



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

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

(11)



1-0042163

(51)^{2020.01} C12N 1/00

(13) B

(21) 1-2021-00388

(22) 25/01/2021

(45) 25/12/2024 441

(43) 25/05/2021 398

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

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

(54) CHỦNG VI KHUẨN KHỬ NITRAT *BACILLUS CEREUS* ST26 THUẦN KHIẾT
VỀ MẶT SINH HỌC

(57) Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn khử nitrat *Bacillus cereus* ST26 thuần khiết về mặt sinh học có khả năng khử nitrit trực tiếp cả điều kiện kỵ khí và hiếu khí trong môi trường nuôi thủy sản nước lợ hay nước ngọt với hiệu quả cao.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực vi sinh, cụ thể là đề cập đến chủng vi khuẩn khử nitrat *Bacillus cereus* ST26 có khả năng khử nitrit trực tiếp cả điều kiện kỵ khí và hiếu khí trong môi trường nuôi thủy sản nước lợ hay nước ngọt với hiệu quả cao.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

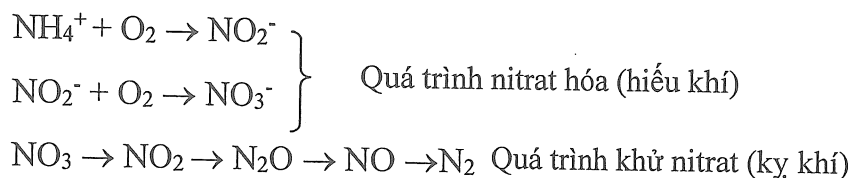
Nitrat là nguồn chính của nitơ vô cơ hòa tan trong nước thải, nồng độ nitrat cao trong nước mặt có thể gây ra hiện tượng phú dưỡng, ngoài ra sự hình thành nitrit trong quá trình chuyển đổi nếu ở trạng thái dư thừa sẽ ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khỏe của con người, chẳng hạn như hình thành methemoglobin trong máu (chất không mang oxy đến các tế bào trong cơ thể) và ung thư biểu mô (carcinoma) (Pai và cs, 1999).

Tại các đầm nuôi thủy sản nói chung và nuôi tôm thương phẩm nói riêng, các hợp chất chứa nitơ như amoni và nitrit luôn được hình thành và tăng đến cấp số nhân trong quá trình nuôi tôm và cực kỳ độc cho tôm, chỉ với hàm lượng amoni (NH_4^+) 0,425mg/l trong môi trường nước có thể gây độc cho tôm, cá và các động vật thủy sinh khác. Nitrit có thể được tạo thành từ quá trình oxy hóa amoni, hoặc bước đầu tiên của quá trình khử nitrat. Nitrit cũng là thành phần gây độc đối với ấu trùng tôm, khi hàm lượng nitrit vượt mức cho phép nó làm giảm khả năng sinh trưởng, giảm vận chuyển oxy trong máu dẫn đến tôm bị stress ảnh hưởng trực tiếp đến sức khỏe tôm. Do vậy cần phải có các biện pháp để xử lý các thành phần ô nhiễm này.

Có nhiều phương pháp để loại bỏ các hợp chất nitơ bao gồm trao đổi ion, hấp phụ, thẩm thấu ngược, điện phân, xúc tác và sinh học (Wang và cs, 2016). Nhưng nhược điểm chính của các phương pháp hóa lý nói trên là chi phí cao và sự hình thành các sản phẩm phụ sau khi xử lý, hơn nữa các quy trình này lại không phù hợp cho các ứng dụng tại chỗ (Sahinkaya và cs, 2011). Vì những lý do này, khử nitơ sinh học được coi là một quá trình phù hợp, hiệu quả và thân thiện với môi trường.

- *Xử lý các hợp chất nitơ bằng con đường sinh học*

Để xử lý các hợp chất nitơ trong các nguồn nước bị ô nhiễm bằng con đường sinh học, quá trình truyền thống là nitrat hóa và khử nitrat vẫn được áp dụng thông qua những công nghệ khác nhau. Tại các hệ thống tái sử dụng nước nuôi trồng thủy sản, các hợp chất nitơ được loại bỏ thông qua hệ lọc sinh học nitrat hóa và khử nitrat:



Cho đến nay các hệ lọc sinh học nitrat hóa đã được thiết lập ổn định, nhưng hệ lọc khử nitrat vẫn đang được phát triển bằng nhiều con đường khác nhau. Các nghiên cứu từ trước đến nay, con đường khử nitrat đến sản phẩm cuối cùng là khí nitơ (N_2) bằng con đường kỵ khí với sự tham gia của các vi sinh vật kỵ khí tùy nghi, với chất cho điện tử có nguồn gốc từ hữu cơ (khử nitrat dị dưỡng) hoặc các nguồn vô cơ (khử nitrat tự dưỡng). Tuy nhiên đã có những phát hiện về khả năng khử nitrat hiếu khí.

- *Khử nitrat trong điều kiện hiếu khí*

Robertson và cộng sự đã phát hiện được quá trình khử nitrat hiếu khí với cơ chế có thể đồng thời sử dụng nitrat và oxy làm chất nhận điện tử (Robertson và cs, 1988, 1989), ông và cộng sự đã phân lập được chủng vi khuẩn khử nitrat hiếu khí như *Paracoccus pantotrophus*, *Paracoccus denitrificans*, *Pseudomonas* sp, và *Alcaligenes faecalis* trong hệ thống khử nitrat – sulfur; Frette và cs (1997) đã phân lập được chủng vi khuẩn khử nitơ từ bể xử lý nước thải kỵ khí/hiếu khí không liên tục, ngoài ra một số vi khuẩn khác đã cho thấy khả năng khử nitrat hiếu khí, như *Hyphomicrobium* X (Meiberg và cs, 1980), *Klebsiella* (Takaya và cs, 2003), *Chrobactrum* (Lukow và cs, 1997) và *Zoogloea* (Pai và cs, 1999), Wang và cộng sự (2007) đã phân lập được các chủng vi khuẩn thuộc chi *Pseudomonas*, *Delftia*, *Herbaspirillum* và *Comamonas* thể hiện khả năng khử nitrat mạnh. Cho đến nay, đã có nhiều vi khuẩn khử nitơ hiếu khí được phân lập từ các hệ sinh thái (Guo và cs, 2013, Han và cs, 2014, Duan và cs, 2015).

Sự xuất hiện vi khuẩn khử nitrat hiếu khí đã đưa ra một lợi thế để vượt qua những hạn chế của việc loại bỏ nitrat sinh học truyền thống. So với quá trình khử nitrat kỵ khí, khử nitrat hiếu khí sẽ linh động hơn nên việc loại bỏ nitơ hiệu quả hơn và tốc độ phân hủy carbon hữu cơ cao hơn. Mặc dù đã phát hiện được vi khuẩn khử nitrat hiếu khí, nhưng các nghiên cứu trước đây về khử nitơ hiếu khí chủ yếu tập trung vào hiệu quả loại bỏ nitrat và tối ưu hóa các điều kiện loại bỏ. Tuy nhiên, rất ít nghiên cứu điều tra, phân lập, tuyển chọn và ứng dụng tiềm năng của vi khuẩn khử nitơ hiếu khí để loại bỏ trực tiếp nitrit trong nước nuôi trồng thủy sản. Sự phát hiện chủng vi khuẩn khử nitrit trực tiếp trong điều kiện hiếu khí đã chứng tỏ sự tồn tại của chúng và thúc

đẩy sự quan tâm trong các nghiên cứu về cơ chế khử nitơ của chúng trong điều kiện hiếu khí, đồng thời đóng vai trò quan trọng trong việc hình thành chế phẩm sinh học góp phần xử lý nước nuôi trồng thủy sản bị ô nhiễm ni tơ. Quá trình khử nitrit hiếu khí khi kết hợp với quá trình nitrat hóa sẽ xử lý triệt để amoni và nitrit (đây là 2 hợp chất rất độc cho động vật thủy sản) mà không cần hệ thống hiếu khí, kỵ khí phức tạp nữa, ngoài ra còn có thể giảm bớt một bước trong quá trình nitrat hóa đó là ô xi hóa nitrit thành nitrat nên giảm được chi phí vận hành, dẫn đến giảm được giá thành công nghệ. Do vậy khử nitrit hiếu khí sẽ rất phù hợp trong các đầm ao nuôi tôm công nghiệp, thâm canh hay bán thâm canh. Việc kết hợp giữa khử nitrit hiếu khí với quá trình nitrat hóa hiếu khí sẽ làm tăng khả năng xử lý các hợp chất nitơ tại các đầm nuôi thủy sản, làm giảm nguồn cacbon hữu cơ dư thừa và có thể đồng khử sunfat trong các hệ thống tuần hoàn nước.

- *Khả năng bám dính lên giá thể do sự hình thành màng sinh học của vi sinh vật*

Một trong những công nghệ làm tăng hiệu quả xử lý ô nhiễm nitơ và dễ dàng áp dụng trong nhiều điều kiện địa hình khác nhau, đó là việc gắn vi khuẩn lên các giá thể hay còn gọi là chất mang. Để việc gắn vi khuẩn lên các giá thể đạt hiệu quả cao thì vi sinh vật đó phải có khả năng tạo màng sinh học. Đó là các polime ngoại bào do chính vi khuẩn tạo ra và bám dính vào các giá thể. Phương pháp này sẽ tiến bộ hơn so với phương pháp bùn trôi nổi vì: i) tăng mật độ vi sinh (trên một đơn vị thể tích) cao hơn so với trạng thái bông bùn từ hàng trăm tới hàng ngàn lần; ii) hoạt tính trao đổi chất lớn nên tăng hiệu quả xử lý trong hệ thống; iii) Khả năng chống chịu độc tố cao do sự hình thành chất kết dính dưới dạng polime ngoại bào bảo vệ vi khuẩn và tăng khả năng hấp thụ chất dinh dưỡng mà cụ thể chính là các hợp chất nitrit, nitrat. Do đó công nghệ màng sinh học sẽ có tính ổn định cao, lúc đó các vi sinh vật sẽ không bị loại ra ngoài khỏi các hệ thống bởi sự rửa trôi do thay nước hay hút cạn đáy ao nuôi, chịu được áp lực tải trọng nước (Thompson và cs, 2002). Phương pháp này rất thích hợp với nhóm vi khuẩn chuyển hóa nitơ, vì đặc tính nhóm vi khuẩn này thích nghi trong điều kiện sống bám, khi sử dụng hệ thống lọc sinh học này các vi khuẩn chuyển hóa nitơ sẽ bám dính trên chất mang và thực hiện hai bước của quá trình nitrat hóa loại bỏ các hợp chất nitơ độc hại. Hiệu quả của quá trình mang lại đã tạo một hệ thống nuôi tôm khép kín không cần thay nước. Các vật liệu mang thường được sử dụng trong hệ lọc sinh học

như đất sét, sỏi nhẹ, vỏ sò, cát, san hô, nhựa để hỗ trợ các vi khuẩn lơ lửng trong nước bám dính (Malone và Pfeiffer, 2006).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề cập đến chủng vi khuẩn khử nitrat *Bacillus cereus* ST26 (còn được viết tắt là ST26) có khả năng khử nitrit trực tiếp không chỉ ở điều kiện kỵ khí mà còn thể hiện đặc tính này trong điều kiện hiếu khí với hiệu quả cao. Đây là tính chất cực kỳ quan trọng liên quan đến công nghệ xử lý bởi khi kết hợp chủng vi khuẩn này với các vi khuẩn nitrat hóa để ứng dụng trong công nghệ xử lý nước nuôi thủy sản bị ô nhiễm nitơ sẽ chỉ cần trên cùng một bể phản ứng sinh học mà không cần các bể kỵ khí và hiếu khí đi kèm như các mô hình truyền thống. Điểm khác biệt ở đây là khả năng khử nitrit trực tiếp của S26 chính là đã rút ngắn được 1 giai đoạn của quá trình nitrat hóa và 1 giai đoạn đầu của quá trình khử nitrat. Ngoài ra chủng vi khuẩn này có khả năng tạo màng sinh học tốt là cơ sở để bám dính trên các giá thể khi ứng dụng trong các mô hình xử lý nước bị ô nhiễm nitơ giúp vi khuẩn không bị rửa trôi khỏi hệ thống do đặc tính tạo polime ngoại bào của nó. ST26 là vi khuẩn dị dưỡng nên nguồn cacbon cực kỳ quan trọng đối với sinh trưởng, nhưng chủng vi khuẩn này lại có thể sử dụng đa dạng nguồn cacbon khác nhau như glucozơ, sacarozơ, lactozơ và axetat - là nguồn cacbon rẻ tiền. Trong đó sacarozơ hoặc glucozơ có thể thay thế cho nguồn cacbon giá thành cao như cao nấm men, cao thịt và pepton mà vẫn cho hoạt tính khử nitrit rất tốt, đây là đặc tính quan trọng bởi nếu sử dụng nó cho mục đích tạo chế phẩm và sản xuất ở qui mô công nghiệp thì những nguồn cacbon luôn sẵn có và rẻ tiền sẽ tạo một sản phẩm với giá thành thấp, đáp ứng với tình hình thực tế ở nước ta và đặc biệt là không gây ô nhiễm thứ cấp do sử dụng nguồn cacbon giàu dinh dưỡng sẽ tạo điều kiện cho vi khuẩn có hại phát triển. Bên cạnh đó chủng vi khuẩn này còn có khả năng xử lý nitrit tốt không những trên môi trường nước lợ mà còn có cả trên môi trường nước ngọt.

Như vậy với đặc tính trên thì ST26 hoàn toàn có thể sinh trưởng được ở đa dạng điều kiện: hiếu khí, kỵ khí, nước lợ, nước ngọt, nguồn cacbon và nó không những khử nitrit mà còn có khả năng khử cả nitrat vì bản chất đây là chủng khử nitrat, nên khi kết hợp chủng vi khuẩn này với các vi khuẩn nitrat hóa nó sẽ xử lý triệt để tất cả các thành phần ni tơ bị ô nhiễm trong môi trường nuôi thủy sản.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện khả năng tạo khí trong ống Dulhan của vi khuẩn ST26 và các chủng vi khuẩn khác trong điều kiện kỵ khí. ĐC là đối chứng âm, không có vi khuẩn; ST20, ST18, ST30 là các chủng vi khuẩn khử nitrat khác;

Fig 2 thể hiện hình thái khuẩn lạc (A) và hình thái tế bào (B) của chủng ST26 được nuôi cấy trên môi trường khử nitrit dưới kính hiển vi điện tử với độ phóng đại 30.000 lần;

Fig. 3 thể hiện cây phát sinh chủng loại của chủng ST26;

Fig. 4 thể hiện khả năng khử nitrat trong điều kiện kỵ khí của vi khuẩn ST26 và các chủng vi khuẩn khác (được dùng để so sánh);

Fig. 5 thể hiện khả năng khử nitrit trong điều kiện kỵ khí của vi khuẩn ST26 và các chủng vi khuẩn khác (được dùng để so sánh);

Fig. 6 thể hiện khả năng khử nitrit trong điều kiện hiếu khí của vi khuẩn ST26 và các chủng vi khuẩn khác (được dùng để so sánh);

Fig. 7 thể hiện khả năng tạo màng sinh học của vi khuẩn ST26 và các chủng vi khuẩn khác thông qua đồ thị khối với chỉ số OD570 và khả năng bắt màu tím kết tinh. ĐC là đối chứng âm, không chứa vi khuẩn; các chủng vi khuẩn khác là đối chứng dương;

Fig. 8 thể hiện ảnh hưởng của pH đến hoạt tính khử nitrit của vi khuẩn ST26;

Fig. 9 thể hiện ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính khử nitrit của vi khuẩn ST26;

Fig.10 thể hiện ảnh hưởng của nồng độ muối NaCl đến hoạt tính khử nitrit của ST26;

Fig.11 thể hiện hoạt tính khử nitrit của chủng vi khuẩn ST26 trên một số nguồn cacbon khác nhau, trong đó K1 là cao nấm men, cao thịt và pepton.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn khử nitrat *Bacillus cereus* ST26 thuần khiết về mặt sinh học phân lập từ mẫu nước nuôi tôm thương phẩm tại Sóc Trăng, Việt Nam có khả năng khử nitrit trực tiếp trong cả điều kiện hiếu khí và kỵ khí, hiệu quả khử nitrit cao hơn và rút ngắn thời gian ở điều kiện hiếu khí.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn *Bacillus cereus* ST26 có khả năng tạo màng sinh học cao nên dễ dàng gắn chúng trên các giá thể trong các công nghệ xử lý nitơ trong cả điều kiện nước lợ và ngọt. Đồng thời, sáng chế cũng

đề cập đến khả năng sử dụng sacarozơ thay thế cho pepton, cao nấm men và cao thịt của ST26 làm giảm giá thành sản phẩm và công nghệ xử lý nitơ.

A. Phân lập chủng vi khuẩn khử nitrit trong điều kiện kỵ khí và hiếu khí, định danh chủng vi khuẩn này

Mẫu nước nuôi tôm tại Sóc Trăng, Việt Nam được lấy từ các đầm nuôi tôm đã thu hoạch và được bảo quản ở 4°C trong các chai lấy mẫu chuyên dụng cho đến khi phân lập. Môi trường Winogradsky được dùng trong quá trình phân lập được đề cập ở đây là môi trường K1 có thành phần như sau: Pepton (5 g/L), NaCl (5 g/L), cao nấm men (2 g/L), cao thịt (1 g/L), NaNO_3 (0,1 g/L), thạch (15 g/L), pH môi trường 7,5, nhiệt độ nuôi cấy và phân lập 37°C (Atlas, 1995).

Mẫu nước sau khi được hoạt hóa trên môi trường đặc trưng của vi khuẩn khử nitrat, tiến hành phân lập, các chủng vi khuẩn sinh trưởng được trên môi trường này sẽ tiếp tục được đánh giá khả năng sinh khí trong ống Duhall. Đây là tiêu chí đầu tiên để đánh giá khả năng chuyển hóa nitrat có trong môi trường kỵ khí, lượng khí được hình thành có thể là N_2O , NO hoặc N_2 xuất hiện ở những giai đoạn cuối của quá trình khử nitrat. Chủng ST26 là một trong những chủng được lựa chọn do có khả năng sinh khí trong ống Dunhal (Fig.1).

Để đánh giá các chủng vi khuẩn phân lập không những sinh trưởng được trên môi trường đặc trưng thì chúng phải có hoạt tính khử nitrat, tiến hành nuôi tách riêng rẽ từng vi khuẩn ở điều kiện kỵ khí trên môi trường khử nitrat với hàm lượng nitrat ban đầu là 20mg N/l. Kết quả nhận được từ Bảng 1 cho thấy, so với đối chứng (ống thí nghiệm chỉ chứa môi trường, không chứa vi khuẩn) tất cả 5 chủng vi khuẩn đều có khả năng chuyển hóa nitrat sau 7 ngày nuôi cấy, trong đó khả năng chuyển hóa nitrat của chủng ST26 là mạnh nhất đạt hiệu suất chuyển hóa đạt khoảng 95,5%, đặc biệt có sự chuyển hóa tiếp theo sau khi hình thành nitrit nên chỉ số nitrit không xuất hiện trong dịch nuôi cấy khác với chủng ST10, ST18, ST32 khi so sánh.

Bảng 1. Khả năng khử nitrat trong điều kiện kỵ khí của vi khuẩn phân lập

TT	Mẫu	mg N- NO_3 /L	mg N- NO_2 /L
1	ĐC	19,85	0
2	ST10	3,78	15,8
3	ST18	3,51	16,5
4	ST32	5,1	7,11

5	ST20	2,9	0
6	ST26	0,9	0

Một trong những tiêu chí lựa chọn vi khuẩn là ngoài khả năng khử nitrat thì chúng phải khử được nitrit (vì nó nằm trong chuỗi khử nito) cho mục đích là phối hợp với các chủng vi khuẩn nitrat hóa để xử lý triệt để amoni và nitrit trong đầm nuôi thủy sản. Do đó các chủng vi khuẩn phân lập này được đánh giá khả năng khử trực tiếp nitrit trong điều kiện kỵ khí với hàm lượng ban đầu là 20mg N/l. Kết quả cho thấy, khả năng chuyển hóa trực tiếp nitrit chỉ xuất hiện ở chủng ST26 và ST20 nhưng ST26 có hoạt tính chuyển hóa nitrit tốt nhất, chỉ sau 4 ngày đã chuyển hóa được 99% nitrit (Bảng 2), hiệu suất khử nitrit của chủng ST20 chỉ đạt 89% sau 4 ngày.

Bảng 2. Khả năng khử nitrit của vi khuẩn trong điều kiện kỵ khí

TT	Ký hiệu	Nồng độ NO ₂ mg N/l			
		ngày 0	ngày 4	ngày 8	ngày 12
1	ST10	20	19,93	19,47	19,02
2	ST18	20	19,59	19,39	18,94
3	ST20	20	2,071	0,384	0,1
4	ST26	20	0,209	0,025	0,01
5	ST32	20	20	19,04	18,36
6	ĐC	20	20	19,97	19,54

Chủng ST26 tiếp tục được đánh giá khả năng khử nitrit trong điều kiện hiếu khí bằng cách nuôi cấy lắc 70 v/ph (vòng/phút), hàm lượng nitrit ban đầu là 20mg N/l. Kết quả cho thấy chỉ sau 3 ngày hàm lượng nitrit đã được chuyển hóa tới 99% (Bảng 3), trong khi chủng ST20 cũng có khả năng chuyển hóa nitrit trong điều kiện hiếu khí nhưng chỉ đạt hiệu suất chuyển hóa 50,95% sau 3 ngày.

Bảng 3. Khả năng khử nitrit của vi khuẩn trong điều kiện hiếu khí

STT	Ký hiệu	Nồng độ NO ₂ mg N/l			
		Ngày 0	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4
1	ST20	20	12,87	9,81	1,48
2	ST26	20	8,5	0,2	0,01
3	ĐC	20	19,95	19,92	19,58

Như vậy, trong cả 2 điều kiện kỵ khí và hiếu khí chủng vi khuẩn ST26 đều có khả năng khử nitrit trực tiếp. Bình thường trong điều kiện bị thiếu oxy (kỵ khí) chủng vi khuẩn này sử dụng nitrat hay nitrit làm chất cho điện tử để khử nitrat và nitrit đến sản phẩm cuối cùng, còn nếu trong điều kiện có oxy thì nitrat hay nitrit sẽ bị oxy thế chỗ. Theo Robertson và cộng sự (1990) cho rằng, chủng vi khuẩn có khả năng khử nitrat cả trong điều kiện kỵ khí và hiếu khí là do trong tế bào vi khuẩn này có chứa 2 loại enzym nitrat reductase (NAR), 1 loại ở màng ngoại vi, 1 loại liên kết màng nên chúng có thể linh động thực hiện các quá trình khử nitrat trong cả 2 điều kiện.

Với hàm lượng ban đầu là 20mg N-NO₂/L, chỉ sau 3 ngày (hiếu khí), 4 ngày (kỵ khí), chủng ST26 đã khử nitrit với hiệu suất 99%, chứng tỏ đây là chủng vi khuẩn có hoạt tính khử nitrit cao (so sánh với các chủng cùng phân lập tại thời điểm không có hoặc chỉ đạt hiệu suất ~ 50-80%). Đây là lý do chủng vi khuẩn này được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

Xác định đặc điểm sinh học của chủng ST26 theo sáng chế

ST26 được nuôi trong môi trường đặc trưng Winogradsky, sau đó tiến hành cấy trang trên các đĩa thạch tương ứng, sau 48 giờ xác định được hình thái khuẩn lạc (Fig. 2); hình thái tế bào đã được chụp dưới kính hiển vi điện tử với độ phóng đại 15.000 lần và sơ bộ phân loại chúng thuộc chi *Bacillus*, cụ thể: khuẩn lạc hình cầu, màu hồng nhạt, bề mặt khô, mép loang, có nhân, đường kính từ 2,5 - 3 mm. Tế bào hình que, bề mặt sần sùi (kích thước: 783-1000nm x 3,52-4,55 µm), sinh trưởng theo kiểu phân đôi tế bào (Fig. 2).

Để khẳng định vị trí phân loại của chủng ST26 tiến hành xác định gen 16S rARN theo Zhou và cộng sự (1996), sử dụng cặp mồi 27f (xuôi) và 1527r (ngược) với trình tự 5' - AGAGTTTGATCMTGGCTCAG - 3'; 5 - AAAGGAGGTGATCCAGCC- 3', Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR như sau: 94°C: 5 phút; 32 chu kỳ lặp lại (94°C: 1 phút; 58°C: 50 giây; 72°C: 1 phút 30 giây); 72°C: 7 phút; 4°C: giữ mẫu,

Sản phẩm PCR sau khi tinh sạch bằng bộ Kit AccuPrep PCR Purification, Bioneer được sử dụng làm khuôn trong phản ứng đọc trình tự trên máy đọc trình tự tự động ABI PRISM 3,100 Avant Genetic Analyzer theo phương pháp của Sanger, trình tự nucleotit của ST26 được xử lý bằng phần mềm ABI PRISM 3,100 Avant Data Collection v 1.0 và trình tự ADN đó được so sánh với trình tự các đoạn gen khác đã được công bố trong NCBI sử dụng phần mềm Blastn. Các trình tự gen sau đó được xử

lý bằng các phần mềm Bioedit, Clusal X và Mega4 để xây dựng cây phát sinh chủng loại (Fig. 3) và được đăng ký trên NCBI với mã số LC599495. Kết quả xác định vị trí phân loại của chủng ST26 cho thấy nó có độ tương đồng 100% với chủng *Bacillus cereus* DHR2-2 (KF625169). Như vậy, dựa trên một số đặc điểm sinh học cũng như so sánh trình tự gen 16S rARN thì chủng ST26 thuộc chi *Bacillus* và được đặt tên *Bacillus cereus* ST26.

Tên chủng “ST26” trong phạm vi bản mô tả này vẫn được sử dụng để chỉ chủng *Bacillus cereus* ST26 vừa được định tên trên đây.

B. Khả năng tạo màng sinh học của chủng ST26

Chủng ST26 được nuôi cấy trên môi trường Winogradsky như đã nêu ở trên được xác định khả năng tạo màng như sau: Sau 24 giờ nuôi cấy ly tâm loại dịch, thu sinh khối (ly tâm ở 6000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C và rửa bằng nước cất 2 lần với thể tích tương ứng để loại bỏ hoàn toàn môi trường nuôi cấy); bổ sung nước cất sau lần ly tâm cuối cùng và đánh tan sinh khối. Tiến hành pha loãng tới hạn và đo OD ở bước sóng 600 nm (xác định mật độ vi khuẩn); bổ sung 100µl dịch này vào ống epandorf chứa 900µl môi trường, tiếp tục nuôi ở 37°C và đánh giá khả năng tạo biofilm của vi khuẩn sau 24h, kết quả được thể hiện trong Bảng 4.

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

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

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

Trong thí nghiệm này, chủng B-1.1 là một chủng có khả năng tạo màng sinh học (Hoang Phuong Ha và cs, 2016), được sử dụng làm đối chứng dương. Còn đối chứng âm là môi trường không chứa vi khuẩn, kết quả được thể hiện ở Bảng 4.

Bảng 4: Khả năng tạo màng sinh học của ST26

	OD ₅₇₀	Ghi chú
ST26	0,8	Chủng theo sáng chế

B-1.1	0,59	Đối chứng dương
Đối chứng âm	0,05	Môi trường không chứa vi khuẩn

So sánh với chủng đối chứng dương đã được công bố về khả năng tạo màng, có thể thấy rằng, chủng ST26 là một chủng có khả năng tạo màng sinh học tốt.

Tiến hành đánh giá ảnh hưởng của một số nhân tố như pH, nhiệt độ, nồng độ muối để từ đó xác định được các điều kiện thích hợp cho việc ứng dụng trong xử lý nước bị ô nhiễm nitơ của chủng ST26 theo sáng chế.

C. Một số tính chất sinh lý, sinh hóa của ST26

• Ảnh hưởng của pH

Chủng ST26 được nuôi cấy trong môi trường chứa 10mg N-NO₂/L với các giá trị pH khác nhau: 4; 6; 7,5; 8 và 10. Sau 3 ngày nuôi cấy tại các điểm pH này, hàm lượng nitrit còn lại được thể hiện trong Bảng 5. Kết quả đã cho thấy, ST26 có thể có hoạt tính ngay cả pH 2, 10 và 12, mặc dù ở pH này hoạt tính thể hiện thấp, nhưng ở pH 4 lại có hoạt tính khá tốt, sau 1 ngày đã giảm được 33% và chỉ sau 2 ngày thì không phát hiện được lượng nitrit trong dịch nuôi cấy, kết quả này gần giống với kết quả ở pH 6 và 8; hoạt tính khử nitrit tốt nhất ở pH 7 và 7,5, sau 1 ngày chủng vi khuẩn này đã khử được khoảng 50% nitrit và đến sau 2 ngày thì không phát hiện được nitrit trong dịch nuôi cấy.

Bảng 5. Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính khử nitrit của ST26

pH	Hàm lượng nitrit (mg N/l)		
	Ngày đầu	Sau 1 ngày	Sau 2 ngày
2	10	8,1	8
4	10	6,7	0
6	10	6,3	0
7	10	5,1	0
7,5	10	5,2	0
8	10	6,3	0
10	10	8,2	5,1
12	10	9	7

• Ảnh hưởng của nhiệt độ

Nhiệt độ ảnh hưởng đến lớn đến sinh trưởng và hoạt tính của vi khuẩn, để nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính khử nitrit, ST26 được nuôi trong các ống nghiệm chứa 10ml môi trường lỏng có bổ sung 10mg N-NO₂/l. Vi khuẩn được nuôi lắc 70 vòng/phút, pH 7,5 trong các dải nhiệt độ khác nhau: 10, 25, 30, 37 và 40°C. Sau 3 ngày nuôi cấy, kết quả được trình bày ở Bảng 6.

Bảng 6. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính khử nitrit của ST26

Nhiệt độ (°C)	Hàm lượng nitrit (mg N/l)		
	Sau 1 ngày	Sau 2 ngày	Sau 3 ngày
10	9	7,2	5,1
20	5,3	0	0
25	5,1	0	0
30	4,9	0	0
37	6,6	2,5	0
40	7,27	5,8	4,3

Kết quả đã chỉ ra ở khoảng nhiệt độ từ 20-30°C hoạt tính khử nitrit là rất tốt, đặc biệt ở 30°C, sau 1 ngày hàm lượng nitrit đã giảm được 51%, sau 2 ngày thì không phát hiện được nitrit trong dịch nuôi cấy. Ở nhiệt độ 37°C thì hoạt tính vẫn thể hiện tốt và ở 40°C thì chủng vi khuẩn này vẫn có hoạt tính khử nitrit cho dù chậm hơn.

- Ảnh hưởng của độ muối NaCl

Bảng 7. Ảnh hưởng của nồng độ NaCl đến hoạt tính khử nitrit của ST26

Nồng độ NaCl (‰)	Hàm lượng nitrit (mg N/l)			
	Ban đầu	Sau 1 ngày	Sau 2 ngày	Sau 3 ngày
0	10	5,6	0,1	0,05
5	10	5,5	0,1	0,05
10	10	5,7	0,1	0,03
15	10	5,6	0,02	0,02
20	10	5,6	0,01	0,01
30	10	5	0,01	0,01
40	10	10	9,5	9,1

ST26 là chủng vi khuẩn khử nitrit được phân lập trên nguồn nước lợ của đầm ao nuôi tôm, nhưng khi đánh giá khả năng loại nitrit trong các độ muối khác nhau đã cho thấy, chỉ sau 2 ngày thì đã gần như không phát hiện được hàm lượng nitrit trong dịch nuôi cấy ở các độ muối NaCl từ 0-30‰ (Bảng 7), chứng tỏ ST26 có khả năng xử lý nitrit cả môi trường nước lợ và ngọt.

- Ảnh hưởng của nguồn cacbon hữu cơ

Chủng vi khuẩn ST26 được phân lập từ các đầm nuôi thủy sản, đã được làm giàu và nuôi cấy trên môi trường dị dưỡng đặc trưng cho vi khuẩn khử nitrit, thành phần môi trường chứa cao nấm men, cao thịt, pepton – đây là những nguồn dinh dưỡng rất giàu. Nhưng trong thực tế nếu sử dụng các nguồn giàu dinh dưỡng như vậy sẽ làm chi phí rất tốn kém do giá thành cao của cao nấm men, cao thịt, pepton, Bên cạnh đó việc ứng dụng ngoài thực tế có thể sẽ ảnh hưởng đến môi trường do làm tăng nguồn dinh dưỡng cho vi khuẩn có hại phát triển. Việc tìm nguồn cacbon rẻ tiền thay thế nhưng vẫn đạt hiệu quả xử lý cao, phù hợp cho ứng dụng ngoài thực tế là tiêu chí được đặt ra. Do vậy đã sử dụng 5 nguồn cacbon khác nhau là: Lactozơ, glucozơ, sacarozơ, axetat, xitrat với nồng độ 5g/L để thay thế, kết quả được thể hiện trong Bảng 8

Bảng 8. Khả năng sử dụng nguồn cacbon khác nhau của ST26

	Ngày đầu	Sau 1 ngày	Sau 2 ngày	
g/L	N-NO ₂ (mg/L)	N-NO ₂ (mg/L)	ΔOD_{600}	N-NO ₂ (mg/L)
Lactozơ (5)	10	9,87	0,16	6,90
Glucozơ (5)	10	0,53	0,94	0,68
Sacarozơ (5)	10	0,71	0,91	0,62
Axetat (5)	10	5,87	0,2	5,51
Xitrat (5)	10	12,2	0,001	9,66
Cao nấm men (2), pepton (5), cao thịt (1)	10	3,61	0,91	0,68

Kết quả đã chỉ ra, khi thay nguồn cacbon là glucoze hoặc sacarozơ cho cao nấm men, pepton và cao thịt thì không những sinh khối của ST26 tăng ngang hoặc có khi cao hơn (được thể hiện bằng ΔOD_{600}) mà hoạt tính khử nitrit còn cao hơn hẳn ở ngay sau 1 ngày, hàm lượng nitrit trong dịch nuôi cấy ở nguồn cacbon là glucozơ và

sacarozo còn 0,53 và 0,71mg N/l tương ứng, trong khi trong môi trường chứa cao nấm men, pepton và cao thịt vẫn còn 3,61mg N/l. Tuy nhiên sau 2 ngày nuôi cấy thì hiệu suất khử nitrit của 3 nguồn này gần như tương đương nhau đạt khoảng trên 93% (Bảng 8). Như vậy có thể sử dụng glucozo hoặc sacarozo thay thế cho cao nấm men, pepton và cao thịt.

D. Đánh giá khả năng sinh trưởng của ST26 trên các nồng độ nitrit khác nhau

Nitrit và nitrat được coi là nguồn nitơ cho sự sinh trưởng của nhóm vi khuẩn khử nitrat, Tuy nhiên, nồng độ nitrit cao sẽ ảnh hưởng không nhỏ đến sinh trưởng của vi khuẩn tức là cũng ảnh hưởng đến hoạt tính chuyển hóa nitrit của chúng, Nitrit tồn tại với hàm lượng cao sẽ dẫn đến sự tạo thành HNO_2 , đây là hợp chất gây độc cho vi khuẩn ngay ở nồng độ thấp (Abeling & Seyfried, 1992), Để đánh giá ảnh hưởng của nồng độ nitrit đến sinh trưởng của ST26, các nồng độ nitrit 2; 5; 10; 100; 200; 500 và 1000mg N/l sẽ được bổ sung vào môi trường K2, ST26 được nuôi hoạt hóa và được bổ sung với mật độ ban đầu như nhau vào các bình nuôi chứa nồng độ nitrit khác nhau và tiến hành nuôi lắc trong 3 ngày, sau đó trang lên các đĩa thạch tương ứng, kết quả đánh giá mật độ tế bào sau nuôi được thể hiện tại Bảng 9,

Bảng 9, Ảnh hưởng của nồng độ nitrit đến sinh trưởng của vi khuẩn khử nitrat hóa

Nồng độ nitrit (mg N- NO_2 /L)	Sinh khối ST26 trước khi nuôi (CFU/ml)	Sinh khối ST26 sau khi nuôi (CFU/ml)
2	3×10^6	9×10^{10}
5	5×10^6	9×10^{11}
10	$2,4 \times 10^6$	$7,5 \times 10^{12}$
100	2×10^6	3×10^{10}
200	6×10^6	5×10^7
500	5×10^6	8×10^2
1000	$4,3 \times 10^6$	2×10^1

Kết quả nhận được từ Bảng 9 cho thấy, mật độ ST26 cao hơn khi nồng độ nitơ ban đầu từ 2-200mg N/l, Trong đó, mật độ tế bào đạt giá trị cao nhất $7,5 \times 10^{12}$ tại 10mgN/l, giá trị này đạt 3×10^{10} và 5×10^7 khi nồng độ nitrit lần lượt ở 100 và 200mgN/l, Ở nồng độ cao 500, 1000mgN- NO_2 /L, sự sinh trưởng của vi khuẩn này bị ức chế, Nghiên cứu của Beccari và cộng sự (1983) đã cho thấy quá trình khử nitrat có

thể diễn ra hoàn toàn trong môi trường N-NO_2^- từ 20-25mgN/l, Glass và cộng sự (1997) cũng cho rằng, nồng độ nitrit là 30 và 250mg $\text{NO}_2\text{-N/l}$ ở pH 6 và 7 tương ứng có thể ức chế quá trình khử nitrat, như vậy chủng ST26 có thể chịu đựng được mức độ nitrit với hàm lượng cao 200mg N/l.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Phân lập và định danh chủng vi khuẩn ST26

Mẫu nước nuôi tôm nuôi được thu thập tại đầm nuôi tôm của tỉnh Sóc Trăng, được bảo quản trong chai và đặt trong bình xốp và chuyển về phòng thí nghiệm. Trước khi tiến hành phân lập, mẫu được làm giàu trên môi trường K1 trong 3 ngày, sau đó phân lập trên môi trường thạch K1, sau 48 giờ các khuẩn lạc được tách và làm sạch, thu được chủng ST26 có hoạt tính khử nitrat thông qua khả năng tạo khí trong ống Dulhan (Fig. 1); hình thái khuẩn lạc cũng như hình thái tế bào như được thể hiện trong (Fig. 2).

Dựa vào hình thái khuẩn lạc và hình thái tế bào cũng như khả năng sinh bào tử của chủng ST26 thu được trên môi trường nuôi cấy dạng thạch, chủng ST26 có thể được xếp vào chi *Bacillus* (Bergey, 1989, 2001).

Phân loại chủng vi khuẩn ST26 được thực hiện bằng phương pháp xác định trình tự đoạn gen 16S rARN với cặp mồi 27F/1527R, ADN tổng số của chủng vi khuẩn ST26 được tách và thu như sau:

Nuôi cấy thu sinh khối vi khuẩn trong 2 ngày trên môi trường K1 ở điều kiện hiếu khí đến khi OD_{600} đạt khoảng 1,2 thì ADN của chúng được tách chiết theo qui trình sau: i), Hút dịch nuôi cấy vào các ống eppendorf 1,5 ml, tế bào được thu lại bằng cách ly tâm 10,000 v/ph trong 5 phút, ii). Bổ sung 576 μl dung dịch TE, để trên đá và lắc đều cho tan hết tế bào; iii) Bổ sung 30 μl SDS 10%, lắc nhẹ và để ở nhiệt độ phòng; iv). Bổ sung 3 μl enzym proteinaza K (10mg/ml), ủ mẫu ở 37°C trong 1 giờ; v), Bổ sung 180 μl NaCl 5M lắc nhẹ, ủ mẫu ở 65°C trong 10 phút, chú ý đảo nhẹ nhàng để tránh đứt gãy ADN; vi) Protein được loại bỏ bằng một thể tích clorofom/ rượu isoamyl 24:1 (v/v), ly tâm 12,000 v/ph trong 10 phút, thu dịch nổi và chuyển sang ống eppendorf mới; vii) Protein được loại bỏ tiếp bằng phenol/ clorofom /rượu isoamyl theo tỷ lệ 25:24:1 (v/v), ly tâm 12.000 v/ph trong 10 phút, thu dịch nổi và chuyển sang ống eppendorf mới; viii) ADN được rửa bằng hai lần thể tích etanol 100% ở 4°C trong 20 phút, ly tâm 12,000 v/ph ở 4°C, phần rửa là ADN hệ gen được thu lại, rửa

được rửa lại bằng etanol 70% ly tâm 12,000 v/ph ở 4°C trong 15 phút và được làm khô bằng máy hút chân không Mi- vac 110 V, sau đó hòa tan ADN trong 25µl TE và bảo quản ở 4°C.

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

Mồi xuôi: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3'; và

Mồi ngược 5'-ACGGCTACCTTGTTACGACT -3'.

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

Thành phần phản ứng (µl):

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

Chu trình nhiệt:

Bước 1: 95°C (5 phút)

Bước 2: 95°C (50 s)

Bước 3: 58°C (45 s)

Bước 4: 72°C (1 phút 30 giây)

Bước 5: Lặp lại 30 lần từ bước 2 đến bước 4

Bước 6: 72°C (7 phút)

Bước 7: Bảo quản ở 4°C

Sản phẩm PCR nhân đoạn gen 16S rARN từ ADN tổng số của chủng ST26 đã được kiểm tra trên gel agarosa 1%, nhuộm ethidi bromua và sau đó soi bản gel dưới tia tử ngoại, Độ dài của sản phẩm PCR có kích thước 1497bp đúng như lý thuyết.

Sản phẩm nhân đoạn gen 16S rARN được tinh sạch bằng kit Gel Purification Kit, hãng Bioneer, Hàn Quốc có bán trên thị trường và sau đó được xác định trình tự theo phương pháp của Sanger, sử dụng máy đọc trình tự tự động ABI, Mỹ, Sử dụng

các phần mềm Bioedit, Clustal X và Mega4 để xây dựng cây phát sinh chủng loại của chủng vi khuẩn ST26.

Trình tự đoạn gen 16S rARN của chủng ST26 có kích thước khoảng 1500 nucleotit có mức độ tương đồng 100% với trình tự tương ứng của chủng *Bacillus cereus* DHR2-2 (KF625169). Mối quan hệ phát sinh chủng loại của chủng ST26 với một số chủng vi khuẩn đã được xây dựng và kết quả được thể hiện ở Fig. 3.

Như vậy, dựa trên các đặc điểm hình thái khuẩn lạc cũng như hình thái tế bào và so sánh trình tự gen 16S rARN thì chủng ST26 thuộc chi *Bacillus* và được đặt tên là *Bacillus cereus* ST26.

Chủng vi khuẩn ST26 phân lập hiện được lưu giữ tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam dưới dạng thuần khiết về mặt sinh học.

Ví dụ 2: Đánh giá khả năng khử nitrat trong điều kiện kỵ khí của chủng ST26

Chủng vi khuẩn ST26 được đánh giá khả năng khử nitrat trước tiên trong điều kiện kỵ khí, hàm lượng nitrat ban đầu được đưa vào là 20mg N/l. Kết quả thể hiện ở Fig. 4 cho thấy, sau 7 ngày, hoạt tính của chủng ST26 đạt hiệu suất xử lý nitrat là 95,5%, khả năng khử nitrat của ST26 cũng được so sánh với một số chủng vi khuẩn khác đã được phân lập tại Sóc Trăng và cho thấy chủng vi khuẩn này có khả năng khử nitrat tốt nhất.

Ví dụ 3. Đánh giá khả năng khử nitrit trong điều kiện kỵ khí của chủng ST26

Trong các đầm ao nuôi thủy sản nói chung, nuôi tôm nói riêng, sự xuất hiện các hợp chất nitơ như amoni và nitrit rất nhiều, nó có thể tăng lên đến cấp số nhân. Các hợp chất này có thể được giải quyết bằng quá trình nitrat hóa với sự tham gia của nhóm vi khuẩn oxy hóa amoni và oxy hóa nitrit, nhưng trong thực tế nhóm vi khuẩn này thường là vi khuẩn tự dưỡng nên sinh trưởng chậm, việc chuyển hóa từ amoni thành nitrit nhanh hơn từ nitrit thành nitrat. Ngoài ra trong các đầm ao nuôi hàm lượng nitrit còn được hình thành bởi quá trình khử nitrat, nên hàm lượng nitrit trong ao nuôi tăng lên rất nhanh nếu không được xử lý kịp thời. Do vậy mục tiêu đặt ra lựa chọn chủng vi khuẩn có khả năng khử nitrit trực tiếp, nên việc đánh giá khả năng khử nitrit được tiến hành bằng cách thay thế nguồn nitrat bằng nguồn nitrit, hàm lượng ban đầu cũng được bổ sung là 10mg N trong NO_2/l . Kết quả thể hiện ở Fig 5 cho thấy, chủng ST26 theo sáng chế có hoạt tính chuyển hóa nitrit tốt nhất, chỉ sau 4 ngày đã chuyển

hóa được 99% nitrit trong khi các chủng còn lại không có hoạt tính khử nitrit trực tiếp hoặc có như chủng ST20 thì phải ngày thứ 8 và 12 mới gần như không phát hiện được lượng nitrit trong dịch nuôi cấy. Như vậy ST26 có khả năng khử trực tiếp nitrit trong điều kiện kỵ khí tốt nhất.

Ví dụ 4. Đánh giá khả năng khử nitrit trong điều kiện hiếu khí của chủng ST26

Với mục tiêu đặt ra là lựa chọn được chủng vi khuẩn khử nitrat, nitrit không những chỉ trong môi trường kỵ khí mà tính chất này còn được thể hiện trong môi trường hiếu khí. Với tính chất này, nếu sử dụng thì các vi khuẩn này có thể đáp ứng đa dạng được các điều kiện hiếu khí hoặc kỵ khí. Do vậy ST26 tiếp tục được đánh giá khả năng khử nitrit hiếu khí bằng cách tiến hành nuôi trong ống nghiệm chứa dịch môi trường và sử dụng nút bông thay cho nút cao su, tiến hành nuôi lắc 70 vòng/phút, nhiệt độ $30 \pm 2^\circ\text{C}$, hàm lượng nitrit ban đầu là 20mg N/l. Kết quả thể hiện ở Fig.6 cho thấy: Sau 3 ngày nuôi, hàm lượng nitrit đã được chuyển hóa tới 99%. Mặc dù, chủng ST20 cũng có khả năng chuyển hóa nitrit trong điều kiện hiếu khí nhưng chỉ đạt hiệu suất chuyển hóa 50,95% sau 3 ngày. Như vậy ST26 có khả năng khử nitrit mạnh trong cả điều kiện hiếu khí và kỵ khí, trong điều kiện hiếu khí khả năng loại nitrit nhanh hơn trong điều kiện kỵ khí.

Ví dụ 5. Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính khử nitrit của chủng ST26

Môi trường nuôi cấy chủng ST26 được đưa về các giá trị pH khác nhau: 2; 4; 6; 7; 7,5; 8; 10 và 12. Hàm lượng nitrit ban đầu là 10mg N/l, nuôi cấy ở 70 v/ph. Kết quả thể hiện ở Fig. 8 cho thấy ST26 có thể có hoạt tính ở dải pH rộng từ pH 2 - 12, tuy nhiên ở pH 2 và 12 thể hiện hoạt tính khử nitrit thấp, ở pH 4 lại có hoạt tính khá tốt, sau 3 ngày thì không phát hiện được lượng nitrit trong dịch nuôi cấy, kết quả này tương tự như ở pH 6 và 8; hoạt tính khử nitrit tốt nhất ở độ pH 7-7,5, sau 1 ngày chủng vi khuẩn này đã khử được khoảng 50% nitrit và sau 2 ngày thì không phát hiện được nitrit trong dịch nuôi cấy.

Ví dụ 6. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng khử nitrit của chủng ST26

Dải nhiệt độ 10; 20; 25; 30; 37 và 40°C đã được sử dụng để đánh giá ảnh hưởng của chúng lên hoạt tính khử nitrit trong 3 ngày nuôi cấy. Hàm lượng nitrit ban đầu là 10mg N/l. Kết quả được thể hiện trên Fig. 9 cho thấy, chủng ST26 có hoạt tính khử nitrit ở phổ nhiệt độ khá rộng từ 10 - 40°C , trong khoảng nhiệt độ này đã thể hiện khả năng khử nitrit của chủng này có thể ở nhiệt độ mùa đông (10°C) và nhiệt độ mùa hè ($30-$

37°C), ở 40°C vẫn thể hiện hoạt tính chứng tỏ nó hoàn toàn đáp ứng khi ứng dụng ngoài thực tế tại các đầm nuôi tôm vào mùa hè. Tuy nhiên hoạt tính thể hiện cao nhất tại nhiệt độ từ 20-37°C. Ngày thứ 3 đã không phát hiện được hàm lượng nitrit trong dịch nuôi cấy.

Ví dụ 7. Ảnh hưởng của nồng độ muối NaCl đến khả năng khử nitrit của chủng ST26

Nồng độ muối NaCl khác nhau từ 0 đến 40‰ đã được chọn để khảo sát tìm ra nồng độ muối thích hợp cho khả năng khử nitrit của chủng ST26.

Kết quả được thể hiện ở Fig. 10 cho thấy, chủng ST26 có khả năng khử nitrit tốt từ nồng độ 0 đến 30‰, trong khoảng nồng độ muối này, khả năng khử nitrit đến 99% ở ngày thứ 3. Như vậy chủng vi khuẩn này có khả năng khử nitrit trong cả điều kiện nước lợ và nước ngọt.

Ví dụ 8. Khả năng khử nitrit của chủng ST26 khi sử dụng một số nguồn cacbon khác nhau thay thế cho cao nấm men, cao thịt và pepton

Cao nấm men, cao thịt, pepton là một nguồn cacbon giàu dinh dưỡng rất phù hợp cho sinh trưởng của vi khuẩn dị dưỡng nói chung, ST26 nói riêng. Nhưng nguồn cacbon này rất đắt, nếu chỉ để sử dụng trong nghiên cứu phòng thí nghiệm thì đây là chuyện bình thường nhưng nếu ứng dụng ngoài thực tế thì nguồn cacbon này cũng sẽ ảnh hưởng đến môi trường sinh thái chung, và cũng là cơ sở để các vi sinh vật có hại khác phát triển. Để có thể thay thế nguồn cacbon phù hợp đối với chủng ST26 mà vẫn giữ được khả năng sinh trưởng và hoạt tính khử nitrit của nó thì môi trường K1 chứa cao nấm men, cao thịt, pepton sẽ được thử nghiệm thay bằng một trong những nguồn cacbon hữu cơ khác như: lactozơ, glucozơ, sacarozơ, axetat, xitrat với nồng độ 5g/L cho sinh trưởng và đánh giá hoạt tính khử nitrit của ST26. Nitrit được đưa vào với nồng độ ban đầu là 10mg N/l, vi khuẩn được nuôi lắc 70 v/ph, pH 7,5, nhiệt độ $30\pm 2^\circ\text{C}$.

Kết quả đánh giá khả năng khử nitrit và sinh trưởng của ST26 trên một số nguồn cacbon khác nhau được thể hiện ở Fig. 11 cho thấy: sau 2 ngày, với nguồn cacbon là glucozơ và sacarozơ đã làm tăng sinh trưởng và hoạt tính khử nitrit, cụ thể khả năng sinh trưởng trên 2 nguồn cacbon này tương đương với nguồn cao nấm men, cao thịt, pepton, giá trị ΔOD_{600} là khoảng 0,91-0,94. Khi đánh giá khả năng khử nitrit cho thấy, chỉ sau 1 ngày thì hiệu suất khử nitrit của ST26 trên nguồn glucozơ và sacarozơ là 94,7% và 93%, còn trên nguồn K1 chỉ đạt 64%. Sau 2 ngày thì hiệu suất

khử nitrit trên nguồn glucoza, saccaroza và nguồn cao nấm men, cao thịt, pepton là gần như nhau đạt khoảng 93%, trong đó trên nguồn saccaroza đạt 94%. Như vậy có thể sử dụng saccaroza làm nguồn cacbon thay thế.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Sáng chế đã phân lập, tuyển chọn, và định danh chủng vi khuẩn khử nitrat *Bacillus cereus* ST26 thuần khiết về mặt sinh học phân lập từ mẫu nước nuôi tôm thương phẩm tại Sóc Trăng, Việt Nam có khả năng khử nitrit trực tiếp trong cả điều kiện hiếu khí và kỵ khí không cần qua giai đoạn khử từ nitrat đến nitrit nên đã tiết kiệm được một giai đoạn của quá trình nitrat hóa là oxy hóa từ nitrit thành nitrat. Chủng vi khuẩn ST26 này có khả năng sinh trưởng và khử nitrit tốt ở nhiều điều kiện sinh lý sinh hóa khác nhau như nồng độ muối NaCl từ 0 - 30 ‰, pH từ 4 - 10 và nhiệt độ từ 10 - 40°C. Đặc biệt chủng vi khuẩn này có thể sử dụng saccaroza làm nguồn cacbon thay thế cho cao nấm men, cao thịt và pepton mà vẫn đạt hiệu quả xử lý nitrit tốt nhất trên 93% sau 2 ngày với hàm lượng nitrit ban đầu là 10mg N/l, vừa tiết kiệm được chi phí lại không gây ô nhiễm thứ cấp nếu ứng dụng ngoài thực tế. Như vậy, chủng ST26 có thể ứng dụng để xử lý ô nhiễm nitrat, nitrit ở các điều kiện tương đối rộng và rất phù hợp với thực tế.

Sau 7 ngày trong điều kiện kỵ khí chủng vi khuẩn này đã xử lý nitrat đạt hiệu suất 95,5%. nhưng khi sử dụng nó cho mục đích xử lý nitrit trực tiếp thì đạt hiệu suất 99% chỉ trong 3 ngày ở điều kiện hiếu khí và 4 ngày trong điều kiện kỵ khí với hàm lượng nitrit ban đầu là 20mg N/l. Kết quả cho thấy chủng ST26 có khả năng xử lý trực tiếp cả nitrat và nitrit đạt hiệu quả cao nếu các thành phần nitơ này xuất hiện trong môi trường nuôi, nó có thể đáp ứng linh hoạt những điều kiện ngoài thực tế như nhiệt độ, pH, nồng độ muối và đặc biệt hơn cả là có thể sử dụng đa dạng nguồn cacbon hữu cơ. Chủng ST26 phân lập ở trong các đầm ao nuôi tôm ven biển đã giúp tận dụng được nguồn sinh vật phong phú của Việt Nam, đặc biệt khi kết hợp với chủng vi khuẩn nitrat hóa sẽ xử lý triệt để các thành phần nitơ như amoni, nitrit và nitrat trong các đầm ao nuôi thủy sản nói chung và nuôi tôm thương phẩm nói riêng mà không gây tổn kém do sử dụng thiết bị công nghệ trên cùng một bề phản ứng sinh học mà không cần các bể kỵ khí và hiếu khí đi kèm như các mô hình truyền thống.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng vi khuẩn khử nitrat *Bacillus cereus* ST26 thuần khiết về mặt sinh học phân lập từ mẫu nước nuôi tôm thương phẩm tại Sóc Trăng, Việt Nam có khả năng khử nitrit trực tiếp trong cả điều kiện hiếu khí và kỵ khí, nước ngọt, nước lợ, trong đó chủng vi khuẩn này có trình tự gen rARN 16S với kích thước 1497bp như được nêu trong SEQ ID NO: 1 và được đăng ký trên GenBank với mã số LC599495, khác biệt ở chỗ chủng vi khuẩn *Bacillus cereus* ST26 này có các đặc tính bao gồm:

(i) có khả năng khử 95,5% nitrat trong điều kiện hiếu khí sau 7 ngày từ nồng độ nitrat ban đầu là 20mg N/l;

(ii) có khả năng khử trực tiếp 99% nitrit trong điều kiện hiếu khí sau 3 ngày từ nồng độ nitrit ban đầu là 20mg N/l;

(iii) có khả năng khử trực tiếp 99% nitrit trong điều kiện kỵ khí sau 4 ngày từ nồng độ nitrit ban đầu là 10mg N/l;

(iv) có khả năng khử nitrit ở độ muối từ 0-30ppt;

(v) có khả năng khử nitrit trong dải độ pH từ pH 2 - 12;

(vi) có khả năng khử nitrit ở nhiệt độ từ 10-40°C;

(vii) có khả năng sinh trưởng và khử nitrit trong điều kiện hiếu khí trong môi trường chứa nguồn cacbon duy nhất là sacazora.

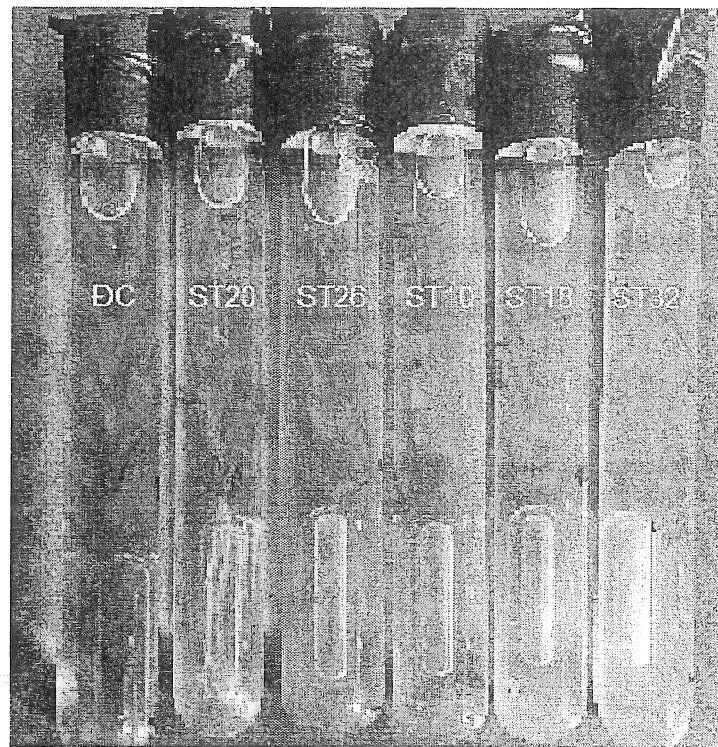


Fig. 1

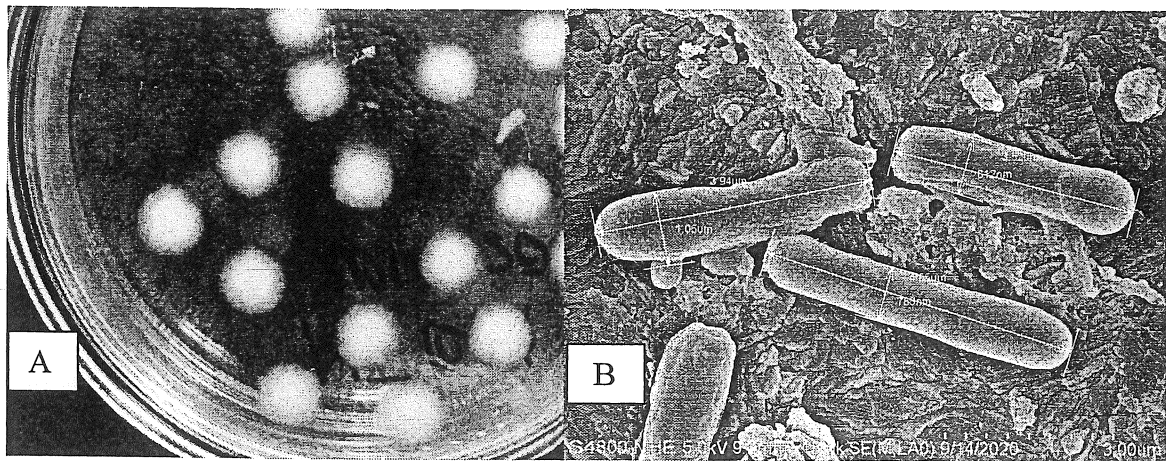


Fig 2

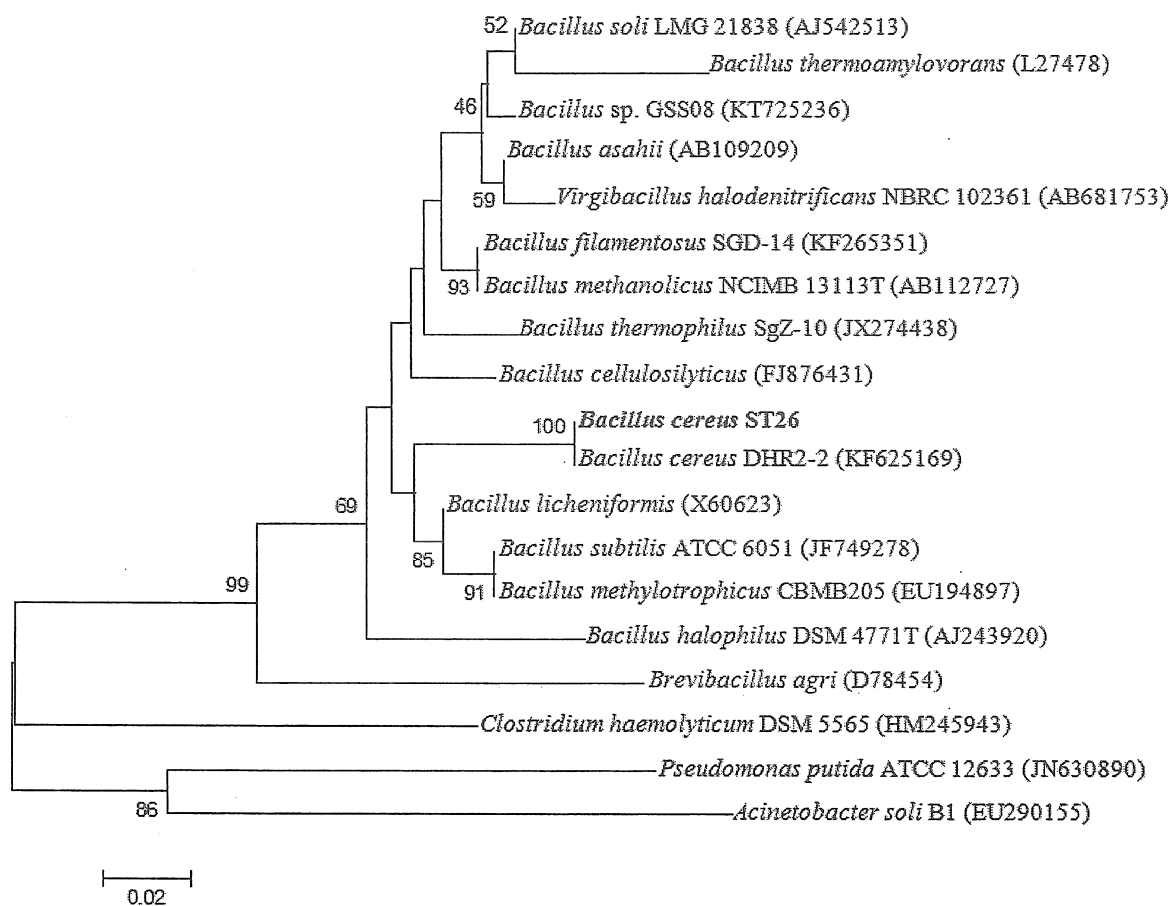


Fig. 3

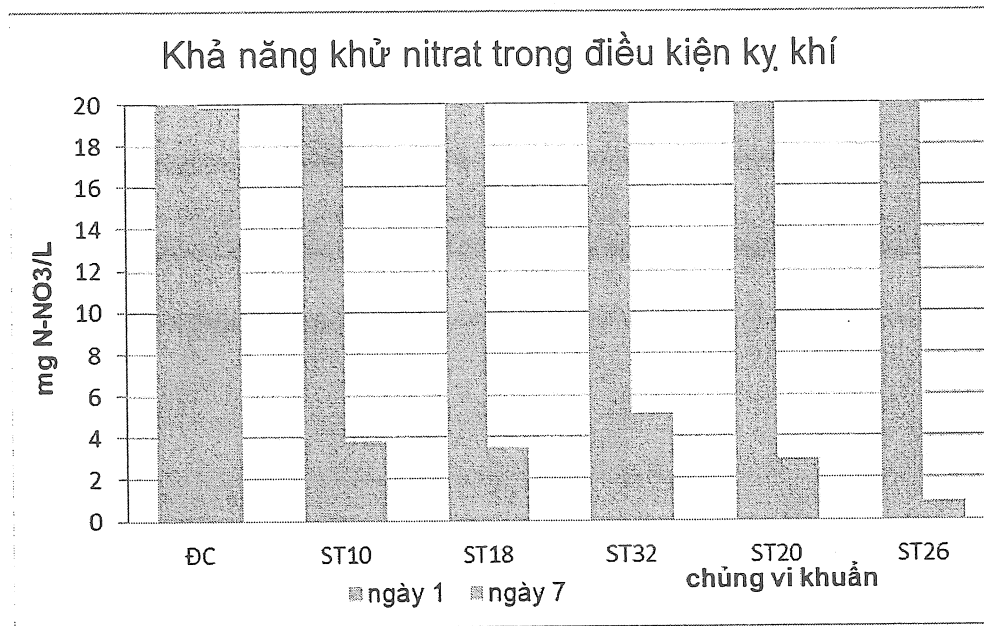


Fig. 4

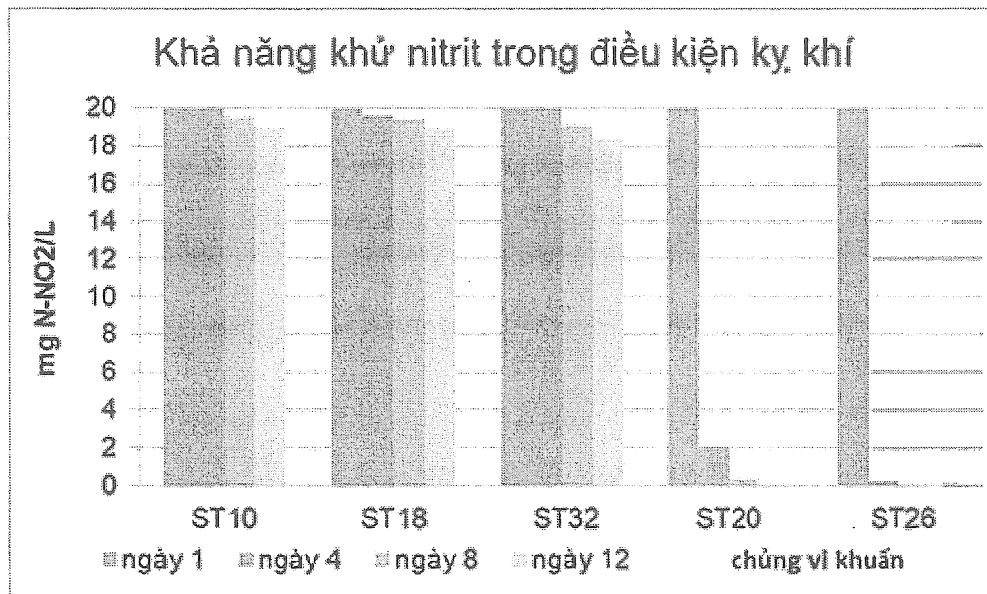


Fig. 5

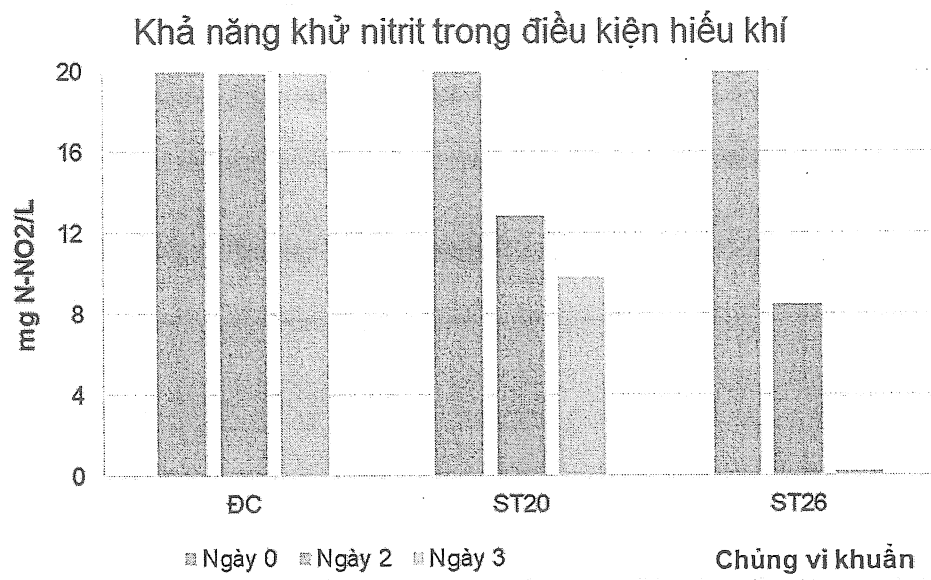


Fig. 6

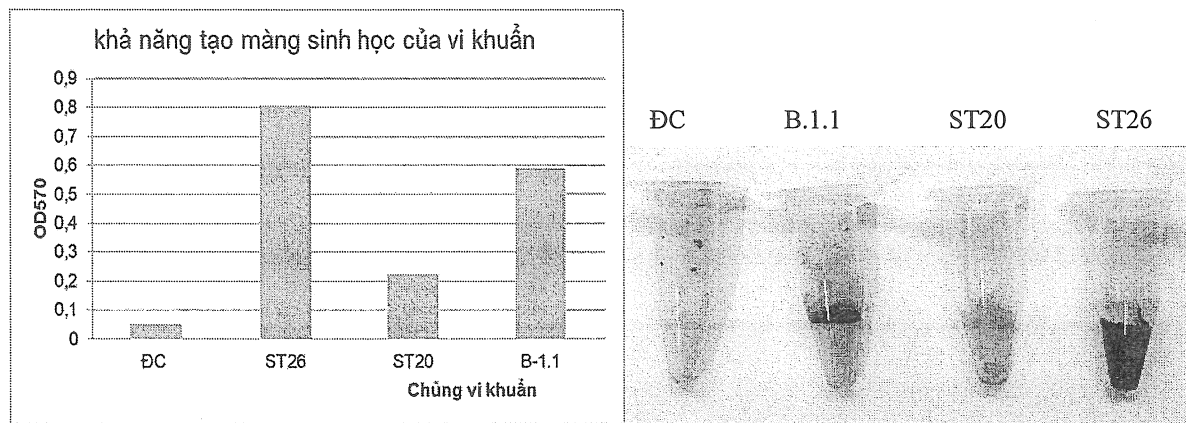


Fig. 7

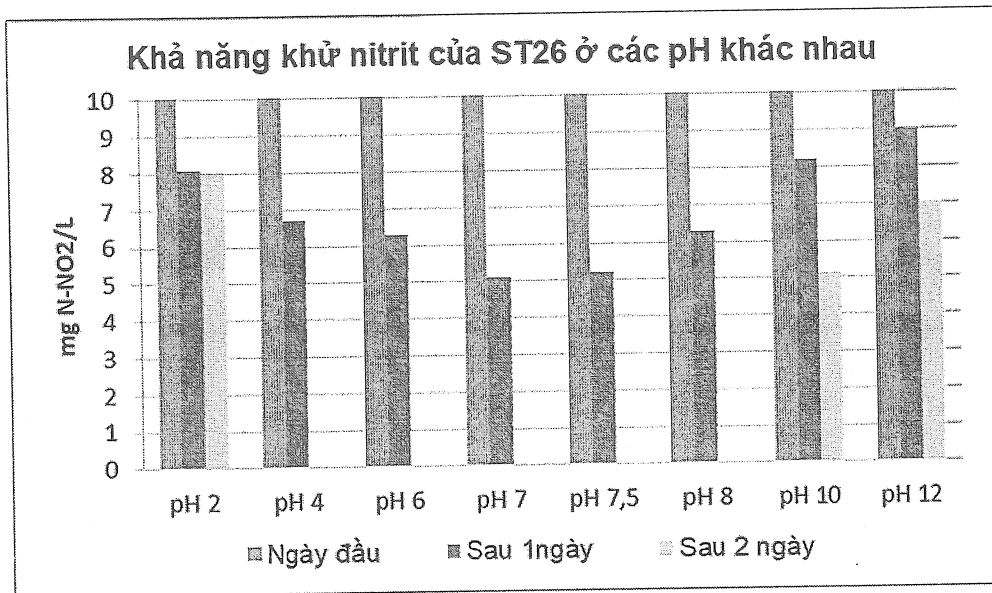


Fig. 8

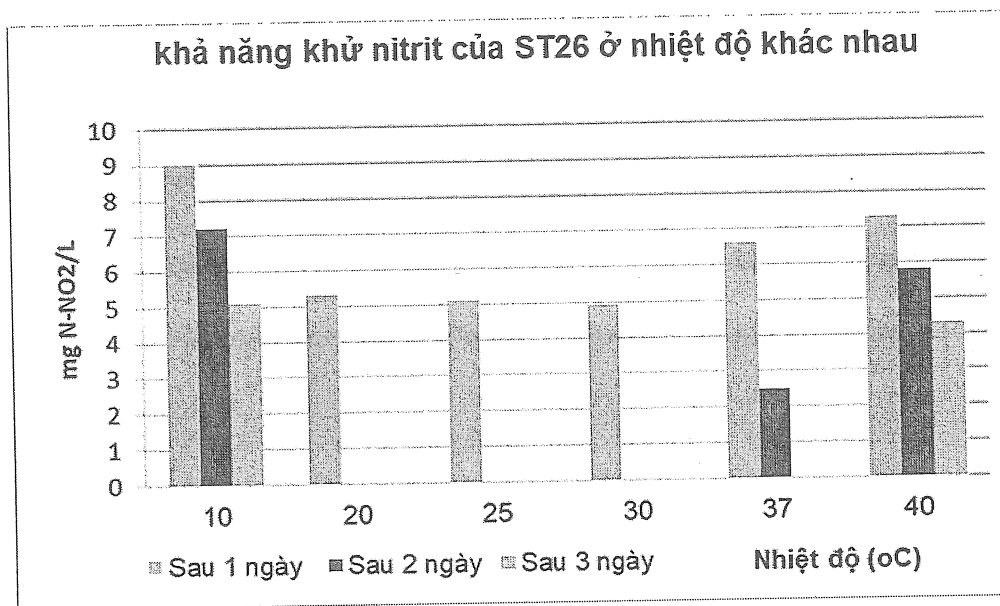


Fig. 9

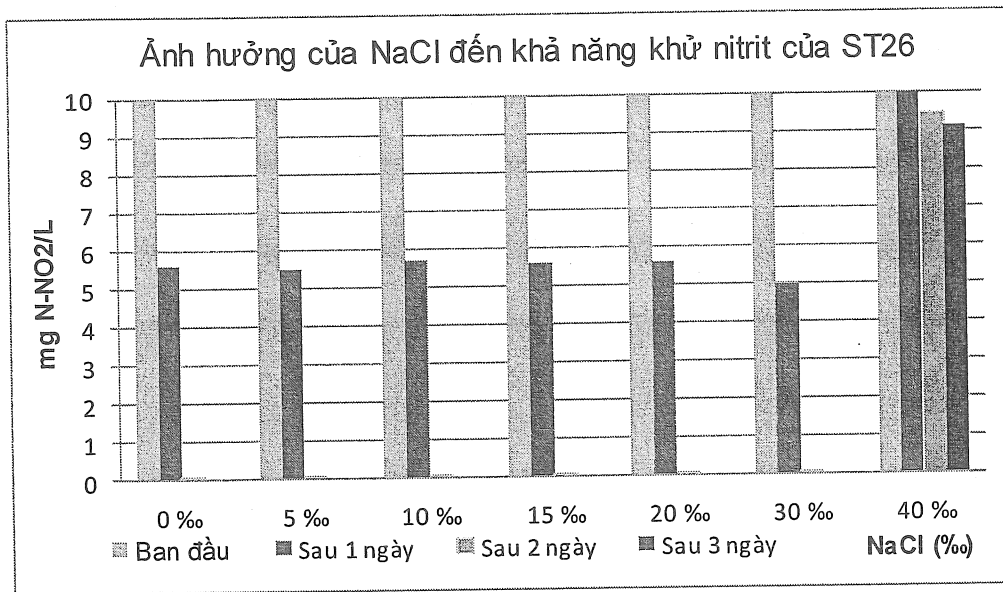


Fig.10

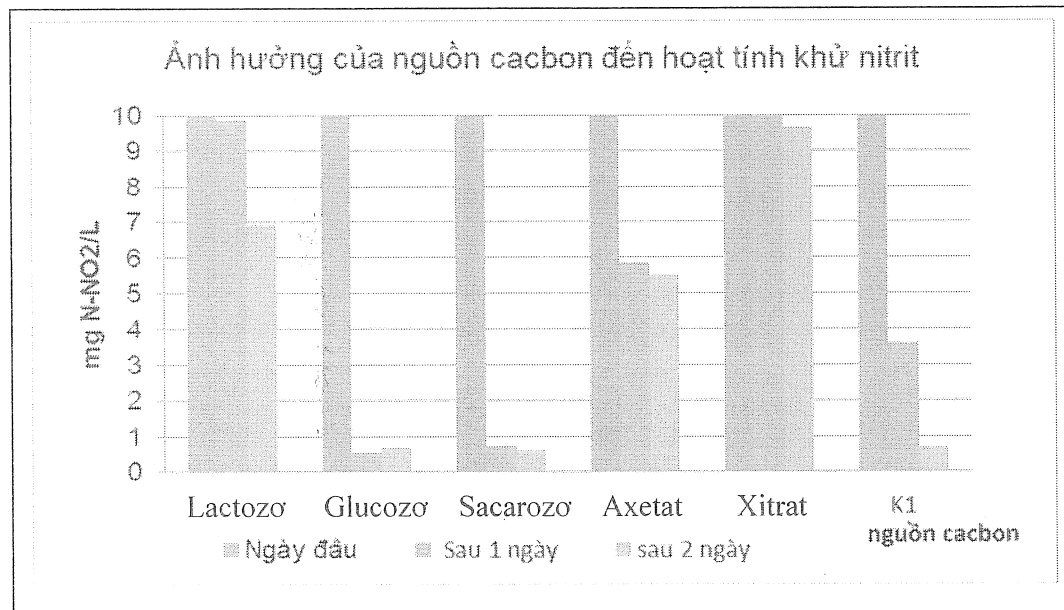


Fig.11

DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> Viện Công nghệ sinh học
 <120> Chủng vi khuẩn khử nitrat *Bacillus cereus* ST26 thuần khiết về mặt sinh học
 <130>
 <160> 1
 <170>
 <210> 1
 <211> 1497
 <212> ADN
 <213> *Bacillus subtilis* ST26
 <220>
 <223> rARN 16S
 <220>
 <400> 1

atacatgcaa gtcgagcgaa tggattaaga gcttgctctt atgaagttag cggcggacgg 60
 gtgagtaaca cgtgggtaac ctgcccataa gactgggata actccgggaa accgggggcta 120
 atacgggata acattttgaa ccgcatggtt cgaaattgaa aggcggcttc ggctgtcact 180
 tatggatgga cccgcgtcgc attagctagt tggtaggta acggctcacc aaggcaacga 240
 tgcgtagccg acctgagagg gtgatcgcc acactgggac tgagacacgg ccagactcc 300
 tacgggaggc agcagtaggg aatcttcgc aatggacgaa agtctgacgg agcaacgccg 360
 cgtgagtgat gaaggcttc gggtcgtaa actctgtgt tagggaagaa caagtgttag 420
 ttgaataagc tggcaccttg acggtacct accagaaagc cacggctaac tacgtgccag 480
 cagccgcggt aatacgtagg tggcaagcgt tatccggaat tattgggcgt aaagcgcgcg 540
 caggtgggtt cttaagtctg atgtgaaagc ccacggctc aaccgtggag ggtcattgga 600
 aactggggag acttgagtgc agaagaggaa agtggattc catgtgtagc ggtgaaatgc 660
 gtagagatat ggaggaacca ccagtggcga aaggcgactt ttctggttg taactgacac 720
 tgaggccgcg aagagcgcga agagcaactt tctgttctg aactgaccac tgaggcgcga 780
 aagcgtggga agccaatcag cattagatac cctggtagtc accgccgtaa acgatgagtg 840
 ctcagtgggt atgacgggtt cctccccctt cagtgtgaa gtaacagca ttcagcactt 900
 ccgcctgggg agtacggccg gccaggctga aactcaaagg aatgacggg ggcccgcacc 960
 aagcgggtga gcatgtggtt taattgaag ccacccgaag aaccttacc agtcttgaca 1020
 tcctctgaca accctagaga tagggcttct cctttgggag cagagtgacc ggtggtgcat 1080
 ggttggtgtc cgctcgtgtc gtgagatgtt gggtaagtc ccgcaacgag cgcaaccctt 1140
 gatcttagt gccatcatta agttgggcac tctaagggtga ctgccggtga caaacggag 1200
 gaaggtgggg atgacgtcaa atcatcatgc cccttatgac ctgggctaca cacgtgctac 1260
 aatggacggt acaaagagct gcaagaccgc gaggtggagc taatctcata aaaccgttct 1320
 cagttcggat tgtaggtgac aactcgcta catgaagctg gaatcgctag taatcgcgga 1380
 tcagcatgcc gcggtgaata cgttccggg ccttgtagac accgcccgtc acaccagag 1440
 agtttgaac acccgaagtc ggtgggggaa ccttttggga gccagccgcc taagggtg 1497