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

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

(11) **2-0004340**

(51) **C12N 1/20**
2023.01

(13) **Y**

(21) 2-2024-00050
(22) 29/11/2019
(62) 2-2019-00537
(45) 25/09/2025 450
(43) 25/03/2024 432
(73) TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HỒ CHÍ MINH (VN)
Khu phố 6, phường Linh Trung, quận Thủ Đức, thành phố Hồ Chí Minh
(72) Nguyễn Phú Hòa (VN); Trương Phước Thiên Hoàng (VN).
(74) Công ty TNHH Dịch thuật sáng chế PROINVEN (PROINVEN CO.,LTD.)

(54) CHỦNG VI KHUẨN BACILLUS VELEZENSIS B31 CHUYỂN HÓA NITƠ TRONG MÔI TRƯỜNG NƯỚC MẶN

(21) 2-2024-00050

(57) Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực vi sinh vật, cụ thể giải pháp hữu ích đề cập đến chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. có trình tự gen vùng 16S rARN như được nêu trong các trình tự SEQ ID NO.1; 2; 3; 4; 5 và 6 chuyển hóa NH_3 từ bùn đáy trong môi trường nước mặn giúp cải thiện chất lượng nước và làm sạch thủy vực vùng nuôi, khác biệt ở chỗ chủng vi khuẩn này có khả năng chuyển hóa amoniac ở nồng độ 13 mg/l từ bùn đáy trong môi trường nước mặn.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực vi sinh vật, cụ thể giải pháp hữu ích đề cập đến chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. chuyển hóa NH_3 từ bùn đáy trong môi trường nước mặn giúp cải thiện chất lượng nước và làm sạch thủy vực vùng nuôi, đồng thời mở ra nhiều tiềm năng to lớn nhằm khắc phục hiện trạng ô nhiễm môi trường nuôi cũng như phòng chống bệnh dịch trên tôm, cá và làm tăng năng xuất nuôi trồng thủy sản.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Để kiểm soát dịch bệnh do vi sinh vật gây ra và cải thiện môi trường nước nuôi tôm hùm, người ta đã sử dụng chất kháng sinh và các chất hóa học. Tuy nhiên, việc lạm dụng chất kháng sinh và chất hóa học đã dẫn đến sự gia tăng các chủng vi khuẩn kháng thuốc và làm mất cân bằng sinh thái. Do đó, nhu cầu nuôi tôm sạch bệnh, đạt tiêu chuẩn an toàn thực phẩm không chứa dư lượng chất kháng sinh và thân thiện với môi trường là rất cần thiết và quan trọng.

Hiện nay, chế phẩm vi sinh chứa các vi sinh vật có lợi được dùng như một phương pháp để kiểm soát dịch bệnh bằng cách ức chế, cạnh tranh với những vi sinh vật có hại, hỗ trợ hệ tiêu hóa, cân bằng vi khuẩn đường ruột. Ngoài ra, chế phẩm vi sinh vật có lợi cũng được dùng trong xử lý hệ thống nuôi tôm bằng cách phân hủy các chất không tiêu hóa được, thức ăn thừa, đặt biệt là rất thân thiện với môi trường.

Vi khuẩn *Bacillus subtilis* giữ vai trò quan trọng trong nuôi trồng thủy sản nói chung và nuôi tôm hùm nói riêng, nhóm vi khuẩn này có khả năng hấp thụ và giải phóng các chất làm thay đổi chất lượng nước. Chúng hấp thụ và giải phóng dinh dưỡng của nền đáy nuôi tôm, duy trì mật độ vi khuẩn có lợi cho môi trường và vật nuôi, những vi khuẩn có lợi này mang lại rất nhiều lợi ích và đáp ứng nhu cầu cấp thiết hiện nay cho ngành nuôi tôm.

Bacillus subtilis được phát hiện lần đầu tiên vào năm 1835 bởi Christian Gottfried Ehrenberg và được đặt tên là "*Vibrio subtilis*", gần 30 năm sau, vi khuẩn này được Casimir Davaine đổi tên thành "*Bacteridium*". Năm 1872, Ferdimand Cohn xác định thấy trực khuẩn này có đầu hình vuông và đặt tên là "*Bacillus subtilis*", đến nay loài vi khuẩn này còn được biết đến với các tên như: trực khuẩn cỏ khô hoặc trực khuẩn cỏ.

Năm 1941, *Bacillus subtilis* được phát hiện đầu tiên trong phân ngựa bởi tổ chức y học Nazi của Đức. Lúc đầu, được sử dụng chủ yếu để phòng bệnh lỵ cho các binh sĩ Đức chiến đấu ở Bắc Phi. Năm 1949 - 1957 khi Henrry, Albot và các cộng sự tách được các chủng thuần khiết của *Bacillus subtilis* từ đó chúng được ứng dụng rộng rãi trong phòng và điều trị một số bệnh về đường tiêu hóa như viêm ruột, viêm đại tràng, chống tiêu chảy trong rối loạn tiêu hóa. Thuật ngữ liệu pháp điều trị subtilis "subtilis therapy" ra đời. Ngày nay, vi khuẩn *Bacillus subtilis* trở nên rất phổ biến, được nghiên cứu rất rộng rãi trong y học, chăn nuôi, công nghiệp và xử lý môi trường (Lê Văn Hiệp, 2004).

Vi khuẩn *Bacillus subtilis* thuộc nhóm vi sinh vật bắt buộc của đường ruột, chúng phân bố hầu hết trong tự nhiên như: cỏ khô, bụi, đất, nước. Phần lớn chúng tồn tại trong đất, thông thường đất trồng trọt chứa khoảng 10-100 triệu CFU/g. Đất nghèo dinh dưỡng ở sa mạc, đất hoang thì *Bacillus subtilis* rất hiếm. Nước, bùn ở cửa sông, nước biển cũng có sự tồn tại của bào tử và tế bào sinh dưỡng của vi khuẩn *Bacillus subtilis* (Vũ Thị Thứ, 1996).

Khi bổ sung dạng bào tử của hai chủng *Bacillus subtilis* và *Bacillus lichenniformis* (BioPlus2B) vào thức ăn cá hồi giúp nâng cao khả năng đề kháng lại vi khuẩn gây bệnh Y. ruckerri (Raida và cộng sự, 2003). Vi khuẩn *Bacillus subtilis* cũng được sử dụng như một chế phẩm sinh học dùng trên cá tráp *S. aurata* L. (Salinas và cộng sự, 2005), nó cũng giúp nâng cao tốc độ tăng trưởng và các chỉ tiêu miễn dịch ở cá rô phi (Aly và cộng sự, 2008), v.v..

Nghiên cứu của Stein (2005) cho thấy *B. subtilis* có khả năng tiết ra hơn 20 loại chất kháng sinh với cấu trúc khác nhau. Bao gồm: subtilin, ericin, mersacidin,

sublancin, subtilosin, surfactin, iturin, bacillibactin, bacillmycin, mycosubtilin, v.v.. Hầu hết các chất được tiết ra trong ruột, trên bề mặt vật chủ hay ra môi trường nước làm rào cản sự nhân lên của vi khuẩn cơ hội gây ức chế các vi sinh vật gây bệnh. Theo thí nghiệm Vaseeharan và Ramasamy (2003) cho thấy *Bacillus subtilis* BT23 có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn *V. harveyi* phân lập từ tôm sú nhiễm bệnh đen mang, làm giảm tỉ lệ chết của tôm 90%. Nghiên cứu này cho thấy mầm bệnh Vibrio đã được kiểm soát bởi *Bacillus subtilis* cả trong điều kiện phòng thí nghiệm và ngoài ao. Trong các trại giống và ao nuôi tôm thịt, Ziaei-Nejad và cộng sự (2006) cũng kết luận rằng hệ số chuyển hóa thức ăn, tốc độ tăng trưởng tuyệt đối và năng suất nuôi trong ao có sử dụng hỗn hợp chế phẩm vi sinh gồm 5 loại *Bacillus* (*B. subtilis, B. licheniformis, B. polymyxa, B. laterosporus* và *B. circulans*) cao hơn đối chứng.

Năm 2007 Balcázar và cộng sự đã tìm thấy *Bacillus subtilis* UTM 126 là chủng vi khuẩn hữu ích có ảnh hưởng tốt trên tôm nuôi do khống chế được *V. parahaemolyticus.*

Theo kết quả nghiên cứu của Li – Xiang Zhou và cộng sự (2010) đã phân lập được vi khuẩn *Bacillus subtilis* A1 có khả năng xử lý amoniac đạt 58,4% trong 60 giờ trên môi trường có muối axetat làm nguồn cacbon chính (tỉ lệ C:N là 6:1), Ngoài ra, nghiên cứu của Fengxing Xie và cộng sự (2013) đã khảo sát khả năng phân giải NH_3 của chủng *Bacillus amyloliquefaciens* HN, nghiên cứu được tiến hành ở nồng độ N-NH_4 4mg/L trong thời gian khảo sát 72 giờ và kết luận chủng *Bacillus amyloliquefaciens* HN có khả năng phân giải amoniac, hiệu suất đạt được tại thời điểm 48 giờ trên 79,8%.

Theo kết quả nghiên cứu của Phạm Thị Tuyết Ngân (2012) phân lập được 4 chủng *B. cereus* B8, B9, B37, B38, *B. amyloliquefaciens* B41 và *B.subtilis* B67 có khả năng chuyển hóa đạm trong bùn đáy ao nuôi tôm sú. Các chủng vi khuẩn này tham gia vào quá trình amon hóa protein, giữ vai trò quan trọng trong việc chuyển nitơ từ dạng khó hấp thu sang dạng muối amon dễ được thực vật thủy sinh hấp thu, giúp làm sạch các thủy vực và tỉ lệ sống của tôm ở các nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn *Bacillus* cao hơn (93 – 97,2 %) so với không bổ sung vi khuẩn (70,8 %).

Năm 2014, Nguyễn Văn Phúc, Phan Thị Phương Trang đã phân lập được hai chủng *B. subtilis* BN1, BD23.1 từ ao nuôi tôm ở tỉnh Bến Tre có khả năng đối kháng mạnh với *V. parahaemolyticus*.

Kết quả nghiên cứu của Thái Cẩm Loan (2015) đã phân lập và định danh được 5 chủng vi khuẩn (B7, B9, B11, B12, B18) là *Bacillus subtilis* có khả năng xử lý amoniac (4 mg/L) trong điều kiện phòng thí nghiệm.

Ở Việt Nam, hiện chưa có bất kỳ kết quả nghiên cứu nào về chủng vi khuẩn *Bacillus sp.* chuyển hóa amoniac từ bùn đáy vùng nuôi tôm hùm được đăng ký bảo hộ tương tự.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là đề xuất chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* được phân lập có trình tự gen vùng 16S rARN, cụ thể là: chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* B5 mang trình tự SEQ ID NO.1; chủng vi khuẩn *Bacillus velezensis* B31 mang trình tự SEQ ID NO.2; chủng vi khuẩn *Bacillus velezensis* B58 mang trình tự SEQ ID NO.3; chủng vi khuẩn *Bacillus velezensis* B68 mang trình tự SEQ ID NO.4; chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* B74 mang trình tự SEQ ID NO.5; và chủng vi khuẩn *Bacillus licheniformis* B85 mang trình tự SEQ ID NO.6; chuyển hóa nitơ trong môi trường nước mặn nhằm cải thiện chất lượng nước khu vực nuôi tôm hùm thân thiện với môi trường và không tác động gây hại lên cơ thể vật nuôi, tìm ra giải pháp xử lý thức ăn dư thừa, tiêu diệt và kìm hãm sự phát triển của tác nhân gây bệnh bằng các biện pháp sinh học an toàn.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là quy trình phân lập và định danh chủng vi khuẩn *Bacillus* sp.
Hình 2 là đặc điểm khuẩn lạc của chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* B5
Hình 3 là đặc điểm khuẩn lạc của chủng vi khuẩn *Bacillus velezensis* B31
Hình 4 là đặc điểm khuẩn lạc của chủng vi khuẩn *Bacillus velezensis* B58
Hình 5 là đặc điểm khuẩn lạc của chủng vi khuẩn *Bacillus velezensis* B68
Hình 6 là đặc điểm khuẩn lạc của chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* B74

Hình 7 là đặc điểm khuẩn lạc của chủng vi khuẩn *Bacillus licheniformis* B85

Hình 8 là biểu đồ thể hiện sự suy giảm hàm lượng amoniac trong 48 giờ của 6 chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. B5, B31, B58, B68, B74, B85

Hình 9 là kết quả phân tích BLAST của chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* B5.

Hình 10 là kết quả phân tích BLAST của chủng vi khuẩn *Bacillus velezensis* B31.

Hình 11 là kết quả phân tích BLAST của chủng vi khuẩn *Bacillus velezensis* B58.

Hình 12 là kết quả phân tích BLAST của chủng vi khuẩn *Bacillus velezensis* B68.

Hình 13 là kết quả phân tích BLAST của chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* B74.

Hình 14 là kết quả phân tích BLAST của chủng vi khuẩn *Bacillus licheniformis* B85.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là đề xuất chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* được phân lập có trình tự gen vùng 16S rARN, cụ thể là: chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* B5 mang trình tự SEQ ID NO.1; chủng vi khuẩn *Bacillus velezensis* B31 mang trình tự SEQ ID NO.2; chủng vi khuẩn *Bacillus velezensis* B58 mang trình tự SEQ ID NO.3; chủng vi khuẩn *Bacillus velezensis* B68 mang trình tự SEQ ID NO.4; chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* B74 mang trình tự SEQ ID NO.5; và chủng vi khuẩn *Bacillus licheniformis* B85 mang trình tự SEQ ID NO.6.

Mười mẫu bùn đáy thu thập tại khu vực nuôi tôm hùm được tiến hành phân tích và xử lý theo quy trình sau:

Bước 1: Phân lập vi khuẩn *Bacillus* sp. từ bùn đáy nuôi tôm hùm trên môi trường TSA.

Quá trình phân lập vi khuẩn *Bacillus* sp. được tiến hành bằng phương pháp xử lý ở nhiệt độ cao để giết chết những chủng vi khuẩn tạp khác không có khả năng tạo bào tử, giữ lại những chủng vi khuẩn có khả năng sinh bào tử. Sau 24 - 28 giờ nuôi cấy, tiến hành nhận diện khuẩn lạc đặc trưng: có dạng tròn, bề mặt khuẩn lạc khô, nhẵn hoặc hơi nhăn, rìa răng cưa không đều, tâm sẩm màu, màu trắng xám đến vàng nhạt và catalaza dương tính.

Kết quả phân lập được 93 khuẩn lạc nghi ngờ là *Bacillus* sp.. Các chủng vi khuẩn này được ký hiệu từ B1 – B93 và được lưu trữ trong thạch nghiêng ở 4 ^{o}C để sử dụng cho các quá trình tiếp theo.

Bước 2: Cấy chuyền và lưu trữ vi khuẩn

Quá trình cấy chuyền và lưu trữ vi khuẩn được thực hiện theo phương pháp của Đặng Thị Hoàng Oanh và đồng tác giả (2004). Sau khi ủ các đĩa môi trường ở 30 ^{o}C trong 24 – 28 giờ, khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn khác nhau sẽ phát triển trên bề mặt đĩa thạch. Thực hiện tách ròng từng chủng vi khuẩn bằng phương pháp cấy chuyền nhiều lần để thu được chủng vi khuẩn thuần, các chủng này được lưu trữ theo hai cách:

- Giữ trong ống thạch nghiêng: mỗi chủng vi khuẩn thuần được cấy trên môi trường thạch nghiên và được ủ ở 30 ^{o}C trong 24 – 28 giờ đến khi khuẩn lạc phát triển, sau đó được bảo quản trong tủ lạnh ở 4 ^{o}C và cấy chuyền định kỳ 2 - 3 tháng/lần.
- Trữ vi khuẩn với glyxerol 25 % trong các ống ly tâm và giữ ở -80 ^{o}C phương pháp lưu trữ này không biến đổi đặc tính sinh học của vi khuẩn khi lưu trữ trong thời gian dài. Vi khuẩn được cấy lên môi trường TSA và được ủ 24 giờ ở 30 ^{o}C. Khoảng một nửa số khuẩn lạc mọc trên đĩa TSA được thu bằng quẻ phe cấy tiệt trùng, cho vào ống ly tâm và giữ ở -80 ^{o}C.

Khi phục hồi vi khuẩn được cấy trong môi trường TSB (thêm 1,5 % NaCl) sau 24 giờ vi khuẩn được cấy trên môi trường TSA ở 30 ^{o}C, để kiểm tra khả năng phục hồi và tính thuần chủng. Sau thời gian 24 giờ các khuẩn lạc có thể phân biệt rõ ràng, nằm riêng biệt và hình dạng bên ngoài khác nhau đã được chọn và cấy sang đĩa petri khác.

Tên các chủng vi khuẩn phân lập được ký hiệu ngắn gọn theo thứ tự từ B1 – B93.

Bước 3: Định danh vi khuẩn

Dựa trên kết quả quan sát hình dạng, màu sắc, đặc điểm của khuẩn lạc, hình dạng của tiêu bản nhuộm gram và nhuộm bào tử đã loại bỏ các chủng vi khuẩn trùng lặp. Đồng thời thực hiện các phản ứng sinh hóa đặc trưng cho *Bacillus* sp. để định danh cho các chủng vi khuẩn đã được phân lập.

Quan sát hình thái vi khuẩn dưới kính hiển vi

Quá trình quan sát hình thái vi khuẩn dưới kính hiển vi nhằm xác định các tiêu bản vi khuẩn phù hợp với những đặc điểm của vi khuẩn *Bacillus* sp. để tiếp tục thử các phản ứng sinh hóa. Quá trình này bao gồm:

- Nhuộm Gram: Lấy một ít sinh khối vi khuẩn từ ống TSA làm tiêu bản nhuộm Gram để quan sát dưới kính hiển vi.
- Nhuộm bào tử (phương pháp Schaeffer-Fulton): Tiến hành nhuộm bào tử vi khuẩn với thuốc nhuộm xanh Malachite cho thấy bào tử bắt màu xanh, hình elip và thành tế bào vi khuẩn bắt màu hồng của safranin

Sau khi nhuộm Gram, nhuộm bào tử 93 chủng vi khuẩn phân lập được và quan sát dưới kính hiển vi ở độ phóng đại 1000 chọn được 30 chủng vi khuẩn thuộc gram dương, tế bào hình que ngắn, nhỏ, đứng riêng lẽ, có khi xếp thành chuỗi ngắn, sinh bào tử.

Các phản ứng sinh hóa của vi khuẩn

Tiến hành các phản ứng sinh hóa đặc trưng để xác định các chủng vi khuẩn *Bacillus* sp.. Các phản ứng sinh hóa này bao gồm:

- Hoạt tính catalaza: Lấy khuẩn lạc 18 – 24 giờ tuổi đặt lên lam kính sạch. Nhỏ 1 giọt H_2O_2 3% phủ lên vi khuẩn và quan sát sự tạo thành bọt khí. Kết quả: Bọt khí sủi mạnh và nhanh là catalaza (+). Một số vi khuẩn không có catalaza nhưng có khả năng phân hủy H_2O_2 tạo thành bọt khí nhỏ và chậm 30 giây, thì không phải là catalaza (+).
- Phản ứng indol: phát hiện vi khuẩn có enzym tryptophanaza chuyển hóa trypton tạo thành indol. Cấy vi khuẩn vào môi trường dịch thể TSB (bổ sung 1,5% NaCl), ủ 30°C trong 24 giờ. Thêm 0,2 - 0,3 ml thuốc thử Kovac's. Sự xuất hiện của màu đỏ đặc trưng ở lớp trên cùng của môi trường dịch thể chứng tỏ phản ứng dương tính, màu vàng âm tính.
- Phản ứng Voges – Proskauer: phát hiện vi khuẩn có khả năng sinh hai loại enzym chuyển hóa 2,3 butandiol thành axetoin khi có oxy và chuyển hóa tiếp axetoin

thành diaxetyl. Vi khuẩn được cấy vào ống nghiệm chứa 3 ml môi trường Clark Lubs + 3% NaCl đã tiệt trùng, ủ ở 30 °C. Sau 36 giờ, nhỏ 0,6 ml thuốc thử A (10 g alpha napthol trong 100 ml rượu etylic) và 0,2 ml thuốc thử B (40 g KOH trong 100 ml nước cất) vào ống nghiệm, lắc đều và để nghiêng ống nghiệm 30 phút. Đọc kết quả, nếu môi trường chuyển màu hồng dương tính, ngược lại âm tính.

- Phản ứng metyl đỏ: phát hiện vi khuẩn lên men glucoza tạo thành axit bền (axit pyruvic). Vi khuẩn được nuôi cấy vào ống nghiệm chứa 3 ml môi trường Clark Lubs + 3% NaCl, sau 24 – 48 giờ nhỏ thêm 2 giọt thuốc thử metyl đỏ, vòng màu đỏ xuất hiện cho kết quả dương tính, màu vàng âm tính.
- Thử nghiệm khả năng di động: phát hiện khả năng di động của vi khuẩn nhờ có roi ở đầu tế bào. Cấy đâm sâu trong thạch mềm (0,3 - 0,6% agar) đã tiệt trùng, khoảng 2/3 độ dài thạch, ủ 30°C trong 48 giờ. Phản ứng dương tính: vi khuẩn có thể di động xung quanh đường cấy, xoắn ốc (vi khuẩn mọc lan rộng xung quanh vết cấy) ngược lại âm tính thì chúng chỉ mọc theo vết cấy.
- Thử nghiệm hóa lỏng gelatin: Phát hiện vi khuẩn có men gelatinaza phân giải và hóa lỏng gelatin, quan sát thấy ngay cả khi nhiệt độ thấp hơn 28°C. Vi khuẩn được cấy vào ống nghiệm chứa 10 ml môi trường NG đã được hấp khử trùng (gelatin 5 g, pepton 0,3 g, NaCl 3 g, 100 ml nước). Sau 48 giờ, đặt các ống nghiệm vào tủ lạnh 4 °C trong 30 phút. Các ống nghiệm chứa các chủng có khả năng phân giải gelatin sẽ không bị đông dù nhiệt độ thấp.
- Khử nitrat: Vi khuẩn được cấy vào ống nghiệm chứa 3 ml môi trường lỏng nitrat broth + NaCl 3% đã hấp tiệt trùng, mẫu ủ 30°C trong 24 giờ, nhỏ 1 ml thuốc thử A (0,6 g axit sulfanilic trong 10 ml nước cất nóng, để nguội sau đó 20 ml HCl đậm đặc được thêm vào, tăng thể tích thành 100 ml bằng nước cất) và thêm 1 ml thuốc thử B (0,6g α-napthylamin được hòa tan trong 10 - 20 ml HCl đậm đặc, sau đó pha loãng thành 100 ml với nước cất) vào ống nghiệm, màu đỏ xuất hiện trong 1-2 phút cho kết quả dương tính, ngược lại âm tính.
- Khả năng lên men đường: glucoza, manitol, sucroza: vi khuẩn được nuôi cấy trong các ống nghiệm chứa môi trường Phenol Red Broth Base pH =7,4, có bổ sung 1%

loại đường cần khảo sát phản ứng dương tính: môi trường chuyển màu vàng, phản ứng âm tính: môi trường không đổi màu.

- Khả năng sử dụng xitrat: Cấy vi khuẩn trên môi trường thạch nghiêng Simmons xitrat (chứa chỉ thị màu xanh bromtymol). Đọc kết quả: Simmons xitrat (+): vi khuẩn mọc trên mặt thạch nghiêng với sự đổi màu sang màu xanh dương hoàn toàn hoặc một phần. Simmons xitrat (–): vi khuẩn không mọc trên mặt thạch và không đổi màu môi trường (màu xanh lá).
- Khả năng sinh enzym proteaza, amylaza của chủng phân lập: Vi khuẩn được cấy điểm trên môi trường thạch có bổ sung casein, tinh bột (1 %) đã được vô trùng ở 30^{o}C sau 48 giờ dùng TCA 10% (proteaza), lugol (amylaza) phủ lên mặt thạch trong 5 phút. Nếu có khả năng sinh enzym nó sẽ tạo thành vùng phân giải xung quanh điểm cấy.

Dựa trên kết quả quan sát hình dạng, màu sắc, đặc điểm của khuẩn lạc, hình dạng của tiêu bản nhuộm gram và nhuộm bào tử đã loại bỏ các chủng vi khuẩn trùng lặp. Đồng thời thực hiện các phản ứng sinh hóa đặc trưng cho *Bacillus* sp.. Kết quả xác định được 14 chủng vi khuẩn khác nhau (B2, B5, B8, B16, B24, B31, B42, B58, B67, B68, B74, B85, B91) có kết quả phù hợp với khóa phân loại Bergey, bước đầu khẳng định 14 chủng vi khuẩn này là *Bacillus* sp..

Bước 4: Kiểm tra khả năng chuyển hóa amoniac của nhóm vi khuẩn *Bacillus* sp..

Vi khuẩn được cấy vào các ống nghiệm chứa 10 ml môi trường định lượng amoniac đã được vô trùng. Sau 48 giờ, nhỏ 6 giọt thuốc thử của chai thuốc thử số 1 vào ống nghiệm chứa khuẩn lắc đều, nhỏ tiếp 6 giọt thuốc thử của chai thuốc thử 2 vào ống nghiệm, lắc đều, cuối cùng nhỏ tiếp 6 giọt thuốc thử của chai thuốc thử số 3 vào ống nghiệm, đóng nắp lắc đều. Sau 5 phút, đối chiếu màu của dung dịch với bảng màu và ống đối chứng.

Tiến hành nuôi cấy 14 chủng vi khuẩn trong môi trường định lượng amoniac (chứa muối $(NH_4)_2SO_4$ là nguồn nitơ chính). Dịch vi khuẩn sau 48 giờ nuôi cấy lắc ở 250 vòng/phút được đem đi kiểm tra khả năng xử lý amoniac bằng bộ kit sera. Kết quả

có 8 chủng vi khuẩn (B2, B5, B31, B58, B68, B74, B85, B91) trong số 14 chủng có khả năng xử lý amoniac. Tuy nhiên, khi kiểm tra khả năng chuyển hóa bằng bộ kit sera cho thấy dịch khuẩn của hai chủng vi khuẩn B2, B91 ngả về màu xanh nhiều hơn màu vàng nên tiến hành chọn 6 chủng vi khuẩn có dịch khuẩn chuyển màu vàng nhiều để tiến hành định lượng.

Bước 5: Đánh giá khả năng xử lý amoniac của nhóm vi khuẩn *Bacillus* sp.

Mục đích của thí nghiệm này nhằm chọn ra chủng vi khuẩn có khả năng xử lý amoniac tốt nhất và nhanh nhất, chọn ra các chủng có tiềm năng làm vật liệu cho các nghiên cứu chế tạo các chế phẩm sinh học phục vụ cho ngành nuôi trồng thủy sản.

Tiến hành nuôi 8 chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. (B2, B5, B31, B58, B68, B74, B85, B91) trong môi trường định lượng chứa 13 mg/L NH_3/NH_4+. Nồng độ amoniac được đo sau 6 giờ, 12 giờ, 24 giờ, 36 giờ, 48 giờ bằng phương pháp phenat. Từ kết quả OD đo được, tiến hành xử lý số liệu dựa vào đường chuẩn để tính hàm lượng amoniac mà các chủng vi khuẩn đã xử lý.

Kết quả của thí nghiệm:

- Giai đoạn từ 0 - 12 giờ: Đây là giai đoạn vi khuẩn thích ứng với điều kiện môi trường nuôi cấy mới (pha tiềm phát), nên số lượng tế bào phân chia chậm, hàm lượng amoniac giảm nhẹ (0,2 – 3 mg/L). Sau 6 giờ, cấy vi khuẩn vào môi trường định lượng amoniac B58 và B74 thích ứng với môi trường nhanh hơn so với 4 chủng vi khuẩn còn lại, vi khuẩn B5 có khả năng thích nghi chậm nhất với hàm lượng xử lý amoniac bằng 11,8% so với B58 và B74.
- Giai đoạn từ 12 – 24 giờ: Đây là giai đoạn vi khuẩn bước vào giai đoạn phân chia mạnh, số lượng tế bào tăng theo lũy thừa (pha lũy thừa), quá trình trao đổi chất diễn ra mạnh mẽ do đó hàm lượng amoniac trong môi trường giảm mạnh (8 – 10 mg/L). Đến thời điểm 12 giờ B5, B68 đã bắt đầu phát triển mạnh mẽ trong môi trường mới, sinh khối tăng nhanh nên khả năng xử lý amoniac cao nhất so với các chủng còn lại đặc biệt B5 có khả năng xử lý amoniac gấp 13,5 lần so với thời điểm 6 giờ, bên cạnh đó B31 vẫn còn phát triển chậm, hàm lượng amoniac được xử lý

chỉ cao hơn thời điểm 6 giờ 24,5%. Đến 24 giờ, hàm lượng amoniac bị phân giải của tất cả các chủng đều tăng vượt bật so với thời điểm trước đó, điều này có thể giải thích vì tại thời điểm 24 giờ vi khuẩn phát triển mạnh nhất, quá trình phân chia tế bào mạnh mẽ và đạt được mật độ vi khuẩn cao nhất nên hiệu quả xử lý đạt mức tối ưu (>85%), nổi bật là chủng vi khuẩn B31 với hàm lượng amoniac bị xử lý cao nhất gấp 9,8 lần so với 12 giờ.

- Giai đoạn từ 24 – 36 giờ: Đây là giai đoạn khi môi trường bắt đầu cạn kiệt thì mật độ vi khuẩn bắt đầu giảm, các tế bào vi khuẩn ngừng phân chia hoặc chuyển sang hình thành bào tử nên quá trình trao đổi chất chậm lại dẫn đến hàm lượng amoniac trong môi trường giảm nhẹ (0,2 – 0,5 mg/L). Sau 24 giờ, do môi trường ngày càng cạn kiệt dinh dưỡng (vì môi trường không được cung cấp liên tục) và sự biến đổi pH dẫn đến sự suy giảm mật độ tế bào cũng như khả năng xử lý amoniac của các vi khuẩn chậm lại (đạt khoảng 3,7 – 5,5 % so với thời điểm 24 giờ), hàm lượng amoniac bị phân giải không đáng kể từ 0,3 - 0,5 mg/L.
- Sau 48 giờ, các chủng vi khuẩn bắt đầu bước vào pha suy vong hàm lượng amoniac giảm không đáng kể do số lượng vi khuẩn bắt đầu giảm, quá trinh trao đổi chất bị đình trệ. Đến thời điểm 48 giờ cho thấy tất cả 6 chủng vi khuẩn *Bacillus sp.* phân lập được đều có khả năng xử lý amoniac tốt ở nồng độ 13 mg/L, với 3 chủng vi khuẩn B5, B31, B68 có hàm lượng amoniac bị phân giải cao nhất (> 99 %), 2 chủng vi khuẩn B74, B85 khả năng phân giải đạt > 98% và thấp nhất là B58 với khả năng phân giải đạt 97,9 %.

Bước 6: Định danh sinh học phân tử các chủng vi khuẩn *Bacillus* sp.

Các chủng *Bacillus* sp. đã được định danh hình thái và sinh hóa, tuyển chọn về khả năng xử lý amoniac. Phương pháp định danh sinh học phân tử chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. bao gồm:

- Tách chiết và khuếch đại ADN: Mẫu vi khuẩn được tăng sinh trong môi trường LB, khi đạt mật độ 10^6 CFU/ml sẽ được tiến hành tách chiết ADN bằng bộ kit AccuPrep Genomic DNA Extraction.

- Khuếch đại sản phẩm PCR: Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng cách điện di trên gel agaroza 1,5 % trong dung dịch đệm TBE 0,5 X ở điện thế 100 V trong 35 phút. Kết quả được xem dưới đèn UV. Trình tự cặp mồi sử dụng nhân dòng sản phẩm bao gồm: mồi xuôi 27F (trình tự 5' AGATTTGATCCTGGCTCAG 3') và mồi ngược 1492R (trình tự 5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3').

Phân tích trình tự rARN 16S nhằm định danh đến mức loài của các chủng *Bacillus*, một trình tự khoảng 500 nucleotit từ gen mã hóa cho rARN 16S của các chủng *Bacillus* được khuếch đại bằng phương pháp PCR với 2 mồi chuyên biệt cho giống *Bacillus* và được xác định trình tự nucleotit.

Kết quả đối chiếu trình tự cho kết quả: Chủng B5 và B74 có độ tương đồng với chủng *Bacillus subtilis* là 99%. Chủng B2 có độ tương đồng với *Bacillus amyloliquefaciens* là 99 %. Chủng B31, B58 và B68 có độ tương đồng với *Bacillus velezensis* là 99 %. Chủng B91 có độ tương đồng với *Bacillus methylotrophicus* là 99 %. Chủng B85 có độ tương đồng với *Bacillus licheniformis* là 99 %. Trong số 8 chủng *Bacillus* đã được định danh bằng đối chiếu trình tự, có 4 chủng có tên trong khóa phân loại của Bergey và kết quả định danh sinh hóa ở 4 chủng này hoàn toàn tương đồng với kết quả định danh bằng phương pháp sinh học phân tử.

Khác biệt ở chỗ, đã phân lập được 6 chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. B5, B31, B58, B68, B74, B85 có khả năng chuyển hóa amoniac ở nồng độ 13 mg/l từ bùn đáy trong môi trường nước mặn. Kết quả giải trình tự gen vùng 16S rARN của 6 chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. B5, B31, B58, B68, B74, B85 như sau: chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* B5 mang trình tự SEQ ID NO.1; chủng vi khuẩn *Bacillus velezensis* B31 mang trình tự SEQ ID NO.2; chủng vi khuẩn *Bacillus velezensis* B58 mang trình tự SEQ ID NO.3; chủng vi khuẩn *Bacillus velezensis* B68 mang trình tự SEQ ID NO.4; chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* B74 mang trình tự SEQ ID NO.5; và chủng vi khuẩn *Bacillus licheniformis* B85 mang trình tự SEQ ID NO.6; chuyển hóa nitơ trong môi trường nước mặn nhằm cải thiện chất lượng nước khu vực nuôi tôm hùm thân thiện với môi trường và không tác động gây hại lên cơ thể vật nuôi, tìm ra giải pháp xử lý thức ăn dư

thừa, tiêu diệt và kìm hãm sự phát triển của tác nhân gây bệnh bằng các biện pháp sinh học an toàn.

Sau đây, các phương án thực hiện giải pháp hữu ích sẽ được mô tả một cách chi tiết hơn

Theo Hình 1, quy trình phân lập và định danh chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. có khả năng chuyển hóa amoniac từ bùn đáy trong môi trường nước mặn, bao gồm các bước sau:

Bước 1: Phân lập vi khuẩn *Bacillus* sp. từ bùn đáy nuôi tôm hùm trên môi trường TSA.

Quá trình phân lập vi khuẩn *Bacillus* sp. được tiến hành bằng phương pháp xử lý ở nhiệt độ cao để giết chết những chủng vi khuẩn tạp khác không có khả năng tạo bào tử, giữ lại những chủng vi khuẩn có khả năng sinh bào tử. Sau 24 - 28 giờ nuôi cấy, tiến hành nhận diện khuẩn lạc đặc trưng: có dạng tròn, bề mặt khuẩn lạc khô, nhẵn hoặc hơi nhăn, rìa răng cưa không đều, tâm sẩm màu, màu trắng xám đến vàng nhạt và catalaza dương tính.

Bước 2: Cấy chuyền và lưu trữ vi khuẩn

Quá trình cấy chuyền và lưu trữ vi khuẩn được thực hiện theo phương pháp của Đặng Thị Hoàng Oanh và đồng tác giả (2004). Sau khi ủ các đĩa môi trường ở 30 ^{o}C trong 24 – 28 giờ, khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn khác nhau sẽ phát triển trên bề mặt đĩa thạch. Thực hiện tách ròng từng chủng vi khuẩn bằng phương pháp cấy chuyền nhiều lần để thu được chủng vi khuẩn thuần, các chủng này được lưu trữ theo hai cách:

- Giữ trong ống thạch nghiên: mỗi chủng vi khuẩn thuần được cấy trên môi trường thạch nghiên và được ủ ở 30 ^{o}C trong 24 – 28 giờ đến khi khuẩn lạc phát triển, sau đó được bảo quản trong tủ lạnh ở 4^{o}C và cấy chuyền định kỳ 2 - 3 tháng/lần.
- Trữ vi khuẩn với glyxerol 25 % trong các ống ly tâm và giữ ở -80 ^{o}C, phương pháp lưu trữ này không biến đổi đặc tính sinh học của vi khuẩn khi lưu trữ trong thời gian dài. Vi khuẩn được cấy lên môi trường TSA và được ủ 24 giờ ở 30 ^{o}C.

Khoảng một nửa số khuẩn lạc mọc trên đĩa TSA được thu bằng quẻ phe cấy tiệt trùng, cho vào ống ly tâm và giữ ở -80 ^{o}C.

Bước 3: Định danh vi khuẩn

Dựa trên kết quả quan sát hình dạng, màu sắc, đặc điểm của khuẩn lạc, hình dạng của tiêu bản nhuộm gram và nhuộm bào tử đã loại bỏ các chủng vi khuẩn trùng lặp. Đồng thời thực hiện các phản ứng sinh hóa đặc trưng cho *Bacillus* sp. để định danh cho các chủng vi khuẩn đã được phân lập.

Quan sát hình thái vi khuẩn dưới kính hiển vi

Quá trình quan sát hình thái vi khuẩn dưới kính hiển vi nhằm xác định các tiêu bản vi khuẩn phù hợp với những đặc điểm của vi khuẩn *Bacillus* sp. để tiếp tục thử các phản ứng sinh hóa. Quá trình này bao gồm:

- Nhuộm Gram: Lấy một ít sinh khối vi khuẩn từ ống TSA làm tiêu bản nhuộm Gram để quan sát dưới kính hiển vi.
- Nhuộm bào tử (phương pháp Schaeffer-Fulton): Tiến hành nhuộm bào tử vi khuẩn với thuốc nhuộm xanh Malachite cho thấy bào tử bắt màu xanh, hình elip và thành tế bào vi khuẩn bắt màu hồng của safranin

Các phản ứng sinh hóa của vi khuẩn

Tiến hành các phản ứng sinh hóa đặc trưng để xác định các chủng vi khuẩn *Bacillus* sp.. Các phản ứng sinh hóa này bao gồm:

- Hoạt tính catalaza: Lấy khuẩn lạc 18 – 24 giờ tuổi đặt lên lam kính sạch. Nhỏ 1 giọt H_2O_2 3% phủ lên vi khuẩn và quan sát sự tạo thành bọt khí. Kết quả: Bọt khí sủi mạnh và nhanh là catalaza (+). Một số vi khuẩn không có catalaza nhưng có khả năng phân hủy H_2O_2 tạo thành bọt khí nhỏ và chậm 30 giây, thì không phải là catalaza (+).
- Phản ứng indol: phát hiện vi khuẩn có enzym tryptophanaza chuyển hóa trypton tạo thành indol. Cấy vi khuẩn vào môi trường dịch thể TSB (bổ sung 1,5% NaCl), ủ 30^{o}C trong 24 giờ. Thêm 0,2 - 0,3 ml thuốc thử Kovac's. Sự xuất hiện của màu

đỏ đặc trưng ở lớp trên cùng của môi trường dịch thể chứng tỏ phản ứng dương tính, màu vàng âm tính.

- Phản ứng Voges – Proskauer: phát hiện vi khuẩn có khả năng sinh hai loại enzym chuyển hóa 2,3 butandiol thành axetoin khi có oxy và chuyển hóa tiếp axetoin thành diaxetyl. Vi khuẩn được cấy vào ống nghiệm chứa 3 ml môi trường Clark Lubs + 3% NaCl đã tiệt trùng, ủ ở 30 °C. Sau 36 giờ, nhỏ 0,6 ml thuốc thử A (10 g alpha napthol trong 100 ml rượu etylic) và 0,2 ml thuốc thử B (40 g KOH trong 100 ml nước cất) vào ống nghiệm, lắc đều và để nghiêng ống nghiệm 30 phút. Đọc kết quả, nếu môi trường chuyển màu hồng dương tính, ngược lại âm tính.
- Phản ứng metyl đỏ: phát hiện vi khuẩn lên men glucoza tạo thành axit bền (axit pyruvic). Vi khuẩn được nuôi cấy vào ống nghiệm chứa 3 ml môi trường Clark Lubs + 3% NaCl, sau 24 – 48 giờ, nhỏ thêm 2 giọt thuốc thử metyl đỏ, vòng màu đỏ xuất hiện cho kết quả dương tính, màu vàng âm tính.
- Thử nghiệm khả năng di động: phát hiện khả năng di động của vi khuẩn nhờ có roi ở đầu tế bào. Cấy đâm sâu trong thạch mềm (thạch aga 0,3 - 0,6%) đã tiệt trùng, khoảng 2/3 độ dài thạch, ủ 30°C trong 48 giờ. Phản ứng dương tính: vi khuẩn có thể di động xung quanh đường cấy, xoắn ốc (vi khuẩn mọc lan rộng xung quanh vết cấy) ngược lại âm tính thì chúng chỉ mọc theo vết cấy.
- Thử nghiệm hóa lỏng gelatin: Phát hiện vi khuẩn có men gelatinaza phân giải và hóa lỏng gelatin, quan sát thấy ngay cả khi nhiệt độ thấp hơn 28°C. Vi khuẩn được cấy vào ống nghiệm chứa 10 ml môi trường NG đã được hấp khử trùng (gelatin 5 g, pepton 0,3 g, NaCl 3 g, 100 ml nước). Sau 48 giờ, đặt các ống nghiệm vào tủ lạnh 4 °C trong 30 phút. Các ống nghiệm chứa các chủng có khả năng phân giải gelatin sẽ không bị đông dù nhiệt độ thấp.
- Khử nitrat: Vi khuẩn được cấy vào ống nghiệm chứa 3 ml môi trường lỏng nitrat broth +3% NaCl đã hấp tiệt trùng, mẫu ủ 30°C trong 24 giờ, nhỏ 1 ml thuốc thử A (0,6 g axit sulfanilic trong 10 ml nước cất nóng, để nguội sau đó 20 ml HCl đậm đặc được thêm vào, tăng thể tích thành 100 ml bằng nước cất) và thêm 1 ml thuốc thử B (0,6g α-napthylamin được hòa tan trong 10 - 20 ml HCl đậm đặc, sau đó pha

loãng thành 100 ml với nước cất) vào ống nghiệm, màu đỏ xuất hiện trong 1-2 phút cho kết quả dương tính, ngược lại âm tính.

- Khả năng lên men đường: glucoza, manitol, sucroza: vi khuẩn được nuôi cấy trong các ống nghiệm chứa môi trường Phenol Red Broth Base pH = 7,4, có bổ sung 1% loại đường cần khảo sát phản ứng dương tính: môi trường chuyển màu vàng, phản ứng âm tính: môi trường không đổi màu.
- Khả năng sử dụng xitrat: Cấy vi khuẩn trên môi trường thạch nghiêng Simmons xitrat (chứa chỉ thị màu xanh bromothymol). Đọc kết quả: Simmons xitrat (+): vi khuẩn mọc trên mặt thạch nghiêng với sự đổi màu sang màu xanh dương hoàn toàn hoặc một phần. Simmons xitrat (–): vi khuẩn không mọc trên mặt thạch và không đổi màu môi trường (màu xanh lá).
- Khả năng sinh enzym proteaza, amylaza của chủng phân lập: Vi khuẩn được cấy điểm trên môi trường thạch có bổ sung casein, tinh bột (1 %) đã được vô trùng ở 30°C sau 48 giờ dùng TCA 10% (proteaza), lugol (amylaza) phủ lên mặt thạch trong 5 phút. Nếu có khả năng sinh enzym nó sẽ tạo thành vùng phân giải xung quanh điểm cấy.

Bước 4: Kiểm tra khả năng chuyển hóa amoniac của nhóm vi khuẩn *Bacillus* sp.

Vi khuẩn được cấy vào các ống nghiệm chứa 10 ml môi trường định lượng amoniac đã được vô trùng. Sau 48 giờ nhỏ 6 giọt thuốc thử của chai thuốc thử số 1 vào ống nghiệm chứa khuẩn lắc đều, nhỏ tiếp 6 giọt thuốc thử của chai thuốc thử 2 vào ống nghiệm, lắc đều, cuối cùng nhỏ tiếp 6 giọt thuốc thử của chai thuốc thử số 3 vào ống nghiệm, đóng nắp lắc đều. Sau 5 phút, đối chiếu màu của dung dịch với bảng màu và ống đối chứng.

Tiến hành nuôi cấy 14 chủng vi khuẩn trong môi trường định lượng amoniac (chứa muối $(NH_4)_2SO_4$ là nguồn nitơ chính). Dịch vi khuẩn sau 48 giờ nuôi cấy lắc ở 250 vòng/phút được đem đi kiểm tra khả năng xử lý amoniac bằng bộ kit sera.

Bước 5: Đánh giá khả năng xử lý amoniac của nhóm vi khuẩn *Bacillus* sp.

Mục đích của thí nghiệm này nhằm chọn ra chủng vi khuẩn có khả năng xử lý amoniac tốt nhất và nhanh nhất, chọn ra các chủng có tiềm năng làm vật liệu cho các nghiên cứu chế tạo các chế phẩm sinh học phục vụ cho ngành nuôi trồng thủy sản.

Tiến hành nuôi 8 chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. (B2, B5, B31, B58, B68, B74, B85, B91) trong môi trường định lượng chứa 13 mg/L NH_3/NH_4+. Nồng độ amoniac được đo sau 6 giờ, 12 giờ, 24 giờ, 36 giờ, 48 giờ bằng phương pháp phenat. Từ kết quả OD đo được, tiến hành xử lý số liệu dựa vào đường chuẩn để tính hàm lượng amoniac mà các chủng vi khuẩn đã xử lý.

Bước 6: Định danh sinh học phân tử các chủng vi khuẩn *Bacillus* sp.

Các chủng *Bacillus* sp. đã được định danh hình thái và sinh hóa, tuyển chọn về khả năng xử lý amoniac. Phương pháp định danh sinh học phân tử chủng vi khuẩn Bacillus sp. bao gồm:

- Tách chiết và khuếch đại ADN: Mẫu vi khuẩn được tăng sinh trong môi trường LB, khi đạt mật độ 10^6 CFU/ml sẽ được tiến hành tách chiết ADN bằng bộ kit AccuPrep Genomic DNA Extraction.
- Khuếch đại sản phẩm PCR: Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng cách điện di trên gel agaroza 1,5 % trong dung dịch đệm TBE 0,5 X ở điện thế 100 V trong 35 phút. Kết quả được xem dưới đèn UV. Trình tự cặp mồi sử dụng nhân dòng sản phẩm bao gồm: mồi xuôi 27F (trình tự 5' AGATTTGATCCTGGCTCAG 3') và mồi ngược 1492R (trình tự 5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3').

Phân tích trình tự rARN 16S nhằm định danh đến mức loài của các chủng *Bacillus*, một trình tự khoảng 500 nucleotit từ gen mã hóa cho rARN 16S của các chủng *Bacillus* được khuếch đại bằng phương pháp PCR với 2 mồi chuyên biệt cho giống *Bacillus* và được xác định trình tự nucleotit.

Theo Hình 2, là hình dạng nhận diện khuẩn lạc đặc trưng của chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* B5: có dạng tròn, bề mặt khuẩn lạc khô, nhẵn hoặc hơi nhăn, rìa răng cưa không đều, tâm sẩm màu, màu trắng xám đến vàng nhạt và catalaza dương tính.

Theo Hình 3, là hình dạng nhận diện khuẩn lạc đặc trưng của chủng vi khuẩn *Bacillus velezensis* B31: có dạng tròn, bề mặt khuẩn lạc khô, nhẵn hoặc hơi nhăn, rìa răng cưa không đều, tâm sẩm màu, màu trắng xám đến vàng nhạt và catalaza dương tính.

Theo Hình 4, là hình dạng nhận diện khuẩn lạc đặc trưng của chủng vi khuẩn *Bacillus velezensis* B58: có dạng tròn, bề mặt khuẩn lạc khô, nhẵn hoặc hơi nhăn, rìa răng cưa không đều, tâm sẩm màu, màu trắng xám đến vàng nhạt và catalaza dương tính.

Theo Hình 5, là hình dạng nhận diện khuẩn lạc đặc trưng của chủng vi khuẩn *Bacillus velezensis* B68: có dạng tròn, bề mặt khuẩn lạc khô, nhẵn hoặc hơi nhăn, rìa răng cưa không đều, tâm sẩm màu, màu trắng xám đến vàng nhạt và catalaza dương tính.

Theo hình 6, là hình dạng nhận diện khuẩn lạc đặc trưng của chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* B74: có dạng tròn, bề mặt khuẩn lạc khô, nhẵn hoặc hơi nhăn, rìa răng cưa không đều, tâm sẩm màu, màu trắng xám đến vàng nhạt và catalaza dương tính.

Theo Hình 7, là hình dạng nhận diện khuẩn lạc đặc trưng của chủng vi khuẩn *Bacillus licheniformis* B85: có dạng tròn, bề mặt khuẩn lạc khô, nhẵn hoặc hơi nhăn, rìa răng cưa không đều, tâm sẩm màu, màu trắng xám đến vàng nhạt và catalaza dương tính.

Theo Hình 8, biểu đồ trong hình cho thấy sự suy giảm hàm lượng amoniac theo thời gian đồng thời, thể hiện đường cong tăng trưởng của vi khuẩn, từ 0 - 12 giờ là giai đoạn vi khuẩn thích ứng với điều kiện môi trường nuôi cấy mới (pha tiềm phát), nên số lượng tế bào phân chia chậm, hàm lượng amoniac giảm nhẹ (0,2 – 3 mg/L). Đến khoảng 12 – 24 giờ vi khuẩn bước vào giai đoạn phân chia mạnh, số lượng tế bào tăng theo lũy thừa (pha lũy thừa), quá trình trao đổi chất diễn ra mạnh mẽ do đó hàm lượng amoniac trong môi trường giảm mạnh (8 – 10 mg/L). Từ 24 – 36 giờ khi môi trường bắt đầu cạn kiệt thì mật độ vi khuẩn bắt đầu giảm, các tế bào vi khuẩn ngừng phân chia hoặc chuyển sang hình thành bào tử nên quá trình trao đổi chất chậm lại dẫn đến hàm lượng amoniac trong môi trường giảm nhẹ (0,2 – 0,5 mg/L). Sau 48 giờ, các chủng vi

khuẩn bắt đầu bước vào pha suy vong hàm lượng amoniac giảm không đáng kể do số lượng vi khuẩn bắt đầu giảm, quá trinh trao đổi chất bị đình trệ.

Theo Hình 9, kết quả phân tích BLAST của chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* B5. Theo đó, kết quả giải trình tự chủng vi khuẩn B5 này như được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO.1.

Theo Hình 10, kết quả phân tích BLAST của chủng vi khuẩn *Bacillus velezensis* B31. Theo đó kết quả giải trình tự chủng vi khuẩn B31 này như được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO.2.

Theo Hình 11, kết quả phân tích BLAST của chủng vi khuẩn *Bacillus velezensis* B58. Theo đó kết quả giải trình tự chủng vi khuẩn B58 này như được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO.3;

Theo Hình 12, kết quả phân tích BLAST của chủng vi khuẩn *Bacillus velezensis* B68. Theo đó kết quả giải trình tự chủng vi khuẩn B68 này như được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO.4.

Theo Hình 13, kết quả phân tích BLAST của chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* B74. Theo đó kết quả giải trình tự chủng vi khuẩn B74 này như được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO.5.

Theo Hình 14, kết quả phân tích BLAST của chủng vi khuẩn *Bacillus licheniformis* B85. Theo đó kết quả giải trình tự chủng vi khuẩn B85 này như được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO.6.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Tiến hành nuôi 6 chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. (B5, B31, B58, B68, B74, B85) trong môi trường định lượng chứa 13 mg/L NH_3/NH_4^+. Nồng độ amoniac được đo sau 6 giờ, 12 giờ, 24 giờ, 36 giờ, 48 giờ bằng phương pháp phenat. Từ kết quả OD đo được chúng tôi tiến hành xử lý số liệu dựa vào đường chuẩn để tính hàm lượng amoniac mà các chủng vi khuẩn đã xử lý.

Bảng 1. Hàm lượng amoniac bị chuyển hóa bởi các chủng vi khuẩn *Bacillus* sp.

Thời gian (giờ)	Hàm lượng amoniac ($NH4^+$-N) bị chuyển hóa (mg/L)						CV (%)
	B5	B31	B58	B68	B74	B85	
6	0.233^{c}	0,862^{b}	1,973^{a}	0,751^{b}	1,973^{a}	1,010^{b}	13,46
12	3,146^{a}	1,073^{c}	2,221^{b}	3,220^{a}	2,221^{b}	2,332^{b}	6,25
24	8,987^{b}	10,515^{a}	8,198^{c}	8,404^{c}	8,254^{c}	9,046^{b}	1,67
36	0,468^{a}	0,211^{c}	0,305^{bc}	0,509^{a}	0,248^{c}	0,417^{ab}	14,45
48	0,040^{c}	0,121^{bc}	0,267^{a}	0,074^{c}	0,187^{b}	0,155^{b}	16,18
Khả năng chuyển hóa amoniac (%)	99,7	99,1	97,9	99,4	98,6	98,8	

Trong cùng một hàng các giá trị trung bình có kí tự theo sau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ($P < 0,01$).

Dựa vào bảng 1 cho thấy sau 6 giờ cấy vi khuẩn vào môi trường định lượng amoniac B58 và B74 thích ứng với môi trường nhanh hơn so với 4 chủng vi khuẩn còn lại, chủng vi khuẩn B5 có khả năng thích nghi chậm nhất với hàm lượng xử lý amoniac bằng 11,8% so với chủng B58 và B74. Đến thời điểm 12 giờ, chủng vi khuẩn B5, B68 đã bắt đầu phát triển mạnh mẽ trong môi trường mới, sinh khối tăng nhanh nên khả năng xử lý amoniac cao nhất so với các chủng còn lại, đặc biệt chủng B5 có khả năng xử lý amoniac gấp 13,5 lần so với thời điểm 6 giờ, bên cạnh đó chủng B31 vẫn còn phát triển chậm, hàm lượng amoniac được xử lý chỉ cao hơn thời điểm 6 giờ 24,5%. Đến 24 giờ, hàm lượng amoniac bị phân giải của tất cả các chủng đều tăng vượt bật so với thời điểm trước đó, điều này có thể giải thích vì tại thời điểm 24 giờ vi khuẩn phát triển mạnh nhất, quá trình phân chia tế bào mạnh mẽ và đạt được mật độ vi

khuẩn cao nhất nên hiệu quả xử lý đạt mức tối ưu (>85%), nổi bật là chủng vi khuẩn B31 với hàm lượng amoniac bị xử lý cao nhất gấp 9,8 lần so với 12 giờ. Sau 24 giờ (36 – 48 giờ) do môi trường ngày càng cạn kiệt dinh dưỡng (vì môi trương không được cung cấp liên tục) và sự biến dổi pH dẫn đến sự suy giảm mật độ tế bào cũng như khả năng xử lý amoniac của các vi khuẩn chậm lại (đạt khoảng 3,7 – 5,5 % so với thời điểm 24 giờ), hàm lượng amoniac bị phân giải không đáng kể từ 0,3 - 0,5 mg/L.

Đến thời điểm 48 giờ cho thấy tất cả 6 chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. phân lập được đều có khả năng xử lý amoniac tốt ở nồng độ 13 mg/L, với 3 chủng vi khuẩn B5, B31, B68 có hàm lượng amoniac bị phân giải cao nhất (> 99 %), thấp nhất là B58 với khả năng phân giải đạt 97,9 %.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. có khả năng xử lý amoniac khá tốt. Do đó, các chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. này mang lại nhiều tiềm năng to lớn nhằm khắc phục hiện trạng ô nhiễm môi trường nuôi cũng như phòng chống bệnh dịch trên tôm, cá tăng năng xuất nuôi trồng thủy sản nói chung và trên tôm hùm nói riêng, đáp ứng nhu cầu nguồn chế phẩm sinh học an toàn, có nguồn gốc từ địa phương giảm chi phí và tăng thêm lợi nhuận cho người ngư dân.

Việc tạo ra các chế phẩm sinh học chứa vi khuẩn *Bacillus* sp. là hướng đi có ý thực tiễn hiệu quả và góp phần đưa nghề nuôi trồng thủy sản phát triển bền vững hơn. Các lợi ích mang lại khi bổ sung chế phẩm sinh học là: làm ổn định chất lượng nước, nền đáy; nâng cao sức khỏe và sức đề kháng vật nuôi; nâng cao hiệu quả sử dụng thức ăn, sản sinh các enzym như proteaza, lipaza giúp cho quá trình tiêu hóa vật chủ tốt hơn; cạnh tranh mạnh mẽ chất dinh dưỡng, năng lượng và giá thể với các loài khuẩn có hại và tảo độc.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng vi khuẩn *Bacillus velezensis* B31 được phân lập, khác biệt ở chỗ chủng này có trình tự gen vùng 16S rARN nêu trong SEQ ID NO.2 và có khả năng chuyển hóa amoniac ở nồng độ 13 mg/L từ bùn đáy trong môi trường nước mặn.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Trường Đại học Nông lâm TP. Hồ Chí Minh (VN)
<120> CHỦNG VI KHUẨN *BACILLUS VELEZENSIS* B31 CHUYỂN HÓA NITƠ TRONG MÔI TRƯỜNG NƯỚC MẶN

<160> 6

<210> 1
<211> 517
<212> ADN
<213> *Bacillus subtilis* B5

<400>

TGGTGGGGGG GGAAGAACAA ATACTTGCAA GTCGAGCGGA CAGATGGGAG 50
CTTGCTCCCT GATGTTAGCG GCGGACGGGT GAGTAACACG TGGGTAACCT 100
GCCTGTAAGA CTGGGATAAC TCCGGGAAAC CGGGGCTAAT ACCGGATGGT 150
TGTTTGAACC GCATGGTTCA AACATAAAAG GTGGCTTCGG CTACCACTTA 200
CAGATGGACC CGCGGCGCAT TAGCTAGTTG GTGAGGTAAC GGCTCACCAA 250
GGCAACGATG CGTAGCCGAC CTGAGAGGGT GATCGGCCAC ACTGGGACTG 300
AGACACGGCC CAGACTCCTA CGGGAGGCAG CAGTAGGGAA TCTTCCGCAA 350
TGGACGAAAG TCTGACGGAG CAACGCCGCG TGAGTGATGA AGGTTTTCGG 400
ATCGTAAAGC TCTGTTGTTA GGGAAGAACA AGTACCGTTC GAATAGGGCG 450
GTACCTTGAC GGTACCTAAC CAGAAAGCCA CGGCTAACTA CGTGCCAGCA 500
GCCGCGGTAA AAACACC 517

<210> 2
<211> 514
<212> ADN
<213> *Bacillus velezensis* B31
<400>

ATCGGGTGGC CTTTCTGGTT AGGTACCGTC AAGGTGCCGC CCTATTTGAA 50
CGGCACTTGT TCTTCCCTAA CAACAGAGCT TTACGATCCG AAAACCTTCA 100
TCACTCACGC GGCGTTGCTC CGTCAGACTT TCGTCCATTG CGGAAGATTC 150
CCTACTGCTG CCTCCCGTAG GAGTCTGGGC CGTGTCTCAG TCCCAGTGTG 200
GCCGATCACC CTCTCAGGTC GGCTACGCAT CGTCGCCTTG GTGAGCCGTT 250
ACCTCACCAA CTAGCTAATG CGCCGCGGGT CCATCTGTAA GTGGTAGCCG 300
AAGCCACCTT TTATGTCTGA ACCATGCGGT TCAAACAACC ATCCGGTATT 350
AGCCCCGGTT TCCCGGAGTT ATCCCAGTCT TACAGGCAGG TTACCCACGT 400
GTTACTCACC CGTCCGCCGC TAACATCAGG GAGCAAGCTC CCATCTGTCC 450
GCTCGACTTG CATGTATTAG GCACGCCGCC AGCGTTCGTC CTGAGCCAGG 500
ATCAAACTCT CAAA 514

<210> 3
<211> 515
<212> ADN
<213> *Bacillus* velezensis B58
<400>

AGGGGGGGAA CGTTGCCTAA TAAATGCAAG TCGAGCGGAC AGATGGGAGC 50
TTGCTCCCTG ATGTTAGCGG CGGACGGGTG AGTAACACGT GGGTAACCTG 100
CCTGTAAGAC TGGGATAACT CCGGGAAACC GGGGCTAATA CCGGATGGTT 150

GTCTGAACCG CATGGTTCAG ACATAAAAGG TGGCTTCGGC TACCACTTAC 200
AGATGGACCC GCGGCGCATT AGCTAGTTGG TGAGGTAACG GCTCACCAAG 250
GCGACGATGC GTAGCCGACC TGAGAGGGTG ATCGGCCACA CTGGGACTGA 300
GACACGGCCC AGACTCCTAC GGGAGGCAGC AGTAGGGAAT CTTCCGCAAT 350
GGACGAAAGT CTGACGGAGC AACGCCGCGT GAGTGATGAA GGTTTTCGGA 400
TCGTAAAGCT CTGTTGTTAG GGAAGAACAA GTGCCGTTCA AATAGGGCGG 450
CACCTTGACG GTACCTAACC AGAAAGCCAC GGCTAACTAC GTGCCAGCAG 500
CCGCCGGTAA TAAAA 515

<210> 4
<211> 512
<212> ADN
<213> *Bacillus* velezensis B68
<400>

AGTTGGGGGG CGTGCCTATA CTGCAAGTCG AGCGGACAGA TGGGAGCTTG 50
CTCCCTGATG TTAGCGGCGG ACGGGTGAGT AACACGTGGG TAACCTGCCT 100
GTAAGACTGG GATAACTCCG GGAAACCGGG GCTAATACCG GATGGTTGTC 150
TGAACCGCAT GGTTCAGACA TAAAAGGTGG CTTCGGCTAC CACTTACAGA 200
TGGACCCGCG GCGCATTAGC TAGTTGGTGA GGTAACGGCT CACCAAGGCG 250
ACGATGCGTA GCCGACCTGA GAGGGTGATC GGCCACACTG GGACTGAGAC 300
ACGGCCCAGA CTCCTACGGG AGGCAGCAGT AGGGAATCTT CCGCAATGGA 350
CGAAAGTCTG ACGGAGCAAC GCCGCGTGAG TGATGAAGGT TTTCGGATCG 400
TAAAGCTCTG TTGTTAGGGA AGAACAAGTG CCGTTCAAAT AGGGCGGCAC 450
CTTGACGGTA CCTAACCAGA AAGCCACGGC TAACTACGTG CCAGCAGCCG 500
CCGGTAATAA AA 512

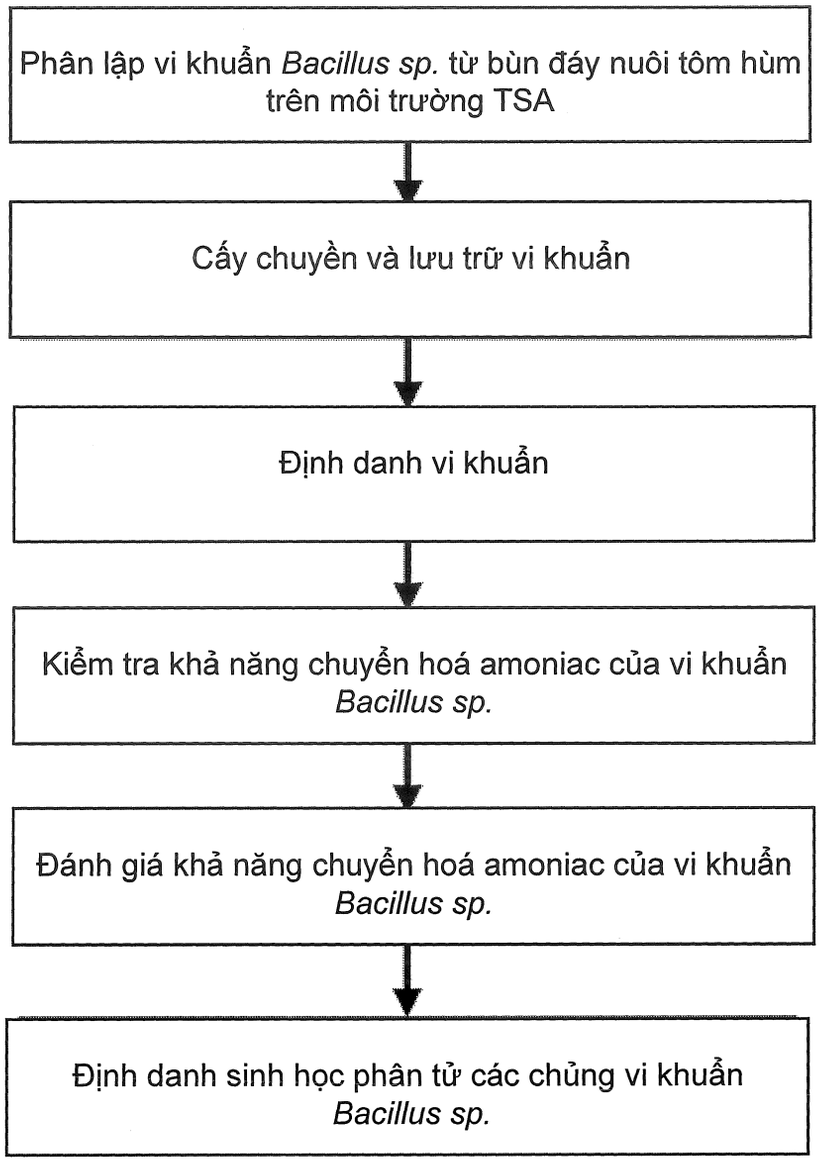
<210> 5
<211> 512
<212> ADN
<213> *Bacillus subtilis* B74
<400>

CCGTGGCTTT TCTGGTTAGG TACCGTCAAG GTACCGCCCT ATTCGAACGG 50
TACTTGTTCT TCCCTAACAA CAGAGCTTTA CGATCCGAAA ACCTTCATCA 100
CTCACGCGGC GTTGCTCCGT CAGACTTTCG TCCATTGCGG AAGATTCCCT 150
ACTGCTGCCT CCCGTAGGAG TCTGGGCCGT GTCTCAGTCC CAGTGTGGCC 200
GATCACCCTC TCAGGTCGGC TACGCATCGT TGCCTTGGTG AGCCGTTACC 250
TCACCAACTA GCTAATGCGC CGCGGGTCCA TCTGTAAGTG GTAGCCAAAG 300
CCACCTTTTA TGTTTGAACC ATGCGGTTCA AACAACCATC CGGTATTAGC 350
CCCGGTTTCC CGGAGTTATC CCAGTCTTAC AGGCAGGTTA CCCACGTGTT 400
ACTCACCCGT CCGCCGCTAA CATCAGGGAG CAAGCTCCCA TCTGTCCGCT 450
CGACTTGCAT GTATTAGGCA CGCCGCCAGC GTTCGTCCTG AGCCAGAATC 500
AAAACTCTCC AA 512

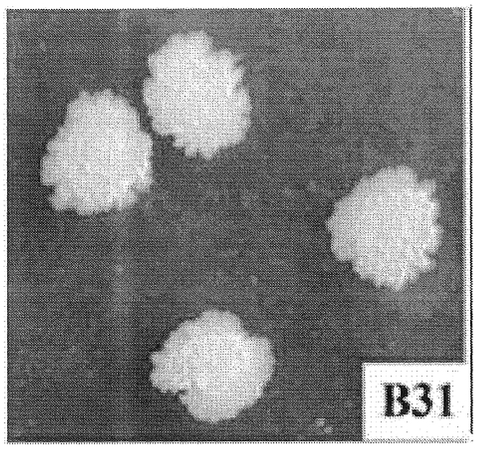
<210> 6
<211> 514
<212> ADN
<213> *Bacillus licheniformis* B85
<400>

ACCCTTGCTT TTCTGGTAAG GTACCGTCAA GGTACCGCCC TATTCGAACG 50
GTACTTGTTC TTCCCTAACA ACAGAGCTTT ACGATCCGAA AACCTTCATC 100
ACTCACGCGG CGTTGCTCCG TCAGACTTTC GTCCATTGCG GAAGATTCCC 150

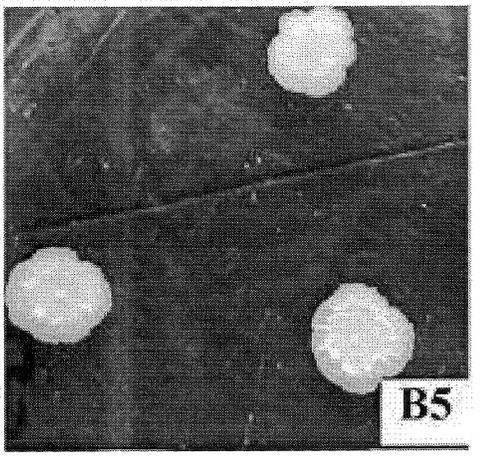
```
TACTGCTGCC  TCCCGTAGGA  GTCTGGGCCG  TGTCTCAGTC  CCAGTGTGGC  200
CGATCACCCT  CTCAGGTCGG  CTACGCATCG  TTGCCTTGGT  GAGCCATTAC  250
CTCACCAACT  AGCTAATGCG  CCGCGGGTCC  ATCTGTAAGT  GGTAGCCGAA  300
GCCACCTTTT  ATGTTTGAAC  CATGCGGTTC  AAACAACCAT  CCGGTATTAG  350
CCCCGGTTTC  CCGGAGTTAT  CCCAGTCTTA  CAGGCAGGTT  ACCCACGTGT  400
TACTCACCCG  TCCGCCGCTA  ACATCAGGGA  GCAAGCTCCC  ATCTGTCCGC  450
TCGACTTGCA  TGTATTAGGC  ACGCCGCCAG  CGTTCGTCCT  GAGCCAGGAT  500
CCAAACTCAA  TCAA                                          514
```


Phân lập vi khuẩn *Bacillus sp.* từ bùn đáy nuôi tôm hùm trên môi trường TSA
Cấy chuyền và lưu trữ vi khuẩn
Định danh vi khuẩn
Kiểm tra khả năng chuyển hoá amoniac của vi khuẩn *Bacillus sp.*
Đánh giá khả năng chuyển hoá amoniac của vi khuẩn *Bacillus sp.*
Định danh sinh học phân tử các chủng vi khuẩn *Bacillus sp.*

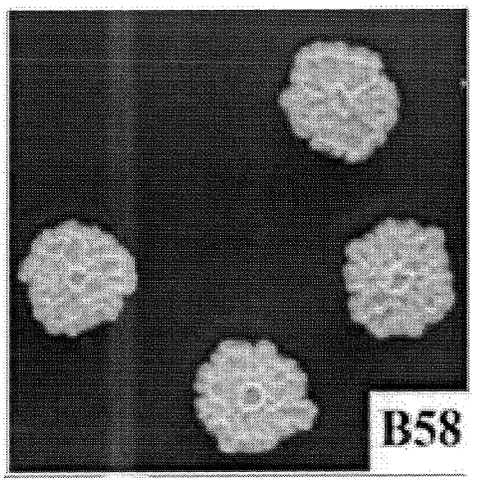
Hình 1



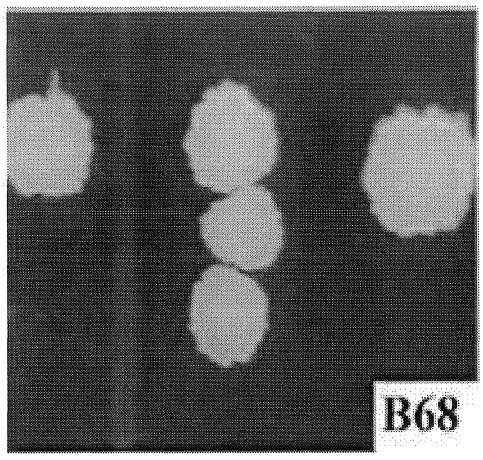
Hình 2.



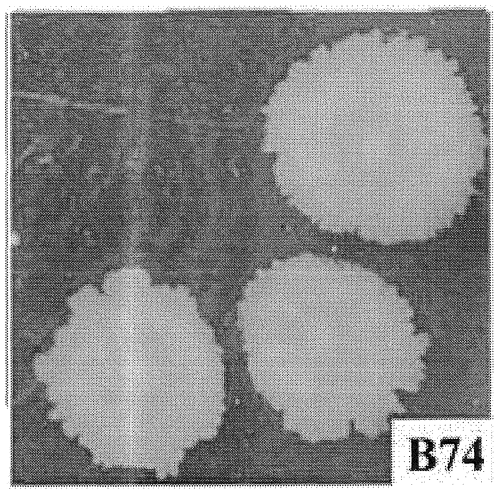
Hình 3



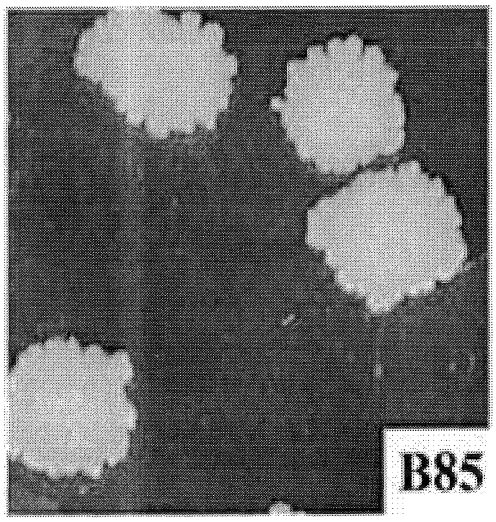
Hình 4.



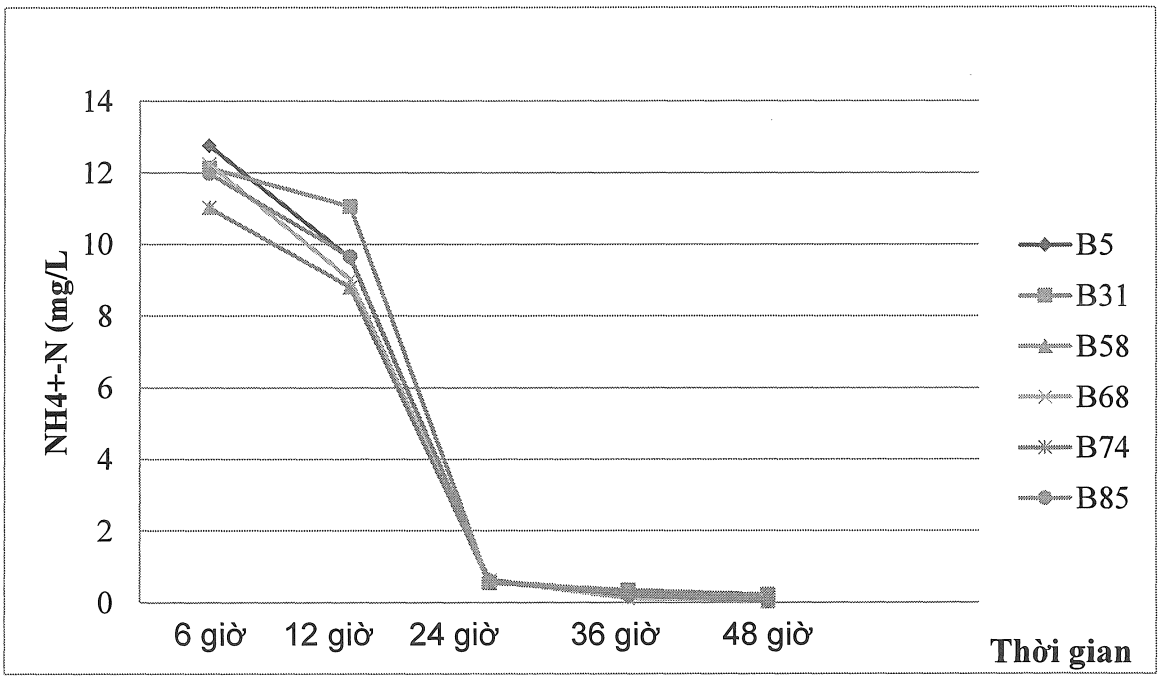
Hình 5



Hình 6



Hình 7



Hình 8.

Hình 9.

Hình 10

Hình 11

Hình 12

Hình 13

Hình 14