuếch đại là không đặc hiệu (Hình 4b). Từ đó cho thấy phương pháp realtime PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu nhân gen *aprE* có thể phân biệt được các loài thuộc chi *Bacillus*.

Độ chính xác (AC), độ đặc hiệu (SP) và độ nhạy (SE) cũng đã được xác định dựa trên công thức trình bày trong mục 2.3 và có giá trị đều bằng 100%.



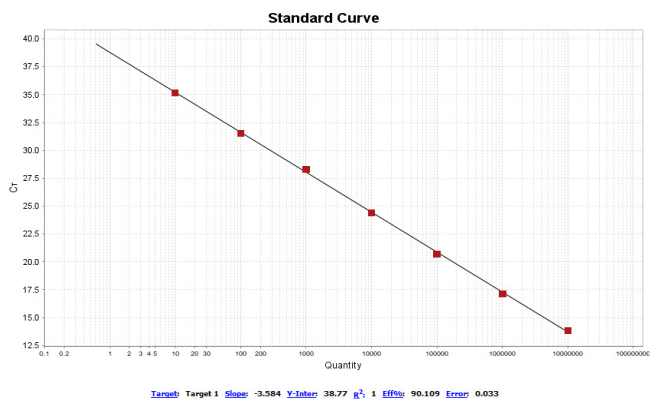
Hình 4. Đường khuếch đại điện hình (A) và nhiệt độ nóng chảy (B) của 2 nhóm mẫu

Bảng 4. Giá trị chu kỳ ngưỡng (Ct) của 2 nhóm mẫu nhóm 1 và nhóm 2

| STT | Tên chủng | Ngưỡng chu kỳ Ct |
|---------------|--|------------------|
| Nhóm 1 | | |
| 1 | <i>B. subtilis</i> (400) | 13,74 |
| 2 | <i>B. subtilis</i> (401) | 14,55 |
| 3 | <i>B. subtilis</i> (407) | 17,88 |
| 4 | <i>B. subtilis</i> (434) | 18,05 |
| 5 | <i>B. subtilis</i> (435) | 23,97 |
| 6 | <i>B. subtilis</i> (484) | 24,59 |
| 7 | <i>B. subtilis</i> (509) | 14,98 |
| 8 | <i>B. subtilis</i> (515) | 18,92 |
| 9 | <i>B. subtilis</i> (548) | 13,86 |
| 10 | <i>B. subtilis</i> (ATCC) | 14,27 |
| Nhóm 2 | | |
| 11 | <i>B. amyloliquefaciens</i> (VTCC 11041) | NA |
| 12 | <i>B. cereus</i> (ATCC 10876) | NA |
| 13 | <i>B. licheniformis</i> (402) | NA |
| 14 | <i>B. pamlus</i> (571) | NA |
| 15 | <i>B. clausii</i> (714) | 38,94 |
| 16 | <i>B. fastidiosus</i> (404) | NA |
| 17 | <i>B. coagulans</i> (669) | NA |
| 18 | <i>E. coli</i> (ATCC) | 39,27 |
| 19 | <i>Salmonella</i> (ATCC 13076) | NA |
| 20 | <i>S. aureus</i> (ATCC 29213) | NA |

3.4 Xây dựng đường chuẩn

Phương pháp định lượng được xác định dựa trên sự liên hệ tuyến tính giữa mật độ vi khuẩn trong mẫu và giá trị Ct tương ứng. Trên cơ sở phần mềm của thiết bị, đường chuẩn được xây dựng như trong Hình 5.

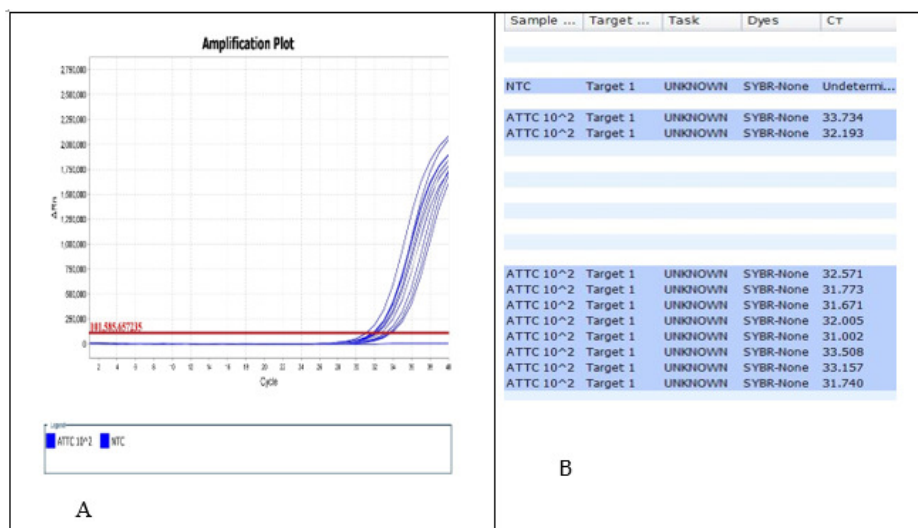


Hình 5. Đường chuẩn *B.subtilis* ở các nồng độ pha loãng từ 10¹ đến 10⁷

Kết quả cho thấy, đường chuẩn có tương quan tuyến tính cao với giá trị R² đạt 1, độ dốc = -3,584, hiệu quả khuếch đại E = 90,1%. Như vậy đường chuẩn của phản ứng real time PCR trong nghiên cứu này có kết quả đáng tin cậy. Đường biểu diễn chuẩn được biểu thị bằng một hàm số biểu thị mối tương quan tuyến tính giữa chu kỳ ngưỡng (Y = Ct) với log₁₀ của số lượng bản DNA đích ban đầu có trong ống phản ứng (X = log₁₀ Sq). Hàm số đó là: Y = -3,584X + 38,77. Từ hàm số này, trị số DNA đích ban đầu Sq (Starting quantity) sử dụng công thức: Sq = 10[(Ct - 38,77)/-3,584]

3.4. Giới hạn định lượng (LOQ)

Từ nồng độ thấp nhất mà phương pháp có thể phát hiện được, giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp, độ lặp lại và độ tái lập của phương pháp đã được xác định bằng cách lặp lại thí nghiệm 10 lần với mẫu có mật độ vi khuẩn là 10² (CFU/mL) (Hình 6). Kết quả cho thấy trong 10 lần lặp lại, phản ứng đạt 100% dương tính. Do đó, có thể kết luận rằng giới hạn định lượng của phương pháp là 10² CFU/mL.



Hình 6. Đường cong khuếch đại (hình A) và giá trị chu kỳ ngưỡng Ct (hình B) của 10 lần lặp lại phản ứng realtime PCR với các mẫu *B. subtilis* có mật độ 10² CFU/mL

3.5. Độ lặp lại (RSD_F), độ tái lập (RSD_R) của phương pháp

Để tiến hành xác định độ lặp lại, các thí nghiệm được tiến hành song song 2 lần với 5 lần/mẫu. Xác định độ tái lập mỗi kiểm nghiệm viên tiến hành thực hiện lặp lại 10 lần/mẫu. Kết quả thu được thể hiện trong Bảng 5.

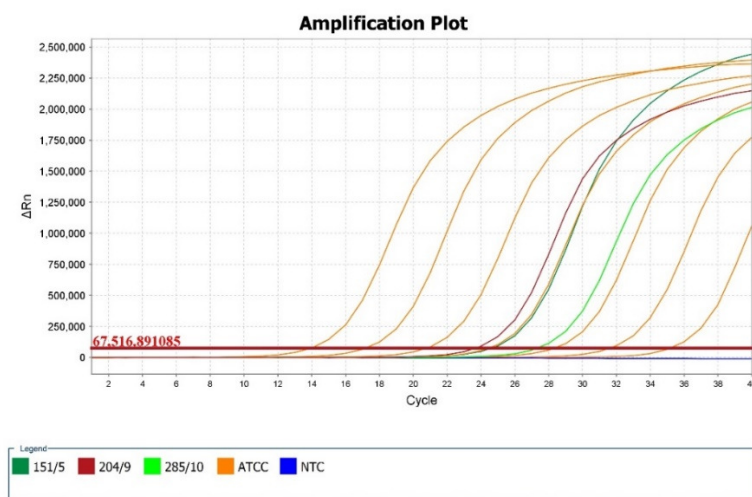
Bảng 5. Giá trị Ct 10 lần lặp lại tại nồng độ vi khuẩn 10^2

| Kiểm nghiệm viên KNV1 | | Kiểm nghiệm viên KNV2 | |
|-----------------------|-----------|-----------------------|-----------|
| Lần 1(ai) | Lần 2(bj) | Lần 1(ai) | Lần 2(bj) |
| 31,35 | 33,73 | 33,73 | 32,00 |
| 34,36 | 32,19 | 32,19 | 31,00 |
| 31,55 | 32,57 | 32,57 | 33,50 |
| 32,63 | 31,77 | 31,77 | 33,15 |
| 31,40 | 31,67 | 31,67 | 31,74 |

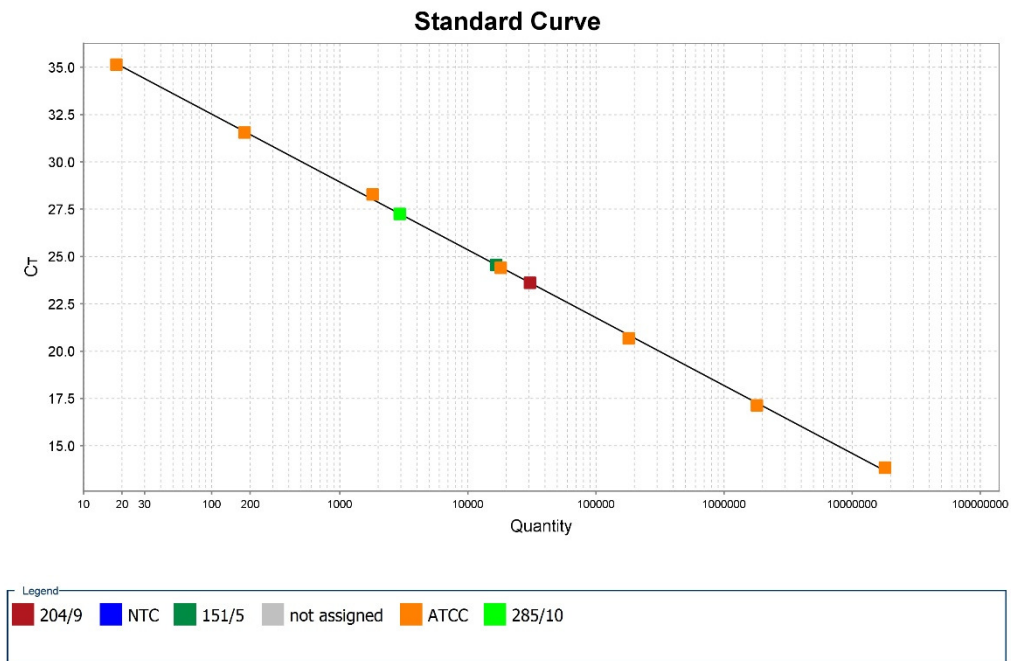
Từ kết quả lặp lại giá trị Ct của hai kiểm nghiệm viên ở Bảng 5 và áp dụng công thức xác định độ lặp lại, độ tái lập trong mục 2.3 có thể tính toán được: độ tái lập của phương pháp của hai kiểm nghiệm viên là 0,0053 và 0,0075 thỏa mãn yêu cầu $\leq 0,25$ nên có độ lệch chuẩn đạt yêu cầu, độ ổn định của phương pháp tốt. Độ tái lập của phương pháp là 0,00898 < 0,35 có độ chụm đạt yêu cầu.

3.6 Phân tích thực tế

Kiểm tra mật độ vi khuẩn *B.subtilis* các mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe, thực phẩm bổ sung được bổ sung vi khuẩn *B. subtilis* được thu thập ngẫu nhiên trên thị trường Hà Nội được mã hóa tên như sau: 204/9; 285/10; 151/5. Mẫu được kiểm tra song song bằng cả phương pháp nuôi cấy truyền thống và phương pháp nghiên cứu. Cả 3 mẫu đều được nuôi cấy truyền thống và kết quả mật độ *B. subtilis* của ba mẫu lần lượt là $4,0 \times 10^7$; $1,3 \times 10^8$; $1,7 \times 10^8$ (CFU/mL). Đồng thời, mẫu cũng được tách chiết DNA và pha loãng lần lượt 100 lần, 10000 lần, 1000 lần. Kết quả được thể hiện như Hình 7 và Hình 8.



Hình 7. Đường cong khuếch đại chủng *B.subtilis* ở các nồng độ pha loãng từ 10^1 đến 10^7 và các mẫu thực tế



Hình 8. Đường chuẩn *B.subtilis* ở các nồng độ pha loãng từ 10^1 đến 10^7 và các mẫu thực tế

Kết quả Hình 7, Hình 8 và cơ sở tính toán từ phần mềm trên máy kết quả của mẫu 204/9 là $3,1 \times 10^5$ (CFU/mL), mẫu 285/10 là $2,9 \times 10^4$ (CFU/mL) và mẫu 151/5 là $1,7 \times 10^5$ (CFU/mL). Điều này cho ta thấy kết quả của hai phương pháp tương đồng nhau.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng thành công quy trình phát hiện và định lượng *B.subtilis* bằng kỹ thuật realtime PCR. Phương pháp cho độ nhạy tốt với giới hạn phát hiện 10^2 (CFU/mL), giới hạn định lượng 10^2 (CFU/mL), độ đặc hiệu, độ chính xác đều đạt 100%. Các đường cong chuẩn được xây dựng bằng cách sử dụng chu kỳ ngưỡng (Ct) so với mật độ vi khuẩn *B.subtilis* thể hiện tương quan tuyến tính ($R^2 = 1$, độ dốc = -3,584). Độ lặp, độ tái lập và độ lệch chuẩn tái lập của phương pháp đạt được tương ứng là: 0,0053; 0,0075; 0,00898, cho thấy phương pháp có độ chụm và độ đúng tốt.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. R. D. M. T. S. Batista, J. D. Paccetz,; W. B. Luiz, E. L. Ferreira, R. C. Cavalcante, R. C. Ferreira, and L. C. Ferreira, , "Gut Adhesive Bacillus subtilis Spores as a Platform for Mucosal Delivery of Antigens," *Infection and Immunity*, vol. 82, pp. 1414-1423, 2014.
- [2]. S. M. R. Lefevre, G. Ripert, B. Housez, M. Cazaubiel, C. Maudet, P. Jüsten, P. Marteau, and M. C. Urdaci, "Probiotic strain Bacillus subtilis CU1 stimulates immune system of elderly during common infectious disease period: a randomized, double-blind placebo-controlled study," *Immunity & Ageing*, vol. 12, p. 24, 2015.

- [3]. S. M. M. R. Lefevre, M. Denayrolles, G. Ripert, T. Desfougères, A. R. Lobach, R. Simon,; F. Pélerin, and M. C. P. U. Jüsten, "Safety assessment of *Bacillus subtilis* CU1 for use as a probiotic in humans.," *Regulatory Toxicology and Pharmacology: RTP*, vol. 83, pp. 54-65, 2017.
- [4]. A. T. A. Hosoi, K. Kiuchi, and S. Kaminogawa, "Improved growth and viability of lactobacilli in the presence of *Bacillus subtilis* (natto), catalase, or subtilisin," *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 46, pp. 892-897, 2000.
- [5]. S. M. M. R. Lefevre, G. Ripert, B. Housez, M. Cazaubiel, C. Maudet, P. Jüsten, P. Marteau, and M. C. Urdaci, "Probiotic strain *Bacillus subtilis* CU1 stimulates immune system of elderly during common infectious disease period: a randomized, double-blind placebo-controlled study," *Immunity & Ageing*, vol. 12, p. 24, 2015.
- [6]. I. M. C. P. Urdaci, "Antimicrobial activity of *Bacillus* probiotics.," *In Bacterial Spore Formers-Probiotics and Emerging Applications; Horizon Bioscience: Norfolk, UK*, pp. 171-182, 2004.
- [7]. S. N. S. Khochamit, P. Sukon, W. Siripornadulsil, "Antibacterial activity and genotypic-phenotypic characteristics of bacteriocin-producing *Bacillus subtilis* KKU213: Potential as a probiotic strain," *Microbiological Research*, vol. 170, pp. 36-50, 2015.
- [8]. Y. P. Z. Piewngam, T. H. Nguyen, S. W. Dickey, H. S. Joo, A. E. Villaruz, J. Chiou, K. A. Glose, and R. L. E. L. H. Fisher, et al., "Pathogen elimination by probiotic *Bacillus* via signalling interference," *Nature*, vol. 562, pp. 532, 2018.
- [9]. L. H. Y. Zhao, X. Xu, C. Jiang, J. Shi, Y. Zhang, L. Liu, S. Lei, D. Shao, and Q. Huang, "Potential of *Bacillus subtilis* lipopeptides in anti-cancer I: induction of apoptosis and paraptosis and inhibition of autophagy in K562 cells," *AMB Express*, vol. 8, p. 78, 2018.
- [10]. S. M. S. K. Marcial-Coba, and D. S. Nielsen, "Low-moisture food matrices as probiotic carriers," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 366, 2019.
- [11]. S. A. M. Alireza Sadeghi, A. R. Bahrami, B. Sadeghi, and M. M. Matin, "Designing a SYBR Green Absolute Real time PCR Assay for Specific Detection and Quantification of *Bacillus subtilis* in Dough Used for Bread Making," *Journal of Cell and Molecular Research*, vol. 6, pp. 84-93, 2014.
- [12]. T. C. Son, *Method validation in chemical and microbiological analysis*, 2010.
- [13]. Accreditation Office, *Additional requirements for accreditation of biofield laboratories*, 2016.
- [14]. C. A. Commission, "Guidelines on performance criteria and validation of methods for detection, identification and quantification of specific DNA sequences and specific proteins in foods," pp. 74, 2010.

New realtime PCR method development for detection and quantification of *Bacillus subtilis*

Dang Thi Huong, Tran Hong Ba, Le Thanh Long, Nguyen Van Cuong, Ninh Thi Hanh, Nguyen Thanh Trung, Le Thi Hong Hao, Nguyen Thi Xuan Huong
National Institute for Food Control, Hanoi, Vietnam

Abstract

Bacillus subtilis is a widely used bacterial strain in probiotic production. The strains belong to this species are endosporegenic, tolerant to acidic pH conditions in the stomach, and many have been shown to produce enzymes that aid in food digestion and inhibit pathogenic microorganisms. In this study, a detection and quantification method was developed based on amplification of *aprE* gene utilising realtime PCR. The *aprE* target gene encodes subtilisin toxin precursor and is a highly conservative and specific gene of *B. subtilis*. The method yielded high sensitivity with LOD is 10^2 (CFU/mL), LOQ is 10^2 (CFU/mL), specificity, and accuracy are both 100%. The preparatory tools were constructed using cycle threshold (Ct) compare with *B. subtilis* concentration, which showed linear correlation ($R^2 = 1$, slope = - 3.584)

Keywords: *realtime PCR, Bacillus subtilis, aprE, probiotic*