



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

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

(11)



1-0034991

(51)⁷ A23L 1/30; A61K 35/74; A23K 1/18

(13) B

(21) 1-2013-03772

(22) 30/04/2012

(86) PCT/US2012/035841 30/04/2012

(87) WO2012/149549 01/11/2012

(30) 61/480,622 29/04/2011 US

(45) 27/03/2023 420

(43) 25/02/2014 311A

(73) AUBURN UNIVERSITY (US)

570 Devall Drive, Auburn, AL 36832, United States of America

(72) TERHUNE Jeffery (US); LILES Mark (US); KLOEPPER Joseph (US).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) CHẾ PHẨM THỨC ĂN DÙNG CHO ĐỘNG VẬT THỦY SINH

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm diệt vi sinh vật chứa chủng *Bacillus* tạo bào tử. Chế phẩm này có thể được ứng dụng trong điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh ở động vật thủy sinh như cá nuôi hoặc các loài giáp xác. Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm thức ăn cho động vật thủy sinh chứa chủng *Bacillus* tạo bào tử.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm và phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh ở động vật thủy sinh như cá nuôi (ví dụ, cá da trơn hoặc cá rô phi) và các loài giáp xác (ví dụ, tôm). Cụ thể, sáng chế đề cập đến chế phẩm và phương pháp bao gồm hoặc sử dụng các chủng *Bacillus* tạo bào tử để điều trị hoặc ngăn ngừa các bệnh như bệnh nhiễm trùng huyết đường ruột ở động vật thủy sinh như cá nuôi (ví dụ, cá da trơn hoặc cá rô phi) và các loài giáp xác (ví dụ, tôm).

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Gần đây, người ta rất chú ý tới việc sử dụng các chế phẩm sinh học để cải thiện sức khỏe và dinh dưỡng động vật. Ứng dụng vi khuẩn có lợi trong nuôi trồng thủy sản là bước tiếp theo của việc ứng dụng chúng làm thuốc cho con người và trong canh tác nông nghiệp (Fuller and Turvey 1971; Roach and Tannock 1980; Fuller 1987; Smoragiewicz *et al.* 1993; Fuller 1997), trong đó các vi sinh vật này thường được dùng làm chất bổ sung sống trong thức ăn (Fuller 1997). Đã có báo cáo về hiệu quả có lợi đối với vật chủ về dinh dưỡng, miễn dịch, và/hoặc liên quan đến sự loại trừ cạnh tranh theo đó các mầm bệnh tiềm năng bị loại trừ trong đường tiêu hóa (Smoragiewicz *et al.* 1993). Đã thấy rằng các chế phẩm sinh học này có tác dụng trong việc phòng trừ các bệnh lây nhiễm khác nhau trong nghề nuôi trồng thủy sản bao gồm bệnh nhọt gây ra bởi *A. salmonicida* ở cá hồi cầu vồng (Irianto and Austin 2002), bệnh nấm thủy mi gây ra bởi *Saprolegnia parasitica* ở cá chình vây ngắn *Anguilla australis* (Lategan *et al.* 2004), bệnh đốm trắng gây ra bởi *Edwardsiella tarda* ở cá chình châu Âu *Anguilla anguilla* (Chang and Liu 2002), bệnh cầu khuẩn và bệnh liên cầu khuẩn gây ra lần lượt bởi *Lactococcus garvieae* và *Streptococcus iniae* ở cá hồi cầu vồng (Brunt and Austin 2005), và bệnh gây ra bởi *Vibrio anguillarum* ở cá tuyết Đại Tây Dương (Gildberg and Mikkelsen 1998). Vi khuẩn được sử dụng cho các chế phẩm sinh học này bao gồm *Enterococcus* spp., *Aeromonas* spp., *Vibrio* spp., và vi khuẩn axit lactic (Gildberg and

Mikkelsen 1998; Chang and Liu 2002; Irianto and Austin 2002; Lategan *et al.* 2004; Brunt and Austin 2005). Phần lớn lợi khuẩn được phân lập từ ruột của động vật nuôi trồng thủy sản (Gildberg and Mikkelsen 1998; Irianto and Austin 2002; Lategan *et al.* 2004; Brunt and Austin 2005). Một số vi khuẩn được phân lập từ nơi sống của động vật nuôi trồng thủy sản cũng có hoạt tính lợi khuẩn (Rengpipat *et al.* 1998). Hoạt tính kháng khuẩn đối với mầm bệnh cụ thể được dùng làm chuẩn cơ bản để chọn lọc lợi khuẩn tiềm năng (Rengpipat *et al.* 1998; Irianto and Austin 2002). Bộ sưu tập chủng vi khuẩn được sử dụng trong nghiên cứu này có nguồn gốc từ các nghiên cứu trước đây về vi khuẩn trong đất có thể dùng để phòng trừ sinh học các bệnh ở thực vật và khả năng thúc đẩy sinh trưởng thực vật của chúng (Kloepper *et al.* 2004), cũng như các môi trường nuôi cấy vi khuẩn thu được từ mẫu ruột cá da trơn được xác định trong nghiên cứu này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất chế phẩm diệt vi sinh vật có thể tiêu diệt hoặc ức chế sự sinh trưởng của vi khuẩn. Chế phẩm này có thể tiêu diệt hoặc ức chế sự sinh trưởng của vi khuẩn gây bệnh như vi khuẩn liên quan đến bệnh nhiễm trùng huyết đường ruột. Chế phẩm này chứa chủng *Bacillus* tạo bào tử với lượng hữu hiệu để tiêu diệt hoặc ức chế sự sinh trưởng của vi khuẩn như vi khuẩn liên quan đến bệnh nhiễm trùng huyết đường ruột. Theo một số phương án, chế phẩm theo sáng chế được điều chế dưới dạng chế phẩm thức ăn cho động vật thủy sinh như cá nuôi (ví dụ, cá da trơn hoặc cá rô phi) và các loài giáp xác (ví dụ, tôm). Theo các phương án khác, chế phẩm theo sáng chế có thể được điều chế để dùng cho môi trường trong đó động vật thủy sinh sống hoặc được nuôi trồng.

Tốt hơn, nếu chế phẩm này chứa chủng tạo bào tử thuộc giống *Bacillus* có mật độ ít nhất là khoảng 10^4 CFU/g thức ăn hoặc trong mỗi ml nước. Tốt hơn, nếu chủng tạo bào tử thuộc giống *Bacillus* có mặt trong chế phẩm với mật độ ít nhất là khoảng 10^5 CFU/g thức ăn hoặc trong mỗi ml nước. Còn tốt hơn nữa nếu chủng tạo bào tử thuộc giống *Bacillus* có mặt trong chế phẩm với mật độ ít nhất là khoảng 10^6 CFU/g thức ăn hoặc trong mỗi ml nước hoặc ít nhất là khoảng 10^7 CFU/g thức ăn hoặc trong

mỗi ml nước. Mật độ thích hợp có thể nằm trong khoảng từ 10^4 đến 10^7 CFU/g thức ăn hoặc trong mỗi ml nước hoặc các khoảng phụ trong đó.

Chế phẩm này có thể chứa một chủng thuộc giống *Bacillus*. Theo cách khác, chế phẩm này có thể chứa hỗn hợp của các chủng thuộc giống *Bacillus*.

Chế phẩm này thường chứa chủng tạo bào tử thuộc giống *Bacillus* với lượng hữu hiệu để tiêu diệt hoặc ức chế sự sinh trưởng của một hoặc nhiều vi sinh vật gây bệnh. Ví dụ, vi khuẩn gây bệnh có thể được chọn từ nhóm bao gồm *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella ictaluri*, *Edwardsiella tarda*, *Flavobacterium columnare*, *Streptococcus iniae*, và *Yersinia ruckeri*. Nấm gây bệnh có thể bao gồm nấm trùng *Saprolegnia*.

Chế phẩm theo sáng chế chứa chủng *Bacillus* tạo bào tử. Chế phẩm này có thể chứa các chất khác để tiêu diệt hoặc ngăn ngừa sự sinh trưởng của các vi sinh vật gây bệnh. Theo một số phương án, chế phẩm này còn chứa thể thực khuẩn gây nhiễm *E. ictaluri* (ví dụ, ϕ eiAU). Chế phẩm theo sáng chế có thể chứa các chất kháng sinh như sulfadimetoxin, ormetoprim, và/hoặc florfenical. Chế phẩm theo sáng chế còn có thể chứa vi khuẩn yếu làm tác nhân vacxin (ví dụ, chủng *E. ictaluri* nhược độc).

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh ở động vật bao gồm bước cho dùng chế phẩm theo sáng chế. Ví dụ, phương pháp này có thể bao gồm bước cho động vật thủy sinh như cá nuôi (ví dụ, cá da trơn hoặc cá rô phi) và các loài giáp xác (ví dụ, tôm) dùng chế phẩm thức ăn bao gồm chủng *Bacillus* tạo bào tử. Phương pháp này còn có thể bao gồm bước đưa vào môi trường động vật thủy sinh như cá nuôi (ví dụ, cá da trơn hoặc cá rô phi) và các loài giáp xác (ví dụ, tôm) đang sống và/hoặc được nuôi trồng chế phẩm diệt vi sinh vật theo sáng chế. Phương pháp này có thể được sử dụng để điều trị hoặc ngăn ngừa các bệnh như bệnh nhiễm trùng huyết đường ruột. Phương pháp này có thể được sử dụng để điều trị hoặc ngăn ngừa nhiễm khuẩn ở động vật thủy sinh như cá nuôi (ví dụ, cá da trơn hoặc cá rô phi) và các loài giáp xác (ví dụ, tôm) gây ra bởi các vi sinh vật gây bệnh như loài *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella ictaluri*, *Edwardsiella tarda*, *Flavobacterium columnare*, *Streptococcus iniae*, *Yersinia ruckeri*, *Vibrio* và/hoặc nấm trùng *Saprolegnia*.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 minh họa ảnh chụp hiển vi với độ phóng đại 10 lần lớp phủ aga mềm chứng minh sự ức chế sinh trưởng chủng *A. hydrophila* ML09-119 (phía bên phải) bởi chủng *Bacillus* AP102 (phía bên trái).

Fig. 2. minh họa số lượng trung bình của chủng *Bacillus* tính theo CFU/g ruột cá da trơn, sau khi cho ăn thức ăn có bổ sung và không có bổ sung *Bacillus* (n=3 con cho mỗi chủng *Bacillus*).

Fig. 3 minh họa tỷ lệ tử vong hằng ngày tích tụ của cá da trơn nhỏ phơi nhiễm với ESC được ăn hoặc không được ăn thức ăn có bổ sung *Bacillus*.

Fig. 4. minh họa nồng độ của chủng *Bacillus* CFUs/g trong ruột cá da trơn sau khi cho ăn thức ăn có bổ sung và không có bổ sung *Bacillus* (n=3 con cho mỗi chủng *Bacillus*).

Fig. 5. minh họa tỷ lệ tử vong hằng ngày tích tụ trung bình của (A) cá da trơn trong hệ tĩnh được thay đổi nước 20-30 phút hằng ngày và (B) cá da trơn trong hệ có nước chảy qua hằng ngày 5-7 giờ, hoặc (C) cá da trơn sọc vằn trong hệ tĩnh được thay đổi nước 20-30 phút hằng ngày, được cho ăn thức ăn có bổ sung và không có bổ sung chủng *Bacillus* và được gây nhiễm bằng *E. ictaluri*. Tất cả các giá trị là giá trị trung bình của bốn lần thực hiện cho mỗi xử lý. Xử lý: (○) đối chứng, (●) AP79, (▼) AP193L, (△) AB01, (■) AP143, và (◆) AP254L.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất chế phẩm diệt vi sinh vật. Chế phẩm diệt vi sinh vật theo sáng chế có thể được mô tả bằng cách sử dụng một số định nghĩa như được đề cập dưới đây.

Trừ khi có quy định khác hoặc được chỉ định trong nội dung bản mô tả, thuật ngữ “một” nghĩa là “một hoặc nhiều.” Ngoài ra, các danh từ số ít như “chủng *Bacillus*” cần được hiểu là “một hoặc nhiều chủng *Bacillus*,” trừ khi có quy định khác hoặc được chỉ định trong nội dung bản mô tả.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu “khoảng”, “xấp xỉ”, “về cơ bản là,” và “đáng kể” và sẽ thay

đôi ở mức nhất định trong ngữ cảnh các thuật ngữ này được sử dụng. Nếu mục đích sử dụng thuật ngữ là không rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này thì trong ngữ cảnh thuật ngữ được sử dụng, “khoảng” và “xấp xỉ” sẽ có nghĩa là cộng hoặc trừ $\leq 10\%$ giá trị cụ thể và “về cơ bản là” và “đáng kể” sẽ có nghĩa là cộng hoặc trừ $> 10\%$ giá trị cụ thể.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “chứa” có nghĩa giống như thuật ngữ “bao gồm.”

Chế phẩm và phương pháp theo sáng chế bao gồm hoặc sử dụng các chủng tạo bào tử thuộc giống *Bacillus*. Giống *Bacillus* khi được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ giống vi khuẩn Gram dương, hình que là các chi thuộc Ngành Firmicutes. Trong các điều kiện môi trường nghiêm ngặt, vi khuẩn *Bacillus* tạo ra nội bào tử hình bầu dục có thể không hoạt động trong khoảng thời gian dài. Vi khuẩn *Bacillus* có thể được xác định đặc điểm và xác định dựa trên trình tự nucleotit của 16S rARN của chúng hoặc mảnh của chúng (ví dụ, trình tự nucleotit của mảnh 16S rARN hoặc rADN có khoảng 1000 nt, 1100 nt, 1200 nt, 1300 nt, 1400 nt, hoặc 1500 nt). Vi khuẩn *Bacillus* có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, *B. acidicerer*, *B. acidicola*, *B. acidiproducens*, *B. aeolius*, *B. aerius*, *B. aerophilus*, *B. agaradhaerens*, *B. ainingensis*, *B. akibai*, *B. alcalophilus*, *B. algalicola*, *B. alkalinitrilicus*, *B. alkalisediminis*, *B. alkalitelluris*, *B. altitudinis*, *B. alveayuensis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. anthracis*, *B. aquimaris*, *B. arsenicus*, *B. aryabhattai*, *B. asahii*, *B. atrophaeus*, *B. aurantiacus*, *B. azotoformans*, *B. badius*, *B. barbaricus*, *B. bataviensis*, *B. beijingensis*, *B. benzoovorans*, *B. beveridgei*, *B. bogoriensis*, *B. boroniphilus*, *B. butanolivorans*, *B. canaveralius*, *B. carboniphilus*, *B. cecembensis*, *B. cellulosilyticus*, *B. cereus*, *B. chagannorensis*, *B. chungangensis*, *B. cibi*, *B. circulans*, *B. clarkii*, *B. clausii*, *B. coagulans*, *B. coahuilenis*, *B. cohnii*, *B. decisifrondis*, *B. decolorationis*, *B. drementensis*, *B. farraginis*, *B. fastidiosus*, *B. firmus*, *B. flexus*, *B. foraminis*, *B. fordii*, *B. fortis*, *B. fumarioli*, *B. funiculus*, *B. galactosidilyticus*, *B. galliciensis*, *B. gelatini*, *B. gibsonii*, *B. ginsengi*, *B. ginsengihumi*, *B. graminis*, *B. halmopalus*, *B. halochares*, *B. halodurans*, *B. hemicellulosilyticus*, *B. herbertsteinensis*, *B. horikoshi*, *B. horneckiae*, *B. horti*, *B. humi*, *B. hwajinpoensis*, *B. idriensis*, *B. indicus*, *B. infantis*, *B. infernus*, *B. isabeliae*,

B. isronensis, *B. jeotgali*, *B. koreensis*, *B. korlenis*, *B. kribbensis*, *B. krulwichiae*, *B. lehensis*, *B. lentus*, *B. licheniformis*, *B. litoralis*, *B. locisalis*, *B. luciferensis*, *B. luteolus*, *B. macauensis*, *B. macyae*, *B. mannanilyticus*, *B. marisflavi*, *B. marmarensis*, *B. massiliensis*, *B. megaterium*, *B. methanolicus*, *B. methylotrophicus*, *B. mojavenensis*, *B. muralis*, *B. murimartini*, *B. mycoides*, *B. nanhaiensis*, *B. nanhaiisediminis*, *B. nealsonii*, *B. neizhouensis*, *B. niabensis*, *B. niacini*, *B. novalis*, *B. oceanisediminis*, *B. odysseyi*, *B. okhensis*, *B. okuhidensis*, *B. oleronius*, *B. oshimensis*, *B. panaciterrae*, *B. patagoniensis*, *B. persepoleis*, *B. plakortidis*, *B. pocheonensis*, *B. polygona*, *B. pseudoalcaliphilus*, *B. pseudofirmus*, *B. pseudomycoides*, *B. psychrosaccharolyticus*, *B. pumilus*, *B. qingdaonensis*, *B. rigui*, *B. ruris*, *B. safensis*, *B. salarii*, *B. saliphilus*, *B. schlegelii*, *B. selenatarsenatis*, *B. selenitireducens*, *B. seohaeanensis*, *B. shackletonii*, *B. siamensis*, *B. simplex*, *B. siralis*, *B. smithii*, *B. soli*, *B. solisalsi*, *B. sonorensis*, *B. sporothermodurans*, *B. stratosphericus*, *B. subterraneus*, *B. subtilis*, *B. taeanis*, *B. tequilensis*, *B. thermantarcticus*, *B. thermoamylovorans*, *B. thermocloacae*, *B. thermolactis*, *B. thioparans*, *B. thuringiensis*, *B. tripoxylicola*, *B. tusciae*, *B. vallismortis*, *B. vedderi*, *B. vietnamensis*, *B. vireti*, *B. wakoensis*, *B. weihenstephanensis*, *B. xiaoxiensis*, và hỗn hợp hoặc tổ hợp của chúng.

Chế phẩm và phương pháp theo sáng chế có thể bao gồm hoặc sử dụng *B. subtilis* hoặc loài *Bacillus* có liên quan mật thiết với *B. subtilis*. Một phần trình tự của NH.259 rADN ribosom 16S của chủng *B. subtilis* (Số hiệu lưu giữ GenBank EU627171,1) được đề xuất trong bản mô tả này là SEQ ID NO:1. Loài *Bacillus* có liên quan mật thiết với *B. subtilis* có thể được xác định là các loài bao gồm trình tự 16S rADN bao gồm SEQ ID NO:1 hoặc bao gồm trình tự 16S rADN có ít nhất khoảng 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% trình tự tương đồng với SEQ ID NO:1.

Chế phẩm và phương pháp theo sáng chế có thể bao gồm hoặc sử dụng *B. amyloliquefaciens* hoặc loài *Bacillus* có liên quan mật thiết với *B. amyloliquefaciens*. Một phần trình tự của Chilli-1 rADN ribosom 16S của chủng *B. amyloliquefaciens* (Số hiệu lưu giữ GenBank HQ021420,1) được đề xuất trong bản mô tả này là SEQ ID NO:2. Loài *Bacillus* có liên quan mật thiết với *B. amyloliquefaciens* có thể được xác

định là các loài bao gồm trình tự 16S rADN bao gồm SEQ ID NO:2 hoặc bao gồm trình tự 16S rADN có ít nhất khoảng 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% trình tự tương đồng với SEQ ID NO:2.

Chế phẩm và phương pháp theo sáng chế có thể bao gồm hoặc sử dụng loài *Bacillus* có 16S rADN có liên quan mật thiết với trình tự liên ứng đã chọn với chủng *Bacillus spp.* Trình tự liên ứng với chủng *Bacillus spp.* được đề xuất là SEQ ID NO:3. Chế phẩm và phương pháp theo sáng chế có thể bao gồm hoặc sử dụng loài *Bacillus* bao gồm trình tự 16S rADN bao gồm SEQ ID NO:3 hoặc bao gồm trình tự 16S rADN có ít nhất khoảng 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% trình tự tương đồng với SEQ ID NO:3.

“Tỷ lệ phần trăm tương đồng về trình tự” có thể được xác định bằng cách sắp thẳng hàng hai trình tự có chiều dài tương đương bằng cách sử dụng Công cụ tìm kiếm liên kết cục bộ cơ bản (the Basic Local Alignment Search Tool - BLAST) sẵn có trên website của Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học quốc gia (the National Center for Biotechnology Information - NCBI) (tức là “bl2seq” như mô tả trong Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden (1999), "trình tự Blast 2- công cụ mới để so sánh protein và trình tự nucleotits", FEMS Microbiol Lett. 174:247-250, được đưa vào bản mô tả bằng cách viện dẫn). Ví dụ, tỷ lệ phần trăm tương đồng về trình tự giữa SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, hoặc SEQ ID NO:3 có thể được xác định bằng cách sắp thẳng hàng hai trình tự này bằng cách sử dụng phần mềm BLAST trực tuyến được cung cấp ở website của NCBI.

“Tỷ lệ phần trăm tương đồng về trình tự” giữa hai trình tự deoxyribonucleotit cũng có thể được xác định bằng cách sử dụng mô hình khoảng cách 2 thông số Kimura hiệu chỉnh cho nhiều đỉnh, có tính đến tỷ lệ thay thế đồng hoán và đảo hoán, trong khi vẫn đảm bảo rằng tần suất xuất hiện 4 nucleotit là giống nhau và tỷ lệ thay thế không thay đổi giữa các vị trí (Nei và Kumar, 2000) như được bổ sung trong MEGA 4 (Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S (2007) phần mềm MEGA4: Phân tích di truyền học tiến hóa phân tử (MEGA) phiên bản 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599), tốt hơn nếu là phiên bản 4.0.2 hoặc phiên bản mới hơn. Khoảng mở khe và điểm phạt mở rộng được đặt lần lượt là 15 và 6,66. Các khe hở đầu cuối không

bị phạt. Điểm chuyển trình tự phân kỳ trễ được đặt đến 30. Điểm đánh giá trọng lượng đồng hoán là 35 được đặt đến 0,5, là điểm cân bằng giữa điểm cặp ghép đôi khớp và không khớp hoàn toàn. Ma trận trọng lượng ADN được sử dụng là ma trận đánh giá IUB trong đó x và n khớp với ký hiệu IUB không rõ ràng bất kỳ, và tất cả các điểm khớp là 1,9, và tất cả các điểm không khớp là 0.

chủng *Bacillus* thích hợp cho chế phẩm và phương pháp theo sáng chế bao gồm chủng được đề cập trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây. Các chủng thích hợp này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chủng *Bacillus subtilis* AB01, và chủng *Bacillus amyloliquefaciens* AP79, AP143, AP193L, và AP254L, được lưu giữ tại Phòng Nông nghiệp Mỹ ngày 27/04/2012, với số hiệu lưu giữ lần lượt là NRRL B-50745, NRRL B-50741, NRRL B-50742, và NRRL B-50743, và NRRL B-50745.

chủng *Bacillus* theo sáng chế có hoạt tính kháng sinh với nhiều mầm bệnh vi khuẩn khác nhau của động vật thủy sinh như cá nuôi (ví dụ, cá da trơn hoặc cá rô phi) và các loài giáp xác (ví dụ, tôm) bao gồm các loài vi khuẩn *Edwardsiella* như *Edwardsiella ictaluri*. Theo một số phương án, thể thực khuẩn được bộc lộ hoặc các biến thể của chúng có thể được sử dụng trong các phương pháp để tiêu diệt hoặc ngăn ngừa sự sinh trưởng của vi khuẩn gây bệnh hoặc nấm của động vật thủy sinh như cá nuôi (ví dụ, cá da trơn hoặc cá rô phi) và các loài giáp xác (ví dụ, tôm). Cụ thể, phương pháp này có thể được sử dụng để phòng trừ hoặc ngăn ngừa nhiễm khuẩn hoặc xâm lấn cá da trơn (ví dụ, *Ictaluri punctatus* Rafinesque) gây ra bởi vi khuẩn gây bệnh hoặc nấm hoặc xâm lấn môi trường trong đó cá da trơn sống hoặc được nuôi trồng (ví dụ, ao nuôi trồng thủy sản). Các phương pháp theo sáng chế cũng có thể được sử dụng để phát hiện sự có mặt của vi khuẩn trong mẫu (ví dụ, mẫu thu được từ động vật thủy sinh bị nhiễm như cá nuôi (ví dụ, cá da trơn hoặc cá rô phi) và các loài giáp xác (ví dụ, tôm), hoặc mẫu được phân lập từ môi trường trong đó động vật thủy sinh như cá nuôi (ví dụ, cá da trơn hoặc cá rô phi) và các loài giáp xác (ví dụ, tôm) sống hoặc được nuôi trồng).

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp sử dụng chủng *Bacillus* theo sáng chế để loại bỏ vi khuẩn gây bệnh hoặc nấm ra khỏi môi trường hoặc thiết bị được sử dụng để nuôi trồng động vật thủy sinh như cá nuôi (ví dụ, cá da trơn hoặc cá rô phi) và các loài

giáp xác (ví dụ, tôm), nhờ đó làm giảm khả năng có thể xâm nhập của vi khuẩn hoặc nấm vào động vật thủy sinh như cá nuôi (ví dụ, cá da trơn hoặc cá rô phi) và các loài giáp xác (ví dụ, tôm).

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp sử dụng chủng *Bacillus* theo sáng chế để điều trị hoặc ngăn ngừa các bệnh gây ra bởi vi khuẩn hoặc nấm gây bệnh (ví dụ, điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh nhiễm trùng huyết đường ruột của cá da trơn (ESC)). Theo các phương án khác nữa, để phòng ngừa hoặc ức chế sự sinh trưởng của vi khuẩn hoặc nấm gây bệnh hoặc để loại bỏ vi khuẩn hoặc nấm gây bệnh, chủng *Bacillus* theo sáng chế có thể được đưa vào môi trường (ví dụ, ao) hoặc thiết bị, hoặc chủng *Bacillus* theo sáng chế có thể được dùng cho động vật thủy sinh như cá nuôi (ví dụ, cá da trơn hoặc cá rô phi) và các loài giáp xác (ví dụ, tôm).

Thuật ngữ “cá da trơn” dùng để chỉ cá thuộc giống *Ictaluri*. Cá da trơn có thể bao gồm loài *Ictaluri punctatus* Rafinesque.

chủng *Bacillus* tạo bào tử theo sáng chế có thể được sử dụng để tiêu diệt hoặc ngăn ngừa sự sinh trưởng của vi khuẩn hoặc nấm gây bệnh cho động vật thủy sinh như cá nuôi (ví dụ, cá da trơn hoặc cá rô phi) và các loài giáp xác (ví dụ, tôm). “Vi khuẩn gây bệnh” có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, loài *A. hydrophila*, *E. ictaluri*, *E. tarda*, *F. columnare*, *Streptococcus iniae*, *F. columnare*, *Yersinia ruckeri*, và *Vibrio*. “Nấm gây bệnh” có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nấm trùn *Saprolegnia*.

chủng *Bacillus* tạo bào tử theo sáng chế có thể được dùng với chất bổ sung để tiêu diệt hoặc ngăn ngừa sự sinh trưởng của vi khuẩn hoặc nấm gây bệnh. Chất bổ sung có thể bao gồm các chất kháng sinh như sulfadimetoxin và ormetoprim, chủng vi khuẩn nhược độc (ví dụ, chủng *E. ictaluri* nhược độc), florfenical, và thể thực khuẩn. Thể thực khuẩn có thể bao gồm thể thực khuẩn có tên gọi là ệeiAU, được lưu giữ trong Bộ sưu tập môi trường nuôi cấy Mỹ (ATCC), đặt tại 10801 University Boulevard, Manassas, Va., 20110-2209, USA, ngày 15 tháng 09 năm 2009 với số truy cập PTA-10342.

Thuật ngữ “mẫu” được dùng trong bản mô tả này theo nghĩa rộng nhất của nó. Mẫu có thể bao gồm mẫu sinh học từ động vật (ví dụ, mẫu sinh học thu được từ động vật thủy sinh như cá nuôi (ví dụ, cá da trơn hoặc cá rô phi) và các loài giáp xác (ví dụ,

tôm)) hoặc mẫu lấy từ môi trường (ví dụ, mẫu nước từ ao hoặc mẫu bề mặt được thâm từ đồ chứa hoặc thiết bị).

Mô tả chi tiết các phương án thực hiện

Các phương án sau nhằm minh họa và không dự định giới hạn đối tượng yêu cầu bảo hộ.

Phương án 1. Chế phẩm thức ăn bao gồm một hoặc nhiều chủng tạo bào tử thuộc giống *Bacillus*.

Phương án 2. Chế phẩm theo phương án 1, trong đó chủng tạo bào tử thuộc giống *Bacillus* là *Bacillus subtilis* hoặc loài *Bacillus* bao gồm trình tự 16S rADN bao gồm SEQ ID NO:1 hoặc bao gồm trình tự 16S rADN có ít nhất khoảng 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% trình tự tương đồng với SEQ ID NO:1.

Phương án 3. Chế phẩm theo phương án 1, trong đó chủng tạo bào tử thuộc giống *Bacillus* là *Bacillus amyloliquefaciens* hoặc loài *Bacillus* bao gồm trình tự 16S rADN bao gồm SEQ ID NO:2 hoặc bao gồm trình tự 16S rADN có ít nhất khoảng 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% trình tự tương đồng với SEQ ID NO:2.

Phương án 4. Chế phẩm theo phương án 1, trong đó chủng tạo bào tử thuộc giống *Bacillus* là loài *Bacillus* bao gồm trình tự 16S rADN bao gồm SEQ ID NO:3 hoặc bao gồm trình tự 16S rADN có ít nhất khoảng 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% trình tự tương đồng với SEQ ID NO:3.

Phương án 5. Chế phẩm theo phương án 1, trong đó chủng tạo bào tử thuộc giống *Bacillus* là chủng được chọn từ nhóm bao gồm AB01, AP79, AP143, AP193L, AP254L, được lưu giữ tại Phòng Nông nghiệp Mỹ vào ngày 27/4/2012, với số hiệu lưu giữ lần lượt là NRRL B-50745, NRRL B-50741, NRRL B-50742, NRRL B-50743, và NRRL B-50744.

Phương án 6. Chế phẩm theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, trong đó chế phẩm thức ăn là chế phẩm thức ăn cho động vật thủy sinh như cá nuôi (ví dụ, cá da trơn hoặc cá rô phi) và các loài giáp xác (ví dụ, tôm).

Phương án 7. Chế phẩm theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, trong đó chủng tạo bào tử thuộc giống *Bacillus* có mặt trong chế phẩm với mật độ ít nhất là khoảng 10^4 CFU/g thức ăn.

Phương án 8. Chế phẩm theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, trong đó chủng tạo bào tử thuộc giống *Bacillus* có mặt trong chế phẩm với mật độ ít nhất là khoảng 10^5 CFU/g thức ăn.

Phương án 8. Chế phẩm theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, trong đó chủng tạo bào tử thuộc giống *Bacillus* có mặt trong chế phẩm với mật độ ít nhất là khoảng 10^6 CFU/g thức ăn.

Phương án 10. Chế phẩm theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, bao gồm một chủng thuộc giống *Bacillus*.

Phương án 11. Chế phẩm theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, bao gồm hỗn hợp của các chủng thuộc giống *Bacillus*.

Phương án 12. Chế phẩm theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, trong đó chủng tạo bào tử thuộc giống *Bacillus* ức chế sự sinh trưởng của một hoặc nhiều vi khuẩn được chọn từ nhóm bao gồm *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella ictaluri*, *Edwardsiella tarda*, *Flavobacterium columnare*, *Streptococcus iniae*, và *Yersinia ruckeri*.

Phương án 13. Chế phẩm theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, trong đó chủng tạo bào tử thuộc giống *Bacillus* ức chế sự sinh trưởng của nấm trùng *Saprolegnia*.

Phương án 14. Chế phẩm theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, còn bao gồm thể thực khuẩn gây nhiễm *E. ictaluri*.

Phương án 15. Chế phẩm theo phương án 14, trong đó thể thực khuẩn là ϕ eiAU.

Phương án 16. Chế phẩm theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, còn bao gồm chất được chọn từ nhóm bao gồm sulfadimetoxin, ormetoprim, và florfenical.

Phương án 17. Chế phẩm theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, còn bao gồm chủng *E. ictaluri* nhược độc.

Phương án 18. Chế phẩm theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu

trên, trong đó chủng tạo bào tử thuộc giống *Bacillus* mẫn cảm với một hoặc nhiều chất kháng sinh chọn từ nhóm bao gồm carbenicillin, ampicillin, spectinomycin, oxacillin, vancomycin, cephalothin, novobiocin, sulfadiazine, amikacin, erytromycin, neomycin, penicillin, chloramphenicol, sulfametoxazol, norfloxacin, gentamicin và ciprofloxacin.

Phương án 19. Phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh ở động vật bao gồm bước cho động vật dùng chế phẩm thức ăn theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên.

Phương án 20. Phương pháp theo phương án 19, trong đó động vật là động vật thủy sinh như cá nuôi (ví dụ, cá da trơn hoặc cá rô phi) và các loài giáp xác (ví dụ, tôm).

Phương án 21. Phương pháp theo phương án 19 hoặc 20, trong đó bệnh cần điều trị là bệnh nhiễm trùng huyết đường ruột.

Phương án 22. Chế phẩm diệt vi sinh vật được điều chế để dùng cho môi trường thủy sinh và chứa lượng hữu hiệu của chủng tạo bào tử thuộc giống *Bacillus* để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh nhiễm trùng huyết đường ruột.

Phương án 23. Chế phẩm theo phương án 22, trong đó môi trường thủy sinh là môi trường trong đó động vật thủy sinh như cá nuôi (ví dụ, cá da trơn hoặc cá rô phi) và các loài giáp xác (ví dụ, tôm) được nuôi trồng.

Phương án 24. Phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh nhiễm trùng huyết đường ruột ở động vật thủy sinh như cá nuôi (ví dụ, cá da trơn hoặc cá rô phi) và các loài giáp xác (ví dụ, tôm) bao gồm bước đưa chế phẩm theo phương án 22 vào môi trường trong đó động vật thủy sinh như cá nuôi (ví dụ, cá da trơn hoặc cá rô phi) và các loài giáp xác (ví dụ, tôm) được nuôi trồng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau nhằm minh họa và không dự định giới hạn đối tượng yêu cầu bảo hộ.

Ví dụ 1 - Phòng trừ sinh học bệnh cá da trơn

Giới thiệu

Nghiên cứu được đề xuất để nhằm tìm ra phương pháp có khả năng cao trong

việc cải thiện tính bền vững với môi trường và khả năng kinh tế trong sản xuất kinh doanh cá da trơn (*Ictalurus punctatus*) ở Đông Nam Mỹ. Bệnh nhiễm trùng huyết đường ruột của cá da trơn (ESC), gây ra bởi *Edwardsiella ictaluri*, và các mầm bệnh vi khuẩn và nấm khác (ví dụ, *Aeromonas hydrophila*, *Flavobacterium columnare*, và *Saprolegnia* spp.) gây ra thiệt hại hàng triệu đô la cho ngành công nghiệp cá da trơn hằng năm. Đối với nhà sản xuất nuôi trồng thủy sản, việc sử dụng các vi sinh vật có lợi để phòng trừ sinh học bệnh có các ưu điểm mong đợi là 1) chi phí dùng thấp, 2) không gây tác động bất lợi cho các vi khuẩn khác, môi trường, hoặc người tiêu dùng, và 3) kết hợp sức mạnh giữa chiến lược phòng trừ sinh học và chiến lược phòng trừ bệnh hiện hành.

Nghiên cứu này về cơ bản sẽ mang lại lợi ích cho nhà sản xuất nuôi trồng cá da trơn bằng cách cung cấp cho họ một chiến lược khác để phòng trừ mầm bệnh tác động đến cá da trơn, do đó tạo điều kiện thuận lợi cho việc sản xuất hiệu quả hơn và tác động có lợi đến đời sống kinh tế cho người nuôi trồng thủy sản ở các bang nông thôn phía Đông Nam. Hơn nữa, bằng cách giảm hoặc loại bỏ việc phải xử lý bằng chất kháng sinh (hoặc hóa chất khác) ao nuôi trồng thủy sản, kiểm soát sinh học có thể làm giảm các tác động xấu đến môi trường sản xuất nuôi trồng thủy sản. Mong muốn có được công nghệ thân thiện môi trường và hiệu quả về chi phí với mục tiêu cuối cùng là ứng dụng các chất kiểm soát sinh học để giảm tỷ lệ mắc và mức độ nghiêm trọng của bệnh trong ao nuôi trồng thủy sản.

Nuôi trồng cá da trơn sông đã trở thành một trong những ngành công nghiệp sản xuất động vật thành công nhất ở Bắc Mỹ trong 30 năm qua, và hiện là ngành công nghiệp nuôi trồng thủy sản lớn nhất ở Mỹ. Trong năm 2009, hơn 210 triệu kg cá da trơn được xử lý chiếm hơn 360 triệu USD trong tổng doanh số bán hàng tại hồ nuôi. Hơn 90% tất cả cá da trơn được sản xuất ở Alabama, Arkansas, Louisiana và Mississippi và chủ yếu được trồng ở ao đất khác nhau có kích thước từ 2 đến 10 ha (USDA, Part I: Reference of Fingerling Catfish Health and Production Practices in the United States, 2003; USDA, Part II: Reference of Foodsize Catfish Health and Production Practices in the United States, 2003). Người nuôi trồng cá da trơn thường bảo quản cá ở mật độ cao và sử dụng hệ nuôi cấy trong đó các điều kiện môi trường có

thể thay đổi rất nhanh. Những điều kiện bất lợi này càng gây bất lợi cho cá, tạo điều kiện thuận lợi cho sự khởi đầu và lây lan của các bệnh cá da trơn khác nhau. Kết quả là nhiều bệnh đó xuất hiện và trở thành đại dịch trong ngành công nghiệp cá da trơn. Bệnh truyền nhiễm đặc hữu quan trọng nhất là ESC, dẫn đến tổn thất hơn 78% tất cả các hoạt động với dịch được báo cáo trong 42% các ao sản xuất cá làm thức ăn (USDA, Part I: Reference of Fingerling Catfish Health and Production Practices in the United States, 2003; USDA, Part II: Reference of Foodsize Catfish Health and Production Practices in the United States, 2003). Sự kết hợp của giá thức ăn tăng lên cùng tỷ lệ mắc bệnh cao càng gây khó khăn về kinh tế cho các nhà sản xuất cá da trơn sông.

E. ictaluri là vi khuẩn Gram âm, hình que đặc hiệu vật chủ cao đối với cá da trơn (Plumb, 1999). Tác động kinh tế của loại vi khuẩn này trong ngành cùg nghiệp cò tra đò tăng lên đáng kể từ khi được mô tả lần đầu tiên như là tác nhân của ESC năm 1981 (Hawke *et al.*, 1981). Ngày nay, người ta ước tính rằng chi phí ESC trong ngành cá da trơn gây thiệt hại cò trực tiếp trong khoảng từ 20\$ đến \$ 30,000,000 hàng năm (Delbos *et al.*, 2001). Nhiễm trùng huyết đường ruột xảy ra dưới các hõnh thức cấp tính, phụ cấp tính, món tính ở cá da trơn (Hawke *et al.*, 1981). Cò bị mắc ESC lơ đờ và thường bơi chậm, xoắn ốc thất thường ở bề mặt của nước. Khi bệnh tiến triển thì xuất huyết và loét xuất hiện dọc hai vòy và lưng của cò. Ở cò bị bệnh món tính, một tổn thương mở có thể phát triển trên đỉnh đầu, tạo cho bệnh có tên gọi chung là ‘bệnh lõ trên đầu’.

A. hydrophila cũng là một tác nhân gây bệnh của vi khuẩn Gram òm, có phạm vi vật chủ rộng hơn so với *E. ictaluri* bằng cách gây ra nhiễm trùng huyết do xuất huyết ở tất cả các loài cá nước ngọt trên toàn thế giới (Cipriano *et al.*, 1984; Ford *et al.*, 1991). Thiệt hại do nhiễm khuẩn *A. hydrophila* thường có mức độ nhỏ hơn nhiều so với những thiệt hại do *E. ictaluri* gây ra và nó thường được xem là tác nhân gây bệnh thứ phỏt liên quan đến căng thẳng, xử lý hoặc nhiễm trùng cơ hội (Plumb, 1999); Tuy nhiên, đại dịch lỏy nhiễm *A. hydrophila* năm 2009 giữa các nhà sản xuất cá da trơn Alabama chưa từng có trong độc tính của nó và phỏ biến nhanh chóng trong kiểm soát sinh học các ao mang bệnh cá da trơn (Terhune, Liles, *et al.*, manuscript in

preparation). Các dịch bệnh của chủng *A. hydrophila* mới đó được ghi nhận trên 48 trang trại ở Tây Alabama và gây ra thiệt hại ước tính 3,8 triệu pao cò, loài có kích thước về cơ bản có thể thu hoạch được với đầu vào chi phí sản xuất đó được tính toán (W. Hemstreet, personal communication, Alabama Fish Farming Center, Greensboro, AL).

Cá da trơn non dễ bị ESC và các mầm bệnh khác. Sự bùng nổ dịch thường bắt đầu vào cuối thông tôm hoặc thông chón khi nhiệt độ nước giảm từ nhiệt độ mùa hè cao điểm đến khoảng nhiệt độ có lợi cho sự phát triển của *E. ictaluri* (22-28°C). Một khi cá đó sống sót sau nhiễm trùng ban đầu, cò có thể trở nên miễn dịch với bệnh truyền nhiễm sau đó do phản ứng bởi hệ miễn dịch mắc phải (Klesius, 1992). Thụng thường ao được quản lý để sản xuất cò có kích thước dựng làm thức ăn được thả lại bằng cách lấy giống nhiều lần trong suốt chu kỳ sản xuất để cho phép thu hoạch liên tục trong ao. Do đó, ao sản xuất cá dùng làm thức ăn thường chứa hỗn hợp của cò ở độ tuổi và tõnh trạng miễn dịch khác nhau. Hầu hết các cá trưởng thành trong một ao nuôi cá dùng làm thức ăn đó trải qua một dịch bệnh và miễn dịch với căn bệnh này nhưng một tỷ lệ trong số chúng sẽ mang các chất này (Klesius, PH 1992). Vỡ vậy, khi cò giống được thả vào ao thì cá dùng làm thức ăn tiếp xúc với các chất này trong môi trường ao nuôi sẽ làm cho chúng dễ thành dịch bệnh (Wise *et al.*, 1998).

Nỗ lực ban đầu để kiểm soát ESC, *A. hydrophila*, và vi khuẩn gây bệnh khác dựa trên việc cho ăn thức ăn chứa thuốc kháng sinh. Trong 20 năm qua, chỉ có thuốc kháng sinh được dõn nhón của Cục Quản lý thực phẩm và dược phẩm Mỹ (FDA) kiểm soát nhiễm trùng ESC và *Aeromonas* lần lượt là Rometđ (ormethoprim-sulfamethoxine) and Terramycinđ (oxytetracycline). FDA gần đây đó phờ duyệt việc sử dụng Aquaflor đ (florfenical) cho dịch ESC và nú hiện đang được Schering Plough Corp. bán trên thị trường (Gaunt *et al.*, 2003; Gaunt *et al.*, 2004). Tuy nhiên, thức ăn dạng thuốc là đắt và thường có hiệu quả thấp trong ứng dụng thực tế thương mại do cò bị bệnh có thể không ăn đủ lượng thức ăn thuốc để loại bỏ nhiễm khuẩn ra khỏi quần thể được xử lý. Ngoài ra, Aquaflor chỉ có thể được dựng với thức ăn thú y chỉ định cần để xác định vi khuẩn và được ghi đơn bởi bác sĩ thú y được cấp phép, điều này có thể tiếp tục trở hoón việc tiến hành các hành động xử lý đúng đắn. Việc sử dụng nội hấp

chất kháng sinh cũng đó dẫn đến sự phát triển tính kháng của vi khuẩn (Khoo, 2001). Các điều tra gần đây về ao nuôi cá tra ở Stoneville, MS đó cho thấy sự hiện diện của plasmid trong thể phõn lập của bệnh *A. ictaluri* gây ra tính kháng với Aquaflor đ 24.

Hầu hết các nhà sản xuất đó kết hợp việc sử dụng các ứng dụng thực tế chế độ cho ăn nghiêm ngặt trong quỏ trõnh bưng phõt ESC để giảm tỷ lệ tử vong. Tuy nhiên, với việc làm giảm đầu vào của thức ăn thì sự tăng trưởng của cỏ bị giảm sýt, ảnh hưởng nghiêm trọng đến lợi nhuận của nhà sản xuất (Wise *et al.*, 1998). Gần đây, chủng *E. ictaluri* sống, nhược độc đã được phát triển nhằm mục đích chủng ngừa và cho thấy đã bảo vệ một cách hạn chế sự nhân giống cá da trơn khi được chủng ngừa ở 10 ngày tuổi, trong cả điều kiện thử nghiệm và thương mại (Lim *et al.*, 2003; Shoemaker *et al.*, 1999; Wise *et al.*, 1998; Wise *et al.*, 2001). Tuy nhiên, vacxin này đã không được người nuôi trồng cá da trơn chấp nhận một cách rộng rãi vì bệnh thường xảy ra ở các quần thể cá đã được chủng ngừa và các chi phí trả trước có thể quỏ cao.

Mặc dù có các chiến lược kiểm soát khác nhau được sử dụng phòng ngừa bệnh cá da trơn nhưng thiệt hại đáng kể vẫn cũn xảy ra do các tác nhân gây bệnh, phương pháp tiếp cận bổ sung khác có thể được tiếp nhận bởi các nhà sản xuất cỏ da trơn. Một chất phòng trừ sinh học có hiệu quả cần phải có hiệu lực tốt, chi phí rất thấp, hoạt tính kháng khuẩn mạnh, không gây tác động xấu đến môi trường, và lý tưởng là sẽ cho phõp kinh doanh cỏ tra dưới dạng sản phẩm sinh trưởng hữu cơ. Chất phòng trừ sinh học gần đây đó được xác định bởi các tởc giả sống chế này

Lý do và tầm quan trọng

Mỗi động vật là một vật chủ cho một hệ sinh thỏi vi sinh vật phức tạp, với nhiều môi trường sống của vi sinh vật duy nhất trên và trong mỗi động vật. Cộng đồng vi khuẩn phức tạp này có thể bảo vệ chống lại bệnh tật và trợ giúp trong việc trao đổi các chất dinh dưỡng cần thiết. Vi sinh vật có lợi đang được khai thác như chất chủng ngừa trong cả nông nghiệp và nuôi trồng thủy sản, để ức chế tác nhân gây bệnh và tăng cường sức khỏe và sự phát triển của cõy trồng và động vật. Nghiên cứu được đề xuất này sẽ phát triển các chủng vi khuẩn *Bacillus* để sử dụng trong nuôi trồng thủy sản, để

1) ngăn ngừa bệnh do mầm bệnh vi khuẩn và nấm, 2) thúc đẩy ứng dụng thực tế nuôi trồng thủy sản bền vững, và 3) làm lợi cho đời sống kinh tế của nhà sản xuất nuôi trồng thủy sản ở bang Alabama.

Đã chứng minh được rằng việc sử dụng biện pháp phòng trừ sinh học để ngăn ngừa và phòng trừ các bệnh gây thiệt hại cho nông nghiệp đã làm giảm nhu cầu về hóa chất trừ dịch hại và các chất kháng sinh trong sản xuất cây lương thực (Kloepper *et al.*, 2004; Lewis *et al.*, 1997; Zehnder *et al.*, 2001). Việc sử dụng trên toàn thế giới các độc tố trừ dịch của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* (Bt) để thay thế cho thuốc trừ sâu là một trong những ví dụ về khả năng của các vi sinh vật có lợi và các sản phẩm tự nhiên để làm lợi cho sự an toàn thực phẩm, giảm bớt sự phụ thuộc vào việc xử lý bằng hóa chất, và thúc đẩy sản xuất bền vững về kinh tế và môi trường (Sanchis, 2008). Như trong nông nghiệp, nuôi trồng thủy sản dựa vào hệ thống độc canh mật độ cao, cung cấp điều kiện lý tưởng cho sự phát triển của vi sinh vật gây bệnh. Việc điều trị bệnh cho cá và động vật giáp xác được nuôi trong trang trại bằng chất kháng sinh dẫn đến tần suất ngày càng tăng của các mầm bệnh kháng thuốc kháng sinh có thể được đưa vào quần thể người, và làm giảm giá trị thị trường cho nông dân buộc phải phụ thuộc vào phương pháp phòng trừ dịch bệnh bằng hóa học tốn kém. Do nhu cầu tăng đối với nguồn protein động vật có chất lượng trong thế kỷ 21, với mức suy giảm nguồn cỏ tự nhiên có thể xảy ra, có nhu cầu xó hội về các phương pháp bền vững và hiệu quả với môi trường có thể được đưa vào ứng dụng thực tế nuôi trồng thủy sản (Harlander, 2002; Serageldin, 1999).

Các tác giả sáng chế đã chứng minh được hiệu quả của vi khuẩn có lợi, các chi tạo bào tử thuộc giống *Bacillus*, có tác dụng làm chất phòng trừ sinh học trong việc ngăn ngừa bệnh ở thực vật do mầm bệnh vi khuẩn hoặc nấm (Kloepper *et al.*, “Theory and applications of rhizobacteria for transplant production and yield enhancement”, 2004; Kloepper *et al.*, “Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp.”, 2004; Kokalis-Burelle *et al.*, 2003). Trong một số trường hợp, cũng đã phát hiện ra rằng chủng *Bacillus* thúc đẩy một cách mạnh mẽ sự sinh trưởng của cây trồng và làm tăng mức độ hấp thụ các chất dinh dưỡng trong đất của thực vật (Enebak

et al., 1998; Kloepper *et al.*, 2004; Kokalis-Burelle *et al.*, 2003). Bào tử của *Bacillus* có thể được áp dụng cho các hạt giống hoặc rễ của thực vật dẫn đến làm giảm đáng kể các triệu chứng bệnh và tỷ lệ tử vong khi thực vật tiếp xúc với mầm bệnh. Việc thu gom trên phạm vi rộng chủng *Bacillus* phòng trừ sinh học có thể sử dụng để chống lại mầm bệnh thực vật (n=160), cùng với môi trường nuôi cấy *Bacillus* được phân lập từ chất đồng nhất ruột cá da trơn (n=17), được thử nghiệm về hoạt tính phòng trừ sinh học đối với nhóm thử nghiệm bảy mầm bệnh là nguyên nhân chính của bệnh trong nuôi trồng thủy sản và thất thoát về kinh tế trên toàn thế giới (ví dụ, Fig. 1). Đặc biệt, mỗi thể phân lập vi khuẩn được thử nghiệm về hoạt tính đối với mầm bệnh vi khuẩn *A. hydrophila*, *E. ictaluri*, *E. tarda*, *F. columnare*, *Streptococcus iniae*, *F. columnare*, *Vibrio harveyi*, *Yersinia ruckeri*, và nấm trứng *Saprolegnia*. Ngoài bộ sưu tập chủng *Bacillus* này, chủng hữu hiệu nhất để sử dụng trong nuôi trồng thủy sản (n=21) đã được xác định dựa vào mức ức chế *in vitro* của chúng đối với sự phát triển mầm bệnh. 21 chủng vi khuẩn *Bacillus* đó được thử nghiệm về khả năng tồn tại và phát triển của chúng trong ruột của cá da trơn, bằng cách phun bào tử *Bacillus* riêng vào thức ăn của cá da trơn (~ 106 CFU/g thức ăn), cho cá da trơn giống ăn thức ăn có bổ sung vi khuẩn *Bacillus* trong một tuần, sau đó cho ăn thức ăn này thường xuyên trong ba ngày, và sau đó giết chúng và ước tính số lượng vi khuẩn *Bacillus* trong mỗi g mù ruột (Fig. 2). Nhiều chủng trong số các chủng vi khuẩn *Bacillus* đạt con số cao (> 108 CFU/g ruột) cho thấy rằng chúng đó xâm chiếm thành công vào đường ruột-dạ dày của cá da trơn, trong khi đó bảy chủng có mức vi khuẩn *Bacillus* tương tự như nhóm kiểm chứng (từ các quần thể ruột). Kiểm tra liên tục sẽ xác định trình tự gen 16S rRNA của các khuẩn lạc *Bacillus* đại diện thu hồi từ ruột cỏ tra, khẳng định rằng đây là những chủng đó được đưa vào cơ thể động vật qua nguồn thức ăn được bổ sung.

“Cốc tai *Bacillus*” được điều chế bằng cách chọn lọc một số chủng *Bacillus* và đưa bào tử *Bacillus* này vào thức ăn của cá da trơn bằng khoảng 10^5 CFU cho mỗi chủng/g thức ăn. Thức ăn có bổ sung *Bacillus* được cá da trơn giống (n=15 cho mỗi thùng, 5 thùng cho mỗi nhóm xử lý) ăn trong hai ngày trước khi gây nhiễm bằng cách thả 2×10^5 CFU/ml chủng *E. ictaluri* S97, và sau đó ghi lại tỷ lệ tử vong theo thời gian. Quan sát được tỷ lệ tử vong giảm đáng kể đối với nhóm cá da trơn được ăn thức

ăn có bổ sung *Bacillus* so với nhóm đối chứng (Fig. 3). Thử nghiệm này đã chứng minh được rằng bào tử *Bacillus* được đưa vào thức ăn của cá da trơn có khả năng làm giảm bệnh và tỷ lệ tử vong ở mô hình bệnh trong bể nuôi có kiểm soát. Cùng trong đề xuất này, các nhà khoa học sẽ thử nghiệm chủng *Bacillus* phòng trừ sinh học để phòng trừ bệnh ở cá da trơn, thực hiện các thử nghiệm quan trọng để phát triển các chủng *Bacillus* này cho ứng dụng phòng trừ sinh học.

Mặc dù với triển vọng của vi sinh vật lợi khuẩn có lợi cho phòng trừ dịch bệnh, lĩnh vực khoa học này vẫn bị hạn chế do thiếu sự chặt chẽ về mặt khoa học trong việc đánh giá một số chế phẩm sinh học được đề xuất, và cần phải đánh giá một cách hệ thống nhiều tác nhân sinh học có thể có hiệu quả và đạt được phê duyệt quy định. Các thử nghiệm được đề cập trong bản mô tả này sẽ 1) xác định chủng vi khuẩn *Bacillus* cụ thể có thể được sử dụng để phòng trừ dịch bệnh thông qua ứng dụng vào thức ăn cá da trơn sông, 2) hoàn thành trình tự bộ gen đối với chủng vi khuẩn *Bacillus* cụ thể cho thấy hứa hẹn tốt nhất trong phòng ngừa dịch bệnh, 3) xác định cấu trúc của kháng sinh được sản xuất bởi mỗi chủng vi khuẩn *Bacillus*, 4) thực hiện nghiên cứu hiệu quả với liều lượng lý tưởng và đặt thời gian cho việc định vi khuẩn *Bacillus*, và 5) đánh giá sức khỏe cá da trơn sau khi cho ăn lâu dài thức ăn có bổ sung *Bacillus*. Trong nghiên cứu này, các chủng vi khuẩn *Bacillus* được lựa chọn thông qua đánh giá hợp lý hiệu quả tương đối của chúng trong phòng ngừa dịch bệnh, và cho các tiêu chí cụ thể trên đây là rất quan trọng để sử dụng thành công trong sản xuất cá da trơn sông.

Phương pháp

Thử nghiệm lợi ích tương đối của mỗi chủng *Bacillus* trong phòng trừ ESC. Nhiễm khuẩn thử nghiệm có kiểm soát trong bể nuôi sẽ được sử dụng để đánh giá phòng trừ sinh học vi khuẩn đối với mỗi chủng vi khuẩn đặc hiệu. Một số biến sẽ được đánh giá khi thiết lập tác dụng bảo vệ của các môi trường nuôi cấy vi khuẩn đối với hoạt tính phòng trừ sinh học tương ứng của chúng. Do việc bảo quản lâu ngoài môi trường có thể là yêu cầu đối với ứng dụng thương mại, vi khuẩn tạo thành nội bào tử trong giống *Bacillus* đã được chọn để đánh giá về khả năng phòng trừ sinh học của chúng. Trong số 15 môi trường nuôi cấy *Bacillus* 1) biểu hiện hoạt tính ức chế mạnh

đối với nhiều mầm bệnh trong nuôi trồng thủy sản (ví dụ, Fig. 1), và 2) có thể sống sót và sao chép trong ruột cá da trơn (Fig. 2), chúng sẽ được sàng lọc một cách riêng rẽ để xác định chủng hữu hiệu nhất về tác dụng bảo vệ *in vivo* đối với ESC trong bể nuôi gây nhiễm. Mỗi môi trường nuôi cấy *Bacillus* sẽ được sinh trưởng trên môi trường tạo bào tử trong 48 giờ và sau đó các tế bào vi khuẩn sẽ được loại bỏ bằng gạc bông vô trùng và tạo huyền phù trong nước vô trùng trong ống hình nón dung tích 50 ml. Sau khi rửa hai lần bằng nước vô trùng, huyền phù chứa bào tử sẽ được thử nghiệm về đơn vị tạo thành khuẩn lạc (CFU) sống, và sau đó được sử dụng để phủ thức ăn của cá da trơn với khoảng 10^7 vi khuẩn CFU/g thức ăn bằng cách phun huyền phù chứa bào tử ở liều lượng 8% (thể tích/khối lượng). Thức ăn được phủ vi khuẩn sẽ được làm khô trước khi cho cá da trơn ăn. Thức ăn được phủ bào tử *Bacillus* sẽ được bảo quản ở 4°C trước khi cho ăn và đã dự đoán được rằng thức ăn này sẽ ổn định cao trong khoảng thời gian bảo quản lâu dài (nhiều tháng) do sự tạo thành nội bào tử.

Đánh giá chủng *Bacillus* đơn lẻ trong việc ngăn ngừa ESC trong bể nuôi gây nhiễm có kiểm soát. Trong các thử nghiệm gây nhiễm này, bốn bể nuôi cho mỗi chủng *Bacillus*, hoặc nhóm đối chứng, với 15 cá da trơn nhỏ không chứa mầm bệnh đặc hiệu cho mỗi bể nuôi sẽ được sử dụng. Một tuần trước khi gây nhiễm, thức ăn của cá da trơn được phủ bằng chủng *Bacillus* đặc hiệu sẽ được cho cá da trơn nhỏ ăn no một lần mỗi ngày, với thùng đối chứng tiếp nhận các tế bào vi khuẩn tiết trùng (bằng cách hấp), hoặc không bổ sung vi khuẩn. Đối với thử nghiệm gây nhiễm, môi trường nuôi cấy *E. ictaluri* pha log là khoảng 10^5 CFU trong mỗi ml sẽ được bổ sung vào bể nuôi trong điều kiện tĩnh. Mức sống sót của cá sẽ được kiểm tra hàng ngày với tỷ lệ sống sót cuối trong mỗi xử lý được sử dụng để đánh giá khả năng ngăn ngừa sự phát triển ESC của mỗi chủng *Bacillus*. Thùng đối chứng sẽ tiếp nhận thức ăn có bổ sung vi khuẩn sống nhưng sẽ không tiếp nhận *E. ictaluri* để xác nhận rằng không có tác động bất lợi của *Bacillus* đến khả năng sống sót của cá da trơn.

Xác định đặc điểm hợp chất kháng sinh được sản xuất bằng mỗi chủng *Bacillus*. đã phát hiện ra rằng mỗi chủng *Bacillus* sản xuất chất kháng sinh tiết hợp chất ức chế vào môi trường sinh trưởng của chúng. Dịch nổi bề mặt không chứa tế bào của chủng *Bacillus* sinh trưởng trong môi trường tối thiểu M9, hoặc trong môi trường phức hợp

canh thịt đậu tương tripxin, có hoạt tính kháng sinh đối với mầm bệnh trước đó được thử nghiệm trong thử nghiệm sinh học trên cơ sở tế bào (ví dụ, Fig.1). Xác định hợp chất kháng sinh được sản xuất bằng chủng *Bacillus* sẽ rất quan trọng để phê chuẩn đăng ký cuối cùng về việc sử dụng các chủng này, riêng rẽ hoặc kết hợp, để phòng trừ bệnh.

Tinh chế một phần chất kháng sinh bằng sắc ký lỏng (LC). Trước tiên, các hợp chất sẽ được tinh chế bằng cách sử dụng LC pha đảo và loại trừ kích cỡ và được thử nghiệm sử dụng các thử nghiệm sinh học được bộc lộ trong bản mô tả này. Các hợp chất được tinh chế một phần sẽ phối nhiễm với phần chiết hữu cơ khác nhau và các phần tách pha để xác định các điều kiện để chiết nhanh ra khỏi môi trường đã tiêu hao. Sau khi xác định các điều kiện này, việc tinh chế sẽ tiến hành bằng cách sử dụng chỉ số lưu C18 đã xác định là bước tinh chế 'cuối'. Tiêu chí này sẽ cố gắng để đạt được việc tinh chế nhanh hợp chất có hoạt tính sinh học, giới hạn việc tinh chế ở quy trình ba giai đoạn khi có thể.

Nhiều con đường tổng hợp thuốc tạo ra nhiều hơn một sản phẩm. Ngoài các hợp chất bất hoạt, chúng có thể bao gồm các chất kháng sinh liên quan về mặt hóa học kết hợp thay đổi hoạt lực và phổ hoạt tính. Ví dụ, vi khuẩn sản xuất epothilone, ứng viên chất chống ung thư, tiết epothilone tương tự về mặt hóa học A, B, và D vào môi trường của nó (Tang *et al.* 2000). Xảy ra đồng thời các phân tử giống thuốc như các phân tử có thể được tách bằng LC dưới dạng nhiều pic hoạt tính giữa các phân đoạn. Bước tinh chế một phần LC ban đầu sẽ tách các hoạt chất và xác định đặc điểm từng phổ hoạt tính kháng sinh của hợp chất riêng rẽ. Việc tinh chế các hợp phần riêng rẽ đến đồng nhất sẽ làm tăng mạnh triển vọng phân tích quang phổ khối xuôi dòng (MS) thành công.

Ba dạng phân tử kháng sinh có thể thu được: peptit nhỏ, phân tử hữu cơ, hoặc lipid. Sắc ký loại trừ kích cỡ và C18 có thể sẽ tách các nhóm này. Việc giữ lại trên C18 không thành công có thể đòi hỏi phải thử bổ sung hóa chất; tuy nhiên, trong các sàng lọc ban đầu các chất kháng sinh *Bacillus*, các tác giả sáng chế ưu tiên các hoạt chất UV được xem là đơn phân tán trong tinh chế ban đầu. Việc thay đổi hệ dung môi và pH sẽ được sử dụng để tăng cường việc tách hỗn hợp phức, trong khi các thử nghiệm sinh

học được đề cập trong bản mô tả này cung cấp công cụ mạnh để theo dõi tính nguyên vẹn của các phân tử. Các hoạt chất có thể được tinh chế định lượng sẽ được phân tích về thông tin cấu trúc bởi LC/MS. Nhiều rào cản tiềm năng có thể cản trở việc tinh chế hợp chất. Một số hoạt tính sinh học là do nhiều phân tử dưới đơn vị có thể làm mất hoạt tính khi các hợp phần được tách bằng sắc ký (ví dụ, violacein). Ngoài ra, solvat hóa và các xử lý khác trong quá trình sắc ký lỏng có thể gây bất hoạt một số phân tử. Để thấy rõ giữa hai tùy chọn này, các phân đoạn sắc ký khác nhau có thể được kết hợp và thử nghiệm về sự phục hồi của hoạt tính.

Xác định đặc tính hóa học của các hoạt chất. Xác định đặc tính hóa học của các hoạt chất sẽ được thử bằng cách sử dụng sắc ký bản mỏng và phân tích MS. Sắc ký bản mỏng (TLC) sẽ được sử dụng làm tiêu chuẩn rẽ để nghiên cứu tính đồng nhất của hợp chất cuối (ví dụ, theo dõi bằng UV, hóa than axít sulfuric) và chức hóa học (ví dụ, tính phản ứng ninhydrin hoặc phản ứng axetyl hóa) đối với các chất kháng sinh được sản xuất bằng chủng *Bacillus*. Các thử nghiệm hóa học ban đầu này sẽ đặt nền tảng cho phân tích phức hợp như MS và NMR. Các điều kiện LC/MS cũng sẽ cho phép phá vỡ sự ức chế ion tiềm năng bất kỳ có thể có mặt trong hỗn hợp mẫu. Các thử nghiệm LC/MS khác nữa cũng sẽ có giá trị trong việc sàng lọc tiêu chuẩn tinh chế. Các thử nghiệm khối chính xác và LC/MS/MS sẽ được thực hiện để sắp xếp các hợp chất vào các nhóm tương tự về mặt cấu trúc. Dữ liệu cấu trúc từ một vòng LC/MS/MS thường không đủ để xác định đầy đủ cấu trúc phân tử. Tuy nhiên, dữ liệu có thể được làm khớp với các giá trị trong tài liệu để xác định các hợp chất được mô tả trước đó. Ngay cả dữ liệu cấu trúc không hoàn chỉnh có thể được dùng để dự đoán độ tan và độ ổn định, và xác định phân tử lượng có thể tạo ra dung dịch ở các nồng độ mol đã biết. Khả năng để điều chế nồng độ đã biết của các hợp chất kháng sinh là quan trọng để xác định hoạt lực và tính gây độc tế bào. Các phân tích cấu trúc hóa học sẽ được thực hiện. Dữ liệu LC/MS sơ bộ sẽ nhằm xác định cấu trúc phân tử hoạt động. Việc chiết và phân tích hóa học để tìm ra cấu trúc của phân tử sản phẩm là các quy trình tương đối đắt. Để tiết kiệm ngân sách dự án, các phân tích cấu trúc hóa học hoàn chỉnh sẽ được thực hiện chỉ với số lượng nhỏ (ví dụ, <6) các hợp chất kháng sinh có hoạt tính cao đã qua được các đánh giá trước đó, và tương ứng với chủng *Bacillus* được xác định vì có

hoạt tính phòng trừ sinh học đáng kể. ứng viên phân tử triển vọng từ mỗi nhóm tương tự về mặt cấu trúc sẽ được xác định đặc điểm tiếp bằng cách sử dụng bộ hoàn chỉnh kỹ thuật kính quang phổ (UV-vis, UV-vis-NIR, FT-IR, FT-Raman, GC-FTIR, Raman cộng hưởng, và quang phổ NMR). Trong pha ban đầu, thử nghiệm ^1H và ^{13}C NMR (ở độ giàu tự nhiên) một kích thước và thử nghiệm NMR ^1H - ^{13}C (ở độ giàu tự nhiên) nhiều kích thước phổ tương tác dị hạt nhân qua một liên kết (Heteronuclear Single Quantum Coherence - HSQC) sẽ được thực hiện để phân loại các hợp chất. Phân tích NMR đầy đủ cũng có thể được thực hiện.

Hoạt lực tương đối xác định được của các hợp chất kháng sinh đối với mầm bệnh khác nhau. Dữ liệu hoạt lực tuyệt đối và tương đối có thể được sử dụng để xếp loại các hợp chất về khả năng dùng làm các chất kháng sinh của chúng. Mỗi mầm bệnh vi khuẩn và nấm được thử nghiệm trước đó ($n=7$, xem trên đây) sẽ phơi nhiễm với chuỗi pha loãng của hợp chất kháng sinh đã tinh chế để xác định các nồng độ ức chế tối thiểu (MIC). Các hợp chất đã tinh chế và dữ liệu phân tử lượng từ phân tích cấu trúc LC/MS sẽ được sử dụng để hòa tan các hợp chất đến nồng độ đã biết. Các điều kiện và môi trường thử nghiệm chất kháng sinh chuẩn (canh thịt Mueller-Hinton được điều chỉnh bằng cation, khi thích hợp) sẽ được sử dụng để đánh giá hoạt lực chất kháng sinh. Tóm lại, các môi trường nuôi cấy vi khuẩn trong pha sinh trưởng log sẽ được chủng ngừa với khoảng rộng của nồng độ chất kháng sinh, ba lần, và ức chế sinh trưởng sẽ được xác định đối với đối chứng âm tính (dung môi hoặc chất đệm được sử dụng cho hợp chất kháng sinh). Động học sinh trưởng sẽ được xác định cho mỗi vi khuẩn loài để tính toán MIC_{50} (50% ức chế sinh trưởng), và mức độ hiệu nghiệm của mỗi hợp chất sẽ so với các hợp chất kháng sinh đã biết khác. đối chứng dương tính sẽ bao gồm các chất kháng sinh thuộc các nhóm khác nhau với hoạt lực đã được xác định trước đó.

Sắp xếp trình tự bộ gen của chủng phòng trừ sinh học *Bacillus* hữu hiệu nhất. Chủng *Bacillus* được xác định bằng các thử nghiệm trong bản mô tả này có thể được sắp xếp trình tự. Thông tin trình tự ADN thu được có thể được sử dụng để bắt đầu hệ thống đo đặc hiệu chủng trên cơ sở ADN để theo dõi sự chuyển động của chủng có lợi được đưa vào trong môi trường. Ngoài ra, xử lý này sẽ thu được bản tóm tắt di truyền

học mở rộng về con đường sinh tổng hợp liên quan đến tổng hợp sản phẩm tự nhiên và chỉ ra khả năng trao đổi chất và enzym của mỗi chủng, để có thể sử dụng trong tương lai các trình tự bộ gen này để thử nghiệm về sự biểu hiện toàn bộ gen *Bacillus* và để tăng cường sinh tổng hợp kháng vi khuẩn trong quá trình phòng trừ sinh học.

Sắp xếp trình tự bộ gen và tập hợp của chủng *Bacillus*. Kích thước bộ gen của mỗi chủng *Bacillus* tương lai sẽ được ước tính bằng điện di gel trường xung (PFGE). Đa số các bộ gen *Bacillus* có kích thước nằm trong khoảng từ 4 đến 7 Mbp, vì thế sử dụng phương pháp sắp xếp trình tự thế hệ tiếp theo có thể tạo ra một cách dễ dàng 50 lần vùng trùng lặp của bộ gen *Bacillus*. Phương pháp kết hợp sử dụng cả 454 giải trình tự cho > 30 lần vùng trùng lặp sắp xếp trình tự bộ gen (chiều dài đọc ~500 bp), và > 50 lần vùng trùng lặp sắp xếp trình tự bộ gen bằng cách sử dụng phương pháp sắp xếp trình tự Illumina (chiều dài đọc ~70 bp cặp đầu tận) là chuẩn tối ưu cho sắp xếp trình tự bộ gen vi khuẩn *một lần nữa*. Môi trường nuôi cấy *Bacillus* sẽ được sinh trưởng trên quy mô lớn (500 ml) để chiết ADN, và ADN bộ gen sẽ được điều chế dưới dạng thư viện phụ được mã vạch và sắp xếp trình tự. Bằng cách sử dụng một định dạng 454, sẽ thu được mức sắp xếp trình tự đủ cho một bộ gen *Bacillus*. Trình tự bộ gen này sẽ được tập hợp vào bộ gen liên kết. Sinh tin học phần mềm hộp bưu kiện, CLC Bio Genome Workbench sẽ được sử dụng để thực hiện chú thích và tập hợp *bộ gen* một lần nữa hiệu suất cao. Cụ thể, phân tích bộ gen sẽ cố gắng để xác định con đường di truyền liên quan đến tổng hợp chất kháng sinh, và quét bộ gen làm căn cứ cho gen bất kỳ có khả năng liên quan đến việc sinh bệnh (ví dụ, hemolysin, độc tố). Danh mục các khung đọc mở (ORF) dự đoán sẽ được xác định bằng cách sử dụng mô hình Markov ẩn nhằm vào bộ gen *Bacillus* được sắp xếp trình tự hoàn chỉnh khác. Dữ liệu về *Bacillus* ORF sẽ so với dữ liệu GenBank nr/nt nhờ các tra cứu thuật toán BLAST, và chú thích sơ bộ được tạo ra theo kết quả GenBank cao nhất cho mỗi ORF tương ứng. bộ gen *Bacillus* hoàn chỉnh (hoặc gần hoàn chỉnh) sẽ là nguồn có giá trị cho các thử nghiệm khai thác gen và biểu hiện gen để hỗ trợ các cơ hội tài trợ ở khu vực xa.

Tạo ra thể đột biến *Bacillus* thiếu hụt khả năng tổng hợp chất kháng sinh. Để xác định gen đặc hiệu cần cho tổng hợp chất kháng sinh, hệ gen nhảy Mariner (Wilson

et al., 2007) sẽ được sử dụng để gây đột biến gen nhảy một cách ngẫu nhiên chủng *Bacillus* (n=3) sẽ được chọn để sắp xếp trình tự bộ gen hoàn chỉnh. Thể đột biến *Bacillus Tn* sẽ mã hóa tính kháng spectinomycin, và mỗi khuẩn lạc đột biến sẽ được phủ bằng aga mềm (0,7%) chứa môi trường nuôi cấy pha log của *E. ictaluri*. Mỗi thể đột biến thiếu hụt vùng ức chế sẽ được chọn để nghiên cứu tiếp. Có thể sẽ sàng lọc rất nhanh mười nghìn thể đột biến về hiện tượng mất chức năng theo cách này, thu được bộ sưu tập hoàn chỉnh về thể đột biến thiếu hụt chất kháng sinh. Mỗi thể đột biến này sẽ được so sánh bằng phân tích thâm Southern bằng cách sử dụng đầu dò hướng đích cắt xét gen nhảy, nhờ đó chỉ ra thể đột biến có đoạn cài xen gen nhảy trong cùng locut gen (hoặc ngay liền kề). Mỗi thể đột biến khác thường sẽ được thử nghiệm về panen mầm bệnh vi khuẩn và nấm rộng hơn đã mô tả trên đây, để xác định nếu hiện tượng mất chức năng đối với chất kháng sinh ức chế sự sinh trưởng của *E. ictaluri* là thiếu hụt tương tự đối với mầm bệnh khác. Nó có thể là trường hợp chủng *Bacillus* có thể biểu hiện nhiều chất kháng sinh, trong đó trường hợp mầm bệnh khác nhau có thể được sử dụng cho sàng lọc sơ bộ để xác định thể đột biến mất chức năng thiếu hụt chức năng tổng hợp chất kháng sinh.

Để xác định gen cần cho quá trình tổng hợp chất kháng sinh, ADN bộ gen của thể đột biến khác thường sẽ được chiết và được sử dụng làm khuôn cho PCR đảo bằng cách sử dụng đoạn mỗi bên trong cắt xét gen nhảy để xác định gen *Bacillus* liền kề với vị trí của đoạn cài xen gen nhảy. Trình tự ADN sẽ so với trình tự bộ gen *Bacillus* hoàn chỉnh (là bộ gen tham chiếu) để chỉ ra vị trí tương đối của mỗi đoạn cài xen gen nhảy trong bộ gen. Đây sẽ là thông tin quan trọng để hiểu được con đường di truyền liên quan đến việc tổng hợp chất kháng sinh có thể mang lại khả năng sinh trưởng hoặc sống sót của *E. ictaluri* và các mầm bệnh khác. Nhờ sử dụng nhiều chủng *Bacillus* để phòng trừ sinh học, hiện đang sử dụng chế phẩm nhiều thuốc, nhờ đó làm giảm khả năng xảy ra mầm bệnh kháng thuốc. Cũng quan tâm đến thử nghiệm thể đột biến *Bacillus* thiếu hụt chức năng tổng hợp chất kháng sinh có bị nhược độc trong hoạt tính phòng trừ sinh học của nó so với chủng bố mẹ kiểu dại của nó hay không.

Phát triển chế phẩm tối ưu của chủng *Bacillus* để phòng trừ sinh học bệnh. Việc lựa chọn chủng *Bacillus* tối ưu, hoặc hỗn hợp chủng, để phòng trừ sinh học bệnh có

thể được thông tin bởi nhiều nguồn dữ liệu thực nghiệm khác nhau. Nghiên cứu được đề xuất này sẽ xác định chủng *Bacillus* và các điều kiện tối ưu để phòng trừ ESC.

Phụ thuộc liều lượng *Bacillus*. Trong các thử nghiệm đầu tiên để đánh giá khả năng phòng trừ bệnh *in vivo* mỗi chủng, bốn chủng *Bacillus* tốt nhất được xác định trên đây khi ngăn ngừa nhiễm khuẩn *E. ictaluri* và tử vong sẽ được sử dụng để xác định liều lượng tốt nhất để đưa vào thức ăn để dùng. Việc tạo ra bào tử *Bacillus* và thức ăn sẽ được thực hiện như đã mô tả trên đây; tuy nhiên, số lượng bào tử được đưa vào trong thức ăn sẽ được thay đổi. Liều lượng sẽ bao gồm 10^4 , 10^5 , 10^6 , hoặc 10^7 CFU/g thức ăn cộng với xử lý đối chứng. Cá sẽ được đưa vào bể nuôi gây nhiễm (như đã mô tả trên đây) được chia thành các xử lý (với năm bể nuôi giống nhau cho mỗi liều lượng) và cho ăn thức ăn đã xử lý hằng ngày để no, kết hợp cho ăn thức ăn đã xử lý liên tục trong 2 tuần. Cá sẽ được gây nhiễm trong điều kiện thả chìm tĩnh như đã mô tả trên đây. Cá sẽ không được cho ăn vào ngày gây nhiễm, nhưng sẽ lại tiếp tục ăn một ngày sau gây nhiễm và tiếp tục trong suốt nghiên cứu gây nhiễm bằng thức ăn xử lý được chỉ định. Tỷ lệ tử vong sẽ được kiểm tra trong ít nhất 21 ngày. Mỗi chủng *Bacillus* sẽ được đánh giá một cách riêng rẽ.

Bacillus để điều trị dự phòng hoặc cứu chữa. Trong chuỗi thử nghiệm thứ hai, chủng *Bacillus* sẽ được thử nghiệm đối với khả năng phòng ngừa và/hoặc khả năng loại bỏ các nhiễm khuẩn đang phát triển. Các thử nghiệm này sẽ được thực hiện qua thay đổi thời gian mà tại đó bào tử được cá ăn ban đầu liên quan đến thời gian gây nhiễm. Đối với mỗi chủng *Bacillus* được xác định và sử dụng trên đây, bốn thời điểm ban đầu sẽ được đánh giá cộng với nhóm đối chứng. Cá sẽ được cấp vào bể nuôi gây nhiễm như đã mô tả trên đây và chỉ định một cách ngẫu nhiên vào một trong năm nhóm xử lý: 1) thức ăn có bổ sung *Bacillus* bắt đầu 1 tuần trước khi gây nhiễm, 2) thức ăn có bổ sung *Bacillus* bắt đầu 3 ngày trước khi gây nhiễm, 3) thức ăn có bổ sung *Bacillus* khởi đầu 1 ngày sau gây nhiễm, 4) thức ăn có bổ sung *Bacillus* khởi đầu ngày tử vong liên quan đến *E. ictaluri* thứ nhất (dựa trên các dấu hiệu lâm sàng và hành vi), và 5) thức ăn đối chứng. Tất cả các nhóm xử lý sẽ được cho ăn thức ăn có bổ sung *Bacillus* trong suốt thử nghiệm với lượng thức ăn được cho ăn no. Các trình tự điều chế thức ăn và gây nhiễm sẽ được tiến hành như đã mô tả trên đây.

Sinh trưởng và bệnh học liên quan đến việc dùng *Bacillus*. Tính theo liều lượng của *Bacillus* được xác định trên đây, cá da trơn sẽ được đưa vào thử nghiệm đặc tính sinh trưởng với từng chủng trong số bốn chủng vi khuẩn được xác định tốt nhất và liều lượng tốt nhất tương ứng của chúng. Thức ăn sẽ được điều chế như được mô tả trước đó với liều lượng *Bacillus* thích hợp. Cá trưởng thành (~5 g mỗi con) sẽ được đếm, cân chung, và đưa vào bể nuôi và chỉ định một cách ngẫu nhiên nhóm xử lý thức ăn đã chọn với bốn bể nuôi giống nhau cho mỗi lần xử lý, 16 con cá cho mỗi thùng giống nhau. Cá sẽ được cho ăn một lần hằng ngày với khoảng 4-5% trọng lượng cơ thể (gần no; tính theo trọng lượng ban đầu) với thức ăn đã điều chế. Thức ăn sẽ được cân hằng ngày. Mỗi hai tuần trong tám tuần, tất cả cá sẽ được loại bỏ khỏi thùng cân chung và trọng lượng được sử dụng để điều chỉnh lượng thức ăn được đề xuất. Ở tuần bốn và tám, bốn con cá từ mỗi thùng sẽ được loại bỏ khỏi mỗi thùng. Phần ruột yếu hơn sẽ được loại bỏ và được sử dụng để đánh giá số lượng sinh vật *Bacillus* mong muốn (CFU/g) sống ở mô. Mô cá còn lại sẽ được bảo quản trong dung dịch formalin đậm trung tính 10% để đánh giá mô bệnh học. Trọng lượng cuối của cá sẽ được sử dụng để xác định các tác động đến đặc tính sinh trưởng và tốc độ chuyển hóa thức ăn.

Kết hợp các chủng *Bacillus* khác nhau (“cốc tai”) để phòng trừ sinh học ESC. Sử dụng mỗi chủng *Bacillus*, ở liều lượng lý tưởng của nó, trong mọi hỗn hợp có thể để đánh giá mỗi “cốc tai” *Bacillus* về khả năng của nó trong việc kiểm soát bệnh ESC. Thức ăn xử lý sẽ được điều chế như được mô tả trước đó với liều lượng bào tử bằng nhau của từ một đến bốn chủng *Bacillus*. Các thử nghiệm gây nhiễm sẽ được tiến hành như đã mô tả trên đây, sử dụng năm bể nuôi giống nhau cho mỗi xử lý cốc tai với 15 con cá cho mỗi sao chép. Tiếp theo, cá sẽ được cho ăn thức ăn xử lý thích hợp trong một tuần trước khi gây nhiễm và sau đó sau gây nhiễm liên tục trong khoảng thời gian thử nghiệm.

Ví dụ 2 - Xác định chủng *Bacillus* để phòng trừ sinh học mầm bệnh cá da trơn.

Trong Ví dụ 2 sau, nghiên cứu được đề xuất và được hoàn thành trong Ví dụ 1 được thực hiện và được sao chép tiếp.

Tóm tắt

chủng *Bacillus* được chọn và được đánh giá để phòng trừ sinh học bệnh ở cá da

trơn. chủng *Bacillus* được phân lập từ đất hoặc ruột cá da trơn và được sàng lọc về khả năng chống lại của chúng với *Edwardsiella ictaluri* và *Aeromonas hydrophila*. 21 chủng được chọn và hoạt tính đối kháng của chúng đối với mầm bệnh dưới nước khác cũng được thử nghiệm. Tỷ lệ sống sót của mỗi chủng *Bacillus* ở ruột cá da trơn được xác định, và năm chủng *Bacillus* có phổ hoạt tính kháng khuẩn tốt nhất và tỷ lệ sống sót trong ruột được đánh giá tiếp về hoạt tính bảo vệ của chúng đối với *E. ictaluri* gây nhiễm trong bể nuôi giống nhau. Hai chủng *Bacillus* mang lại lợi ích đáng kể trong việc làm giảm tỷ lệ tử vong của cá da trơn ($P < 0,05$). Thử nghiệm gây nhiễm tương tự được tiến hành ở Việt nam với bốn trong số năm chủng *Bacillus* cũng có tác dụng bảo vệ đối với *E. ictaluri* ở cá da trơn sọc vằn. Nghiên cứu an toàn ở 3 trong số các chủng được chọn đã không cho thấy sự có mặt của các plasmit và tính kháng các chất kháng sinh quan trọng về mặt lâm sàng. Chủng *Bacillus* có lợi với cá da trơn khi được dùng làm chất bổ sung thức ăn để phòng ngừa các bệnh gây ra bởi *E. ictaluri*. Chủng *Bacillus* được chọn trong nghiên cứu này có ứng dụng tiềm năng trong nghề nuôi trồng thủy sản cũng như là một giải pháp thay thế hiệu quả về chi phí trong việc sử dụng các hợp chất kháng vi khuẩn hiện nay.

Giới thiệu

Nghề nuôi trồng thủy sản cá da trơn, *Ictalurus punctatus*, đã trở thành một trong những ngành công nghiệp sản xuất động vật thành công nhất ở Bắc Mỹ trong 30 năm qua và hiện là ngành công nghiệp nuôi trồng thủy sản lớn nhất ở Mỹ. Hơn 90% toàn bộ cá da trơn được tạo ra ở Mỹ được nuôi trồng ở Alabama, Arkansas, Louisiana, và Mississippi và chủ yếu được sinh trưởng ở các ao bằng đất nằm trong khoảng từ 2 đến 10 ha (USDA 2003a, 2003b). Người nuôi trồng cá da trơn thường bảo quản cá với mật độ cao.

Đầu vào thức ăn cao được đi liền với môi trường nuôi cấy cá mật độ cao kích thích quá trình tăng sinh của vi khuẩn cơ hội (Austin *et al.* 1995). Ngoài ra, mật độ cá cao và thay đổi nhiệt độ và thành phần hóa học của ao nuôi trồng thủy sản một cách nhanh chóng càng gây khó khăn cho cá, tạo các điều kiện thuận lợi cho sự tấn công và lan tràn của bệnh. Nhiễm trùng huyết đường ruột của cá da trơn (ESC), do vi khuẩn Gram âm *Edwardsiella ictaluri* (Hawke 1979) gây ra, là bệnh lây nhiễm đặc hữu quan

trọng nhất trong ngành cùg nghiệp nuôi trồng thủy sản cỏ da tron sông (Hawke và Khoo 2004). Đó có bảo cỏ tồn thất do ESC gây ra hơn 78% toàn bộ hoạt động với dịch được báo cáo trong 42% ao nuôi cá da tron, với thiệt hại kinh tế nằm trong khoảng từ \$ 20 đến \$ 30,000,000 hàng năm (Wagner *et al.* 2002; USDA 2003a, 2003b).

Mầm bệnh quan trọng khác ở cá da tron là *Aeromonas hydrophila*, là tác nhân gây bệnh cơ bản của bệnh nhiễm trùng máu do Aeromonad di động (MAS) (Harikrishnan *et al.* 2003) và có thể lây nhiễm cho nhiều loài cá bao gồm cá rô phi, cá da tron, cá vàng, cá chép, và cá chình (Pridgeon *et al.* 2011). Năm 2009 và 2010, *A. hydrophila* được xác định là tác nhân gây bệnh của bệnh lây truyền ở cá da tron nuôi, dẫn đến tỷ lệ tử vong cao hơn so với thông thường đối với MAS với hơn 5 triệu pao thất thoát từ cá da tron cho ngành công nghiệp cá da tron thương mại ở Alabama. Chủng *A. hydrophila* (ví dụ, chủng AL09-119) được phân lập từ cá bị bệnh trong quá trình lây truyền này là rất độc hại trong thử nghiệm gây nhiễm bệnh trong bể nuôi so với chủng *A. hydrophila* tham chiếu (Pridgeon *et al.* 2011).

Pangasianodon hypophthalmus Sauvage, thường được gọi là cá da tron sọc vằn, là cá da tron tự nhiên ở vùng châu thổ Mê công của Việt nam. Thị phần nuôi trồng *P. hypophthalmus* được ghi lại có tốc độ sinh trưởng cao nhất theo thể tích so với mặt hàng nuôi trồng thủy sản khác bất kỳ trên toàn cầu trong thập kỷ qua (Phan *et al.* 2009; Phuong and Oanh 2009). Thị phần này giải thích cho sản lượng lần lượt là 687.000 và 1.094.879 tấn vào năm 2007 và 2008, sản lượng năm 2008 chiếm lên đến 34% tổng sản lượng nuôi trồng thủy sản ở Việt nam, quốc gia đứng thứ 5 về sản xuất nuôi trồng thủy sản trên toàn cầu (De Silva *et al.* 2010). Hơn thế nữa, hơn 90% cá da tron được nuôi trồng được xử lý và xuất khẩu đến hơn 100 quốc gia trên toàn cầu (Phuong and Oanh 2009). Bệnh hoại tử hình quen của *Pangasius* spp. (BNP), cũng gây ra bởi *E. ictaluri*, là bệnh gây thiệt hại đáng kể về mặt kinh tế cho ngành công nghiệp nuôi trồng thủy sản cá da tron sọc vằn ở vùng châu thổ Mê công, có thể gây ra tỷ lệ tử vong 50-90% và xảy ra ở 98% khu nuôi trồng (Phan *et al.* 2009).

Hóa trị liệu bằng việc dùng qua đường miệng các chất kháng sinh trong thức ăn cá là phương pháp điều trị phổ biến nhất đối với các bệnh về vi khuẩn; tuy nhiên, việc

sử dụng các chất kháng sinh trong nghề nuôi trồng thủy sản có thể đưa vào các rủi ro tiềm tàng cho sức khỏe cộng đồng và cho môi trường bởi sự xuất hiện của vi sinh vật kháng thuốc và dư lượng kháng sinh (Johnson 1991; DePaola *et al.* 1995; Plumb *et al.* 1995). Hơn thế nữa, các vi sinh vật hội sinh bình thường trong đường tiêu hóa, góp phần mang lại sức khỏe và chất dinh dưỡng của cá, bị ức chế bởi việc hóa trị liệu qua đường miệng (Gerald and Jane 1966; Sugita *et al.* 1990). Để điều chỉnh trường hợp này, đã tập trung hơn vào cải tiến việc quản lý thông qua mức dinh dưỡng tốt hơn, chất lượng nước được cải thiện, mật độ cất giữ thấp hơn, và việc sử dụng vacxin và chất kích thích miễn dịch không đặc hiệu (Austin and Austin 1999). Rất ít nghiên cứu đã được tiến hành để nghiên cứu lợi khuẩn để làm giảm nhẹ các bệnh lây nhiễm ở cá da trơn, và không có nghiên cứu nào được báo cáo sử dụng dùng trực tiếp trong thức ăn. Queiroz and Boyd (1998) đã ứng dụng sản phẩm lợi khuẩn thương mại, Biostart, chứa rất ít loài *Bacillus* spp., cho nước ao cá da trơn và đã chứng minh được rằng mức sống sót và sản lượng thực của cá được xử lý bằng *Bacillus* spp. lớn hơn đáng kể so với mẫu đối chứng. Tuy nhiên, vi khuẩn được sử dụng trong nghiên cứu trước đây không được phân lập đặc hiệu để sử dụng cho cá da trơn cũng không phải là hoạt tính kháng khuẩn của chúng đối với mầm bệnh quan trọng của cá da trơn được xác định đặc điểm.

Trong nghiên cứu này, thu gom trên phạm vi rộng chủng *Bacillus* (n=160) được phân lập từ đất và chủng từ ruột của cá da trơn (n=17) được thử nghiệm về hoạt tính kháng khuẩn *in vitro* đối với chủng *E. ictaluri* được phân lập từ cá da trơn bị bệnh, *A. hydrophila*, và các mầm bệnh vi khuẩn và nấm khác của cá da trơn. Chủng *Bacillus* đã cho thấy độ kháng sinh hiệu quả được đánh giá đối với mức sống sót tương ứng của chúng trong ruột của cá da trơn. Hoạt tính phòng trừ sinh học của chủng *Bacillus* tốt nhất khi được bổ sung vào thức ăn được nghiên cứu bằng cách sử dụng nghiên cứu gây nhiễm bệnh cá da trơn sọc vằn và cá da trơn trong hệ bể nuôi. Độ an toàn của chủng *Bacillus* được chọn cũng được đánh giá về sự có mặt của các plasmid và tính kháng các chất kháng sinh.

Vật liệu và phương pháp

Chủng vi khuẩn. Chủng *E. ictaluri* S97-773 được sử dụng để sàng lọc sơ bộ đối

với độ kháng sinh *Bacillus* và đối với các thử nghiệm gây nhiễm ESC vì chủng này gây bệnh cao đối với cá da trơn và đã được sử dụng trước đó trong nghiên cứu gây nhiễm ở Phòng thí nghiệm bệnh cá hợp tác Đông Nam (Southeastern Cooperative Fish Disease Laboratory - SCFDL), Auburn University. Chủng *E. ictaluri* R-4383, chủng *E. ictaluri* Alg-08-200, *Edwardsiella tarda*, *Streptococcus iniae*, *Yersinia ruckeri*, *Flavobacterium culumnaire*, và *Saprolegnia ferax* lấy từ bộ sưu tập thể phân lập gây bệnh ở SCFDL. *E. ictaluri* NLF33 được phân lập từ cá da trơn bị bệnh sọc vằn ở Việt nam. *Aeromonas hydrophila* AL09-119 được phân lập từ cá da trơn bị bệnh MAS năm 2009. Chủng *Bacillus* (n=160) trong đất đã chọn lọc được cung cấp bởi phòng thí nghiệm của Tiến sỹ Joseph Kloepper (Department of Entomology and Plant Pathology, Auburn University). *Bacillus subtilis* 1E17 thu được từ Trung tâm lưu trữ di truyền *Bacillus*.

Phân lập chủng *Bacillus spp.* từ ruột của cá da trơn và đánh giá hoạt tính kháng khuẩn.

Cá da trơn khỏe mạnh (7-10 cm) được giết bằng cách cho dùng quá liều MS-222, và ruột được lấy ra ở trạng thái nguyên vẹn của chúng. Khoảng 1,0 g được làm đồng nhất trong 9,0 ml dung dịch nước muối vô trùng (0,9% khối lượng/thể tích). Dung dịch pha loãng chuỗi 10 lần được điều chế đến 10^{-6} trong nước muối sạch, và 0,1 ml được trải trên bề mặt của ba đĩa giống nhau chứa aga đậu tương trypton (TSA) kết hợp ủ ở 28°C trong 48 h (Irianto and Austin 2002). Các khuẩn lạc giống *Bacillus* được chọn ra ngẫu nhiên, được tinh chế bằng cách cấy thành vạch các khuẩn lạc đã phân lập trên môi trường sạch, và được kiểm tra về khả năng ức chế với sự sinh trưởng của *E. ictaluri* bằng cách sử dụng phương pháp aga mềm hai lớp (Jack *et al.* 1996). Đối với lớp phủ aga mềm, thể phân lập vi khuẩn được sinh trưởng trong 5ml canh thịt đậu tương trypton (TSB) trong 24 giờ ở 30°C. Sau đó, thể tích 5 ul được chấm lên ba đĩa giống nhau chứa TSA và được ủ thêm trong 24 h. Aga mềm (0,7% khối lượng/thể tích aga) được điều chế bằng TSB được làm nóng chảy và được làm nguội đến 37°C và gieo mầm với nguyên liệu nuôi cấy của chủng *E. ictaluri* S97-773 pha log để đạt được độ đục nhẹ (tức là 10^7 tế bào/ml). Huyền phù tế bào vi khuẩn trong aga mềm được rót ngay lên các đĩa TSA và được ủ trong 24 giờ ở 30°C và sau đó ghi lại sự có mặt của

vùng trong trong quá trình sinh trưởng của đám *E. ictaluri* (theo mm) làm bằng chứng về sự ức chế sinh trưởng. Môi trường nuôi cấy được xem là ức chế *E. ictaluri* được xác định đặc điểm bằng cách nhuộm Gram và sắp xếp trình tự gen 16S rARN bằng cách sử dụng bộ đoạn mồi ‘vi khuẩn hành tinh’ 27F và 1492R (Weisburg *et al.* 1991). Trình tự 16S rARN liên ứng được tạo ra bằng cách sử dụng Chromas Pro (Technelysium Pty Ltd., Queensland, Australia), và mỗi trình tự được so sánh với dữ liệu nucleotit GenBank không thừa bằng BLASTn. Chủng *Bacillus spp.* được bảo quản đông lạnh ở -80°C. Chủng *Bacillus* trong đất đã chọn (n=160) được thử nghiệm về hoạt tính kháng khuẩn đối với *E. ictaluri* bằng cách sử dụng cùng phương pháp.

50 chủng *Bacillus* có hoạt tính đối kháng đối với *E. ictaluri* S97-773 được thử nghiệm về hoạt tính ức chế của chúng đối với chủng *E. ictaluri* khác (*E. ictaluri* R-483, *E. ictaluri* Alg-08-200). Chủng *Bacillus* đã thể hiện hoạt tính kháng khuẩn đối với tất cả ba chủng *E. ictaluri* được đánh giá tiếp về hoạt tính ức chế của chúng đối với sự sinh trưởng của chủng *A. hydrophila* AL09-119. 21 chủng *Bacillus* đã thể hiện hoạt tính kháng khuẩn đáng kể đối với cả *E. ictaluri* và *A. hydrophila* được thử nghiệm về hoạt tính của chúng đối với một số mầm bệnh cá da trơn khác bao gồm *Edwardsiella tarda*, *Streptococcus iniae*, *Yersinia ruckeri*, *Saprolegnia ferax* bằng phương pháp phủ aga mềm đã mô tả trên đây.

Hoạt tính kháng khuẩn đối với thử nghiệm *Flavobacterium culumnare* bằng phương pháp khuếch tán kỹ aga. Đối với thử nghiệm khuếch tán kỹ, chủng *Bacillus* được sinh trưởng trong 5ml TSB trong 48h ở 30°C. Sau khi ly tâm ở tốc độ 3.600 vòng/phút trong 10 phút, dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy được lọc qua màng lọc 0,2 µm. Sau đó, 200 µl dịch nổi bề mặt đã tiệt trùng bằng màng lọc được bổ sung vào lỗ tròn (có đường kính khoảng 20 mm) được tạo ra trong đĩa aga (Farmer 2004) môi trường sinh trưởng *F. culumnare* (FCGM). Sau khi dịch nổi bề mặt được hấp thụ vào môi trường aga, môi trường nuôi cấy *F. culumnare* pha log sinh trưởng trong canh thịt FCGM được trải đều lên đĩa bằng cách sử dụng gạc bông vô trùng. Các đĩa được ủ trong 48 h ở 30°C.

chủng *Bacillus* AP79, AP143, AP193L, AP254L, và AB01 cũng được thử nghiệm về hoạt tính kháng khuẩn *in vitro* của chúng đối với *E. ictaluri* NLF33, tác

nhân gây bệnh BNP ở cá da trơn sọc vằn. Môi trường nuôi cấy canh thịt của *E. ictaluri* được điều chỉnh đến mật độ 10^6 CFU/mL và được thấm đều lên các đĩa TSA. Ba lỗ được đục từ đĩa aga và 50 μ L 10^8 CFU/mL dịch nổi bề mặt không chứa tế bào *Bacillus* (48 h nuôi cấy trong TSB) được bổ sung vào mỗi lỗ. Vùng ức chế được đo sau 24 giờ ủ ở 30°C.

Sắp xếp trình tự bộ gen *Bacillus*. ADN bộ gen của chủng *Bacillus* được chiết ra khỏi 500 ml môi trường nuôi cấy sinh trưởng trong TSB bằng cách sử dụng kit phân lập ADN bộ gen Promega (Madison, WI). Hiệu suất và độ tinh khiết của ADN bộ gen được ước tính bằng cách sử dụng phổ quang kế Nanodrop (Thermo Scientific, Wilmington, DE), và khoảng 7 microgam ADN bộ gen *Bacillus* được chuyển đến Lucigen Corporation (Middleton, WI) để tạo ra thư viện phụ được mã vạch cho 454 giải trình tự với titan chemistry. Các thư viện phụ *Bacillus* được mã vạch được sắp xếp trình tự tại Phòng thí nghiệm dịch vụ bộ gen của Hudson Alpha (Huntsville, AL) bằng cách sử dụng bộ sắp xếp trình tự bộ gen Roche 454 FLX (Branford, CT) với hai bộ gen *Bacillus* cho mỗi một nửa đĩa 454 (chủng AP143 và AP 254L) hoặc ba bộ gen *Bacillus* cho mỗi đĩa 454 hoàn chỉnh (chủng AP18, AP193L, và chủng khác không được mô tả trong nghiên cứu này). Trình tự bộ gen được nhập vào CLC bộ gen ics Workbench (Cambridge, MA), lọc định tính ở mức nghiêm ngặt 0,01, và thu thập một lần nữa bằng cách sử dụng bộ thiết lập thu thập có phân đoạn chiều dài = 0,5 và mức tương tự = 0,8. Việc chọn lọc trình tự bộ gen liền kề (contig) lớn hơn 10 kb được chuyển vào tập tin đã định dạng FASTA, và mỗi contig so với dữ liệu nr GenBank bằng BLASTn. Ngoài ra, các khung đọc mở (ORF) trên mỗi contig được dự đoán bằng GeneMark.hmm cho chương trình sinh vật chưa có nhân điển hình, sử dụng mô hình tìm kiếm ORF *B. subtilis*. ORF đã dự đoán cho mỗi bộ gen *Bacillus* so với trình tự trong dữ liệu nr ở GenBank bằng BLASTn và BLASTx. Tỷ lệ phần trăm tương đồng của bộ gen *Bacillus* trình tự so với bộ gen *Bacillus* đã biết trong dữ liệu GenBank được ước tính bằng cách chứa kết quả BLAST của tất cả các contig lớn hơn 10 kb cùng nhau và đánh giá tỷ lệ phần trăm tương đồng tích tụ đối với tất cả các contig đối với bộ gen *Bacillus* đặc hiệu cho vùng bộ gen được sắp thẳng hàng tương ứng chia cho tổng số các cặp bazơ đã sắp xếp trình tự trong các contig này. Bằng cách này, việc

định danh cho mỗi chủng trong số các *Bacillus* đã được sắp xếp trình tự được xác định và được chỉ ra trong Bảng 1, với% giá trị tương đồng lớn hơn 70% chỉ định của liên kết loài.

Điều chế bào tử *Bacillus* và thức ăn có bổ sung bào tử. Bào tử *Bacillus* được điều chế bằng phương pháp được mô tả bởi Kenny và Couch (1981) với một số cải biến. Chủng *Bacillus* được sinh trưởng trong TSB ở 30°C qua đêm. Sau đó canh thịt được trải lên aga chứa chế phẩm bào tử (pepton 3,3g/l, dịch chiết bột thịt bò 1,0g/l, NaCl 5,0g/l, K₂HPO₄ 2,0g/l, KCl 1,0g/l, MgSO₄ · 7H₂O 0,25g/l, MnSO₄ 0,01g/l, lactoza 5g/l, aga 15 g/l) bằng gạc bông vô trùng và được ủ ở 28°C trong khoảng thời gian từ 5 đến 7 ngày. Để thu gom bào tử, 5 ml nước cất vô trùng được bổ sung vào đĩa và bào tử được tạo huyền phù trong nước bằng cách sử dụng vòng cấy. Huyền phù chứa bào tử sau đó được ủ ở 85°C trong 15 phút để tiêu diệt các tế bào sinh dưỡng. Nồng độ của huyền phù chứa bào tử được xác định bằng cách pha loãng chuỗi và trải lên TSA. Nồng độ cuối của huyền phù chứa bào tử được thao tác bằng tay bằng nước vô trùng đến $1,25 \times 10^{10}$ CFU/ml cho thử nghiệm tỷ lệ sống sót trong ruột và 10^9 CFU/ml cho thử nghiệm gây nhiễm ESC. Để điều chế thức ăn có bổ sung bào tử, 80 ml huyền phù chứa bào tử được phun lên 1000 g thức ăn cá dạng viên tròn chìm chậm đang có trên thị trường (2 mm, 40% protein, Zeigler, Gardners, PA) bằng cách sử dụng bình phun bơm đã tiệt trùng bằng etanol và chất tẩy trắng để đạt được khoảng 8% thể tích/khối lượng huyền phù chứa bào tử. Sau đó, thức ăn được trộn đều với 30 ml dầu cá. Thức ăn đối chứng chỉ được bổ sung dầu cá.

Cây và định lượng *Bacillus* spp. trong ruột của cá da trơn. Cá da trơn giống (7-10cm) được phân bố vào 22 thùng dung tích 60 L, mỗi thùng chứa 15 L nước và ba con cá. Cá được để đói trong một tuần trước khi thử nghiệm. Thức ăn của cá da trơn được bổ sung trong các mẻ riêng bằng 21 chủng *Bacillus* đã cho thấy hoạt tính kháng khuẩn tốt với cả *E. ictaluri* và *A. hydrophila* bằng cách sử dụng phương pháp ứng dụng bào tử được mô tả trước đó. Mỗi thức ăn có bổ sung chủng *Bacillus* ($\sim 10^9$ CFU/g thức ăn) được đưa vào một thùng nước. Cá được cho ăn một lần hằng ngày bằng thức ăn có bổ sung bào tử hoặc thức ăn đối chứng trong 1 tuần, và sau khi tất cả các con cá đã tiếp nhận thức ăn đối chứng trong 3 ngày. Một thùng được sử dụng làm đối chứng

và tiếp nhận thức ăn cá không được xử lý trong khoảng thời gian thử nghiệm. Tỷ lệ cho ăn hằng ngày là 3% tổng trọng lượng cơ thể.

Vào cuối thử nghiệm, tất cả các con cá được giết bằng cách cho dùng quá liều MS-222. Ruột được lấy ra, cân lên, và sau đó được làm đồng nhất trong 2 ml dung dịch nước muối vô trùng (0,9% khối lượng/thể tích). Mẫu đã được làm đồng nhất sau đó được pha loãng theo chuỗi trong dung dịch nước muối vô trùng và trải lên TSA và được ủ ở 28°C trong 48h. Ba khuẩn lạc đại diện có hình thái học giống nhau như chủng *Bacillus* đã dùng được nhặt một cách ngẫu nhiên ra khỏi đĩa, được tinh chế trên các đĩa mới và được xác định bằng sắp xếp trình tự gen 16S rARN như mô tả trước đó và so sánh với trình tự gen 16S rARN đã biết từ mỗi chủng *Bacillus*. Đối với nhóm đối chứng và nhóm xử lý, chỉ hình thái học khuẩn lạc khác biệt tương ứng với hình thái học khuẩn lạc của chủng *Bacillus* được bổ sung được ghi lại. Số lượng có thể nuôi cấy được cho mỗi chủng *Bacillus* được thu hồi từ ruột được xác định là CFU/g mẫu ruột.

Nghiên cứu gây nhiễm bể nuôi. Năm chủng *Bacillus* (AB01, AP143, AP193L, AP254L, và AP79) được chọn để đánh giá tiếp trong thử nghiệm gây nhiễm bể nuôi bằng chủng *E. ictaluri* S97-773. Nghiên cứu bao gồm năm nhóm được xử lý bằng *Bacillus* và một nhóm đối chứng với bốn bể nuôi giống nhau. Từng bể nuôi giống nhau được cấp 25 cá da trơn giống cân nặng khoảng 13 g. Cá được làm quen với thức ăn khô thương phẩm trong 1 tuần. Cá từ mỗi nhóm xử lý sau đó được cho ăn chế độ ăn thử nghiệm được bổ sung bào tử của chủng *Bacillus* (8×10^7 CFU/g) ở tỷ lệ cho ăn hằng ngày là 2,5% fw/bw (trọng lượng thức ăn/trọng lượng cơ thể) trong hai tuần. Cá trong nhóm đối chứng chỉ tiếp nhận thức ăn bình thường.

Cá được gây nhiễm bằng cách thả trong 45 phút vào 10 L nước chứa *E. ictaluri* S97-773. Tất cả các con cá trong cùng nhóm được thả trong một đồ chứa. Nồng độ của *E. ictaluri* S97-773 được xác định là $4,5 \times 10^6$ CFU/ml. Điều kiện gây nhiễm đối với nhóm đối chứng là giống như các xử lý khác chỉ khác là môi trường BHI được bổ sung vào thay vì môi trường nuôi cấy *E. ictaluri*. Tỷ lệ tử vong được theo dõi trong giai đoạn 21 ngày, và cá chết được phẫu tích và sự có mặt của *E. ictaluri* được xác nhận bằng xét nghiệm vi sinh gạc chứa thận và gan trên TSA. Tính đồng nhất của *E. ictaluri* đã thu hồi được xác nhận bằng phân tích sinh hóa.

Cá được nuôi trong hệ tái tuần hoàn trong giai đoạn làm quen. Khi bắt đầu cho ăn *Bacillus* và trong suốt pha gây nhiễm, hệ tĩnh được đưa vào trao đổi nước 20-30 phút hằng ngày. Bộ lọc sinh học xốp và loại bỏ hằng ngày chất thải/chất không ăn được được đưa vào để phòng trừ các vấn đề có thể xảy ra liên quan đến chất lượng nước. Nhiệt độ nước được giữ ở $26 \pm 2^\circ\text{C}$. Trong suốt pha tĩnh, hệ cấp nhiệt buồng trung tâm kết hợp với bộ cấp nhiệt nước bể nuôi có thể ngâm chìm được được sử dụng để kiểm soát nhiệt độ nước theo yêu cầu, và hệ cấp nhiệt nước được sử dụng để kiểm soát nhiệt độ của nước đầu vào trong quá trình trao đổi nước.

Thử nghiệm gây nhiễm khác sử dụng cá da trơn được tiến hành với liều lượng thấp hơn của *E. ictaluri* và các điều kiện qua dòng chảy. Trong thử nghiệm gây nhiễm này, bao gồm năm nhóm được xử lý bằng *Bacillus* (AP79, AP143, AP193L, và AB01) và một nhóm đối chứng với bốn bể nuôi giống nhau. Mỗi bể nuôi được cấp 20 cá da trơn giống (~12 g). Liều lượng thấp hơn của *E. ictaluri* S97-773 (8×10^5 CFU/ml) được sử dụng để gây nhiễm cá và bắt đầu ngay sau khi gây nhiễm bể nuôi được xúc trong khoảng thời gian từ 5 đến 8 giờ mỗi ngày. Tất cả các điều kiện trong gây nhiễm này là giống như trong thử nghiệm gây nhiễm trước đó. Tỷ lệ tử vong được kiểm tra trong giai đoạn 21 ngày sau khi gây nhiễm, và sự có mặt của *E. ictaluri* trong cá chết được xác nhận như được mô tả trước đó.

Thử nghiệm gây nhiễm bổ sung được tiến hành để đánh giá tác dụng bảo vệ của bốn chủng *Bacillus* (AP79, AP193L, AP254L, và AB01) đối với *E. ictaluri* cho cá da trơn sọc vằn. Nghiên cứu này bao gồm năm xử lý với bốn thùng giống nhau. Mỗi thùng được cấp 18 cá da trơn sọc vằn (~14g). Cá da trơn sọc vằn được cho ăn thức ăn có bổ sung bào tử *Bacillus* ($\sim 10^7$ CFU/g thức ăn) và thức ăn đối chứng trong 2 tuần và cá được chuyển đến thùng dung tích 80 L để gây nhiễm bể bằng *E. ictaluri* NLF33. Cá được thả trong 30 phút trong bể nuôi tĩnh, được xúc khí ở liều lượng $\sim 10^6$ CFU/mL đến đích khoảng 70% tỷ lệ tử vong trong nhóm đối chứng. Chế độ ăn thử nghiệm và đối chứng được đề xuất trong suốt pha gây nhiễm. Việc ghi lại tỷ lệ tử vong và xác nhận *E. ictaluri* trong cá chết được tiến hành như trên đây.

Phân tích plasmit. Plasmit ADN được chiết ra khỏi chủng *Bacillus* AP79, AP193L, và AB01, bằng phương pháp rửa giải bằng kiềm (Birnboim và Doly 1979).

Bacillus subtilis 1E17 chứa plasmit pC194 được sử dụng làm mẫu đối chứng dương tính. ADN đã chiết được phân tích bằng hệ điện di trường xung Chef-DR II (Bio-Rad, Hercules, CA). Thời gian xung dao động trong khoảng từ 1 đến 15 giây trong 15 giờ ở 6 V/cm. Gel được nhuộm bằng ethidii bromua và quan sát bằng trực quan sử dụng hệ thống tài liệu gel AlphaImager HP (ProteinSimple, Santa Clara, CA).

Phân tích tính kháng chất kháng sinh. Độ nhạy cảm của chủng *Bacillus* AP79, AP193L, và AB01 với carbenicillin, ampicillin, spectinomycin, oxacillin, vancomycin, cephalothin, novobiocin, sulfadiazine, amikacin, erytromycin, neomycin, penicillin, chloramphenicol, sulfametoxazol, norfloxacin, gentamicin và ciprofloxacin được xác định bằng thử nghiệm khuếch tán đĩa sau các phương pháp được đưa ra bởi Ủy ban quốc gia về Tiêu chuẩn Phòng thí nghiệm lâm sàng (National Committee for Clinical Laboratory Standards (CLSI 2012)). Môi trường nuôi cấy pha log của mỗi chủng được pha loãng đến nồng độ nằm trong khoảng từ 1×10^8 đến 2×10^8 CFU/ml (McFarlva chuẩn 0,5). Nguyên liệu nuôi cấy sau đó được gieo mầm lên đĩa aga Mueller-Hinton bằng cách sử dụng que cấy bông. Các đĩa đã thấm chất kháng sinh (BD Biosciences) được đặt lên các đĩa đã gieo mầm này, và đường kính của vùng ức chế sinh trưởng được đo sau 18 h ủ ở 37°C. Các thử nghiệm được thực hiện lặp lại 3 lần và đường kính trung bình của vùng ức chế được tính toán.

Thống kê. Thiết kế ngẫu nhiên hoàn chỉnh được sử dụng trong nghiên cứu này. Dữ liệu được biểu thị dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ sai số chuẩn (SE). Dữ liệu gây nhiễm được phân tích phương sai trong SAS 9.2. Sự sai khác giữa các giá trị trung bình được thử nghiệm bằng thử nghiệm khoảng Tukey và được xem là có ý nghĩa khi thu được các giá trị xác suất là $< 0,05$.

Kết quả

Xác định đặc điểm thể phân lập *Bacillus*. Mỗi chủng *Bacillus* được phân lập từ đất hoặc ruột cá da trơn có hoạt tính ức chế với cả *E. ictaluri* và *A. hydrophila* có khả năng sự tạo thành nội bào tử. Mỗi môi trường nuôi cấy *Bacillus* tinh khiết được ribotyp, chỉ ra rằng phần lớn chủng *Bacillus* là thuộc nhóm *B. subtilis* (bao gồm *B. amyloliquefaciens*), với hai chủng của *B. pumilus* cũng trong bộ sưu tập. Do thể phân lập *B. subtilis* hoặc *B. amyloliquefaciens* không thể được biệt hóa một cách chắc chắn

trên cơ sở dữ liệu trình tự gen sinh hóa hoặc 16S rARN, trong một số trường hợp dữ liệu trình tự bộ gen là sẵn có (tức là, đối với chủng AP18, AP143, AP193L, và AP254L) và được sử dụng để phân loại phát sinh loài. Đối với mỗi các chủng này, tỷ lệ tương đồng > 80% đối với phần lớn chủng bộ gen *Bacillus* có quan hệ mật thiết, cung cấp bằng chứng rõ ràng về liên kết phát sinh loài. Trong số các chủng được chọn để sắp xếp trình tự bộ gen, chỉ có duy nhất chủng AP193L được chọn trên cơ sở tính đối kháng của nó với mầm bệnh trong nuôi trồng thủy sản và hiệu quả trong việc làm giảm tỷ lệ tử vong do ESC. Chú thích đầy đủ của các bộ gen này nằm ngoài phạm vi của nghiên cứu này, nhưng các trình tự bộ gen này đưa ra đánh giá mục tiêu sự phát sinh loài và chỉ ra con đường sinh tổng hợp giả định cho tổng hợp kháng vi khuẩn có thể có liên quan đến phòng trừ sinh học mầm bệnh cá da trơn (dữ liệu không được thể hiện).

Hoạt tính kháng khuẩn của chủng *Bacillus*. Chủng *Bacillus* AB01 được phân lập từ ruột cá da trơn thể hiện hoạt tính kháng khuẩn đáng kể đối với *E. ictaluri*. Trong số chủng *Bacillus* trong đất đã được chọn, 50 chủng có tính đối kháng đáng kể với *E. ictaluri*. Toàn bộ 50 chủng *Bacillus* cũng thể hiện hoạt tính ức chế đối với *E. ictaluri* R-4383 và *E. ictaluri* Alg-08-200. Tổng 21 chủng *Bacillus* có hoạt tính kháng sinh tiềm năng với cả *E. ictaluri* và *A. hydrophila* (ví dụ, Fig. 1). 21 chủng *Bacillus* đã chọn được thử nghiệm về hoạt tính của chúng đối với nhiều mầm bệnh trong nuôi trồng thủy sản. Tất cả các chủng đều đối kháng với nhiều mầm bệnh cá da trơn, bao gồm vi khuẩn Gram âm và Gram dương, và nấm trứng *Saprolegnia*. chủng *Bacillus* AB01, AP193L, AP219, và AP301 thể hiện hoạt tính kháng khuẩn đối với tất cả các mầm bệnh được thử nghiệm (Bảng 1). Ngoài ra, tất cả năm chủng *Bacillus* được thử nghiệm (AP79, AP143, AP193L, AP254L, và AB01) thể hiện hoạt tính đối kháng đáng kể đối với *E. ictaluri* NLF33.

Mức sống sót và tồn lưu của chủng *Bacillus* trong ruột của cá da trơn. Vi khuẩn đã dùng đã được thu hồi từ ruột. Quan sát được hơn 10^7 CFU/g được đưa vào *Bacillus* quan sát được trong ruột đối với chủng AB01, AP76, AP77, AP79, AP143, và AP254L (Fig. 4). Đối với chủng AP18, AP280, và AP303, số lượng đếm của vi khuẩn thu hồi được là tương đối thấp, và chúng được loại ra khỏi trong nghiên cứu tiếp theo.

21 chủng *Bacillus* không thu hồi được từ nhóm đối chứng. Trong tất cả các trường hợp trình tự gen 16S rARN được xác định từ các khuẩn lạc đại diện khớp với trình tự gen 16S rARN từ chủng *Bacillus* tương ứng được bổ sung vào thức ăn của cá da trơn. Đối với một số chủng *Bacillus* quan sát được có số lượng CFU/g ruột lớn (ví dụ, chủng AB01 và AP76), chỉ các khuẩn lạc quan sát được ở tỷ lệ pha loãng 10^{-6} và 10^{-7} tương ứng với hình thái học khuẩn lạc *Bacillus* tương ứng.

Nghiên cứu gây nhiễm. Trong thử nghiệm gây nhiễm thứ nhất, tỷ lệ tử vong trung bình của nhóm đối chứng là 98,0%. Các nhóm xử lý của chủng *Bacillus* AP143 hoặc AB01 thể hiện tỷ lệ tử vong giảm đáng kể so với nhóm đối chứng ($P < 0,05$), với tỷ lệ tử vong lần lượt là 83,1%, 84,8%, và 79,6% với các chủng này. Không có sai khác đáng kể giữa hai chủng này. Các nhóm xử lý của chủng *Bacillus* AP79, AP193L, hoặc AP254L (với tỷ lệ tử vong lần lượt là 89,0%, 95,0%, và 93,7%) đã không cho thấy sự sai khác đáng kể so với nhóm đối chứng (Fig. 5A, Bảng 2). Đối với thử nghiệm gây nhiễm thứ hai, 41,3% cá chết trong nhóm đối chứng. Tỷ lệ tử vong trong các nhóm xử lý dao động trong khoảng từ 35,0% đến 46,3% và quan sát được không có sự sai khác đáng kể giữa các nhóm bất kỳ trong số các nhóm xử lý và các nhóm đối chứng (Fig. 5B, Bảng 2).

Trong thử nghiệm gây nhiễm cá da trơn sọc vằn, nhóm xử lý được ăn thức ăn có bổ sung bào tử của chủng AP79 có tỷ lệ tử vong tích tụ (9,7%) và khác đáng kể so với nhóm đối chứng ($P < 0,05$). Nhóm xử lý được ăn thức ăn có bổ sung chủng AP193L đạt 30,6% tỷ lệ tử vong; tuy nhiên, cần chú ý rằng phần lớn tỷ lệ tử vong được ghi lại trong một thùng nước vào ngày gây nhiễm thứ 4. Cá da trơn được cho ăn chủng AP254L và AB01 có tỷ lệ tử vong lần lượt là 54,2% và 56,9%, trong khi nhóm đối chứng có tỷ lệ tử vong là 70,8% (Fig. 5C, Bảng 2).

Nghiên cứu plasmit và tính kháng chất kháng sinh. Phân tích về hàm lượng ADN plasmit đối với chủng *Bacillus* đã chọn được tiến hành bằng PFGE, và tác giả sáng chế đã không quan sát được sự có mặt của plasmit bất kỳ trong bốn chủng này nhưng nhóm đối chứng dương tính đã cho thấy sự có mặt của plasmit pC194 (dữ liệu không được thể hiện). Đánh giá độ nhạy chất kháng sinh đã xác định được rằng tất cả bốn chủng này đều mẫn cảm với tất cả các chất kháng sinh trong số các chất kháng

sinh được thử nghiệm ở mức độ khác nhau. Chúng đều mẫn cảm cao với carbenicillin, cephalothin, sulfametoxazone và ciprofloxacin (đường kính của vùng ức chế > 25mm). Ampicillin, penicillin, vancomycin, novobiocin, amikacin, erytromyxin, neomycin, chloramphenicol, norfloxacin và gentamicin cũng ức chế sinh trưởng của chúng một cách hiệu quả (vùng ức chế 20-25 mm), trong khi đó spectinomycin, oxacillin, sulfadiazine thể hiện sự ức chế nhẹ (vùng ức chế 15-20 mm). Bốn chủng này thể hiện mức kháng sinh tương tự nhau, với sự thay đổi về đường kính vùng ức chế trong bốn chủng thấp hơn 10% đường kính trung bình với mỗi chất kháng sinh được thử nghiệm.

Thảo luận

Các kết quả của nghiên cứu này chỉ ra rằng chủng đặc hiệu trong nhóm *Bacillus subtilis* có triển vọng để phòng trừ bệnh trong nghề nuôi trồng thủy sản cá da trơn. Trong nghiên cứu trước đây, việc ứng dụng môi trường nuôi cấy *Bacillus* vào nước ao đã làm cải thiện mức sống sót của cá và hiệu suất (Queiroz and Boyd 1998). Tuy nhiên, môi trường nuôi cấy *Bacillus* được sử dụng trong nghiên cứu sau đó đã không đánh giá được về tính đối kháng với *E. ictaluri* hoặc mầm bệnh khác trong nuôi trồng thủy sản. Hơn thế nữa, khả năng của môi trường nuôi cấy *Bacillus* từ thương phẩm này để làm giảm tỷ lệ tử vong hoặc các triệu chứng bệnh do ESC không được đánh giá và phức tạp do nhiễm khuẩn cá da trơn bệnh mang tăng sinh trong suốt giai đoạn thử nghiệm. Nghiên cứu này là nghiên cứu đầu tiên để chọn lọc lợi khuẩn để phòng trừ ESC và mầm bệnh khác ở cá da trơn và để đánh giá về hiệu quả phòng trừ sinh học của chúng qua việc dùng thức ăn. *Bacillus* spp. được sử dụng trong nghiên cứu này vì chúng có thể được áp dụng ở dạng bào tử, do đó tạo điều kiện thuận lợi cho việc bảo quản và sử dụng dễ dàng, và nhiều chủng trong số các chủng *Bacillus* đã được nghiên cứu trước đó về khả năng của chúng để đối kháng với mầm bệnh vi khuẩn và/hoặc nấm của thực vật (Kloepper *et al.* 2004).

Gatesoupe (1999) đã kết luận rằng lợi khuẩn cho nuôi trồng thủy sản cần đối kháng với mầm bệnh, xâm lấn ruột, và làm tăng tính kháng của vật chủ với mầm bệnh. Lợi khuẩn lý tưởng cần được chọn bằng cách xem xét toàn bộ ba tiêu chuẩn. Tuy nhiên, khó để đánh giá chủng lợi khuẩn tiềm năng đối với tiêu chuẩn thứ hai và thứ ba

trên số lượng lớn ứng viên vi khuẩn. Do đó, hoạt tính kháng khuẩn *in vitro* là tiêu chuẩn cơ bản mà qua đó số lượng lớn chủng được đánh giá, với ứng viên chủng vi khuẩn không thể hiện hoạt tính đối kháng bị loại bỏ ra khỏi nghiên cứu tiếp theo. Mục đích cơ bản của dự án nghiên cứu này là nhằm xác định chủng vi khuẩn có thể được áp dụng để phòng ngừa *E. ictaluri*, *A. hydrophila*, và các vi khuẩn khác và mầm bệnh nấm trúng của cá da trơn. Do mầm bệnh vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* chịu trách nhiệm cho phần lớn tỷ lệ tử vong hiện quan sát được trong nuôi trồng thủy sản cá da trơn, khả năng ức chế sự sinh trưởng của hai mầm bệnh này của chủng *Bacillus* là cực kỳ quan trọng và chỉ có chủng có khả năng ức chế cả hai mầm bệnh này mới được chọn để thử nghiệm trong nghiên cứu gây nhiễm bệnh thủy sinh.

Khả năng của chủng lợi khuẩn xâm lấn và sống sót trong hoặc trên vật chủ của nó cũng là một tiêu chuẩn quan trọng để chọn lọc chủng. Tuy nhiên, trong nhiều trường hợp lợi khuẩn không thể xâm lấn vĩnh viễn trong đường dạ dày-ruột non mà thay vào đó là đạt đến trạng thái tạm thời kéo dài (Robertson 2000; Irianto and Austin 2002). Thậm chí vi khuẩn tạm thời có thể có hiệu quả trong việc làm trung gian phòng trừ sinh học bệnh nếu các tế bào được đưa vào nhân tạo qua thức ăn liên tục hoặc bán liên tục (Gournier-Chateau *et al.* 1994; Gatesoupe 1999;). Mức quần thể cao của một số chủng *Bacillus* được thu hồi từ ruột cá da trơn ba ngày sau khi cho ăn thức ăn có bổ sung bào tử *Bacillus*. Đối với chủng *Bacillus* có số lượng lớn trong ruột, các khuẩn lạc có hình thái học giống như chủng *Bacillus* được dùng chiếm ưu thế các đĩa TSA, và ribotyp của các khuẩn lạc đại diện khẳng định mức tương đồng của chúng như chủng *Bacillus* được dùng. Trong nghiên cứu trước đây về sự tồn lưu của thể thực khuẩn đặc hiệu *E. ictaluri* trong ruột của cá da trơn, quan sát được rằng 72 giờ sau khi ăn thể thực khuẩn không thể dò được trong mẫu ruột (Carrias 2011). Điều này cho thấy rằng hạt trợ bất kỳ sẽ được thải ra khỏi ruột cá da trơn trong vòng 72 giờ sau khi ăn và chủng vi khuẩn dò được sau khung thời gian này sẽ có mức tồn lưu trong ruột nhất định. Xét rằng mức quần thể vi khuẩn ở ruột phải suy giảm sau khi ngừng ăn chế độ ăn chứa bào tử, mức tối đa của chủng *Bacillus* CFU/g mô ruột đạt được trong suốt phác đồ cho ăn có thể cao hơn. Mức quần thể vi khuẩn ở đây (10^6 - 10^7 CFU/g đối với phần lớn chủng) là mức thông thường với các nghiên cứu trước đây liên quan đến cá (Jørborn *et al.*

1997; Gildberg and Mikkelsen 1998; Robertson *et al.* 2000; Irianto and Austin 2002). Những kết quả này chứng tỏ rằng một số chủng *Bacillus* được đánh giá trong nghiên cứu này có thể tiếp tục tồn tại trong cá da trơn đường dạ dày-ruột non trong ít nhất ba ngày. Tuy nhiên, ở điểm này mức tồn lưu và khả năng xâm lấn niêm mạc ruột là chưa biết đối với mỗi chủng. Thử nghiệm chi tiết hơn đánh giá sự xâm chiếm và/hoặc tồn lưu của chủng *Bacillus* đặc hiệu trong ruột cá da trơn sẽ được tiến hành để giúp hiểu về cơ chế phòng trừ sinh học của chủng *Bacillus* và chỉ dẫn khoảng thời gian và tính toán thời gian ăn *Bacillus*. Các nghiên cứu trong tương lai cũng sẽ kiểm tra sự tác động của mỗi chủng *Bacillus* đến hệ vi sinh vật đường ruột và sức khỏe và sinh trưởng của cá khi không có mặt của mầm bệnh trong nuôi trồng thủy sản.

Trong một trong số các nghiên cứu gây nhiễm ESC, quan sát được tỷ lệ tử vong rất cao (98,0%) trong nhóm đối chứng, có thể có ảnh hưởng đến mức độ bảo vệ có thể được tạo ra bởi chủng *Bacillus*. Theo lý tưởng, gây nhiễm bệnh thủy sinh sẽ dẫn đến tỷ lệ tử vong nằm trong khoảng từ 60% đến 70%, kích thích chính xác hơn sự phát triển tự nhiên của ESC. Tỷ lệ tử vong cao có thể là hậu quả của việc duy trì hệ tĩnh trong quá trình gây nhiễm, trong đó *E. ictaluri* tiếp tục tồn tại trong thùng trong thêm một khoảng thời gian nữa. Mặc dù quan sát được tỷ lệ tử vong cao hơn trong gây nhiễm này, hai chủng *Bacillus* (AP143 và AB01) đã tạo ra được sự bảo vệ đáng kể cho cá da trơn. Lưu ý quan trọng là hai gây nhiễm này đã cho thấy tác dụng bảo vệ đối với chủng *Bacillus* là trong hệ tĩnh với 20-30 phút trao đổi nước hằng ngày, trong khi gây nhiễm không có hiệu quả đáng kể được tiến hành trong hệ được xục trong 5-8 giờ mỗi ngày sau khi gây nhiễm. Điều này cho thấy rằng môi trường giống ao hơn trong đó lợi khuẩn được duy trì trong nước, và có khả năng là da và mang của cá, có thể có lợi hơn đối với phòng trừ sinh học hiệu quả bệnh. Ngoài ra, có lẽ ở liều lượng *E. ictaluri* thấp hơn mà cá da trơn thường được tiếp xúc với ao nuôi trồng thủy sản thì mức độ kiểm soát sinh học được tạo ra bởi các chủng vi khuẩn *Bacillus* sẽ lớn hơn.

Nghiên cứu gây nhiễm với cá da trơn sọc vẫn đã cho thấy mức tử vong do *E. ictaluri* giảm đối với tất cả các chủng *Bacillus*, đặc biệt là với việc sử dụng chủng AP79 làm giảm tỷ lệ tử vong chỉ còn 9,7% so với mức tử vong là 70,8% của nhóm đối chứng. Điều thú vị là hoạt tính phòng trừ sinh học tương đối của chủng *Bacillus* được

thử nghiệm là khác nhau ở hai loài cá da trơn. Điều này có thể phản ánh sự khác nhau có ý nghĩa sinh học trong tương tác giữa chủng *Bacillus* và vật chủ tương ứng của chúng. Ngoài ra, có thể là sự tương tác khác thường ba bên giữa vật chủ, mầm bệnh, và lợi khuẩn có thể bị ảnh hưởng bởi các yếu tố môi trường. Rõ ràng là cần nghiên cứu tiếp để hiểu được sự tác động lẫn nhau phức tạp giữa vật chủ, mầm bệnh và chủng *Bacillus* lợi khuẩn, và cách xử lý môi trường để đạt được mức phòng trừ sinh học bệnh tối ưu. Các nghiên cứu tiếp sử dụng mô hình bệnh thủy sinh với các điều kiện tĩnh cần được tiến hành để tối ưu hóa các thông số quan trọng đối với gây nhiễm như liều lượng và tính toán thời gian với chủng *Bacillus* thực hiện tốt nhất, với các nghiên cứu sau đó trong phạm vi ao để đánh giá hiệu quả phòng trừ sinh học trong hệ sinh thái ao nuôi trồng thủy sản.

Một trong những yêu cầu an toàn đối với vi khuẩn sống được con người tiêu thụ trực tiếp đó là phải không có khả năng kháng bất kỳ với các chất kháng sinh quan trọng về mặt lâm sàng (Sorokulova 2008). Mặc dù chủng *Bacillus* được sử dụng trong nghiên cứu này không phải cho con người tiêu thụ trực tiếp, nhưng chúng có thể được tiêu thụ một cách tình cờ, vì các vật chủ của chúng được nuôi trồng để làm thực phẩm. Do vậy, việc phân tích tính kháng chất kháng sinh ở chủng lợi khuẩn và phân biệt tính kháng tự nhiên, là một trong những đặc trưng phenotyp của các loài, và khả năng kháng (tức là, có thể chuyển được), đi liền với sự xuất hiện của plasmid. Ngoài ra, việc sinh ra bệnh và độc tố trong ruột có liên quan mật thiết với các plasmid (Pannucci *et al.* 2002). Tất cả các chủng *Bacillus* được chọn đều không mang plasmid bất kỳ, và mỗi chủng này miễn cảm với phổ rộng các chất kháng sinh được thử nghiệm, đảm bảo chúng không có khả năng chuyển một cách liên hợp plasmid bất kỳ có thể tạo ra tính kháng chất kháng sinh.

Sự hiểu biết về các quá trình trao đổi chất thứ cấp được thể hiện bằng mỗi chủng *Bacillus* có thể cải thiện việc chọn lọc hợp lý chủng và chủng “cốt tủy” để tăng cường hiệu quả phòng trừ sinh học đối với mầm bệnh trong nuôi trồng thủy sản. Chủng *Bacillus* với profin kháng sinh tương tự với mầm bệnh nuôi trồng thủy sản và mầm bệnh thực vật có thể được nhóm lại với nhau (Kloepper *et al.* 2004). Hợp chất kháng vi khuẩn được sản xuất bằng các chủng từ các nhóm kháng sinh khác nhau cần

phải khác nhau. Có lẽ là sự kết hợp của các chủng từ các nhóm kháng sinh khác nhau sẽ cung cấp mức kiểm soát sinh học lớn hơn đối với bệnh do sản xuất nhiều hợp chất kháng sinh tác động bởi các cơ chế khác nhau. Đó quan sát được các hợp chất kháng khuẩn có thể khuếch tán có liên quan rõ ràng trong hoạt tính đối kháng trong lớp phủ aga mềm và trong các thử nghiệm khuếch tán. Tầm quan trọng tương đối của các chất chuyển hóa thứ cấp đối với kiểm soát sinh học *in vivo* là chưa biết so với cơ chế cạnh tranh và/hoặc cạnh tranh loại trừ ở cở của các chất đối kháng mầm bệnh. Nghiên cứu trong tương lai sẽ điều tra sự đóng góp tương đối của các hợp chất kháng sinh cụ thể cho các hoạt động kiểm soát sinh học của một số chủng vi khuẩn *Bacillus*.

Tóm lại, bộ sưu tập các chủng vi khuẩn *Bacillus* đó được xác định là đối kháng với tác nhân gây bệnh chính của cá da trơn và có lợi cho cả cá da trơn sông và cỏ tra khi dựng vào thức ăn để phòng trừ lần lượt ESC và BNP. Những vi khuẩn này có khả năng ứng dụng trong nuôi trồng thủy sản như là một giải pháp thay thế hiệu quả trong việc sử dụng các hợp chất kháng khuẩn hiện nay.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ dễ dàng hiểu rằng việc thay đổi các thay thế và các cải biến có thể được thực hiện đối với đối tượng được bộc lộ trong bản mô tả này mà không nằm ngoài nội dung hoặc phạm vi sáng chế. Sáng chế được mô tả bằng cách minh họa trong bản mô tả này có thể được ứng dụng thực tế một cách thích hợp khi không có mặt của yếu tố hoặc các yếu tố, dấu hiệu hoặc các dấu hiệu không được bộc lộ cụ thể trong bản mô tả này. Các thuật ngữ và diễn đạt đã được sử dụng được dùng làm thuật ngữ mô tả và không giới hạn phạm vi của sáng chế, và không dự định sử dụng các thuật ngữ và diễn đạt này để loại trừ các dạng tương đương bất kỳ của dấu hiệu được thể hiện và được mô tả hoặc các phần của chúng, nhưng cần phải hiểu rằng các cải biến khác nhau cũng nằm trong phạm vi của sáng chế. Do vậy, cần phải hiểu rằng mặc dù sáng chế đã được minh họa bằng các phương án cụ thể và các dấu hiệu tùy ý, cải biến và/hoặc thay đổi về các khái niệm được bộc lộ trong bản mô tả này có thể được dùng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, và các cải biến và các thay đổi như vậy được xem là nằm trong phạm vi của sáng chế.

Trích dẫn một số tài liệu tham khảo patent và phi patent được thực hiện trong

bản mô tả này. Các tài liệu tham khảo được trích dẫn được đưa vào bằng cách tham khảo đến toàn bộ nội dung của chúng. Trong trường hợp có sự không thống nhất giữa định nghĩa của thuật ngữ trong phần mô tả so với định nghĩa của thuật ngữ trong tài liệu tham khảo được trích dẫn thì thuật ngữ cần được giải thích dựa trên định nghĩa trong phần mô tả.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Austin, B., Stuckey, L.F., Robertson, P., Effendi, I. and Griffith, D. (1995) A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *J Fish Dis* 18, 93-96.
- Austin, B. and Austin, D.A. (1999) *Bacterial Fish Pathogens, Disease in Farmed and Wild Fish*, 3rd (revised) edn. Godalming: Springer-Praxis.
- Birnboim, H.C. and Doly, J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.
- Brunt, J. and Austin, B. (2005) Use of a probiotic to control lactococcosis and streptococcosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J Fish Dis* 28, 693-701.
- Carrias, A.A. (2011) Evaluation of Biological Agents for Controlling Enteric Septicemia of Catfish. Thesis. Auburn, AL: Department of Fisheries and Applied Aquacultures, Auburn University.
- Chang, C.I. and Liu, W.Y. (2002) An evaluation of two probiotic bacterial strains, *Enterococcus faecium* SF68 and *Bacillus toyoi*, for reducing edwardsiellosis in cultured European eel, *Anguilla anguilla* L. *J Fish Dis* 25, 311-315.
- Cipriano, R. C., Bullock, G.L., and Pyle, S.W. (1984) *Aeromonas hydrophila* and motile aeromonad septicemia of fish. U.S. Fish and Wildlife Service, Fish Disease Leaflet 68:23.
- Delbos, B. C., Weirich, C. R., Fernandez, D., and Thune, R. Evaluation of a live attenuated vaccine for the control of enteric septicemia of catfish under simulated production conditions. Aquaculture 2001: Book of Abstracts, 177. 2001.
- DePaola, A., Peeler, J.T. and Rodrick, G.E. (1995) Oxytetracycline-medicated feed on antibiotic resistance of gram-negative bacteria in Catfish Ponds. *Appl Environ Microbiol* 61, 2335-2340.

- De Silva, S.S., Ingram, B.A., Nguyen, P.T., Bui, T.M., Gooley, G.J. and Turchini, G.M. (2010) Estimation of nitrogen and phosphorus in effluent from the striped catfish farming sector in the Mekong Delta, Vietnam. *Ambio* 39, 504-514.
- Enebak, S.A., Wei, G., and Kloepper, J.W. (1998) Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on loblolly and slash pine seedlings. *Forest Science*, 44:139-144.
- Farmer, B. (2004) Improved methods for the isolation and characterization of *Flavobacterium columnare*. Thesis. Baton Rouge, LA: Department of Pathobiological Sciences, Louisiana State University.
- Ford, L.A., and Thune, R.L. (1991) S-layer positive motile aeromonads isolated from channel catfish, *Journal of Wildlife Diseases* 27:557-561.
- Fuller, R. and Turvey, A. (1971) Bacteria associated with the intestinal wall of the fowl (*Gallus domesticus*). *J Appl Bacteriol* 34, 617-622.
- Fuller, R. (1987) A review: probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 66, 365-378.
- Fuller, R. (1997) *Probiotics 2, Applications and Practical Aspects*. London: Chapman & Hall.
- Gatesoupe, F.J. (1999) The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180, 147-165.
- Gaunt, P., Endris, R., Khoo, L., Leard, A. T., Jack, S., Santucci, T., Katz, T., Radecki, S. V., and Simmons, R. Preliminary Assessment of the Tolerance and Efficacy of Florfenicol against *Edwardsiella ictaluri* Administered in Feed to Channel Catfish. *Journal of Aquatic Animal Health* 15(3), 239-247. 2003.
- Gaunt, P. S., Endris, R. G., Khoo, L. H., Howard, R., McGinnis, A. L., Santucci, T. D., and Katz, T. Determination of Dose Rate of Florfenicol in Feed for Control of Mortality in Channel Catfish *Ictalurus punctatus* (Rafinesque) Infected with *Edwardsiella ictaluri*, Etiological Agent of Enteric Septicemia. *Journal of the World Aquaculture Society* 35(2), 257-267. 2004.

- Gerald, D.A. and Jane, E.B. (1966) Effect of the normal microbial flora on the resistance of the small intestine to infection. *J Bacteriol* 92, 1604-1608.
- Gildberg, A. and Mikkelsen, H. (1998) Effects of supplementing the feed to Atlantic cod(*Gadus morhua*) fry with lactic acid bacteria and immuno-stimulating peptides during a challenge trial with *Vibrio anguillarum*. *Aquaculture* 167, 103-113.
- Gournier-Chateau, N., Larpent, J.P., Castellanos, I. and Larpent, J.L. (1994) *Les Probiotiques en Alimentation Animale et Humaine* pp. 192. Paris: Technique et Documentation Lavoisier.
- Harikrishnan, R., Nisha Rani, M. and Balasundaram, C. (2003) Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. *Aquaculture* 221, 41-50.
- Harlander, S.K. (2002) The Evolution of Modern Agriculture and Its Future with Biotechnology. *Journal of the American College of Nutrition*, 21:161S-165S.
- Hawke, J. P., 1979: A bacterium associated with disease of pond cultured channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Journal of the Fisheries research Board of Canada* 36, 1508-1512.
- Hawke, J.P. and Khoo, L.H. (2004) Infectious diseases. In *Biology and Culture of Channel Catfish* ed. Tucker, C.S. and Hargreaves, J.A. pp. 387-443. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier.
- Hawke, J. P. , McWhorter, A. C., Steigerwalt, A. G., and Brenner, D. J., 1981: *Edwardsiella ictaluri* sp. nov., the causative agent of enteric septicemia of catfish. *International Journal of Systemic Microbiology* 31, 396-400.
- Hossain, M. J., Rahman, K.H., Terhune. J. S., and Liles, M. R. An outer membrane porin protein modulates phage susceptibility of *Edwardsiella ictaluri*. *Microbiology*. 2012 Feb;158(pt2):474-87. Epub 2011 Dec. 1.
- Irianto, A. and Austin, B. (2002) Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J Fish Dis* 25, 333-342.

- Jack, R.W., Wan, J., Gordon, J., Harmark, K., Davidson, B.E., Hillier, A.J., Wettenhall, R.E., Hickey, M.W. and Coventry, M.J. (1996) Characterization of the chemical and antimicrobial properties of piscicolin 126, a bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* JG126. *Appl Environ Microbiol* 62, 2897–2903.
- Jöborn, A., Olsson, J.C., Westerdah, M.A., Conway, P.L. and Kjelleberg, S. (1997) Colonization in the fish intestinal tract and production of inhibitory substances in intestinal mucus and faecal extracts by *Carnobacterium* sp. strain K1. *J Fish Dis* 20, 383-392.
- Johnson, M.R. (1991) Bacterial resistance to antibiotics: a growing problem in the channel catfish industry. In: *Proceedings of Louisiana Aquaculture Conference* ed. Reigh, R.C., pp. 22–23. Louisiana State University Agricultural Center, Baton Rouge, LA.
- Kenney, D.S. and Couch, T.L. (1981) Mass production of biological agents for plant disease, weed and insect control. In: *Biological Control in Crop Production BARC Symposium No. 5* ed. Papavizas, G.C., pp. 143-150. Totowa, NJ: Allenheld and Osmum.
- Khoo, L. Antibiotic resistance in the channel catfish industry. *Aquaculture 2001: Book of Abstracts*, 329. 2001.
- Klesius, P. H. 1992. Carrier state of channel catfish infected with *Edwardsiella ictaluri* . *Journal of Aquatic Animal Health* 4(3), 227-230.
- Kloepper, J.W., Reddy, M.S., Kenney, D.S., Vavrina, C., Kokalis-Burelle, N., and Martinez-Ochoa, N. (2004) Theory and applications of rhizobacteria for transplant production and yield enhancement. *Proc. XXVI IHC – Transplant Production and Stand Establishment*. Eds. S. Nicola, J. Nowak and C.S. Vavrina. *Acta Hort.* 631:217-229.
- Kloepper, J.W., Ryu, C.-M., Zhang, S. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*, 94:1259-1266.
- Kokalis-Burelle, N., Vavrina, C.S., Reddy, M.S., and Kloepper, J.W. (2003) Amendment of muskmelon transplant media with plant growth-promoting rhizobacteria: effects on seedling

quality, disease, and nematode resistance. *Hortechology* 13:476-482.

Lategan, M.J., Torpy, F.R. and Gibson, L.F. (2004) Control of saprolegniosis in the eel *Anguilla australis* Richardson, by *Aeromonas media* strain A199. *Aquaculture* 240, 19-27.

Lewis, W.J., van Lenteren, J.C., Sharad, C., Phatak, C., and Tumlinson III, J.H. (1997). A total system approach to sustainable pest management. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 94:12243–12248.

Lim, C. and Klesius, P. H. Influence of Feed Deprivation on Hematology, Macrophage Chemotaxis, and Resistance to *Edwardsiella ictaluri* Challenge of Channel Catfish. *Journal of Aquatic Animal Health* 15(1), 13-20. 2003.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (2012) *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test*; Approved Standard-Ninth Edition. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Pannucci, J., Okinaka, R.T., Sabin, R. and Kuske, C.R. (2002) *Bacillus anthracis* pXO1 plasmid sequence conservation among closely related bacterial species. *J Bacteriol* 184, 134-141.

Phan, L.T., Bui, T.M., Nguyen, T.T.T., Gooley, G.J., Ingram, B.A., Nguyen, H.V., Nguyen, P.T. and De Silva, S.S. (2009) Current status of farming practices of striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* in the Mekong Delta, Vietnam. *Aquaculture* 296, 227-236.

Phuong, N.T. and Oanh, D.T.H. (2009) Striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) aquaculture in Viet Nam: an unprecedented development within a decade. In: *Success Stories in Asian Aquaculture* ed. De Silva, S.S., Davy, F.B., pp. 133-149. Dordrecht, Bangkok and Ottawa: Springer, NACA and IDRC.

Plumb, J.A., 1999: *Edwardsiella septicaemias*, In: Woo, P.T.K., and Bruno, D.W.[Eds.] *Fish Diseases and disorders*, Vol. 3, pp479-521.

Plumb, J.A., Sheifinger, C.C., Shryock, T.R. and Goldsby, T. (1995) Susceptibility of six

bacterial pathogens of channel catfish to six antibiotics. *J Aquat Anim Health* 7, 211-217.

Pridgeon, J.W., Klesius, P.H., Mu, X. and Song, L. (2011) An *in vitro* screening method to evaluate chemicals as potential chemotherapeutants to control *Aeromonas hydrophila* infection in channel catfish. *J Appl Microbiol* 111, 114-124.

Queiroz, J. and Boyd, C.E. (1998) Effects of a Bacterial Inoculum in Channel Catfish Ponds. *J World Aquacult Soc* 29, 67-73.

Rengpipat, S., Phianphak, W., Piyatiratitivorakul, S. and Menasveta, P. (1998) Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. *Aquaculture* 167, 301-313.

Rhaman, M.H., Suzuki, S. and Kawai, K. (2001) The effect of temperature on *Aeromonas hydrophila* infection in goldfish, *Carassius auratus*. *J Appl Ichthyol* 17, 282-285.

Robertson, P.A.W., O'Dowd, C., Burrells, C., Williams, P. and Austin, B. (2000) Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Aquaculture* 185, 235-243.

Roach, S. and Tannock, G.W. (1980) Indigenous bacteria that influence the number of *Salmonella typhimurium* in the spleen of intravenously challenged mice. *Can J Microbiol* 26, 408-411.

Sanchis, V., and Bourguet, D. (2008) *Bacillus thuringiensis*: applications in agriculture and insect resistance management. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 28:11-20.

Serageldin, I. (1999) Biotechnology and food security in the 21st century. *Science*, 285:387-389.

Shoemaker, C. A., Klesius, P. H., and Bricker, J. M., 1999: Efficacy of a modified live *Edwardsiella ictaluri* vaccine in channel catfish as young as seven days post hatch. *Aquaculture* 176, 189-193.

- Smoragiewicz, W., Bielecka, M., Babuchowski, A., Boutard, A. and Dubeau, H. (1993) Les probiotiques. *Can J Microbiol* 39, 1089-1095.
- Sorokulova, I (2008) Preclinical testing in the development of probiotics: a regulatory perspective with *Bacillus* strains as an example. *Clin Infect Dis* 46, SS92-95.
- Sugita, H., Miyajima, C. and Deguchi, Y. (1990) The vitamin B12-producing ability of intestinal bacteria isolated from tilapia and channel catfish. *Nippon Suisan Gakkaishi* 56, 701.
- Tang, L., Shah, S., Chung, L., Carney, J., Katz, L., Khosla, C., and Julien, B. (2000) Cloning and heterologous expression of the epothilone gene cluster. *Science* 287:640-642.
- USDA. Part I: Reference of Fingerling Catfish Health and Production Practices in the United States. 2003a. Fort Collins, CO #N406.1103, USDA:APHIS:VS:CEAH, National Animal Health Monitoring System.
- USDA. Part II: Reference of Foodsize Catfish Health and Production Practices in the United States. 2003b. Fort Collins, CO #N407.1103, USDA:APHIS:VS:CEAH, National Animal Health Monitoring System.
- U.S. Published Application No. 20100092431, published April 15, 2010; Inventor(s): Liles, M.R., Walakira, J., Carrias, A., and Terhune, J.
- Wagner, B.A., Wise, D.J., Khoo, L.H. and Terhune, J.S. (2002) The epidemiology of bacterial diseases in food-size channel catfish. *J Aquat Anim Health* 14, 263-272.
- Walakira, J., Carrias, A., Hossain, M., Jones, E., Terhune, J.S., and Liles, M.R. (2008) Identification and characterization of bacteriophages specific to the catfish pathogen *Edwardsiella ictaluri*. *Journal of Applied Microbiology*, 105(6):2133-2142.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. and Lane, D.J. (1991) 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *J Bacteriol* 173, 697-703.
- Welch, T. (2008) IncA/C Plasmid-Mediated Florfenicol Resistance in the Catfish Pathogen

Edwardsiella ictaluri. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 53:845-846.

Wilson, A. C., M. Perego, and J. A. Hoch. (2007) New transposon delivery plasmids for insertional mutagenesis in *Bacillus anthracis*. J. Microbiol. Methods 71:332-335.

Wise, D. J., Camus, A. C., Schwedler, T. E., and Terhune, J. S., 2004: Health Management. In: C. S. Tucker and J. A. Hargreaves (eds.), Biology and Culture of Channel Catfish, Amsterdam, The Netherlands.

Wise, D. J. and Johnson, M. J., 1998: Effect of feeding frequency and Romet-medicated feed on survival, antibody response, and weight gain of fingerling channel catfish *Ictalurus punctatus* after natural exposure to *Edwardsiella ictaluri*. Journal of the World Aquaculture Society 29: 169-175.

Wise, D. J., Klesius, P. H., Shoemaker, C. A., and Wolters, W. R., 2000: Vaccination of mixed and full-sib families of channel catfish *Ictalurus punctatus* after natural exposure to *Edwardsiella ictaluri*. Journal of the World Aquaculture Society 31: 206-212.

Wise, D. J. and Terhune, J. S., 2001: The relationship between vaccine dose and efficacy in channel catfish *Ictalurus punctatus* vaccinated as fry with a live attenuated strain of *Edwardsiella ictaluri* (RE-33). Journal of the World Aquaculture Society 32: 177-183.

Zehnder, G.W., Murphy, J.F., Sikora, E.J. and Kloepper, J.W. (2001) Application of rhizobacteria for induced resistance. *European Journal of Plant Pathology*. 107:39-50.

Bảng 1. Hoạt tính kháng khuẩn của 22 chủng *Bacillus* với mầm bệnh.

Phát sinh loài	Chủng	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Edwardsiella ictaluri</i>	<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>Flavobacterium culumnaire</i>	<i>Saprolegnia ferax</i>	<i>Streptococcus iniae</i>	<i>Yersinia ruckeri</i>
Nhóm <i>B. subtilis</i>	AB01	+	+	+	+++	+	++	++
<i>B. pumilus</i> [†]	AP18	+	+	-	-	+	+	-
Nhóm <i>B. subtilis</i>	AP71	+	++	+	-	-	++	+
<i>B. cereus</i>	AP76	+	++	++	-	+	++	++
Nhóm <i>B. subtilis</i>	AP77	+	+++	++	-	+	+	++
Nhóm <i>B. subtilis</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> [†]	AP79	++	++	+	-	-	++	++
Nhóm <i>B. subtilis</i>	AP102	+	++	++	++	+	-	++
Nhóm <i>B. subtilis</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> [†]	AP143	++	++	++	-	+	+	++
Nhóm <i>B. subtilis</i>	AP183	+	++	++	-	-	++	+
Nhóm <i>B. subtilis</i>	AP189	++	+++	++	-	-	++	+
<i>B. methylotrophicus</i>	AP191	++	+++	+	+	+	++	-
Nhóm <i>B. subtilis</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> [†]	AP193L	++	++	++	++	+	+	-
Nhóm <i>B. subtilis</i>	AP215	+	+++	+	-	+	+	++
Nhóm <i>B. subtilis</i>	AP218	+	++	+	-	+	+	+
Nhóm <i>B. subtilis</i>	AP219	++	++	+	+	+	++	+
Nhóm <i>B. subtilis</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> [†]	AP254L	+	++	+	++	-	-	-

<i>B. pumilus</i>	AP280	+	++	+	-	+	+	+
Nhóm <i>B. subtilis</i>	AP295	+	++	+	-	+	+	++
Nhóm <i>B. subtilis</i>	AP301	+	++	+	+++	+	++	+
Nhóm <i>B. subtilis</i>	AP303	++	++	++	-	+	+	++
Nhóm <i>B. subtilis</i>	AP305	++	++	++	-	-	+	++

(+) Vùng ức chế lên đến 5 mm;

(++) Vùng ức chế nằm trong khoảng từ 5 mm đến 1 cm;

(+++) Vùng ức chế lớn hơn 1 cm.

(-) Vùng ức chế không quan sát được.

* Liên kết phát sinh loài được suy ra từ việc so sánh bộ gen trình tự các chủng *Bacillus* này với bộ gen *Bacillus* đã được sắp xếp trình tự trước đó.

Bảng 2. Tỷ lệ tử vong (%) ($\pm$ SE) của nhóm cá được tiếp nhận thức ăn có bổ sung chủng *Bacillus* khác nhau hoặc thức ăn đối chứng và được gây nhiễm bằng *E. ictaluri* (n=4).

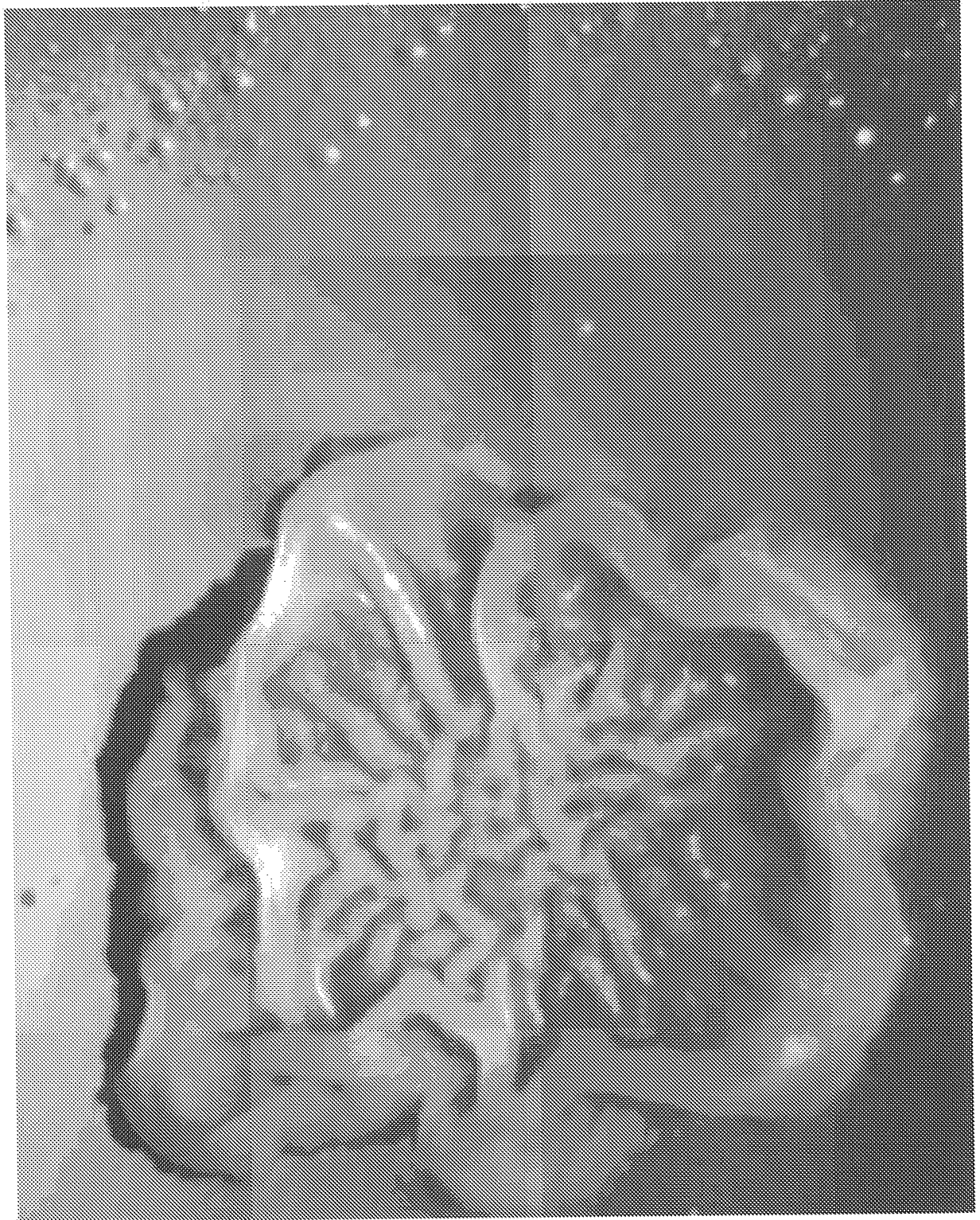
Xử lý	Gây nhiễm cá da trơn (Fig 5.A)	Gây nhiễm Cá da trơn (Fig 5.B)	Gây nhiễm Cá da trơn sọc vằn (Fig 5.C)
Đối chứng	98,0 $\pm$ 1,16 ^a	41,3 $\pm$ 5,91 ^a	70,8 $\pm$ 7,31 ^a
AB01	84,8 $\pm$ 1,95 ^{bc}	37,5 $\pm$ 9,46 ^a	56,9 $\pm$ 6,56 ^{ab}
AP143	83,1 $\pm$ 2,88 ^{bc}	43,3 $\pm$ 14,81 ^a	Không xác định được
AP193L	95,0 $\pm$ 3,00 ^{ab}	35,0 $\pm$ 5,40 ^a	30,6 $\pm$ 23,73 ^{ab}
AP254L	93,7 $\pm$ 2,79 ^{ab}	Không xác định được	54,2 $\pm$ 11,43 ^{ab}
AP79	89,0 $\pm$ 2,74 ^{abc}	46,3 $\pm$ 5,15 ^a	9,7 $\pm$ 6,56 ^b

Các giá trị có nghĩa trong cùng một cột có chỉ số chữ cái trên không khác nhau đáng kể ($P > 0,05$) được xác định bằng thử nghiệm Tukey.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm thức ăn dùng cho động vật thủy sinh chứa chủng *Bacillus* tạo bào tử, trong đó chủng *Bacillus* tạo bào tử là loài *Bacillus* có trình tự 16S rADN bao gồm SEQ ID NO:1 hoặc 2 hoặc bao gồm trình tự 16S rADN có mức tương đồng ít nhất là khoảng 99% với các trình tự nêu trong SEQ ID NO:1 hoặc 2, và trong đó chủng *Bacillus* tạo bào tử có mặt với mật độ ít nhất là khoảng 10^4 CFU/g thức ăn.
2. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chủng *Bacillus* tạo bào tử miễn cảm với một hoặc nhiều chất kháng sinh chọn từ nhóm bao gồm carbenicillin, ampicillin, spectinomycin, oxacillin, vancomycin, cephalothin, novobiocin, sulfadiazine, amikacin, erythromycin, neomycin, penicillin, chloramphenicol, sulfamethoxazol, norfloxacin, gentamicin và ciprofloxacin.
3. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chủng *Bacillus* tạo bào tử được chọn từ nhóm bao gồm chủng được lưu giữ với các số truy nhập là NRRL B-50741, NRRL B-50742, NRRL B-50743, NRRL B-50744, và NRRL B-50745.
4. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm thức ăn là chế phẩm thức ăn cho cá nuôi.
5. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này bao gồm một chủng *Bacillus*.
6. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này bao gồm hỗn hợp của các chủng.
7. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chủng *Bacillus* tạo bào tử ức chế sự sinh trưởng của một hoặc nhiều vi khuẩn được chọn từ nhóm bao gồm *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella ictaluri*, *Edwardsiella tarda*, *Flavobacterium columnare*, *Streptococcus iniae*, và *Yersinia ruckeri*.

8. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chủng *Bacillus* tạo bào tử ức chế sự sinh trưởng của nấm trứng *Saprolegnia*.
9. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này còn bao gồm thể thực khuẩn gây nhiễm *E. ictaluri*.
10. Chế phẩm theo điểm 9, trong đó thể thực khuẩn là ϕ eiAU.
11. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này còn bao gồm chất được chọn từ nhóm bao gồm sulfadimetoxin, ormetoprim, và florfenical.
12. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này còn bao gồm chủng *E. ictaluri* nhược độc.

**FIG. 1**

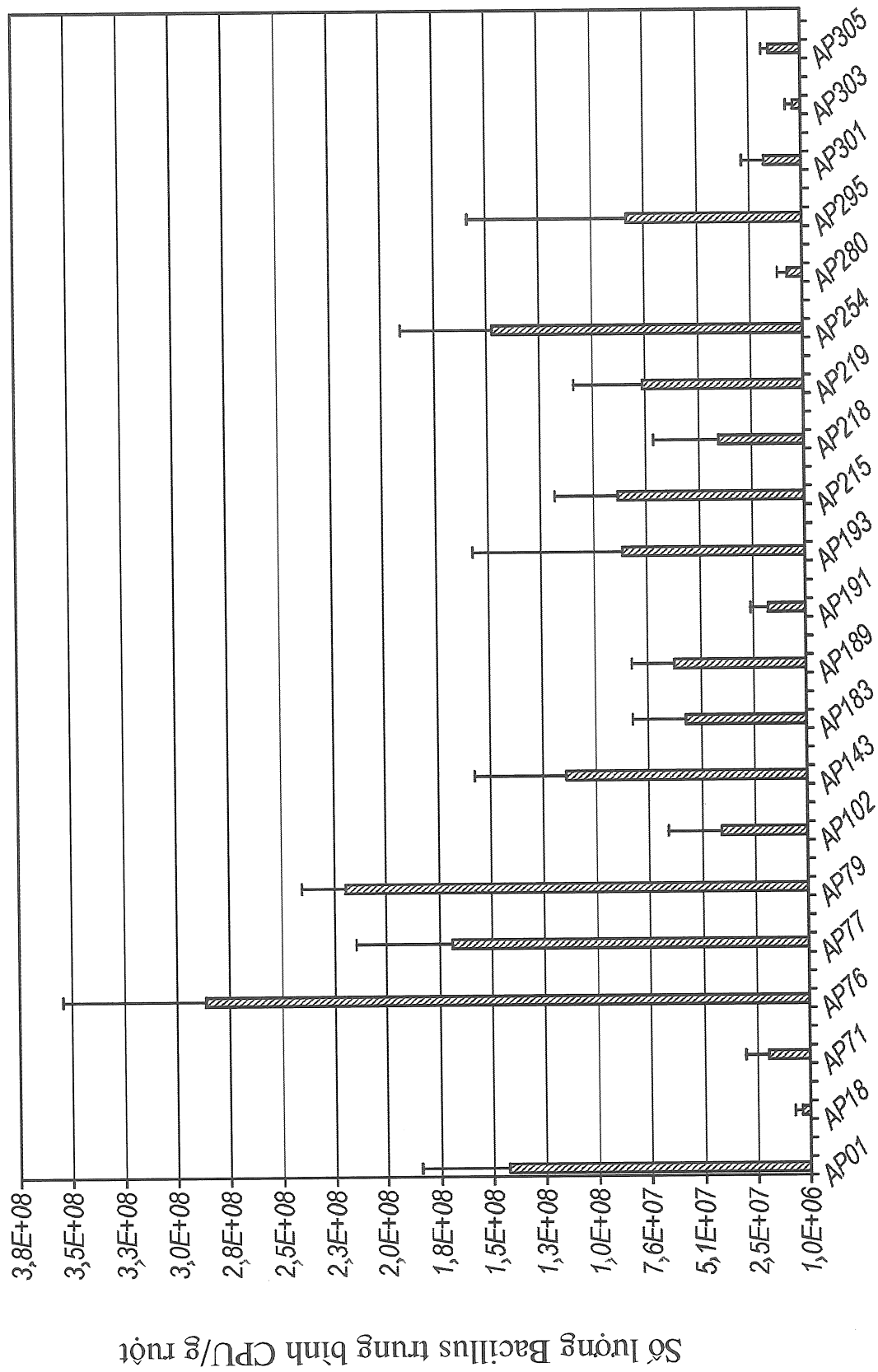


FIG. 2

FIG. 3

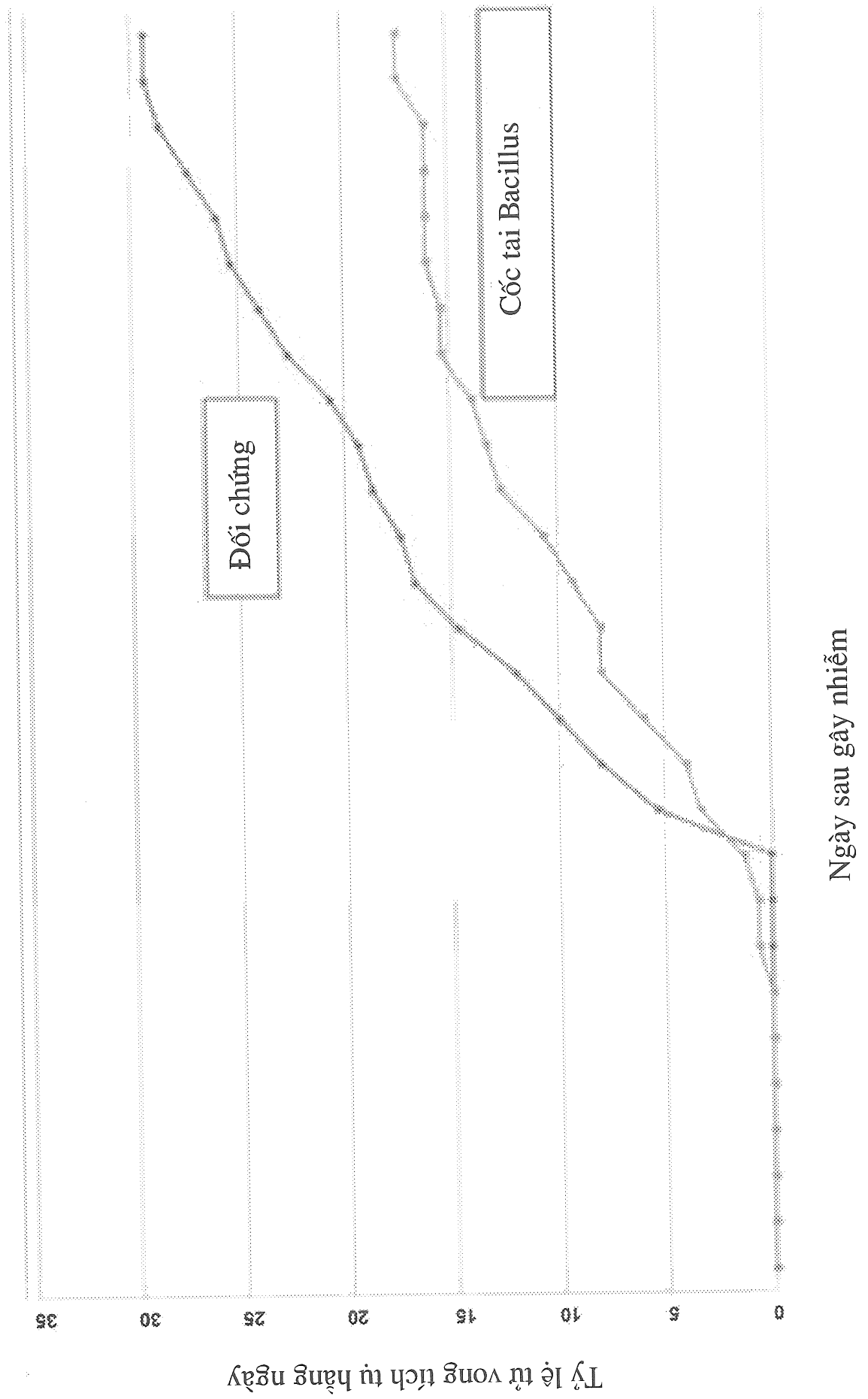


FIG. 4

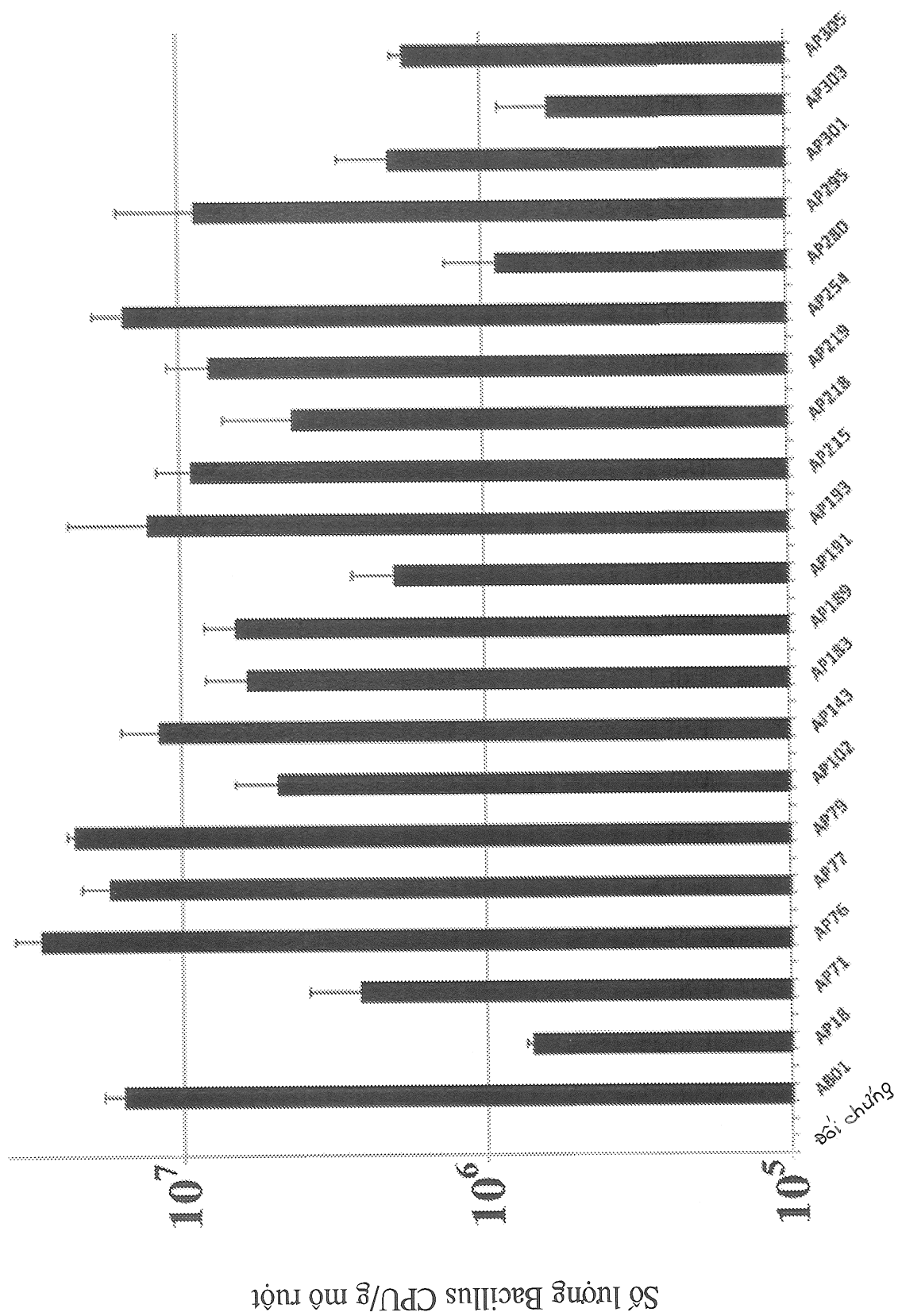


FIG. 5.A

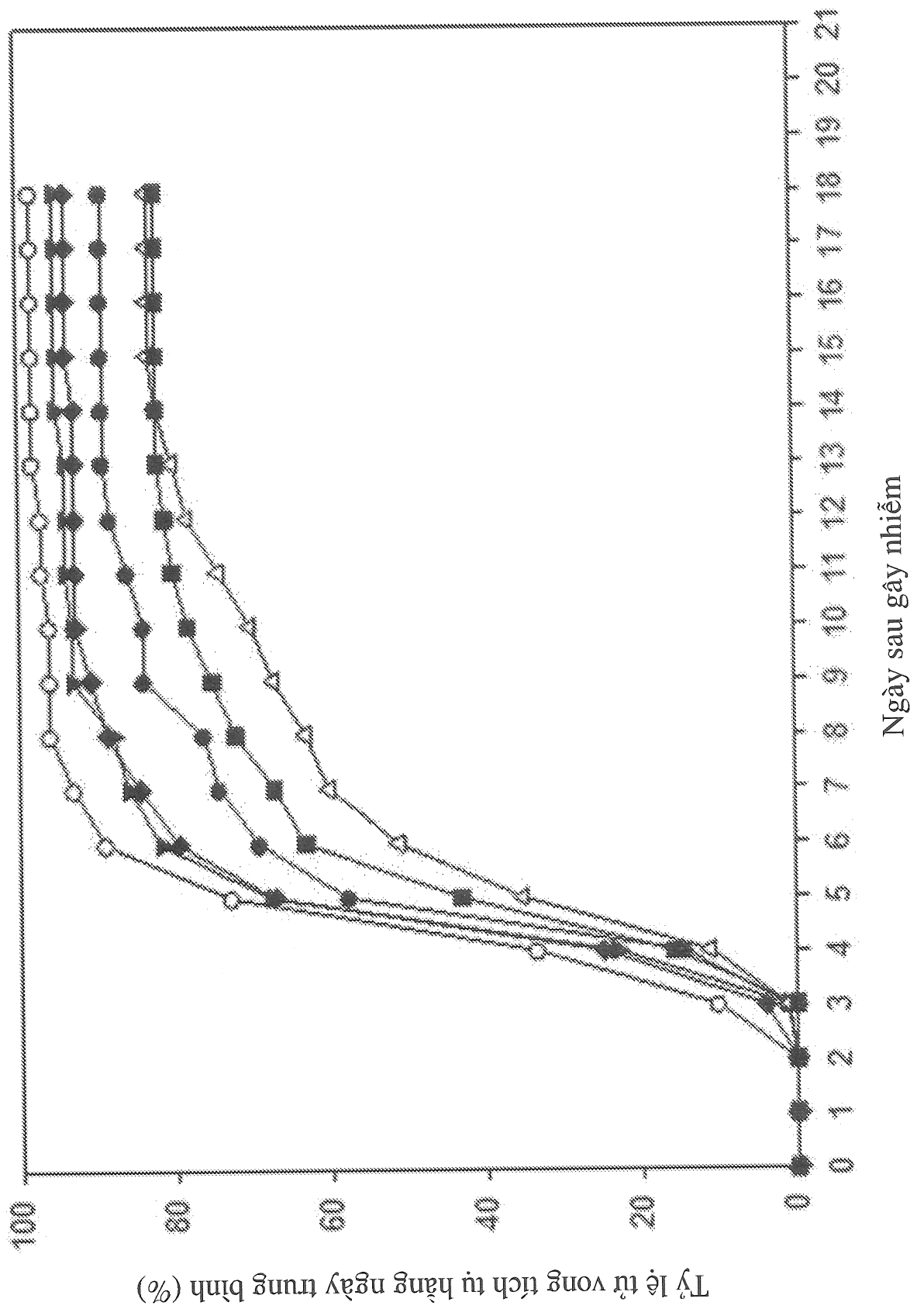
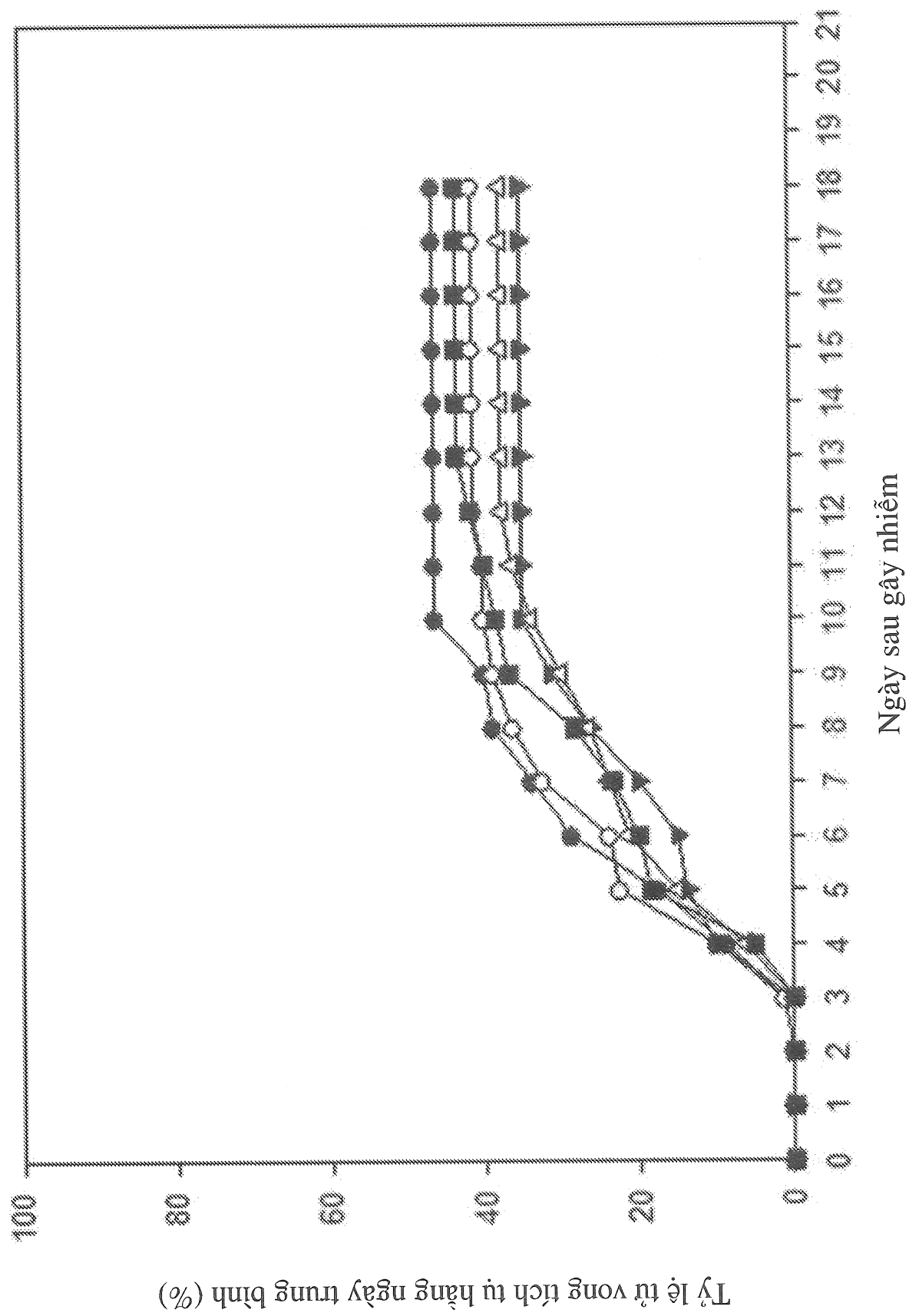
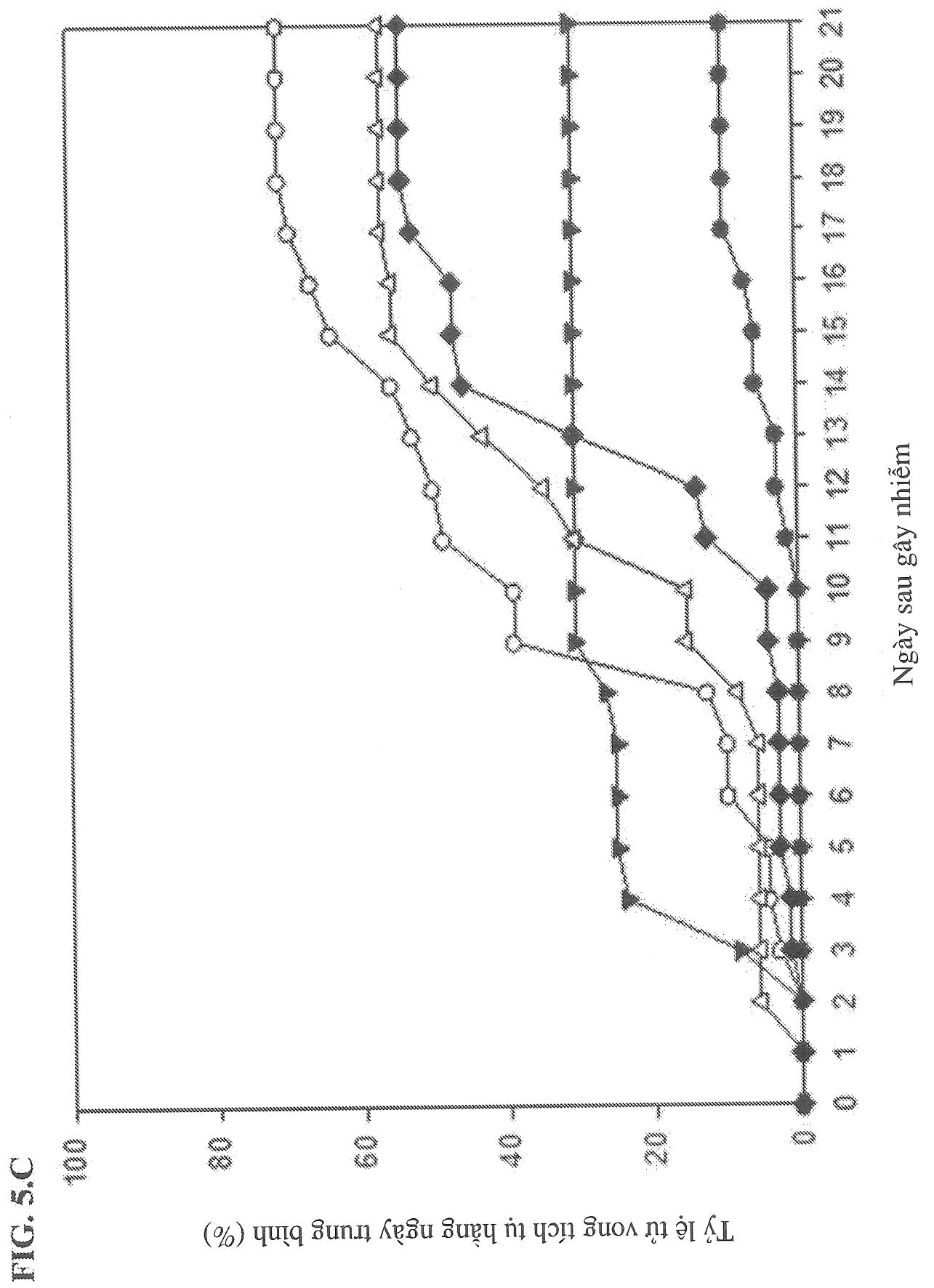


FIG. 5.B





DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110>	Auburn University Terhune, Jeffery Liles, Mark Kloepper, Joseph	
<120>	Chế phẩm thức ăn dùng cho động vật thủy sinh	
<130>	5171-00321	
<150>	US 61/480,622	
<151>	2011-04-29	
<160>	3	
<170>	PatentIn phiên bản 3.5	
<210>	1	
<211>	1124	
<212>	ADN	
<213>	Bacillus subtilis	
<400>	1	
	tgctatacat gcaagtcgag cggacagatg ggagcttgct ccctgatgtt agcggcggac	60
	gggtgagtaa cacgtgggta acctgcctgt aagactggga taactccggg aaaccggggc	120
	taataccgga tggttgtttg aaccgcatgg ttcagacata aaaggtggct tcggctacca	180
	cttacagatg gacccgcggc gcattagcta gttggtgagg taacggctca ccaaggcgac	240
	gatgcgtagc cgacctgaga gggtagtcgg ccacactggg actgagacac ggcccagact	300
	cctacgggag gcagcagtag ggaatcttcc gcaatggacg aaagtctgac ggagcaacgc	360
	cgcgtgagtg atgaaggttt tcggatcgta aagctctgtt gttaggggaag aacaagtgcc	420
	gttcaaataag ggcggcacct tgacgggtacc taaccagaaa gccacggcta actacgtgcc	480
	agcagccgag gtaatacgta ggtggcaagc gttgtccgga attattgggc gtaaagggtc	540
	cgcaggcggt ttcttaagtc tgatgtgaaa gccccgggt caaccgggga gggtcattgg	600
	aaactgggga acttgagtgc agaagaggag agtggaattc cacgtgtagc ggtgaaatgc	660
	gtagagatgt ggaggaacac cagtggcgaa ggcgactctc tggctctgtaa ctgacgctga	720
	ggagcgaaaag cgtggggagc gaacaggatt agataccctg gtagtccacg ccgtaaacga	780
	tgagtgctaa gtggttagggg gtttccgccc cttagtgtctg cagctaacgc attaagcact	840

ccgcctgggg agtacggtcg caagactgaa actcaaagga attgacgggg gcccgacaaa 900
 gcgggtggagc atgtgggttta attcgaagca acgcgagaac cttaccaggt cttgacatcc 960
 tctgacatcc tagagatagg acgtcccctt cgggggcaga gtgacagtgg tgcattggtg 1020
 tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggta agtcccgcac gagcgacccc ttgatcttag 1080
 ttgccagcat tcagttggca ctctaagggtg actgccgggtg acga 1124

<210> 2

<211> 1577

<212> ADN

<213> Bacillus amyloliquefaciens

<400> 2

gatcctgggt caggacgaac gctggcgggcg tgcctaatac atgcaagtcg agcggacaga 60
 tgggagcttg ctccctgatg ttagcggcgg acgggtgagt aacacgtggg taacctgcct 120
 gtaagactgg gataactccg ggaaaccggg gctaataccg gatggttgct tgaaccgcat 180
 ggttcagaca taaaagggtg cttcggctac cacttacaga tggaccgcg gcgcattagc 240
 tagttggtga ggtaacggct caccaaggcg acgatgcgta gccgacctga gaggtgatc 300
 ggccacactg ggactgagac acggcccaga ctctacggg aggcagcagt agggaatctt 360
 ccgcaatgga cgaaagtctg acggagcaac gccgcgtgag tgatgaaggt tttcggatcg 420
 taaagctctg ttgttaggga agaacaagtg ccgttcaaata agggcggcac cttgacggta 480
 cctaaccaga aagccacggc taactacgtg ccagagccgc gggtaatacg taggtggcaa 540
 gcgttggtccg gaattattgg gcgtaaaggc ctgcgaagcg ttttcttaag tctgatgtga 600
 aacccccggg ctcaaccggg gagggtcatt ggaaaccgag gaacttgagt gcagaagagg 660
 agagtggaaat tccacgtgta gcggtgaaat gcgtagagat gtggaggaac accagtggcg 720
 aaggcgactc tctgttctgt aactgacgct gagagagcga agcgtgggga gcgaacagaa 780
 ttagataccc tggtagtcca cgccgtaaac gatgagtgtt aagtgttagg gggtttccgc 840
 cccttagtgc tgcagctaac gcattaagca ctccgcctgg ggagtacggg cgcaagactg 900
 aaactcaaag gaattgacgg gggcccgcac aagcgggtgga gcatgtggtt taattcgaag 960
 caacgcgaag aaccttacca ggtcttgaca tcctctgaca atcctagaga taggacgtcc 1020
 ccttcggggg cagagtgaca ggtggtgcat ggttgctgct agctcgtgct gtgagatgtt 1080


```

gggttaagtc cgcgaacgag cgcaaccctt gatcttagtt gccagcattc agttgggcac      1140
tctaaggtga ctgccggtga caaaccggag gaaggtgggg atgacgtcaa atcatcatgc      1200
cccttatgac ctgggctaca cacgtgctac aatggacaga acaaagggca gcgaaaccgc      1260
gaggttaagc caatcccaca aatctgttct cagttcggat cgcagtctgc aactcgactg      1320
cgtgaagctg gaatcgctag taatcgcgga tcagcatgcc gcggtgaata cgttcccggg      1380
ccttgtagac accgcccgtc acaccacgag agtttgtaac acccgaagtc ggtgaggtaa      1440
cctttatgga gccagccgcc gaaggtggga cagatgattg ggtgaagtc gtaacaaggt      1500
agccgtatcg gaaggtgcgg ctggatcacc tcctttctaa ggattttaac ggaatataag      1560
accttgggtc ttataac                                                    1577

```

```

<210> 3
<211> 722
<212> ADN
<213> Nhân tạo

```

```

<220>
<223> Trình tự liên ứng cho Bacillus spp. 16S rDNA

```

```

<400> 3
acacttagca ctcacggtt tacggcgtgg actaccaggg tatctaattc tgttcgctcc      60
ccacgctttc gtcctcagc gtcagttaca gaccagagag tcgccttcgc cactggtgtt      120
cctccacatc tctacgcatc tcaccgctac acgtggaatt ccactctcct cttctgcact      180
caagttcccc agtttccaat gaccctcccc ggttgagccg ggggctttca catcagactt      240
aagaaaccgc ctgcgagccc ttacgcca ataattccgg acaacgcttg ccacctacgt      300
attaccgagg ctgctggcac gtagttagcc gtggctttct ggtaggtac cgtcaaggtg      360
ccgccctatt tgaacggcac ttgttcttcc ctaacaacag agctttacga tccgaaaacc      420
ttcatcactc acgcggcgtt gtcctgcag actttcgtcc attgcggaag attccctact      480
gctgcctccc gtaggagtct gggccgtgtc tcagtcccag tgtggccgat caccctctca      540
ggtcggctac gcatcgctgc cttggtgagc cgttacctca ccaactagct agtgcgccgc      600
gggtccatct gtaagtggta gccgaagcca ccttttatgt ctgaaccatg cggttcaaac      660
aaccatccgg tattagcccc ggtttccggg atgttatccc catgtcttag cagggcaggg      720
tt                                                                    722

```