



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**

(11)



2-0002651

(51) C12N 1/20; C12N 1/00
2020.01

(13) **Y**

(21) 2-2021-00113

(22) 04/04/2019

(67) 1-2019-01683

(45) 25/07/2021 400

(43) 25/06/2019 375A

(73) Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)
18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

(72) Hoàng Phương Hà (VN); Lê Thị Nhi Công (VN); Cung Thị Ngọc Mai (VN); Đỗ Thị Liên (VN).

(54) CHŨNG VI KHUẨN BACILLUS SUBTILIS ST44 THUẦN KHIẾT VỀ MẶT SINH HỌC,
PHÂN LẬP ĐƯỢC TỪ RUỘT TÔM, CÓ ĐẶC TÍNH PROBIOTIC

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* ST44 thuần khiết về mặt sinh học, phân lập được từ ruột tôm trong đầm nuôi tôm nước lợ ở Sóc Trăng, Việt Nam. Chủng vi khuẩn này được đăng ký trên GenBank với mã số LC425345 và có các đặc tính probiotic như: i) có khả năng tạo màng sinh học làm tăng khả năng bám dính vào thành ruột vật chủ ở các điều kiện: nhiệt độ trong khoảng 15-45 °C; độ pH trong khoảng 2-10; nồng độ muối của nước biển là 40 ‰; ii) có khả năng tạo màng sinh học ở nồng độ dịch mật đến 2% trong 2 ngày; iii) có khả năng sinh các enzym tiêu hóa α -amylaza, xenlulaza, proteaza hỗ trợ tiêu hóa và tăng sức đề kháng; và iv) có khả năng sinh bacterioxin kháng các loài vi sinh vật gây bệnh *Vibrio parahaemolyticus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, và *Escherichia coli*.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* ST44 thuần khiết về mặt sinh học, có các đặc tính probiotic, phù hợp làm chế phẩm probiotic bổ sung vào thức ăn nuôi trồng thủy sản, gia súc, gia cầm. Chủng vi khuẩn này được phân lập từ ruột tôm trong đầm nuôi tôm nước lợ của Việt Nam.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* có một số vai trò tích cực giống như một số vi sinh vật có lợi khác như khả năng tạo màng sinh học (Morikawa *et al.*, 2006), sản sinh các hoạt chất sinh học như bacterioxin để kháng lại các vi sinh vật gây bệnh, ngoài ra chúng có khả năng sinh các enzym tiêu hóa như enzym amylaza, proteaza, xenlulaza tăng cường chuyển hóa thức ăn, kích thích sinh trưởng cho động vật nuôi, tôm, làm tăng khả năng miễn dịch của cơ thể. Nhóm các vi khuẩn này sinh sống đa dạng nhưng phổ biến trong đất. Đặc trưng của vi khuẩn này là có khả năng sinh bào tử nên nó có thể tồn tại và chống chịu với các điều kiện khắc nghiệt của môi trường (độ pH axit, nhiệt độ cao...), khi gặp điều kiện thuận lợi bào tử sẽ chuyển thành tế bào sinh dưỡng và thực hiện các quá trình trao đổi chất bình thường. Rengpipat và cộng sự (2000) chỉ ra rằng, việc sử dụng các sản phẩm có chứa vi khuẩn *Bacillus* sp. sẽ kích hoạt hệ miễn dịch tế bào và miễn dịch dịch thể ở tôm sú. Sử dụng các chủng vi khuẩn này khi lên men khô dầu đậu nành còn làm giảm chất ức chế trypsin, tăng giá trị dinh dưỡng của khô dầu đậu nành (Teng *et al.*, 2012). Đây là các tính chất quan trọng của các lợi khuẩn và rất cần thiết đối với cơ thể vật chủ nên được xem là một trong những tiêu chí ban đầu trong sàng lọc, tuyển chọn các chủng vi sinh vật probiotic.

Tài liệu WO 2019/038153 A1 đã đề cập đến chủng *Bacillus subtilis* có khả năng sinh một số enzym xenlulaza, proteaza, catalaza và superoxit dismutaza làm tăng khả năng chuyển hóa thức ăn của gia cầm, gia súc, đồng thời kích thích khả năng miễn dịch nên cũng làm tăng năng suất của vật nuôi. Chủng vi khuẩn này có thể sinh trưởng được trong môi trường chứa 0,3 % dịch mật lợn và có khả năng tạo màng sinh học trên môi trường LB-Kelly hoặc TSBYE trong điều kiện hiếu khí.

Theo Gilliland và cộng sự (1984), nồng độ muối mật 0,3 % được xem là nồng độ quyết định để sàng lọc các chủng vi sinh vật có khả năng chống chịu muối mật. Nghiên cứu của

Kumura và cộng sự (2004) cũng cho thấy, khi thử nghiệm một số chủng nấm men sử dụng làm probiotic sinh trưởng trong môi trường nuôi chứa 0,3 - 0,5 % axit cholic – là axit đặc trưng trong dịch mật thì chúng vẫn sinh trưởng bình thường.

Do đó, vẫn có nhu cầu tìm kiếm được chủng vi khuẩn *Bacillus* phân lập từ nguồn nước mà có thể được sử dụng làm probiotic để bổ sung vào thức ăn cho động vật thủy hải sản, gia cầm, gia súc.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đề xuất chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* ST44 thuần khiết về mặt sinh học phân lập được từ ruột tôm trong đầm nuôi tôm nước lợ ở Sóc Trăng, Việt Nam. Chủng vi khuẩn này có trình tự gen 16S rARN với kích thước 1500 bp như nêu trong SEQ ID NO:1 và được đăng ký trên GenBank với mã số LC425345, trong đó chủng vi khuẩn này có các đặc tính probiotic sau:

- Có khả năng tạo màng sinh học làm tăng khả năng bám dính vào thành ruột vật chủ trong điều kiện nuôi cấy trong 2 ngày: ở nhiệt độ trong khoảng 15-45 °C, tốt nhất là trong khoảng 30-37 °C; độ pH trong khoảng 2-10, tốt nhất là từ 6-8; nồng độ muối của nước biển là 40 ‰; hoặc ở nồng độ dịch mật đến 2 %;

- Có khả năng sinh các enzym α -amylaza, xenlulaza, proteaza hỗ trợ tiêu hóa; và

- Có khả năng sinh bacterioxin kháng các loài vi sinh vật gây bệnh *Vibrio parahaemolyticus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, và *Escherichia coli*.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện hình thái khuẩn lạc và hình thái tế bào của chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* ST44. A. Khuẩn lạc chủng *Bacillus subtilis* ST44 được nuôi cấy trên môi trường MPA. B. Tế bào của chủng *Bacillus subtilis* ST44 dưới kính hiển vi điện tử với độ phóng đại 10.000 lần.

Fig. 2 thể hiện khả năng tạo bào tử của chủng *Bacillus subtilis* ST44 thông qua sự sinh trưởng sau khi xử lý nhiệt ở 80°C/15 phút và cấy lại trên môi trường MPA. A. ĐC (đối chứng): *Bacillus subtilis* (Gram +); B. ĐC (đối chứng): *Escherichia coli* (Gram -); C. Chủng *Bacillus subtilis* ST44.

Fig. 3 thể hiện kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR nhân lên từ ADN tổng số của chủng *Bacillus subtilis* ST44 bởi cặp mồi 27f, 1527r. M: Marker 1 kb; 1-NA 53; 2-ST21; 3-ST43; 4-ST44.

Fig. 4 thể hiện cây phát sinh chủng loài của chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* ST44.

Fig. 5 thể hiện khả năng sinh enzyme α -amilaza (A), xenluloza (B), proteaza (C) của chủng *Bacillus subtilis* ST44. ĐC: đối chứng (-) môi trường không chứa vi khuẩn; amilaza, xenluloza và proteaza là các enzyme đối chứng (+); ST11, ST43, ST44 và NA53 là tên chủng.

Fig.6 thể hiện khả năng kháng khuẩn của chủng *Bacillus subtilis* ST44 đối với 4 chủng vi khuẩn gây bệnh. A: khả năng kháng *Vibrio parahaemolyticus*; ĐC: đối chứng; ST21 và NA53 là các chủng kháng khuẩn. B: khả năng kháng *Enterococcus faecalis* ATCC 299212; ĐC: đối chứng; ST43, ST51 và NA53 là các chủng kháng khuẩn. C: khả năng kháng *Bacillus cereus* ATCC 13245; ĐC: đối chứng; ST43 và NA53 là các chủng kháng khuẩn. D: khả năng kháng *Escherichia coli* ATCC 25922; ĐC: đối chứng; NA53 là chủng kháng khuẩn.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* ST44 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ ruột tôm của đầm nuôi tôm tại Sóc Trăng, Việt Nam. Chủng vi khuẩn này có các đặc tính probiotic, có khả năng ứng dụng cao để làm chế phẩm probiotic bổ sung vào thức ăn nuôi trồng thủy sản, gia súc, gia cầm.

Lựa chọn ngẫu nhiên một số mẫu tôm đang nuôi ở 45 ngày tuổi tại đầm nuôi tôm của tỉnh Sóc Trăng, Việt Nam. Tôm được bảo quản sao cho vẫn còn sống trong thời gian chuyển mẫu về phòng thí nghiệm. Sử dụng dụng cụ chuyên dụng (vô trùng) để mổ tôm, lựa lấy ruột tôm và tiến hành phân lập ngay trên môi trường MPA. Môi trường MPA được dùng trong quá trình phân lập được đề cập ở đây là môi trường có thành phần như sau: NaCl (5 g/L); Cao thịt (3 g/L); Pepton (10 g/L); pH 7-7,2. Môi trường MPA khử trùng ở 121°C trong 30 phút.

Kết quả đã phân lập được chủng ST44. Dựa vào một số đặc điểm sinh học về hình thái khuẩn lạc và hình thái tế bào (Fig. 1), khả năng sinh bào tử của chủng ST44 đã sơ bộ phân loại chúng thuộc chi *Bacillus*, cụ thể: khuẩn lạc hình cầu nhỏ, màu trắng ngà, không viền, bề mặt sần sùi, d = 1-1,5 mm. Tế bào hình que, bề mặt nhẵn (kích thước: 710-790nm x 1,92-2,36 μ m) và có khả năng sinh bào tử.

Đặc trưng cơ bản nhất của các chủng thuộc chi *Bacillus* là khả năng sinh bào tử, trong điều kiện bất lợi như nhiệt độ, pH cực trị hay thiếu dinh dưỡng, các chủng vi khuẩn thuộc chi này sẽ chuyển từ tế bào sinh dưỡng sang dạng bào tử, gặp điều kiện thuận lợi bào tử lại chuyển thành tế bào sinh dưỡng để thực hiện các vai trò của chúng. Chủng ST44 được hoạt hóa trong môi trường MPA sau 1 ngày rồi tiến hành sốc nhiệt ở nhiệt độ 80°C trong 15 phút, sau đó cấy trải trên môi trường nuôi, nếu chủng vi khuẩn nào tiếp tục sinh trưởng trên đĩa thạch tức là chúng có khả năng sinh bào tử, chủng nào không thể sinh trưởng đồng nghĩa là không sinh bào tử, kết quả thử nghiệm có đối chứng dương (sinh bào tử) là chủng *Bacillus*

subtilis và đối chứng âm (không sinh bào tử) là chủng *Escherichia coli*, kết quả được thể hiện Fig. 2 và cho thấy chủng ST44 vẫn có thể sinh trưởng được sau khi sốc nhiệt nên nó được cho là có khả năng sinh bào tử.

Để khẳng định vị trí phân loại của chủng ST44, tiến hành xác định gen 16S rARN theo Zhou và cộng sự (1996). Sử dụng cặp mồi 27f (xuôi) và 1527r (ngược) với trình tự 5' - AGAGTTTGATCMTGGCTCAG - 3'; 5' - AAAGGAGGTGATCCAGCC - 3'. Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR như sau: 94°C: 5 phút; 32 chu kỳ lặp lại (94°C: 1 phút; 58°C: 50 giây; 72°C: 1 phút 30 giây); 72°C: 7 phút; 4°C: giữ mẫu.

Sản phẩm PCR sau khi tinh sạch bằng bộ Kit AccuPrep PCR Purification, Bioneer (Fig. 3) được sử dụng làm khuôn trong phản ứng đọc trình tự trên máy đọc trình tự tự động ABI PRISM 3.100 Avant Genetic Analyzer theo phương pháp của Sanger. Trình tự nucleotit của ST44 được xử lý bằng phần mềm ABI PRISM 3.100 Avant Data Collection v 1.0 và trình tự ADN này được so sánh với trình tự các đoạn gen khác đã được công bố trong NCBI sử dụng phần mềm BlastN. Các trình tự gen sau đó được xử lý bằng các phần mềm Bioedit, Clusal X và Mega4 để xây dựng cây phát sinh chủng loại (Fig. 4) và được đăng ký trên NCBI với mã số LC425345. Kết quả xác định vị trí phân loại của chủng ST44 cho thấy nó có độ tương đồng 100% với chủng *Bacillus subtilis* JD-014 (mã số MK124647). Như vậy, dựa trên một số đặc điểm sinh học cũng như so sánh trình tự gen 16S rARN thì chủng ST44 thuộc chi *Bacillus* và được đặt tên *Bacillus subtilis* ST44. Chủng vi khuẩn này có trình tự gen 16S rARN với kích thước 1500 bp như nêu trong SEQ ID NO:1.

Chủng *Bacillus subtilis* ST44 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập này được lưu giữ tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Chủng *Bacillus subtilis* ST44 đã được nghiên cứu có các đặc tính probiotic sau:

- Có khả năng tạo màng sinh học làm tăng khả năng bám dính vào thành ruột vật chủ trong điều kiện nuôi cấy trong 2 ngày: ở nhiệt độ trong khoảng 15-45 °C, tốt nhất là trong khoảng 30-37 °C; độ pH trong khoảng 2-10, tốt nhất là từ 6-8; nồng độ muối của nước biển là 40 ‰; hoặc ở nồng độ dịch mật đến 2 %;

- Có khả năng sinh các enzym α -amylaza, xenlulaza, proteaza hỗ trợ tiêu hóa; và

- Có khả năng sinh bacterioxin kháng các loài vi sinh vật gây bệnh *Vibrio parahaemolyticus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, và *Escherichia coli*.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1. Phân lập và định danh chủng vi khuẩn ST44

Mẫu tôm nuôi ở 45 ngày tuổi được thu thập tại đầm nuôi tôm của tỉnh Sóc Trăng, tôm được bảo quản trong túi nilông chứa nước nuôi tôm và có bơm ôxy, tất cả đặt trong bình xốp và chuyển về phòng thí nghiệm. Mẫu tôm được xử lý bằng dao và dụng cụ chuyên biệt để mổ và lấy ruột tôm, ruột tôm được nghiền nát sau đó hòa tan bằng nước muối sinh lý 0,9 % và tiến hành phân lập trên môi trường MPA. Sau 48 giờ các khuẩn lạc được tách và làm sạch, thu được chủng ST44 có hình thái khuẩn lạc cũng như hình thái tế bào như được thể hiện trong Fig. 1.

Dựa vào hình thái khuẩn lạc và hình thái tế bào cũng như khả năng sinh bào tử của chủng ST44 thu được trên môi trường nuôi cấy dạng thạch, chủng ST44 có thể được xếp vào chi *Bacillus* (Bergey, 1989, 2001).

Phân loại chủng vi khuẩn ST44 được thực hiện bằng phương pháp xác định trình tự đoạn gen 16S rARN với cặp mồi 27F/1527R. ADN tổng số của chủng vi khuẩn ST44 được tách và thu được như sau:

- Nuôi cấy thu sinh khối vi khuẩn trong 2 ngày trên môi trường MPA ở điều kiện hiếu khí đến khi OD₆₀₀ đạt 0,8 - 1 thì ADN của chúng được tách chiết theo quy trình sau: i) Hút dịch nuôi cấy vào các ống eppendorf 1,5 ml, tế bào được thu lại bằng cách ly tâm 10.000 v/ph trong 5 phút; ii) Bổ sung 576 µl dung dịch TE, để trên đá và lắc đều cho tan hết tế bào; iii) Bổ sung 30 µl SDS 10 %, lắc nhẹ và để ở nhiệt độ phòng; iv) Bổ sung 3 µl enzym proteaza K (10 mg/ml), ủ mẫu ở 37°C trong 1 giờ; v) Bổ sung 180 µl NaCl 5M lắc nhẹ, ủ mẫu ở 65 °C trong 10 phút. Chú ý: đảo nhẹ nhàng để tránh đứt gãy ADN; vi) Protein được loại bỏ bằng một thể tích chloroform/isoamylalcohol 24:1 (v/v), ly tâm 12.000 v/ph trong 10 phút, thu dịch nổi và chuyển sang ống eppendorf mới; vii) Protein được loại bỏ tiếp bằng phenol/chloroform/isoamylalcohol theo tỷ lệ 25:24:1 (v/v), ly tâm 12.000 v/ph trong 10 phút, thu dịch nổi và chuyển sang ống eppendorf mới; viii) ADN được rửa bằng hai lần thể tích ethanol 100 % ở 4 °C trong 20 phút, ly tâm 12.000 v/ph ở 4 °C, phần rửa là ADN hệ gen được thu lại, rửa được rửa lại bằng ethanol 70 %, ly tâm 12.000 v/ph ở 4 °C trong 15 phút và được làm khô bằng máy hút chân không Mi- vac 110 V, sau đó hòa tan ADN trong 25µl TE và bảo quản ở 4 °C.

Cặp mồi được sử dụng để định danh chủng vi khuẩn là cặp mồi 27F/1527R được thiết kế dựa vào trình tự có tính bảo thủ cao của gen 16S rARN ở sinh vật nhân sơ (White *et al.*, 1990).

Mồi xuôi 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3' và mồi ngược 5'-ACGGCTACCTTGTTACGACT -3'.

ADN thu được từ chủng vi khuẩn được thực hiện nhân gen 16S rARN bằng phương pháp PCR với thành phần phản ứng và chu trình nhiệt như sau:

Thành phần phản ứng (μ l):

Đệm Taq 10X:	2,5 μ l	Taq-polymeraza (5 U/ μ l):	0,25 μ l
MgSO ₄ (25 mM):	2,5 μ l	ADN khuôn:	2,0 μ l
dNTP (2,5 mM):	2,0 μ l	H ₂ O khử ion:	13,75 μ l
Môi xuôi 10 μ M:	1,0 μ l	Tổng thể tích:	25 μ l
Môi ngược 10 μ M:	1,0 μ l		

Chu trình nhiệt:

- Bước 1: 95 °C (5 phút)
- Bước 2: 95 °C (50 s)
- Bước 3: 58 °C (45 s)
- Bước 4: 72 °C (1 phút 30 giây)
- Bước 5: Lặp lại 30 lần từ bước 2 đến bước 4
- Bước 6: 72 °C (7 phút)
- Bước 7: Bảo quản ở 4 °C

Sản phẩm PCR nhân đoạn gen 16S rARN từ ADN tổng số của chủng ST44 đã được kiểm tra trên gel agarosa 1%, nhuộm etidium bromit và sau đó soi bản gel dưới tia tử ngoại. Độ dài của sản phẩm PCR có kích thước đúng như lý thuyết và được thể hiện trên Fig. 3.

Sản phẩm nhân đoạn gen 16S rARN được tinh sạch bằng kit Gel Purification, hãng Bioneer, Hàn Quốc có bán trên thị trường và sau đó được xác định trình tự theo phương pháp của Sanger, sử dụng máy đọc trình tự tự động ABI, Mỹ. Sử dụng các phần mềm Bioedit, Clustal X và Mega4 để xây dựng cây phát sinh chủng loại của chủng vi khuẩn ST44.

Trình tự gen của chủng ST44 có kích thước khoảng 1500 nucleotit và được đăng ký trên GenBank với mã số truy cập LC425345.

Trình tự gen của chủng ST44 có có mức độ tương đồng 100 % với trình tự tương ứng của chủng *Bacillus subtilis* JD-014 (MK124647). Mối quan hệ phát sinh chủng loài của chủng ST44 với một số chủng vi khuẩn đã được xây dựng và kết quả được thể hiện ở Fig. 4.

Như vậy, dựa trên các đặc điểm hình thái khuẩn lạc cũng như hình thái tế bào và so sánh trình tự gen 16S rARN thì chủng ST44 thuộc chi *Bacillus* và được đặt tên là *Bacillus subtilis* ST44.

Chủng *Bacillus subtilis* ST44 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập này được lưu giữ tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Ví dụ 2. Đánh giá khả năng tạo màng sinh học của chủng ST44

Chủng ST44 sau khi phân lập được được tiến hành xác định một số yếu tố ảnh hưởng đến khả năng tạo màng sinh học của nó.

Chủng ST44 được nuôi cấy trên môi trường MPA như đã nêu ở trên được xác định khả năng tạo màng như sau: Sau 24 giờ nuôi cấy ly tâm loại dịch, thu sinh khối (ly tâm ở 6000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C và rửa bằng nước cất 2 lần với thể tích tương ứng để loại bỏ hoàn toàn môi trường nuôi cấy). Bổ sung nước cất sau lần ly tâm cuối cùng và đánh tan sinh khối. Tiến hành pha loãng tới hạn và đo OD ở bước sóng 600 nm (xác định mật độ vi khuẩn). Bổ sung 100µl dịch này vào ống epandorf chứa 900µl môi trường, tiếp tục nuôi ở 37°C và đánh giá khả năng tạo màng sinh học của vi khuẩn sau 24h. Kết quả được thể hiện trong Bảng 1.

Đánh giá khả năng tạo màng bằng cách dùng pipetman hút nhẹ dịch nuôi cấy (không làm vỡ màng), rửa bằng 1 ml nước cất vô trùng rồi hút ra lặp lại lần nữa. Thành phần và thể tích các chất trong phản ứng xác định khả năng tạo màng như sau:

Thành phần phản ứng	Mẫu đối chứng (ml)	Mẫu thí nghiệm (ml)
Tím tinh thể (Crystal violet) 0,1 % (để 10 phút)	1	1
Rửa với nước cất vô trùng (2 lần)	1	1
Axit axetic (33 %)	1	1

Dung dịch thu được đảo trộn, pha loãng và đo ở bước sóng 570 nm.

Trong thí nghiệm này, chủng B-1.1 là chủng có khả năng tạo màng sinh học (Hoang Phuong Ha *et al.*, 2016), được sử dụng làm đối chứng dương. Còn đối chứng âm là môi trường không chứa vi khuẩn. Kết quả được thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 1: Khả năng tạo màng sinh học của ST44

	OD ₅₇₀	Ghi chú
ST44	1,13	Chủng theo giải pháp hữu ích
B-1.1	0,59	Đối chứng dương
Đối chứng âm	0,095	Môi trường không chứa vi khuẩn

So sánh với chủng B-1.1, có thể thấy rằng, chủng ST44 là chủng có khả năng tạo màng sinh học tốt.

Ví dụ 3. Đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ lên khả năng tạo màng sinh học của chủng ST44

Dải nhiệt độ 5; 10; 15; 20; 25; 30; 37; 40 và 45°C được sử dụng để đánh giá ảnh hưởng của chúng lên khả năng tạo màng sinh học của chủng ST44 trong 2 ngày nuôi cấy. Chủng B-1.1 được sử dụng làm đối chứng dương. Kết quả được thể hiện trên Bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng tạo màng sinh học của chủng ST44

	Nhiệt độ (°C)	5	10	15	20	25	30	37	40	45
OD ₅₇₀	ST44	0,26 (+ 0,02)	0,38 (+ 0,03)	0,72 (+ 0,01)	0,90 (+ 0,04)	1,1 (+ 0,04)	1,26 (+ 0,01)	1,26 (+ 0,03)	0,92 (+ 0,02)	0,95 (+ 0,01)
	ĐC	0,09	0,09	0,095	0,098	0,095	0,09	0,09	0,09	0,09

Kết quả từ bảng 2 cho thấy, chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* ST44 có khả năng tạo màng sinh học ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 15 °C đến 45 °C, tốt nhất là ở nhiệt độ từ 30-37 °C, điều này được thể hiện thông qua chỉ số OD₅₇₀ là 1,26 . Tại 40 và 45°C, khả năng tạo màng của các chủng này vẫn được duy trì, tại các điểm nhiệt độ này giá trị OD₅₇₀ trên 0,9. Ở khoảng nhiệt độ từ 5-10 °C mặc dù khả năng tạo màng của ST44 thấp, nhưng sẽ không ảnh hưởng khi đưa chúng vào cơ thể. Như vậy, việc ứng dụng chủng ST44 làm chủng probiotic bổ sung vào thức ăn cho động vật nuôi là hoàn toàn phù hợp.

Ví dụ 4. Đánh giá ảnh hưởng của độ pH lên khả năng tạo màng sinh học của chủng ST44

Khả năng tạo màng sinh học của chủng vi khuẩn ST44 khi nuôi trên môi trường MPA có giá trị pH từ 2 đến 10 đã được nghiên cứu. Sau 2 ngày nuôi cấy, chủng ST44 đều tạo màng sinh học khá tốt trong môi trường có các giá trị pH này. Kết quả được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của độ pH đến khả năng tạo màng sinh học của chủng ST44

pH	2	4	6	7	8	10
ST44 (OD ₅₇₀)	0,714 (+ 0,02)	0,836 (+ 0,05)	0,989 (+ 0,03)	0,963 (+ 0,03)	0,922 (+ 0,03)	0,68 (+ 0,02)

Kết quả từ bảng 3 cho thấy, chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* ST44 có khả năng tạo màng ở các dải pH thử nghiệm và khả năng tạo màng cao nhất ở pH 6-8. Tại giá trị pH này OD₅₇₀ trên 0,9. Khả năng tạo màng vẫn thể hiện tốt ở pH 4 là pH trong dịch dạ dày hay đường ruột của tôm nuôi và giá trị OD₅₇₀ là trên 0,8. Ngoài ra khả năng tạo màng của chủng ST44 vẫn hình thành khi ở pH = 2 và pH = 10, OD₅₇₀ đạt khoảng 0,7. Như vậy, trong môi trường axit (pH 2, pH 4) hay bazơ (pH 10) không ảnh hưởng đến sự hình thành màng sinh học của chủng ST44. Kết quả này có ý nghĩa thực tế khi sử dụng chủng vi sinh vật này làm chế phẩm probiotic bổ sung vào thức ăn sẽ không bị ảnh hưởng ở các điều kiện môi trường khắc nghiệt.

Ví dụ 5. Đánh giá ảnh hưởng của nồng độ muối lên khả năng tạo màng sinh học của chủng ST44

Chủng ST44 được hoạt hóa trên môi trường MPA, sau đó bổ sung vào môi trường nuôi cấy với các nồng độ muối NaCl khác nhau từ 0 đến 40 ‰ để đánh giá khả năng tạo màng bởi chủng ST44 này. Kết quả được thể hiện trên bảng 4 sau 2 ngày nuôi cấy.

Bảng 4. Ảnh hưởng của nồng độ NaCl đến khả năng tạo màng sinh học của chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* ST44

NaCl (‰)	0	10	20	30	40
ST44(OD ₅₇₀)	1,1 + 0,05	0,9 + 0,04	0,98 + 0,04	0,87 + 0,03	0,83 + 0,05

Kết quả từ bảng 4 cho thấy, sau 2 ngày nuôi cấy, chủng ST44 có khả năng tạo màng cao hơn ở nồng độ NaCl 0 ‰, tuy nhiên ở 10 - 40 ‰ khả năng tạo màng sinh học vẫn rất tốt, OD₅₇₀ giao động từ 0,8-0,9. Điều này cho thấy chủng ST44 hoàn toàn không ảnh hưởng khi chúng được sinh trưởng trong điều kiện nước lợ, mặn của nước nuôi trồng thủy hải sản.

Ví dụ 6. Đánh giá ảnh hưởng của dịch mật lên khả năng tạo màng sinh học của chủng ST44

Dịch mật với các nồng độ khác nhau 0,5; 1; 1,5 và 2% được sử dụng để đánh giá ảnh hưởng của nó đến khả năng tạo màng của ST44 trong 2 ngày. Kết quả được thể hiện ở Bảng 5.

Bảng 5. Ảnh hưởng của nồng độ dịch mật đến khả năng tạo màng sinh học của chủng ST44

Dịch mật (%)	0,5	1	1,5	2
ST44 (OD ₅₇₀)	1,19 + 0,02	1,05 + 0,05	1,13 + 0,04	0,9 + 0,04

Kết quả từ bảng 5 cho thấy, tất cả các nồng độ dịch mật đều không ảnh hưởng đến khả năng tạo màng của chủng ST44, khả năng tạo màng của chủng vi khuẩn này cao nhất ở nồng độ dịch mật 0,5%, lúc đó giá trị OD₅₇₀ đạt 1,19, giá trị này thấp hơn không nhiều ở nồng độ dịch mật 2% là 0,9. Như vậy, sau 2 ngày chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* ST44 vẫn có khả năng tạo màng sinh học tốt ở cả nồng độ dịch mật là 2%.

Ví dụ 7. Đánh giá khả năng sinh enzym hỗ trợ tiêu hóa của chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* ST44

Để xác định chủng ST44 có sinh các enzym như α -amylaza, enzym xenlulaza, enzym proteaza hay không, tiến hành định tính enzym theo phương pháp bán định lượng (khuyếch tán trên đĩa thạch) (Lê Thanh Mai *et al.*, 2005).

Nguyên liệu và Hóa chất: tinh bột tan; carboxymetyl xenlulaza (CMC); casein; đệm phosphat natri 0,1M, pH 7,0; thuốc thử Logol (5 mM I₂ trong 5 mM KI); đệm phosphat

sorensen 0,1M, pH 7,6; amido đen 10B; metanol; axit axetic; đĩa thạch; Dung dịch enzym xenlulaza; enzym α - amylaza; dung dịch enzym casein.

Đĩa thạch 1% chứa cơ chất tinh bột tan 1 % pha trong đệm phosphat natri (pH = 7) 0,1M để xác định enzym α -amylaza; đĩa thạch 1% chứa cơ chất CMC 1 % pha trong đệm phosphat natri (pH = 7) 0,1M để xác định enzym xenlulaza; đĩa thạch 1% chứa cơ chất casein 0.1% pha trong đệm phosphat Sorensen 0,1M pH 7,6 hoặc đệm Britton 0,04M, chứa chất diệt khuẩn (NaN_3 0,02 %).

Tiến hành xác định enzym α -amylaza hoặc enzym xenlulaza: đĩa thạch chứa môi trường có bổ sung các loại cơ chất khác nhau tương ứng các enzym, sau khi đục lỗ thạch tiến hành tra mẫu, trong đó giếng chứa enzym được coi là đối chứng dương, dung dịch môi trường là đối chứng âm, các giếng còn lại là dịch vi khuẩn nghiên cứu. Mỗi giếng được bổ sung 100 μl . Sau 16 giờ nuôi tĩnh ở nhiệt độ phòng (25 °C), đổ dung dịch thuốc thử lugol sao cho ngập kín mặt đĩa thạch. Sau 1 giờ, rửa lại mẫu bằng nước cất rồi quan sát enzym α -amylaza hoặc enzym xenlulaza sẽ phân giải cơ chất tạo nên các vòng sáng màu trên nền thạch chứa cơ chất bắt màu xanh. Đường kính (D-d = mm) của vòng phân giải thể hiện hoạt độ của enzym.

Tiến hành xác định enzym proteaza: Tiến hành như xác định enzym xenlulaza và amylaza rồi để ở nhiệt độ (30- 40 °C) trong 24 giờ. Sau đó, ngừng phản ứng enzym và nhuộm màu thạch bằng dung dịch amido đen 10B 0,1 % pha trong dung dịch metanol, axit axetic, nước cất theo tỷ lệ 3:1:6, hoặc trong axit axetic 7 %. Các enzym phân giải protein (nếu có) sẽ phân giải cơ chất tạo nên các vòng sáng màu trên nền thạch chứa cơ chất bắt màu xanh nâu. Đường kính (D-d = cm) của vòng phân giải thể hiện hoạt độ của enzym.

Kết quả đánh giá như được thể hiện trong bảng 6 sau đây cho thấy chủng ST44 có khả năng sinh cả 3 enzym hỗ trợ tiêu hóa này.

Tên chủng	Kích thước vòng phân giải D-d (mm)		
	<i>proteaza</i>	<i>xenlulaza</i>	<i>α – amylaza</i>
ST44	26	24	24
enzym	22	20	22

Ví dụ 8. Đánh giá khả năng sinh bacterioxin kháng các loài vi sinh vật gây bệnh như *Vibrio parahaemolyticus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, và *Escherichia coli*

Chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* ST44 được đề cập đến theo giải pháp hữu ích có khả năng ức chế sự sinh trưởng của một số vi khuẩn gây bệnh như vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh trên tôm, *Enterococcus faecalis* gây bệnh trên gia cầm, gia súc,

Bacillus cereus gây nhiễm độc thực phẩm, *Escherichia coli* gây bệnh tiêu chảy, gây nhiễm khuẩn nặng đường ruột cho cả người và động vật.

Các chủng vi sinh vật kiểm định *Vibrio parahaemolyticus*, *Enterococcus faecalis* ATCC 299212, *Bacillus cereus* và *Escherichia coli* ATCC 25922 được sử dụng trong ví dụ này là các chủng được lưu giữ tại Phòng Công nghệ sinh học môi trường, Viện Công nghệ sinh học và có nguồn gốc từ Trung tâm giống vi sinh, trường ĐHQG Hà Nội. Việc đánh giá được thực hiện bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch (Jayasree *et al.*, 2006), được tiến hành như sau:

Cấy 0,05 ml dịch chứa mỗi loại vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*, *Enterococcus faecalis* ATCC 299212, *Bacillus cereus* hoặc *Escherichia coli* ATCC 25922 đã được hoạt hóa trên môi trường thạch MPA (mỗi loại vi khuẩn 1 đĩa riêng biệt). Đục các giếng thạch có đường kính 8mm trên đĩa môi trường thạch MPA đã trải vi khuẩn kiểm định. Lấy 0,1 ml dịch nuôi cấy chủng ST44 bổ sung vào mỗi lỗ, đối chứng là môi trường không chứa vi khuẩn và tiến hành nuôi cấy tĩnh hiếu khí ở 37°C trong 24 giờ. Kiểm tra khả năng kháng khuẩn bằng cách nhìn thấy vòng phân giải ức chế sinh trưởng của vi khuẩn gây bệnh trên đĩa thạch (màu sáng), vòng càng lớn tỷ lệ ức chế càng cao (xem Fig 6). Kết quả cũng được thể hiện trong bảng 6 cho thấy chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* ST44 kháng lại cả 4 chủng vi khuẩn gây bệnh nêu trên.

Bảng 6. Kích thước vòng kháng vi khuẩn kiểm định của chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* ST44

Chủng	<i>V. parahaemolyticus</i> (mm)	<i>Enterococcus faecalis</i> (mm)	<i>Bacillus cereus</i> (mm)	<i>Escherichia coli</i> (mm)
ST44	15	16	20	17

Như vậy, chủng ST44 có khả năng sản sinh bacterioxin ức chế vi khuẩn gây bệnh ở phổ khá rộng, nó có thể ức chế cả 4 loại vi khuẩn gây bệnh nguy hiểm về đường tiêu hóa cho người và động vật, đặc biệt chủng ST44 kháng được *V. parahaemolyticus* là vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan cấp tính trên tôm, bệnh đốm trắng hay còi tôm, gây chết tôm hàng loạt chỉ trong vài ngày. Do vậy, chủng ST44 có đầy đủ các điều kiện để sử dụng cho mục đích sản xuất chế phẩm sinh học bổ sung vào thức ăn nuôi gia súc, gia cầm hay động vật thủy hải sản.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* ST44 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập trực tiếp từ ruột tôm trong đầm nuôi tôm nước lợ ở Việt Nam có đặc tính probiotic như: khả năng

tạo màng sinh học tốt làm tăng khả năng bám dính trên các niêm mạc ruột, có thể tạo màng tốt ngay ở nồng độ dịch mật là 2% trong 2 ngày. Chủng vi khuẩn này có khả năng sinh các enzym hỗ trợ tiêu hóa như α -amylaza, xenlulaza, proteaza, và sản sinh bacterioxin có khả năng ức chế đa dạng các vi khuẩn gây bệnh như *V. parahaemolyticus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus* và *Escherichia coli*. Như vậy, chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* ST44 có giá trị và vai trò quan trọng để làm chế phẩm probiotic bổ sung vào thức ăn nuôi trồng thủy sản, gia súc, và gia cầm.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* ST44 thuần khiết về mặt sinh học, phân lập được từ ruột tôm trong đầm nuôi tôm nước lợ ở Sóc Trăng, Việt Nam, có trình tự gen 16S rARN với kích thước 1500 bp như nêu trong SEQ ID NO:1 và được đăng ký trên GenBank với mã số LC425345, trong đó chủng vi khuẩn này có các đặc tính probiotic sau:

- Có khả năng tạo màng sinh học làm tăng khả năng bám dính vào thành ruột vật chủ trong điều kiện nuôi cấy trong 2 ngày: ở nhiệt độ trong khoảng 15-45 °C, tốt nhất là trong khoảng 30-37 °C; độ pH trong khoảng 2-10, tốt nhất là từ 6-8; nồng độ muối của nước biển là 40 ‰; hoặc ở nồng độ dịch mật đến 2 %;

- Có khả năng sinh các enzym α -amylaza, xenlulaza, proteaza hỗ trợ tiêu hóa; và

- Có khả năng sinh bacterioxin kháng các loài vi sinh vật gây bệnh *Vibrio parahaemolyticus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, và *Escherichia coli*.

Fig. 1.

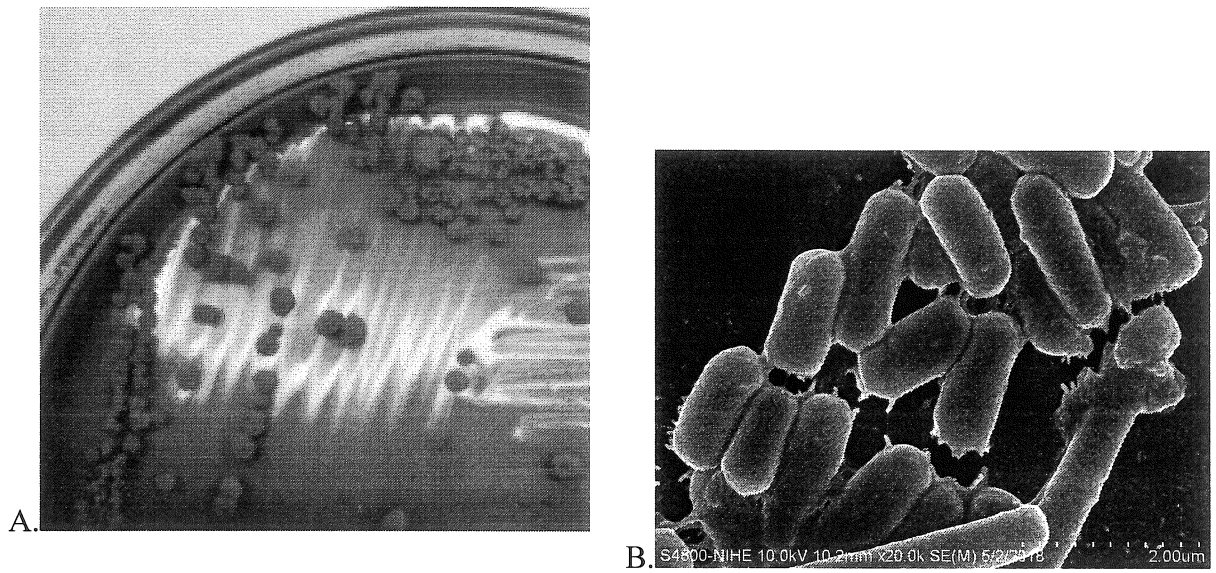


Fig. 2.

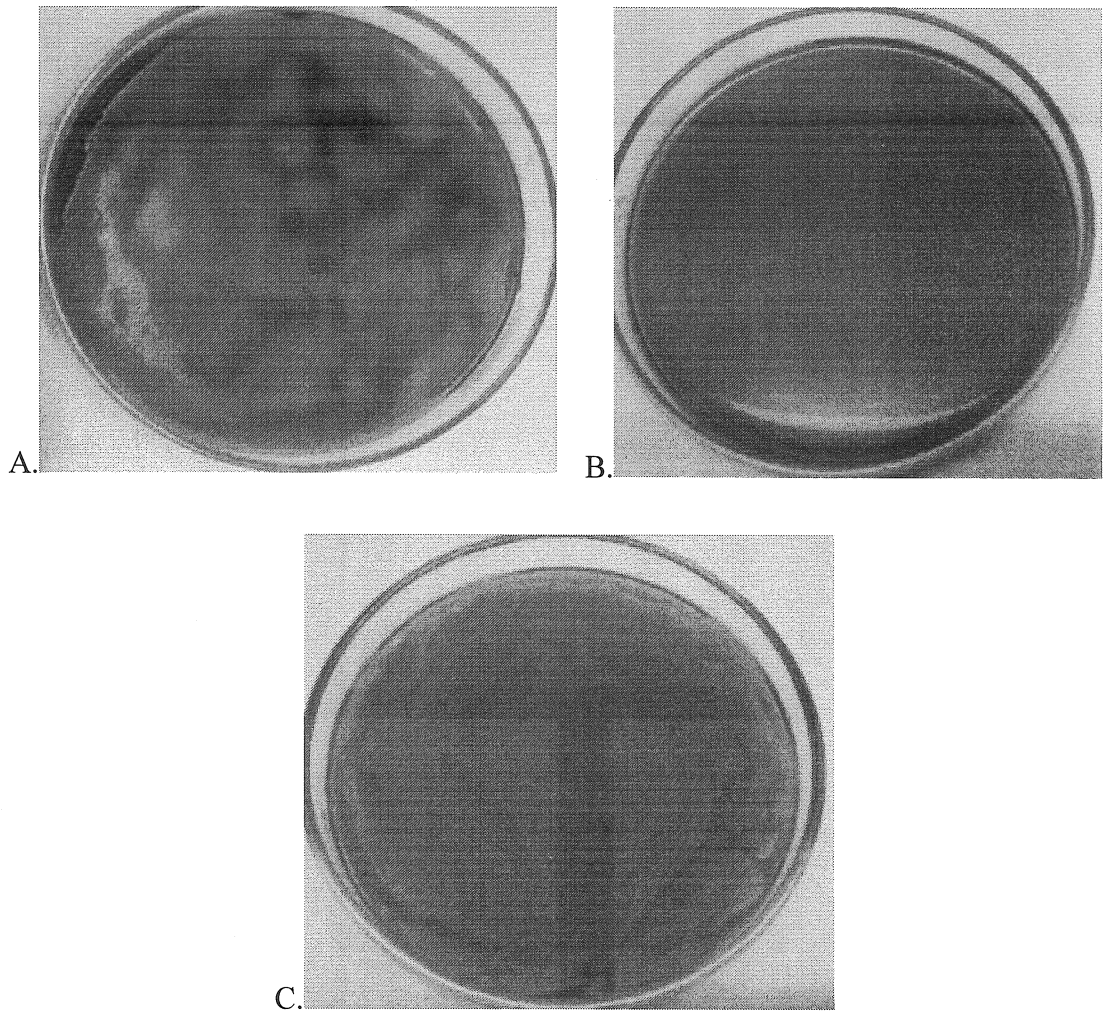


Fig. 3.

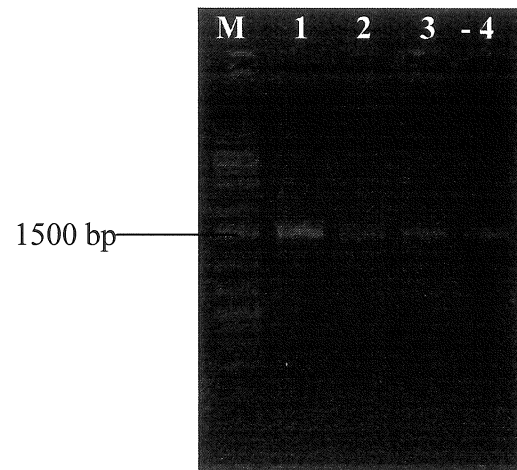


Fig. 4.

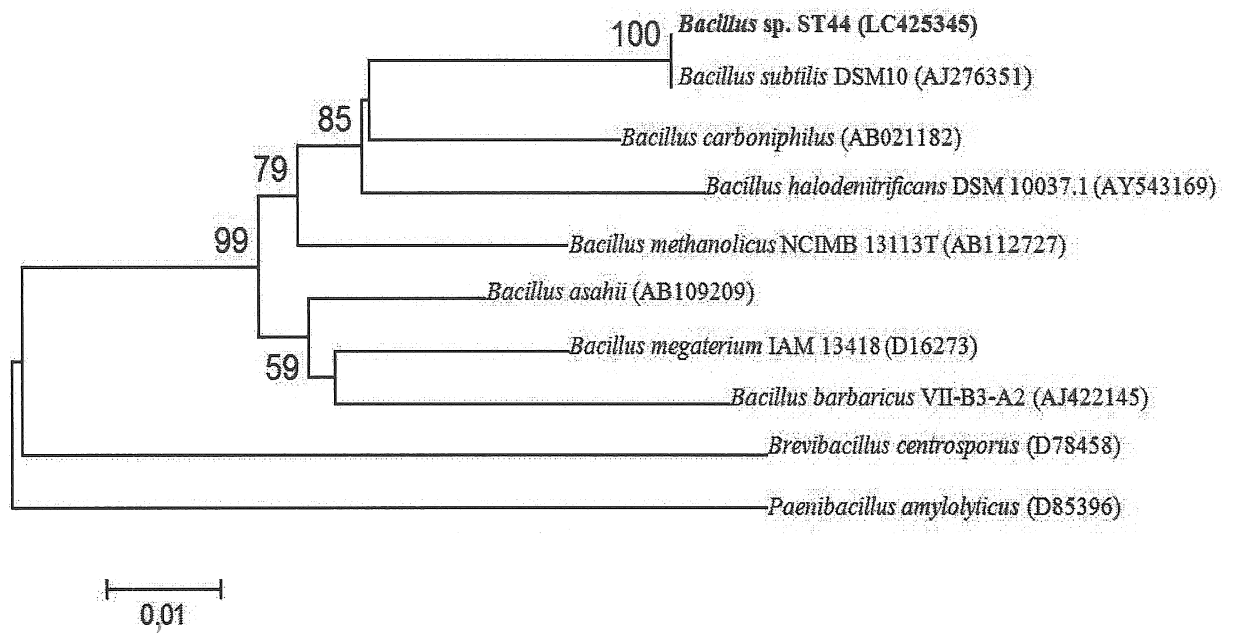


Fig. 5.

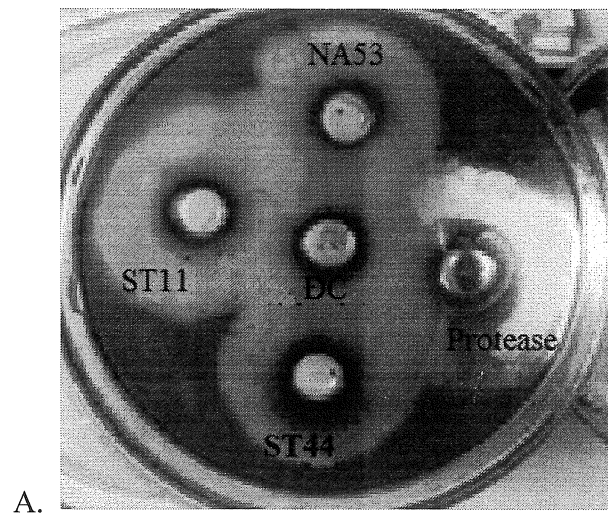
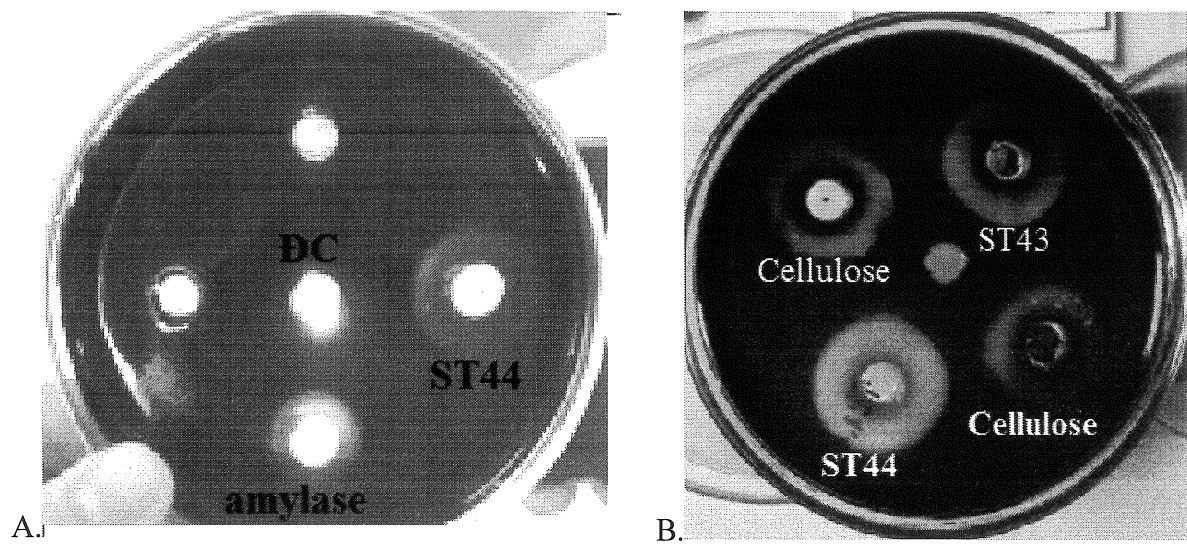
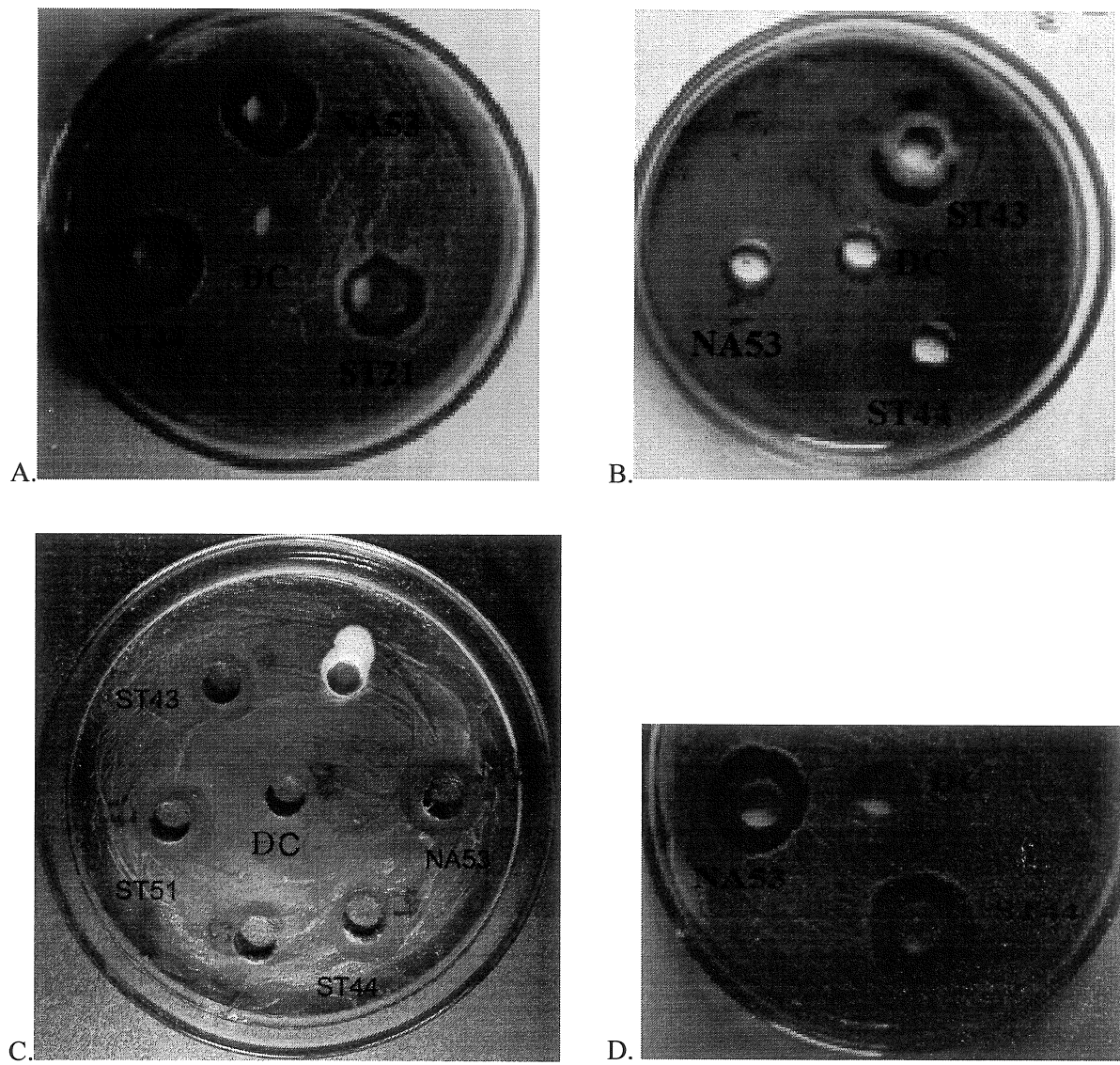


Fig. 6.



DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> Viện Công nghệ sinh học- Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
- <120> Chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* ST44 thuần khiết về mặt sinh học, phân lập được từ ruột tôm, có đặc tính probiotic
- <130>
- <160> 12
- <170>
- <210> 1
- <211> 1500
- <212> ADN
- <213> *Bacillus subtilis* ST44
- <220>
- <223>
- <220>
- <400> 1500

taatacatgc aagtcgagcg gacagatggg agcttgctcc ctgatgtag cggcggacgg

61 gtgagtaaca cgtgggtaac ctgcctgtaa gactgggata actccgggaa accggggcta

121 ataccggatg gttgtttgaa ccgcatggtt caaacataaa aggtggcttc ggctaccact

181 tacagatgga cccgcggcgc attagctagt tggtaggta acggctcacc aaggcaacga

241 tgcgtagccg acctgagagg gtgatcgcc aactgggac tgagacacgg ccagactcc

301 tacgggaggc agcagtaggg aatcttccgc aatggacgaa agtctgacgg agcaacgccg

361 cgtgagtgat gaaggttttc ggatcgtaaa gctctgttgt tagggaagaa caagtaccgt

421 tcgaataggg cggtaccttg acggtaccta accagaaagc cacggctaac tacgtgccag

481 cagccgcggt aatacgtagg tggcaagcgt tgtccggaat tattgggcgt aaagggctcg

541 caggcggttt cttaagtctg atgtgaaagc ccccggtca accggggagg gtcattggaa

601 actggggaac ttgagtgcag aagaggagag tggaattcca cgtgtagcgg tgaaatgcgt

661 agagatgtgg aggaacacca gtggcgaagg cgactctctg gtctgtaact gacgctgagg

721 agcgaaagcg tggggagcga acaggattag ataccctggg agtccacgcc gtaaactgatg

781 agtgctaagt gttagggggg ttccgccct tagtgctgca gctaacgcat taagcactcc

841 gcctggggag tacggtcgca agactgaaac tcaaaggaat tgacgggggc ccgcacaagc

901 ggtggagcat gtggtttaat tcgaagcaac gcgaagaacc ttaccaggtc ttgacatcct

961 ctgacaatcc tagagatagg acgtcccctt cgggggcaga gtgacaggtg gtgcatgggt
1021 gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggt taagtccgc aacgagcgca acccttgatc
1081 ttagttgcca gcattcagtt gggcactcta aggtgactgc cggtgacaaa ccggaggaag
1141 gtggggatga cgtcaaatca tcatgcccct tatgacctgg gctacacacg tgctacaatg
1201 gacagaacaa agggcagcga aaccgcgagg ttaagccaat cccacaaatc tgttctcagt
1261 tcggatcgca gtctgcaact cgactgcgtg aagctggaat cgctagtaat cgcggatcag
1321 catgccgcgg tgaatacgtt cccgggcctt gtacacaccg cccgtcacac cagagagtt
1381 tgtaacaccc gaagtcggtg aggtaacctt ttaggagcca gccgccgaag gtgggacaga
1441 tgattggggt gaagtcgtaa caa

//