



(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)



1-0023947

(51)⁷ C12N 1/20; A01N 63/02; A23K 1/16

(13) B

(21) 1-2013-02619

(22) 31/01/2012

(86) PCT/KR2012/000758 31/01/2012

(87) WO2012/105804 09/08/2012

(30) 10-2011-0009792 31/01/2011 KR

(45) 25/06/2020 387

(43) 25/12/2013 309A

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

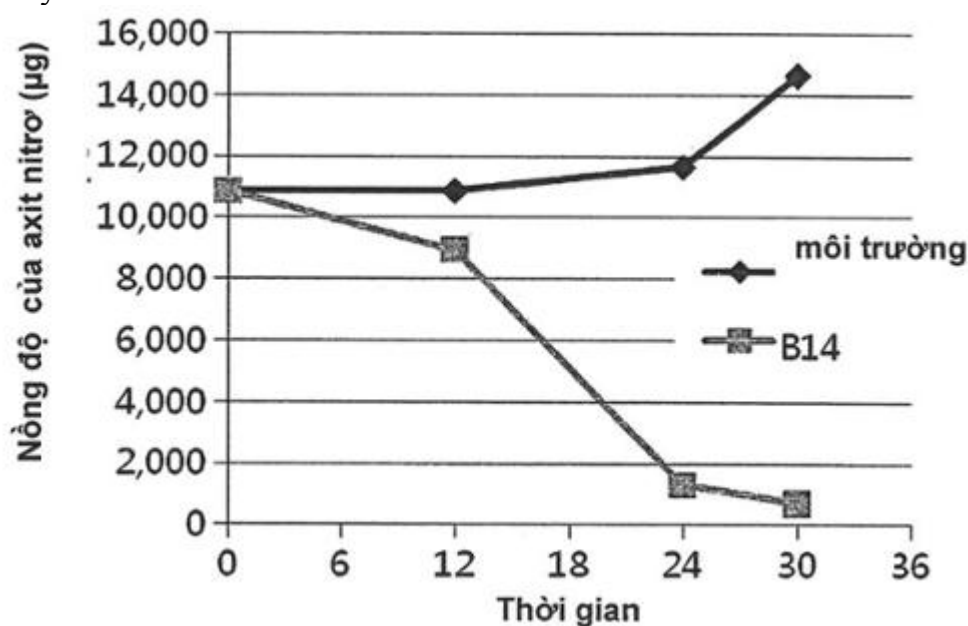
330, Dongho-ro, Ssangnim-dong, Jung-gu, Seoul 100-400, Republic of Korea

(72) YANG, Si Yong (KR); WOO, Seo Hyung (KR); KANG, In Hye (KR); SEO, Hyo Seel (KR)

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

(54) CHỦNG VI KHUẨN BACILLUS SP.CJP-14 VÀ CHẾ PHẨM LỢI KHUẨN CHỨA CHỦNG VI KHUẨN NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến các lợi khuẩn để kiểm soát sinh học chống Saprolegnia sp. và cụ thể, sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn mới được phân lập có thể ức chế sự phát triển của nấm Saprolegnia sp. gây bệnh và tạo ra các thể mang sắt; sáng chế đề cập đến môi trường nuôi cấy thu được bằng cách nuôi cấy chủng vi khuẩn, sản phẩm cô đặc hoặc sản phẩm sấy khô của môi trường này; chế phẩm lợi khuẩn, phụ gia thức ăn, chất kháng vi sinh vật, chất kháng nấm hoặc chất cải thiện chất lượng nước chứa chủng vi khuẩn, môi trường nuôi cấy, sản phẩm cô đặc hoặc sản phẩm sấy khô của môi trường này; và phương pháp nuôi cá hoặc động vật giáp xác, phòng ngừa bệnh nấm thủy mi ở động vật và cải thiện chất lượng nước sử dụng chủng vi khuẩn, môi trường nuôi cấy, sản phẩm cô đặc hoặc sản phẩm sấy khô của môi trường này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các lợi khuẩn (probiotics) để kiểm soát sinh học chống nấm *Saprolegnia* sp. và cụ thể, sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn mới phân lập ức chế sự phát triển của nấm *Saprolegnia* sp. gây bệnh và tạo ra các thể mang sắt (siderophores); sáng chế đề cập đến môi trường nuôi cấy thu được bằng cách nuôi cấy chủng, sản phẩm cô đặc hoặc sản phẩm sấy khô của môi trường này; chế phẩm lợi khuẩn, phụ gia thức ăn, chất kháng vi sinh vật, chất kháng nấm hoặc chất cải thiện chất lượng nước chứa chủng, môi trường nuôi cấy, sản phẩm cô đặc hoặc sản phẩm sấy khô của môi trường này; phương pháp nuôi cá hoặc động vật giáp xác sử dụng chủng, môi trường nuôi cấy, sản phẩm cô đặc hoặc sản phẩm sấy khô của môi trường này; phương pháp phòng ngừa bệnh nấm thủy mi ở động vật bằng cách bổ sung chủng, môi trường nuôi cấy, sản phẩm cô đặc hoặc sản phẩm sấy khô của môi trường này; và phương pháp cải thiện chất lượng nước nhờ xử lý bằng chủng, môi trường nuôi cấy, sản phẩm cô đặc hoặc sản phẩm sấy khô của môi trường này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Ở những khu vực phát triển như Hoa Kỳ, châu Âu và Nhật Bản chẳng hạn, người ta chú ý nhiều đến việc cải thiện đời sống ăn uống để phòng ngừa bệnh tật ở người trưởng thành, vì dân số và tiêu chuẩn sống của người dân trên toàn thế giới ngày càng tăng cao. Do đó, nhu cầu về các sản phẩm từ cá tiếp tục gia tăng, dẫn đến sự phát triển nhanh chóng về sản xuất nuôi trồng thủy sản. Công nghiệp nuôi trồng thủy sản đã trở thành một ngành đóng góp quan trọng đối với nền kinh tế của nhiều nước và sự bùng nổ bệnh tật ở cá nuôi sẽ dẫn đến những tổn thất kinh tế nghiêm trọng (Jose Luis Balcazar et al. Veter.Microbio. 114(2006):173-186; Laurent venrschuere et al. Microbio.Mot. Biol.Rev. Dec. 2000.655-671).

Sự xuất hiện bệnh ở các trang trại nuôi cá là do cá nhiễm bệnh hoặc do các tác nhân gây bệnh lây truyền từ môi trường nước biển gần các trang trại nuôi trồng thủy sản và cũng do nguồn cung cấp thức ăn cho cá bị nhiễm hoặc do các điều kiện mất vệ sinh ở các trang trại nuôi cá. Các bệnh nhiễm trùng ở cá được phân thành nhiễm trùng do nấm, do vi khuẩn và do virus. Trong số này, nhiễm trùng do nấm điển hình do nấm *Saprolegnia sp.* gây ra (xem tài liệu *Diagnosis of Fish Diseases and Treatment Measures*, The Ministry of Maritime Affairs and Fisheries, 2001). Nấm *Saprolegnia sp.* gặp phổ biến trong các hệ sinh thái nước ngọt và là giống nấm chính trong nước gây ra nhiễm trùng nấm nặng nề cho cá nước ngọt. Ở cá, nấm *Saprolegnia sp.* xâm nhập qua các mô biểu bì, thường khởi đầu ở đầu hoặc vây cá và có thể lan ra toàn bộ bề mặt cơ thể cá, dẫn đến xuất hiện những bệnh trầm trọng ở các trang trại nuôi cá. Đã có thông báo là nấm *Saprolegnia sp.* gây ra các nhiễm trùng tiên phát, nhưng trong hầu hết mọi trường hợp, nó xuất hiện ở dạng tác nhân gây bệnh thứ phát, tiếp sau tổn hại tiên phát trên da gây ra bởi các ký sinh trùng như các virus và vi khuẩn chẳng hạn (xem tài liệu *Aquatic fungi and fish production in Egypt, II-in vivo studies*).

Để phòng ngừa các tổn hại do nấm *Saprolegnia sp.* gây ra, các thuốc diệt nấm tổng hợp (ví dụ, xanh malachite, v.v.) đã được sử dụng. Tuy nhiên, các thuốc diệt nấm tổng hợp này không phân hủy sinh học một cách dễ dàng và có xu hướng tồn tại lâu trong môi trường dẫn đến sự thoái biến môi trường, cũng như gây ra các tác động bất lợi nhẹ hoặc nặng, và một số loại nấm đã phát triển tính kháng đối với các hóa chất này. Do đó, việc sử dụng các hóa chất này đã bị hạn chế và đã có nhiều nỗ lực nhằm phát triển các loại hóa chất thay thế cho các hóa chất này (xem tài liệu Ebele M. et al. *African Journal of Biotechnology* Vol.8 (24), 7130-7132, 2009). Trong một nỗ lực như vậy, US 6160023 đã bộc lộ việc sử dụng bronopol để điều trị các bệnh khác nhau do các vi sinh vật thủy sinh gây ra, bao gồm các nhiễm trùng do nấm, nhiễm trùng do động vật nguyên sinh và bệnh do vi khuẩn ở mang cá và phương pháp khử khuẩn các bể và/hoặc trang thiết bị nuôi cá nhờ sử dụng bronopol. Tương tự, KR 0782500 đã bộc lộ tác nhân điều trị nhiễm trùng do nấm ở cá, chứa chất chiết từ cây thủy xương bồ

(*acorus calamus*) làm hoạt chất.

Trong khi đó, với nhu cầu nuôi trồng thủy sản thân thiện môi trường đang ngày càng gia tăng, nên hiện nay việc sử dụng lợi khuẩn làm chất tăng cường miễn dịch được chấp thuận rộng rãi. Việc sử dụng lợi khuẩn đã được R. Fuller phổ cập rộng rãi vào năm 1989 và dưới dạng thức ăn bổ sung chứa vi sinh vật sống có tác động hữu ích cho vật chủ qua việc cải thiện cân bằng vi sinh vật đường ruột của vật chủ. Ví dụ, các vi khuẩn như *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium* và *Bacillus*, nấm men như *Saccharomyces* và nấm như *Aspergillus* đã được sử dụng làm các lợi khuẩn. Các lợi khuẩn được công nhận là an toàn (Generally Recognized As Safe - GRAS) và không còn chứa gen gây độc cho người và động vật và cũng không tạo ra các chất gây bệnh. Lợi khuẩn là các vi sinh vật được thừa nhận là có hiệu quả cải thiện năng suất ở vật nuôi. Các lợi khuẩn được đặc trưng bởi khả năng không gây bệnh, tăng sinh dễ dàng *in vitro*, phát triển nhanh trong cơ thể và có tính kháng với axit và mật. Ngoài ra, các lợi khuẩn này phải có hoạt tính không bị ức chế bởi các thành phần của thức ăn, có thể duy trì được tác dụng của chúng ở nhiệt độ trong phòng và có thể dễ dàng được trộn với thức ăn thích hợp.

Các lợi khuẩn có tác dụng cạnh tranh với các vi khuẩn gây bệnh đường ruột để ngăn chặn sự bám chặt của các vi khuẩn này vào biểu mô đường ruột và phục hồi nhanh chóng hệ vi khuẩn chí đường ruột bị thay đổi do hậu quả của việc điều trị bằng kháng sinh. Ngoài ra, các lợi khuẩn phòng ngừa nhiễm trùng do các vi sinh vật gây bệnh và ức chế quá trình tăng sinh của chúng, thúc đẩy sự tăng sinh của hệ vi khuẩn chí đường ruột bằng cách hỗ trợ các điều kiện tối ưu, tạo ra axit lactic hoặc axit axetic cấu thành các axit hữu cơ đường ruột và làm giảm độ pH trong ruột để ngăn chặn sự tăng sinh của các vi khuẩn gây bệnh có hại. Do đó, việc cung cấp lợi khuẩn có nhiều tác dụng nêu trên sẽ duy trì được hệ vi khuẩn chí đường ruột và tăng năng suất ở vật nuôi. Trong nuôi trồng thủy sản, các lợi khuẩn cũng được bổ sung vào thức ăn cho cá hoặc bổ sung vào nước. Gần đây, đã có các nghiên cứu để tăng cường miễn dịch chống lại các tác nhân gây bệnh và cải thiện chất lượng nước nhờ sử dụng lợi khuẩn trong chăn

nuôi cá hoặc tôm (Jiqui Li et al. Aquaculture 291(2009) 35-40). Các lợi khuẩn tiêu biểu được sử dụng để kiểm soát sinh học trong nuôi trồng thủy sản là các vi khuẩn có lợi như *Lactobacillus*, *Enterococcus* và *Bacillus*. *Bacillus* là một vi khuẩn sinh nội bào tử, hình que, ram dương và có hình thể đặc biệt trong số các chủng được sử dụng làm lợi khuẩn. Các chủng vi khuẩn như *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), *Bacillus cereus* (*B. cereus*), *Bacillus coagulans* (*B. coagulans*), *Bacillus clausii* (*B. clausii*), *Bacillus megaterium* (*B. megaterium*) và *Bacillus licheniformis* (*B. licheniformis*) được sử dụng làm lợi khuẩn. *Bacillus* có khả năng chịu nhiệt tốt hơn so với *Lactobacillus* là chủng không tạo ra các nội bào tử. Ngoài ra, *Bacillus* có khả năng sống sót ở độ pH thấp trong hàng rào dạ dày và do đó hầu hết vi khuẩn đưa vào đều tới được ruột non mà không bị biến đổi (Barbosa, T.M. et al. Appl. Environ. Microbiol. 71(2005)968-978; Spinosa, M. R. et al. Res. Microbiol. 151(2000):61-368). Đã được thông báo rằng, *Bacillus* được sử dụng cho người ở dạng thức ăn bổ sung và cho động vật ở dạng thức ăn tăng trưởng, cũng như để thúc đẩy sự phát triển và tăng cường tính kháng bệnh cho cá hoặc tôm trong nuôi trồng thủy sản, cải thiện chất lượng nước và tốc độ phát triển của tôm và giảm bớt các phẩy khuẩn gây bệnh (Dalmin, G. et al. Indian J. Exp. Biol 39(2001) 939-942; Wang, Y.B. et al. Fish. Sci. 71(2005) 1034-1039).

Trong khi đó, thể mang sắt là một loại kháng sinh được tạo ra bởi các vi sinh vật, bao gồm cả các vi khuẩn gây bệnh, khi chúng cạnh tranh với các vi sinh vật khác để phát triển nhanh và tăng sinh trong một môi trường nhất định. Các thể mang sắt liên kết với các ion sắt (Fe^{3+}) và sau đó được vận chuyển vào trong tế bào thông qua hệ vận chuyển sắt ái tính cao, các ion sắt (Fe^{3+}) này hỗ trợ cho sự phát triển của vi sinh vật. Vi sinh vật tạo ra thể mang sắt do có cạnh tranh về các ion sắt (Fe^{3+}), lượng thể mang sắt cao sẽ ức chế sự phát triển của các vi sinh vật khác. Về khía cạnh này, các vi khuẩn tạo ra thể mang sắt đã được nghiên cứu một cách tích cực để sử dụng làm chất kiểm soát sinh học tiềm năng. Năm 1970, khi có thông báo rằng đất ức chế ở các vùng nông nghiệp là do các hoạt động đối kháng của các vi sinh vật trong đất, sự cạnh tranh của các thể

mang sắt đặc hiệu do *Pseudomonas* sp. sản xuất ra đã được nghiên cứu làm phương pháp kiểm soát sinh học để ức chế sự phát triển của các tác nhân gây bệnh trên thực vật (Sang-Min Woo and Sang-Dal Kim, Kor. J. Microbiol. Biotechnol. Vol.36(4):326-335(2008)). Cho tới nay, đã được thông báo rằng, thể mang sắt là một chất chuyển hóa hòa tan được trong nước có phân tử lượng thấp tương đương 1kDa hoặc thấp hơn và có ái tính cao đối với các ion sắt. Các thể mang sắt được phân chia thành loại catechol và loại hydroxamat theo các nhóm chức liên kết với ion sắt, các thể mang sắt và các lợi khuẩn tạo ra sắt đã được nghiên cứu một cách tích cực. Một trong các nghiên cứu đó, US 6746672 đã bộc lộ phương pháp ức chế sự phát triển của *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) nhờ sử dụng các thể mang sắt được tạo ra bởi bifidobacteria. KR 037043 đã bộc lộ chủng vi khuẩn đối kháng mới của *Pseudomonas fluorescens* LS20 tạo ra thể mang sắt, phương pháp ức chế sự phát triển của *Rhizobacterium*, *Fusarium solani* gây bệnh trên thực vật nhờ sử dụng *Pseudomonas fluorescens* LS20 và phương pháp điều trị bệnh gây ra bởi các nấm gây bệnh trên thực vật nhờ sử dụng các thể mang sắt. KR 0747700 đã bộc lộ về *Bacillus subtilis* tạo ra thể mang sắt và chế phẩm kiểm soát *Phytophthora capsici* hoặc *Fusarium oxysporum* chứa các thể mang sắt được tạo ra theo cách đó làm hoạt chất.

Hầu hết các patent liên quan đều chỉ đề cập đến việc sử dụng các vi sinh vật tạo ra thể mang sắt để kiểm soát sinh học đối với các vi khuẩn hoặc nấm gây bệnh trên thực vật, và chưa có thông báo nào về trực khuẩn có lợi được sử dụng để ức chế các vi khuẩn gây bệnh cho cá.

Các tác giả sáng chế đã phân lập được các lợi khuẩn từ nguồn tự nhiên, trong đó các lợi khuẩn này có hoạt tính kháng vi sinh vật cao chống lại các vi khuẩn gây bệnh trong chăn nuôi cá, tôm và có khả năng sản xuất ra các enzym phân cắt hiệu quả, và các tác giả sáng chế đã tiến hành khảo sát kiểm tra các đặc tính hình thể, sinh hóa và di truyền của chúng. Kết quả, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng, lợi khuẩn này là loài *Bacillus* có tính chịu nhiệt tốt, có năng suất cao trong việc tạo ra thể mang sắt và ức chế nấm nước *Saprolegnia* sp.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng, vi khuẩn *Bacillus* sp. mới được phân lập có thể ức chế sự phát triển của nấm nước *Saprolegnia* sp., có năng suất cao trong việc tạo ra thể mang sắt để cạnh tranh với các vi khuẩn gây bệnh về sự thu nạp sắt và do đó có thể được sử dụng làm chế phẩm lợi khuẩn trong chăn nuôi cá và động vật giáp xác, bằng cách đó đã hoàn thành sáng chế.

Giải pháp kỹ thuật

Mục đích của sáng chế là đề cập đến chủng vi khuẩn mới được phân lập, chủng này ức chế sự phát triển của nấm *Saprolegnia* sp. và tạo ra các thể mang sắt.

Mục đích khác của sáng chế đề cập đến môi trường nuôi cấy thu được bằng cách nuôi cấy chủng vi khuẩn, sản phẩm cô đặc hoặc sản phẩm sấy khô của môi trường này.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề cập đến chế phẩm lợi khuẩn chứa chủng vi khuẩn, môi trường nuôi cấy, sản phẩm cô đặc hoặc sản phẩm sấy khô của môi trường này.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề cập đến phụ gia thức ăn chứa chủng vi khuẩn, môi trường nuôi cấy, sản phẩm cô đặc hoặc sản phẩm sấy khô của môi trường này.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề cập đến phương pháp nuôi cá hoặc động vật giáp xác sử dụng chủng vi khuẩn, môi trường nuôi cấy, sản phẩm cô đặc hoặc sản phẩm sấy khô của môi trường này.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề cập đến chất kháng vi sinh vật hoặc chất kháng nấm chứa chủng vi khuẩn, môi trường nuôi cấy, sản phẩm cô đặc hoặc sản phẩm sấy khô của môi trường này.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề cập đến phương pháp phòng ngừa bệnh nấm thủy mi bằng cách bổ sung chủng vi khuẩn, môi trường nuôi cấy, sản

phẩm cô đặc hoặc sản phẩm sấy khô của môi trường này.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề cập đến chất cải thiện chất lượng nước chứa chủng vi khuẩn, môi trường nuôi cấy, sản phẩm cô đặc hoặc sản phẩm sấy khô của môi trường này.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề cập đến phương pháp cải thiện chất lượng nước nhờ xử lý bằng chủng vi khuẩn, môi trường nuôi cấy, sản phẩm cô đặc hoặc sản phẩm sấy khô của môi trường này.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Vi khuẩn *Bacillus* sp. CJP-14 mới được phân lập theo sáng chế thể hiện tác dụng kháng nấm hữu hiệu đối với nấm nước *Saprolegnia* sp. và cũng tạo ra các thể mang sắt. Do đó, vi khuẩn này có thể được ứng dụng rộng rãi trong nhiều sản phẩm có khả năng kiểm soát nhiễm trùng do nấm khác nhau bao gồm nhiễm trùng do nấm *Saprolegnia* sp. và nhiễm trùng do vi khuẩn, như các phụ gia thức ăn trong nuôi trồng thủy sản, các chế phẩm lợi khuẩn và các chất cải thiện chất lượng nước.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các mục đích nêu trên và các mục đích khác, các dấu hiệu và thuận lợi khác của sáng chế sẽ được hiểu một cách rõ ràng hơn thông qua phần mô tả chi tiết sau đây kết hợp với các hình vẽ kèm theo, trong đó:

FIG. 1 là ảnh thể hiện vi khuẩn *Bacillus* sp. CJP-14 theo sáng chế ức chế sự phát triển của nấm nước *Saprolegnia* sp.;

FIG. 2 là ảnh thể hiện hoạt tính kháng vi sinh vật thông qua sự hình thành thể mang sắt của vi khuẩn *Bacillus* sp. CJP-14 theo sáng chế trên các tác nhân gây bệnh cho cá, *Vibrio harveyi* (VH1, VH2, VH3), *Vibrio cholerae* (VC), *Vibrio vulnificus* (VV) và *Aeromonas salmonicida* (AS) trong môi trường CAS;

FIG. 3 là ảnh thể hiện sự xuất hiện huyết tán của vi khuẩn *Bacillus* sp. CJP-14 theo sáng chế; và

FIG. 4 là hình vẽ đồ thị thể hiện việc sử dụng axit nitro của vi khuẩn

Bacillus sp. CJP-14 theo sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. CJP-14 mới được phân lập (KCCM11143P). Chủng vi khuẩn này có khả năng tạo ra các thể mang sắt và cũng ức chế sự phát triển của nấm *Saprolegnia* sp.

Cụ thể, các mẫu nguồn gốc từ nước biển được tập hợp ở các trang trại nuôi tôm xung quanh vùng đảo Ganghwa và được nuôi cấy trong môi trường BHI rắn có bổ sung 3% natri clorua. Sau đó, quan sát theo dõi các khuẩn lạc về sự tạo nhóm và tiến hành phân lập các chủng.

Trong số các chủng được phân lập, các chủng thể hiện hoạt tính kháng khuẩn mạnh đối với các vi khuẩn gây bệnh điển hình tấn công cá nuôi, bao gồm các chủng *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio anguillarum*, *Edwardsiella tarda*, *Streptococcus iniae* và *Vibrio haemolyticus* được chọn thông qua sàng lọc lần thứ nhất.

Trong số các chủng sàng lọc lần thứ nhất có hoạt tính kháng khuẩn mạnh, các chủng có hoạt tính enzym phân cắt mạnh như proteaza, xenlulaza, amylaza và lipaza được chọn thông qua sàng lọc lần thứ hai.

Trong số các chủng sàng lọc lần thứ hai, chủng được chọn cuối cùng là *Bacillus* sp. CJP-14 có tác dụng ức chế mạnh đối với nấm *Saprolegnia* sp., đây là nấm gây bệnh ở cá nước ngọt, chủng này có năng suất cao trong việc tạo ra thể mang sắt để thu hút các ion sắt (Fe^{3+}), nhờ đó thể hiện hoạt tính đối kháng cạnh tranh đối với sự phát triển của các vi khuẩn gây bệnh khác.

Vi khuẩn *Bacillus* sp. CJP-14 hình thái dạng que, gram dương và thể hiện 99% mức độ tương đồng so với vi khuẩn *Bacillus* sp. W30 theo kết quả phân tích trình tự bazơ ADN ribosom 16S. Khi so sánh kết quả này với kết quả mà trình tự bazơ ADN ribosom 16S của chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* AH18 tạo ra thể mang sắt đã biết thể hiện 98% mức độ tương đồng so với chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* CICC 10088 (xem: KR 0717700), có thể thấy rằng, chủng vi

khuẩn theo sáng chế là một chủng vi khuẩn mới chưa hề được biết đến. Ngoài ra, chủng vi khuẩn theo sáng chế có khả năng tạo ra thể mang sắt cũng như xenlulaza, proteaza, amylaza và lipaza, trong khi đó chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* AH18 chỉ có khả năng tạo ra xenluloza và auxin ngoài các thể mang sắt ra, chứng tỏ rằng, chủng vi khuẩn theo sáng chế là một chủng vi khuẩn mới chưa hề được biết đến.

Do đó, các tác giả sáng chế đã nộp lưu chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. CJP-14 mới được phân lập tại bộ sưu tập chủng giống gốc Hàn Quốc (Korean Federation of Culture Collection) (tại Korean Culture Center of Microorganisms, 361-221, Yurim B/D 3F, Hongje-1-dong, Seodaemun-gu, Seoul) ngày 14/12/2010 là chủng vi khuẩn “*Bacillus* sp. CJP-14” (KCCM11143P).

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến môi trường nuôi cấy thu được bằng cách nuôi cấy chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. mới được phân lập, sản phẩm cô đặc hoặc sản phẩm sấy khô của môi trường này. Cụ thể, môi trường nuôi cấy theo sáng chế có nghĩa là môi trường trong đó chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. CJP-14 mới được phân lập được nuôi cấy và tốt hơn là môi trường nuôi cấy chứa chủng vi khuẩn này.

Như được sử dụng theo sáng chế, môi trường nuôi cấy có nghĩa là môi trường chứa các chất dinh dưỡng cần thiết để nuôi cấy tế bào động vật, tế bào thực vật hoặc vi khuẩn và môi trường nuôi cấy có nghĩa là môi trường lỏng trong đó chủng được cấy truyền và nuôi cấy trong môi trường đó. Môi trường nuôi cấy có thể là môi trường chứa chủng hoặc phần dịch lọc nuôi cấy được bào chế bằng cách loại bỏ chủng ra khỏi môi trường nuôi cấy trong đó chủng đã được cấy truyền và nuôi cấy ở đó. Sản phẩm cô đặc của môi trường nuôi cấy có nghĩa là các sản phẩm được bào chế bằng cách cô đặc môi trường nuôi cấy và sản phẩm sấy khô của môi trường nuôi cấy có nghĩa là các sản phẩm được bào chế bằng cách loại bỏ nước ra khỏi môi trường nuôi cấy. Phương pháp sấy khô có thể bao gồm phương pháp hong khô không khí, hong khô tự nhiên, sấy phun

và sấy đông lạnh, nhưng không chỉ giới hạn ở các phương pháp này.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến chế phẩm lợi khuẩn chứa hoạt chất là *Bacillus* sp. mới được phân lập hoặc môi trường nuôi cấy nó, sản phẩm cô đặc hoặc sản phẩm sấy khô của môi trường này và chất mang được dụng.

Như được sử dụng theo sáng chế, thuật ngữ “chất mang được dụng” đề cập đến chất mang hoặc chất pha loãng mà không gây ra kích thích đáng kể nào cho sinh vật và không phá hủy hoạt tính sinh học cũng như các đặc tính của hợp chất sử dụng. Để thiết lập hỗn hợp thành chế phẩm lỏng, chất mang được dụng vô trùng và tương thích sinh học có thể được sử dụng như nước muối, nước vô trùng, nước muối đậm, dung dịch albumin truyền, dung dịch dextroza, dung dịch maltodextrin, glyxerol và hỗn hợp của một hoặc nhiều chất mang này. Nếu cần thiết, các chất phụ gia thông thường khác có thể được bổ sung như các chất chống oxy hóa, chất đệm, chất kìm khuẩn và chất tương tự. Ngoài ra, các chất pha loãng, chất phân tán, chất hoạt diện, chất kết dính và chất làm trơn có thể được bổ sung thêm vào hỗn hợp để bào chế thành các chế phẩm tiêm như dung dịch nước, huyền phù và nhũ tương hoặc thành dạng viên tròn, viên nang, dạng hạt hoặc viên nén.

Bacillus sp. mới được phân lập được chứa làm hoạt chất trong các lợi khuẩn theo sáng chế sống trong đường dạ dày - ruột của cá hoặc động vật giáp xác nuôi để ức chế các vi khuẩn gây hại và ức chế sự tăng sinh của các vi khuẩn gây bệnh. Ngoài ra, các enzym phân cắt có lợi được tạo ra bởi chủng vi khuẩn này sẽ tạo điều kiện thuận lợi cho sự hấp thu và tính hữu ích của các chất dinh dưỡng để cải thiện hệ số chuyển đổi thức ăn.

Chế phẩm theo sáng chế chứa từ 5×10^4 đến 5×10^{10} CFU/ml và tốt hơn chứa từ 1×10^6 đến 1×10^9 CFU/ml của *Bacillus* CJP-14.

Tốt hơn nếu chế phẩm theo sáng chế có thể được bào chế thành dạng phân liều theo đường miệng, và ví dụ về dạng phân liều theo đường miệng có thể bao gồm dạng viên nén, viên dẹt, viên ngậm hình thoi, các huyền phù nước hoặc nhũ

hóa, dạng bột hoặc dạng hạt, nhũ tương, viên nang cứng hoặc mềm, sirô hoặc cồn ngọt. Đối với chế phẩm như viên nén và viên nang, chất phụ gia hữu dụng là chất kết dính như lactoza, sacaroza, sorbitol, manitol, tinh bột, amylopectin, xenluloza hoặc gelatin, tá dược như đicanxi phosphat, chất phân hủy như tinh bột ngô hoặc tinh bột khoai lang, chất làm trơn như magie stearat, canxi stearat, natri stearyl fumarat hoặc sáp polyetylen glycol. Đối với viên nang, chất mang lỏng như lipit có thể được sử dụng thêm ngoài các hợp chất nêu trên.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến phụ gia thức ăn chứa chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. mới được phân lập hoặc môi trường nuôi cấy của nó, sản phẩm cô đặc hoặc sản phẩm sấy khô của môi trường này.

Điển hình, tất cả các loài *Bacillus* đều có thể tạo ra nội bào tử có tính chịu nhiệt rất cao. Do đó, *Bacillus* sp. CJP-14 mới được phân lập có thể được bào chế ở dạng phụ gia thức ăn và sau đó được bổ sung vào thức ăn. Theo cách khác, *Bacillus* sp. CJP-14 mới được phân lập có thể được bổ sung trực tiếp trong quá trình bào chế thức ăn. Chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. CJP-14 trong thức ăn theo sáng chế có thể ở dạng lỏng hoặc dạng sấy khô và tốt hơn là ở dạng bột sấy khô. Phương pháp sấy khô có thể bao gồm hong khô không khí, hong khô tự nhiên, sấy khô phun và sấy khô đông lạnh, nhưng không chỉ giới hạn bởi các phương pháp này. Chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. CJP-14 theo sáng chế có thể được trộn vào bột theo tỷ lệ nằm trong khoảng từ 0,05 đến 10% theo trọng lượng và tốt hơn nằm trong khoảng từ 0,1% đến 1% theo trọng lượng, tính theo trọng lượng thức ăn. Ngoài ra, thức ăn trong nuôi trồng thủy sản có thể bao gồm thêm các chất phụ gia thông thường để cải thiện khả năng bảo quản, ngoài chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. CJP-14 theo sáng chế.

Thức ăn chứa chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. CJP-14 theo sáng chế có thể bao gồm các thức ăn gốc thực vật như các loại hạt, quả hạch, các sản phẩm phụ chế biến thức ăn, tảo, chất xơ, dầu, tinh bột, bột xay thô và sản phẩm phụ của các loại hạt và các thức ăn gốc động vật như protein, các chất vô cơ, mỡ, chất khoáng, protein đơn bào, động vật phù du và bột cá, nhưng không chỉ giới hạn ở

các chất này.

Theo sáng chế, chế phẩm lợi khuẩn chứa chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. CJP-14 bao gồm các chất phụ gia để ngăn chặn sự suy giảm chất lượng, như các chất kết dính, chất nhũ hóa và chất bảo quản cũng như bao gồm các chất phụ gia để gia tăng tính hữu dụng, như các axit amin, vitamin, enzym, chất tạo hương, nitơ phi protein, các silicat, chất đệm, dịch chiết và các oligosacarit, nhưng không chỉ giới hạn bởi các chất này. Ngoài ra, chế phẩm lợi khuẩn chứa chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. CJP-14 có thể bao gồm thêm các hỗn hợp thức ăn trộn sẵn, nhưng không chỉ giới hạn bởi các hỗn hợp này.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến phương pháp nuôi cá hoặc động vật giáp xác, bao gồm bước xử lý trang trại nuôi cá hoặc động vật giáp xác nhờ sử dụng chủng vi khuẩn mới được phân lập, môi trường nuôi cấy, sản phẩm cô đặc hoặc sản phẩm sấy khô của môi trường này.

Như đã mô tả ở trên, chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. CJP-14 mới được phân lập theo sáng chế có phạm vi hoạt tính kháng vi sinh vật rộng và cũng có hoạt tính đối kháng cạnh tranh để ức chế sự phát triển của các vi khuẩn gây bệnh khác. Do đó, chủng vi khuẩn được sử dụng để phòng ngừa bệnh gây ra bởi các vi khuẩn gây bệnh thông thường trong nuôi trồng thủy sản, nhờ đó có thể nuôi cá hoặc động vật giáp xác một cách an toàn.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến chất kháng vi sinh vật hoặc chất kháng nấm chứa chủng vi khuẩn mới được phân lập, môi trường nuôi cấy, sản phẩm cô đặc hoặc sản phẩm sấy khô của môi trường này.

Như được sử dụng theo sáng chế, thuật ngữ “phòng ngừa” được dự định bao gồm tất cả các hoạt động để ngăn chặn hoặc làm chậm sự tiến triển của bệnh trong quá trình sử dụng chế phẩm.

Chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. CJP-14 mới được phân lập theo sáng chế có hoạt tính kháng vi sinh vật chống lại 6 loại vi khuẩn gây bệnh mô tả ở trên trong nuôi trồng thủy sản và tạo ra các thể mang sắt thể hiện khả năng chiếm giữ sắt hiệu quả. Do đó, chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. CJP-14 mới được phân lập theo

sáng chế có hoạt tính đối kháng cạnh tranh để ức chế sự phát triển của các vi khuẩn gây bệnh khác. Ngoài ra, khẳng định rằng, *Bacillus* sp. CJP-14 mới được phân lập có khả năng ức chế sự phát triển của nấm nước *Saprolegnia* sp. gây bệnh. Do đó, *Bacillus* sp. mới được phân lập được sử dụng để phòng ngừa bệnh gây ra bởi các vi khuẩn gây bệnh mô tả ở trên trong nuôi trồng thủy sản.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến chất cải thiện chất lượng nước chứa *Bacillus* sp. mới được phân lập, môi trường nuôi cấy, sản phẩm cô đặc hoặc sản phẩm sấy khô của môi trường này.

Chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. CJP-14 mới được phân lập theo sáng chế có thể được sử dụng để làm giảm hàm lượng axit nitơ có mặt trong môi trường nuôi trồng thủy sản.

Để cải thiện chất lượng nước, *Bacillus* sp. CJP-14 mới được phân lập theo sáng chế có thể được bào chế riêng biệt ở dạng chất cải thiện chất lượng nước hoặc *Bacillus* sp. CJP-14 mới được phân lập, môi trường nuôi cấy, sản phẩm cô đặc hoặc sản phẩm sấy khô của môi trường này có thể được phun trực tiếp. Chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. CJP-14 trong chất cải thiện chất lượng nước theo sáng chế có thể ở dạng lỏng hoặc dạng sấy khô và tốt hơn là ở dạng bột sấy khô.

Đối với chất cải thiện chất lượng nước, chất mang vô trùng và tương thích sinh học có thể được sử dụng như nước muối, nước vô trùng, nước muối đậm, dung dịch albumin truyền, dung dịch dextroza, dung dịch maltodextrin, glyxerol và các hỗn hợp của một hoặc nhiều chất mang này. Nếu cần thiết, các chất phụ gia thông thường khác có thể được bổ sung như các chất chống oxy hóa, chất đệm, chất kìm khuẩn và chất tương tự. Ngoài ra, các chất pha loãng, chất phân tán, chất hoạt diện, chất kết dính và chất làm trơn có thể được bổ sung thêm vào hỗn hợp để bào chế các chế phẩm tiêm như các dung dịch nước, huyền phù và nhũ tương hoặc dạng viên tròn, viên nang, dạng hạt hoặc viên nén.

Nếu sử dụng chất cải thiện chất lượng nước, thì chất lượng nước của trang trại nuôi trồng thủy sản có thể được cải thiện. Cụ thể, chất cải thiện chất lượng nước có thể được bổ sung vào trang trại nuôi trồng thủy sản trước hoặc trong khi

nuôi trồng thủy sản. Tốt hơn nếu chất này được bổ sung vào trang trại nuôi trồng thủy sản trước khi nuôi trồng thủy sản và được giữ lại trong một thời gian xác định trước. Do đó, *Bacillus* sp. CJP-14 mới được phân lập theo sáng chế tạo ra đầy đủ các thể mang sắt thể hiện khả năng chiếm giữ sắt hiệu quả và do đó ức chế sự phát triển của các vi khuẩn gây bệnh khác và nấm *Saprolegnia* sp. Ngoài ra, chất cải thiện chất lượng nước được bổ sung một hoặc nhiều lần trong khi nuôi trồng thủy sản để ngăn chặn sự phát triển thêm *Saprolegnia* sp.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện chất lượng nước, phương pháp này bao gồm bước xử lý nước bằng *Bacillus* sp. mới được phân lập, môi trường nuôi cấy, sản phẩm cô đặc hoặc sản phẩm sấy khô của môi trường này. Nước đã cải thiện có thể được sử dụng trong trang trại nuôi trồng thủy sản và cũng có thể được sử dụng làm nước uống cho vật nuôi hoặc con người. Về khía cạnh này, nước xử lý bằng *Bacillus* sp. mới được phân lập, môi trường nuôi cấy, sản phẩm cô đặc hoặc sản phẩm sấy khô của môi trường này tốt hơn là được tinh chế trước khi sử dụng và bước tinh chế nước được thực hiện theo phương pháp đã biết.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế có thể được hiểu rõ hơn thông qua các ví dụ dưới đây, các ví dụ này được đưa ra để minh họa làm rõ bản chất chứ không nhằm giới hạn phạm vi yêu cầu bảo hộ của sáng chế.

Ví dụ 1: Phân lập *Bacillus* sp. CJP-14

Ví dụ 1-1: Tiếp nhận mẫu và phân lập chủng

Xét thấy rằng, đặc điểm của lợi khuẩn là có tính đặc hiệu cao với môi trường và vật chủ, các tác giả sáng chế đã tập hợp các mẫu nguồn gốc từ nước biển ở các trang trại nuôi tôm mà ít xuất hiện các loại bệnh tại trang trại và có năng suất cao. Mẫu tập hợp được pha loãng hàng loạt và được trải lên thạch BHI (Difco, USA) có bổ sung 3% natri clorua, tiếp theo bằng cách nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 24 giờ. Việc chia nhóm các chủng phân lập từ mỗi một mẫu được tiến hành bằng cách quan sát khuẩn lạc và các chủng được lựa chọn.

Các khuẩn lạc lựa chọn được nuôi cấy trong môi trường mới 3 lần để phân lập. Các chủng phân lập được lưu giữ trong môi trường chứa 20% glyxerol ở nhiệt độ -70°C hoặc thấp hơn.

Ví dụ 1-2: Lựa chọn các chủng có hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm cao

Để lựa chọn lần thứ nhất các chủng có hoạt tính kháng vi sinh vật chống lại các vi khuẩn gây bệnh điển hình trong nuôi trồng thủy sản, thử nghiệm về hoạt tính kháng vi sinh vật chống lại 6 loại vi khuẩn bao gồm *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio anguillarum*, *Edwardsiella tarda* và *Vibrio haemolyticus* được tiến hành.

Hoạt tính kháng vi sinh vật chống lại các vi khuẩn gây bệnh được đánh giá thông qua phân tích vùng sáng. Trộn 3ml thạch 0,7% (trọng lượng/thể tích) và từng 150µl môi trường nuôi cấy đang khuấy của 6 loại vi khuẩn gây bệnh (OD₆₀₀=2,0) được trộn kết hợp và phủ lên môi trường BHI để bào chế thạch mềm. 10µl môi trường nuôi cấy chủng đã lựa chọn được nhỏ giọt lên thạch mềm đã bào chế và tiến hành nuôi cấy trong thời gian 18 giờ ở nhiệt độ 30°C. Sau đó, tiến hành quan sát sự xuất hiện vùng sáng xung quanh các chủng được nhỏ vào. Trong số 53 loại chủng lựa chọn, thì 20 chủng thể hiện hoạt tính kháng vi sinh vật chống lại một loại bất kỳ trong số 6 loại vi khuẩn gây bệnh trong nuôi trồng thủy sản được sàng lọc lần thứ nhất (Bảng 1).

Bảng 1. Hoạt tính kháng vi sinh vật của các chủng lựa chọn lần thứ nhất

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
AS	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
SI	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
ET	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
VH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
VA	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
AS	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-
SI	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
ET	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VH	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

VP	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
VA	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53		
AS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+		
SI	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+		
ET	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
VH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-		
VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-		
VA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

-: không có hoạt tính, +; có hoạt tính

AS: *Aeromonas salmonicida*;

SI: *Streptococcus iniae*;

ET: *Edwardsiella tarda*;

VH: *Vibrio harveyi*;

VP: *Vibrio hemolyticus*;

VA: *Vibrio anguillarum*.

Ví dụ 1-3: Lựa chọn các chủng có hoạt tính enzym cao

Ví dụ 1-3-1: Thu thập dịch chiết enzym thô

Để lựa chọn các chủng có hoạt tính enzym phân cắt phức hợp, 20 loại chủng có hoạt tính kháng vi sinh vật được nuôi cấy trong môi trường BHI trong thời gian lần lượt 8, 24 và 48 giờ và môi trường nuôi cấy các chủng này được tập hợp, tiếp theo bằng cách ly tâm ở nhiệt độ 4°C và tốc độ 13.000 vòng/phút trong thời gian 5 phút. Dịch nuôi cấy bề mặt cuối cùng được sử dụng làm dịch chiết enzym thô để phân tích hoạt tính enzym và môi trường chứa từng chất nền của các enzym dưới đây được sử dụng để xác định sự thoái biến chất nền.

Ví dụ 1-3-2: Hoạt tính proteaza

Bào chế môi trường YM (Difco, USA) có bổ sung 2% sữa gầy (Sigma, USA) làm chất nền. Bổ sung 3μl dịch chiết enzym thô đã tập hợp vào từng môi trường chất nền và sau đó tiến hành phản ứng ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 2 giờ. Hoạt tính enzym được xác định thông qua sự xuất hiện vùng sáng ở xung quanh dịch chiết enzym thô, vùng này được hình thành do sự thoái biến chất

nền.

Ví dụ 1-3-3: Hoạt tính xenlulaza

Bào chế môi trường YM có bổ sung 1% CMC (cacboxyl metyl xenluloza) làm chất nền. Bổ sung 3 μ l dịch chiết enzym thô đã tập hợp vào từng môi trường chất nền và sau đó tiến hành phản ứng ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 2 giờ, tiếp theo bằng cách nhuộm màu bằng dung dịch thuốc nhuộm đỏ công gô 0,2% trong thời gian 30 phút và khử màu bằng dung dịch nước NaCl 1M. Hoạt tính enzym được xác định thông qua sự xuất hiện vùng sáng ở xung quanh dịch chiết enzym thô, vùng này được hình thành do sự thoái biến chất nền.

Ví dụ 1-3-4: Hoạt tính amylaza

Bào chế môi trường YM có bổ sung 1% tinh bột hòa tan làm chất nền. Bổ sung 3 μ l dịch chiết enzym thô đã tập hợp vào từng môi trường chất nền và sau đó tiến hành phản ứng ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 2 giờ, tiếp theo bằng cách nhuộm màu bằng dung dịch nước chứa 0,1% I₂ và 2% KI. Hoạt tính enzym được xác định thông qua sự xuất hiện vùng sáng ở xung quanh dịch chiết enzym thô, vùng này được hình thành do sự thoái biến chất nền.

Ví dụ 1-3-5: Hoạt tính lipaza

Bào chế môi trường YM có bổ sung 1% tricaptylin làm chất nền. Bổ sung 3 μ l dịch chiết enzym thô đã tập hợp vào từng môi trường chất nền và sau đó tiến hành phản ứng ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 2 giờ. Sau đó, hoạt tính enzym được xác định thông qua sự xuất hiện vùng sáng ở xung quanh dịch chiết enzym thô, vùng này được hình thành do sự thoái biến chất nền.

Trong số 20 loại chủng có hoạt tính kháng vi sinh vật, thì 6 chủng tạo ra 4 loại enzym phân cắt bao gồm proteaza, xenlulaza, amylaza và lipaza được chọn như được thể hiện trong Bảng 2 sau:

Bảng 2. Khả năng sản xuất enzym phân cắt của các chủng được sàng lọc lần thứ hai

Enzym	Proteaza		Amylaza		Xenlulaza		Lipaza	
Thời gian nuôi cấy	8 giờ	24 giờ	8 giờ	24 giờ	8 giờ	24 giờ	8 giờ	24 giờ
11	+++	+++	+	++	+++	++	-	-
12	+++	++	+++	++	+++	++	-	+
14	++	+	+	++	+++	+++	-	+++
23	+++	++	+	++	+++	++	-	-
26	++	+++	+	+++	+++	+++	-	+++
52	+++	++	+	+	+++	+++	-	++

-: không có hoạt tính, +; có hoạt tính, ++: hoạt tính mạnh, +++: hoạt tính rất mạnh

Ví dụ 2: Thử nghiệm *in vitro* về tác dụng ức chế đối với nấm gây bệnh ở cá nước ngọt

Tác dụng ức chế đối với nấm *Saprolegnia sp.* gây bệnh ở cá nước ngọt được khảo sát *in vitro* sử dụng 4 chủng đại diện có hoạt tính kháng vi khuẩn và kháng nấm mạnh và có khả năng tạo ra enzym phức hợp.

Nấm *Saprolegnia sp.* được nuôi cấy theo cách nuôi cấy tĩnh trên môi trường rắn PDA (Difco, USA) ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 72 giờ. Nấm *Saprolegnia sp.* nuôi cấy trên môi trường rắn được cắt thành kích cỡ 5mm x 5mm (dài x rộng) và được cấy truyền vào giữa môi trường rắn PDA mới và được nuôi cấy trong thời gian 24 giờ. Cấy 20µl của mỗi chủng trong số 4 chủng đại diện lên các đĩa bằng giấy vô khuẩn và sau đó, được cấy truyền lên môi trường rắn có nấm *Saprolegnia sp.* được nuôi cấy trong đó, tiếp theo bằng cách nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 48 giờ. Như được thể hiện trong Bảng 3, sự xuất hiện vùng sáng xung quanh 4 chủng đại diện được quan sát thấy (FIG. 1).

Bảng 3. Các tác dụng ức chế đối với sự phát triển của nấm *Saprolegnia* sp.

Chủng đại diện	Sự xuất hiện vòng sáng
CJP11	++
CJP12	+
CJP14	+++
CJP26	+++

-: không có hoạt tính, +; có hoạt tính, ++: hoạt tính mạnh, +++: hoạt tính rất mạnh

Để đánh giá các tác dụng ức chế đối với nấm *Saprolegnia* sp. trong môi trường lỏng, 4 chủng đại diện được nuôi cấy trong môi trường BHI ở nhiệt độ 37°C, 200 vòng/phút trong thời gian 8 giờ. Từng môi trường nuôi cấy được pha loãng hàng loạt ở mật độ 10^8 CFU, 10^7 CFU, 10^6 CFU, 10^5 CFU và 10^4 CFU và được bổ sung vào từng giếng của các đĩa 24 giếng (Falcon, USA) và nấm *Saprolegnia* sp. được bổ sung vào đó với mật độ 102 tới thể tích cuối cùng 1ml. Bổ sung 0,5ml môi trường lỏng PDB (Difco, USA) chứa 0,5g/L pepton và 20g/L dịch chiết nấm men vào đó, tiếp theo bằng cách nuôi cấy ở nhiệt độ 25°C trong thời gian 48 giờ. Sự ức chế hoạt tính nấm được đánh giá thông qua sự rắn hóa và 2 chủng đại diện ức chế sự phát triển của nấm *Saprolegnia* sp. được thể hiện trong Bảng 4 dưới đây.

Bảng 4. Tác dụng ức chế của 2 chủng đại diện đối với sự phát triển của nấm *Saprolegnia* sp.

Chủng thử nghiệm	10^8	10^7	10^6	10^5	10^4
CJP14	+++	+++	++	-	-
CJP26	+++	+	+	-	-

+, Dương tính; -, Âm tính

Ví dụ 3: Lựa chọn các chủng có năng suất cao trong việc tạo ra thể mang sắt

Để khảo sát khả năng tạo ra thể mang sắt của 4 chủng đại diện có các hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm mạnh và có khả năng tạo enzym phức hợp, thử nghiệm CAS được tiến hành. Môi trường CAS được bào chế như sau.

Bảng 5. Thành phần của môi trường CAS để đánh giá khả năng tạo ra thể mang sắt

Dung dịch Fe (1mM FeCl ₃ .6H ₂ O trong 10mM HCl)	1,5
Dung dịch CAS (0,121g CAS trong 100ml nước cất)	7,5
HDTMA (0,0219g HDTMA trong 50ml nước cất)	50
Dung dịch đệm piperazin, độ pH = 6,5 (4,307g piperazin trong 30ml nước cất)	30
Nước cất	100 (phần còn lại)

Mỗi chủng trong số 4 chủng đại diện được cấy truyền với 0,1% trong môi trường lỏng BHI và được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C và tốc độ 200 vòng/phút trong thời gian 18 giờ. Ngoài ra, mỗi một trong số các vi khuẩn gây bệnh *Vibrio harveyi*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus* và *Aeromonas salmonicida* được cấy truyền với 0,1% trong môi trường LB có bổ sung 2% natri clorua và được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C, tốc độ 200 vòng/phút trong thời gian 18 giờ. Từng lớp nổi trên bề mặt nuôi cấy được lọc sử dụng dụng cụ lọc kích thước 0,45µm và lớp nổi trên bề mặt nuôi cấy đã lọc được sử dụng để tiến hành thử nghiệm. Một giếng có đường kính 0,5cm được tạo ra trong thạch CAS và từng 50µl lớp nổi trên bề mặt nuôi cấy đã lọc được cấy truyền vào giếng này và tiến hành phản ứng ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 8 giờ. Như được thể hiện trên FIG. 2, một vùng sáng màu da cam xung quanh giếng, vùng này được tạo ra khi sử dụng sắt, được quan sát thấy. Chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. CJP-14 có khả năng tạo ra thể mang sắt mạnh nhất trong số 4 chủng đại diện và 4 loại vi khuẩn gây bệnh nêu trên cuối cùng được lựa chọn (Bảng 6).

Bảng 6. Đánh giá khả năng tạo ra thể mang sắt

Chủng đại diện	Khả năng tạo ra thể mang sắt	Các vi khuẩn gây bệnh ở cá chần nuôi	Khả năng tạo ra thể mang sắt
CJP11	++	<i>Vibrio harveyi</i>	++
CJP12	+	<i>Vibrio cholerae</i>	++
CJP14	+++	<i>Vibrio vulnificus</i>	++
CJP26	++	<i>Aeromonas salmonicida</i>	+

Ví dụ 4: Nhận diện chủng lựa chọn và xác định đặc tính sinh lý và hóa sinh của chủng này

Ví dụ 4-1: Nhận diện chủng

Trong số 4 chủng đại diện, chủng CJP-14 thể hiện tác dụng ức chế mạnh đối với nấm *Saprolegnia* sp. và có năng suất cao trong việc tạo ra thể mang sắt sau cùng được lựa chọn, nhận diện và phân tích. Việc nhận diện chủng được tiến hành bằng các phương pháp sinh lý và hóa sinh cũng như các phương pháp hệ thống hóa phân tử. Chủng được phát hiện có đặc tính hình thể của vi khuẩn hình que, Gram dương. Phân tích trình tự ADN ribosom 16S chứng minh rằng, chủng có 99% mức độ tương đồng với chủng vi khuẩn *Bacillus* sp., biểu thị một vi sinh vật mới. Trình tự bazơ của ADN ribosom 16S của chủng phân lập được nêu trong SEQ ID NO. 1. Phân tích trình tự bazơ được tiến hành bằng cách khuếch đại ADN ribosom 16S bằng cách sử dụng dụng cụ PCR premix (Bioneer, Korea) và các đoạn mồi chung 27F và 492R có trình tự bazơ bên dưới. Thao tác khuếch đại gen được tiến hành với tổng thể tích phản ứng 20μl trong tổng cộng 30 chu kỳ bao gồm các chu kỳ ở nhiệt độ 94°C trong thời gian 1 phút, ở nhiệt độ 56°C trong thời gian 1 phút và ở nhiệt độ 72°C trong thời gian 1 phút để phân tích trình tự bazơ của ADN đã khuếch đại.

27F: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'(SEQ ID NO.2)

92R: 5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3'(SEQ ID NO.3)

Vi sinh vật mới theo sáng chế nhận diện theo phương pháp nêu trên được nộp lưu tại Bộ sưu tập chủng giống gốc Hàn Quốc (Korean Federation of Culture Collection) (tại Korean Culture Center of Microorganisms, 361-221, Yurim B/D 3F, Hongje-1-dong, Seodaemun-gu, Seoul) vào ngày 14/12/2010 là chủng vi khuẩn “*Bacillus* sp. CJP-14” (KCCM11143P).

Ví dụ 4-2: Xác định đặc tính sinh lý và hóa sinh

Để phân tích đặc tính hóa sinh của chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. CJP-14 theo sáng chế, các mô hình lên men đường của chủng được phân tích nhờ sử dụng hệ API 50 CHB (Korean Culture Center of Microorganisms, Korea) (Bảng 7).

Bảng 7. Kết quả của các mô hình lên men đường

Đối chứng	-	Esculin	+
Glyxerol	+	Salixin	+
Erythritol	-	Xenlobioza	+
D-Arabinosa	-	Maltoza	+
L-Arabinosa	+	Lactoza	+
Riboza	+	Melibioza	-
D-Xyloza	+	Sacaroza	+
L-Xyloza	-	Trehaloza	+
Adonitol	-	Inulin	-
β Metyl-xylosit	-	Melezitoza	-
Galactoza	-	D-Rafinoza	+
D-Glucoza	+	Amidon	+
D-Fructoza	+	Glycogen	+
D-Manosa	+	Xylitol	-
L-Sorboza	-	β Gentiobioza	-
Rhamnoza	-	D-Turanoza	-
Dulxitol	-	D-Lyxosa	-
Inositol	+	D-Tagatoza	-
Manitol	+	D-Fucoza	-
Sorbitol	+	L-Fucoza	-
α Metyl-Dmannosit	-	D-Arabitol	-
α Metyl-glucosit	+	L-Arabitol	-
N Axetyl glucosamin	-	Gluconat	-
Amygdalin	+	2 xeto-gluconat	-
Arbutin	+	5 xeto-gluconat	-

+, Dương tính; -, Âm tính

Ví dụ 5: Tính an toàn và việc sử dụng

Ví dụ 5-1: Tan huyết β

Sự tan huyết β là sự phân giải hoàn toàn các tế bào máu đỏ, gây ra do quá trình thủy phân phospholipit bởi các vi khuẩn sinh phospholipaza.

Để khảo sát sự tan huyết của chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. CJP-14, đĩa thạch máu chứa TSA (tryptic soy agar) (Difco, USA) và 5% máu cừu (Kisan Biotech, Korea) được bào chế. Sau khi cấy thành vạch bằng *Bacillus* sp. CJP-14 trên đĩa thạch máu đã bào chế, tiến hành ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 24 giờ để khảo sát sự tan huyết. Như được thể hiện trên FIG. 3, không quan sát thấy có sự tan huyết.

Ví dụ 5-2: Sử dụng axit nitơ

Để khảo sát việc sử dụng axit nitơ của chủng theo sáng chế, môi trường chứa axit nitơ được bào chế như thể hiện trong Bảng 8 dưới đây. 0,1% chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. CJP-14 được cấy truyền trong môi trường đã bào chế và sau đó được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C, tốc độ 200 vòng/phút trong thời gian 6 giờ, 12 giờ và 24 giờ. Mẫu môi trường nuôi cấy được tập hợp tại mỗi một lần nuôi cấy. Các mẫu môi trường nuôi cấy đã tập hợp được ly tâm ở nhiệt độ 4°C, tốc độ 13.000 vòng/phút trong thời gian 5 phút để thu được lớp nổi trên bề mặt và tiến hành xác định hàm lượng axit nitơ ở lớp nổi trên bề mặt thu được để định lượng hàm lượng tiêu thụ.

Bảng 8. Thành phần của môi trường để đánh giá việc sử dụng axit nitơ

Nitrit (NaNO_2)	0,5g/L
Natri phosphat điaxit (Na_2HPO_4)	13,5g/L
Kali Phosphat điaxit (K_2HPO_4)	0,7g/L
Magie sulfat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,1g/L
Canxi clorua (CaCl_2)	0,18g/L
Natri bicacbonat (NaHCO_3)	0,5g/L
Sắt (III) clorua ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0,014g/L
Glucoza (glucoza)	0,5g/L

Nồng độ ban đầu của axit nitơ trong môi trường xấp xỉ là 10mg. Khi chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. CJP-14 phát triển sử dụng axit nitơ, lượng axit nitơ tiêu thụ là xấp xỉ 94% sau khi nuôi cấy trong thời gian 30 giờ (xem trên FIG. 4).

Các kết quả nêu trên chứng tỏ rằng, chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. CJP-14 thể hiện tác dụng ức chế đối với nấm nước *Saprolegnia* sp., thể hiện khả năng tạo ra thể mang sắt và hoạt tính kháng vi sinh vật.

Ví dụ 6: Hiệu quả đối với nấm *Saprolegnia* sp. gây bệnh ở cá nước ngọt

Tiến hành đánh giá hiệu quả của chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. CJP-14 có tác dụng ức chế đối với nấm *Saprolegnia* sp. gây bệnh ở cá nước ngọt *in vitro* và có năng suất cao trong việc tạo ra thể mang sắt. Các tác giả sáng chế tiến hành gây nhiễm bằng nấm *Saprolegnia* sp. cho trứng cá hồi cầu vồng đã thụ tinh với sự có mặt của chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. CJP-14 theo sáng chế và sau đó, kiểm tra tỷ lệ xuất hiện mắt cá (%).

Cụ thể, 500 trứng cá hồi cầu vồng đã thụ tinh được đặt vào trong một cốc mở chứa nước ngọt tinh khiết và sau đó, trứng được ngâm nhúng trong đó cùng với nấm *Saprolegnia* sp. và cùng với từng hàm lượng được trình bày trong Bảng 9 trong thời gian 30 phút, mỗi ngày một lần trong vòng 3 ngày và sau đó, tỷ lệ xuất hiện mắt cá (%) được xác định như sau (Bảng 9). Natri clorua và formalin được sử dụng làm nhóm đối chứng.

Tỷ lệ xuất hiện mắt cá (%) = (số lượng trứng mở mắt / số lượng trứng thụ tinh sử dụng) x 100

Bảng 9. Hiệu quả đối với nấm *Saprolegnia* sp.

Nhóm xử lý	Nồng độ	Số lượng trứng đã thụ tinh	Tỷ lệ xuất hiện mắt (%)
<i>Bacillus</i> sp. CJP14	1×10^9 CFU	300	54,7
<i>Bacillus</i> sp. CJP14	1×10^8 CFU	300	53,2
<i>Bacillus</i> sp. CJP14	1×10^7 CFU	300	40,5
Natri clorua	10 ppm	300	52,3
Formalin (37% dung dịch formaldehyt)	120 ppm	300	19,5
Nhóm đối chứng	-	300	0,5

Như được thể hiện trong Bảng 9, tỷ lệ xuất hiện mắt của nhóm đối chứng là 0,5% và tỷ lệ ở nhóm dùng natri clorua và formalin hiện nay đang được sử dụng

làm chất kháng nấm lần lượt là 52,3% và 19,5%. Xử lý bằng chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. CJP-14 nồng độ 1×10^8 CFU hoặc cao hơn thể hiện hiệu quả mạnh hơn so với natri clorua và dung dịch formalin, cho thấy tác dụng ức chế của *Bacillus* sp. CJP-14 theo sáng chế đối với nấm *Saprolegnia* sp. gây bệnh ở cá nước ngọt.

Ví dụ 7: Hiệu quả của lợi khuẩn

Để kiểm tra xem chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. CJP-14 theo sáng chế trên thực tiễn có thể hiện hoạt tính lợi khuẩn hay không khi được bổ sung vào thức ăn và cá được nuôi dưỡng bằng thức ăn này, chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. CJP-14 theo sáng chế được trộn với thức ăn và cá con được nuôi dưỡng bằng thức ăn trộn này trong thời gian 8 tuần để xác định tỷ lệ tăng trọng, tốc độ phát triển hàng ngày, hệ số chuyển đổi thức ăn, tỷ lệ hiệu quả của protein thức ăn và tỷ lệ sống sót.

Cụ thể, thức ăn cơ bản (nhóm đối chứng) được bào chế để có hàm lượng năng lượng tương đương 30% protein thô, như được thể hiện trong Bảng 10. Vi khuẩn *Bacillus* sp. CJP-14 của chủng vi khuẩn theo sáng chế được bổ sung vào thức ăn cơ bản để tạo ra thức ăn trộn chứa 5% *Bacillus* sp. CJP-14 và lượng xenluloza được giảm theo lượng bổ sung lợi khuẩn về hàm lượng năng lượng tương đương.

Bảng 10. Thành phần thức ăn cơ bản

Nguyên liệu thô	%
Bột cá	36,0
Bã đậu nành	12,0
Bột gluten ngô	8,0
Bột mì	30,4
Dầu gan mực	5,0
Bã đậu nành	5,0
CMC	1,0
Xenluloza	0,5
Hỗn hợp khoáng chất	1,0
Vitamin premix	1,0

Cá bơn con sử dụng trong thử nghiệm này có trọng lượng trung bình ban đầu là 25g và 25 cá được phân ngẫu nhiên vào trong bể PP tròn thể tích 150L. Nước biển lọc cát được sử dụng làm nước nuôi cấy và tốc độ dòng được kiểm soát ở tốc độ từ 2 đến 3L/phút. Bể được bố trí đá bọt để cung cấp oxy và tuần hoàn nước nuôi cấy. Chu kỳ sáng được duy trì trong điều kiện chu kỳ 12 giờ sáng:12 giờ tối (12L:12D) sử dụng đèn huỳnh quang. Nhiệt độ nước nuôi cấy được duy trì trong điều kiện nhiệt độ tự nhiên từ 21 đến 29°C trong toàn bộ giai đoạn thử nghiệm. Cá được cho ăn no 2 lần một ngày. Tốc độ phát triển được xác định cứ mỗi 3 tuần và toàn bộ cá được bỏ đói trong thời gian 24 giờ trước khi đánh giá (xem trong Bảng 11).

Bảng 11. Hiệu quả của lợi khuẩn ở cá bơn

	Nhóm đối chứng	Nhóm thử nghiệm
Trọng lượng trung bình cuối cùng (g)	$50,6 \pm 1,7^a$	$57,4 \pm 3,8^b$
Tỷ lệ tăng trọng (%)	$103,03 \pm 5,6^a$	$130,05 \pm 9,3^b$
Tốc độ phát triển hàng ngày (%)	$1,42 \pm 0,06^a$	$1,67 \pm 0,08^b$
Tỷ lệ sống (%)	$77,3 \pm 15,1^a$	$97,3 \pm 2,3^b$
Hệ số chuyển đổi thức ăn	$15,9 \pm 0,15^a$	$1,16 \pm 0,05^b$
Tỷ lệ hiệu quả của protein thức ăn	$1,10 \pm 0,1^a$	$1,40 \pm 0,0^b$

Như được thể hiện trong Bảng 11, việc bổ sung *Bacillus* sp. CJP 14 làm tăng tốc độ phát triển tới xấp xỉ 13% so với nhóm đối chứng và cũng làm tăng hệ số chuyển đổi thức ăn và tỷ lệ hiệu quả của protein thức ăn so với nhóm đối chứng. Tỷ lệ sống cũng tăng xấp xỉ 25% so với nhóm đối chứng.

Các kết quả này chứng minh rằng, *Bacillus* sp. CJP 14 có khả năng tạo ra enzym phức hợp tạo điều kiện thuận lợi cho tốc độ phân cắt và tốc độ tăng trọng của cá và giảm thiểu bài tiết, dẫn đến cải thiện chất lượng nước.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. CJP-14 (KCCM11143P).
2. Môi trường nuôi cấy chứa chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. CJP-14 (KCCM11143P) theo điểm 1.
3. Môi trường nuôi cấy theo điểm 2, trong đó môi trường nuôi cấy là ở dạng sản phẩm cô đặc hoặc sản phẩm sấy khô.
4. Chế phẩm lợi khuẩn, trong đó chế phẩm này chứa hoạt chất là chủng vi khuẩn theo điểm 1, hoặc môi trường nuôi cấy theo điểm bất kỳ trong số các điểm 2 và 3.
5. Phụ gia thức ăn, trong đó phụ gia này chứa hoạt chất là chủng vi khuẩn theo điểm 1, hoặc môi trường nuôi cấy theo điểm bất kỳ trong số các điểm 2 và 3.
6. Chất kháng vi sinh vật, trong đó chất kháng vi sinh vật này chứa chủng vi khuẩn theo điểm 1, hoặc môi trường nuôi cấy theo điểm bất kỳ trong số các điểm 2 và 3.
7. Chất cải thiện chất lượng nước, trong đó chất cải thiện chất lượng nước này chứa chủng vi khuẩn theo điểm 1, hoặc môi trường nuôi cấy theo điểm bất kỳ trong số các điểm 2 và 3.
8. Chất chống nấm, trong đó chất chống nấm này chứa chủng vi khuẩn theo điểm 1, hoặc môi trường nuôi cấy theo điểm bất kỳ trong số các điểm 2 và 3.

Fig. 1

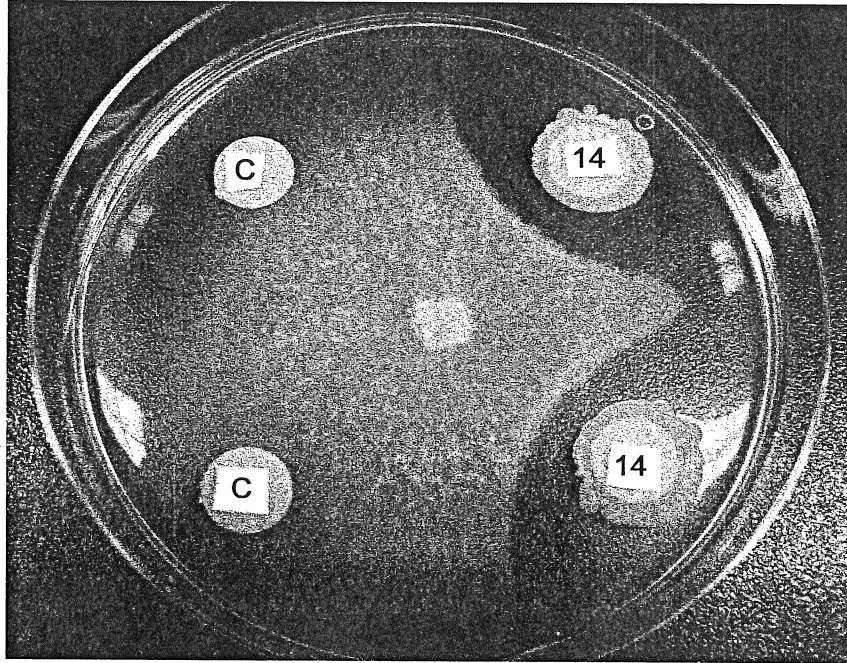


Fig. 2

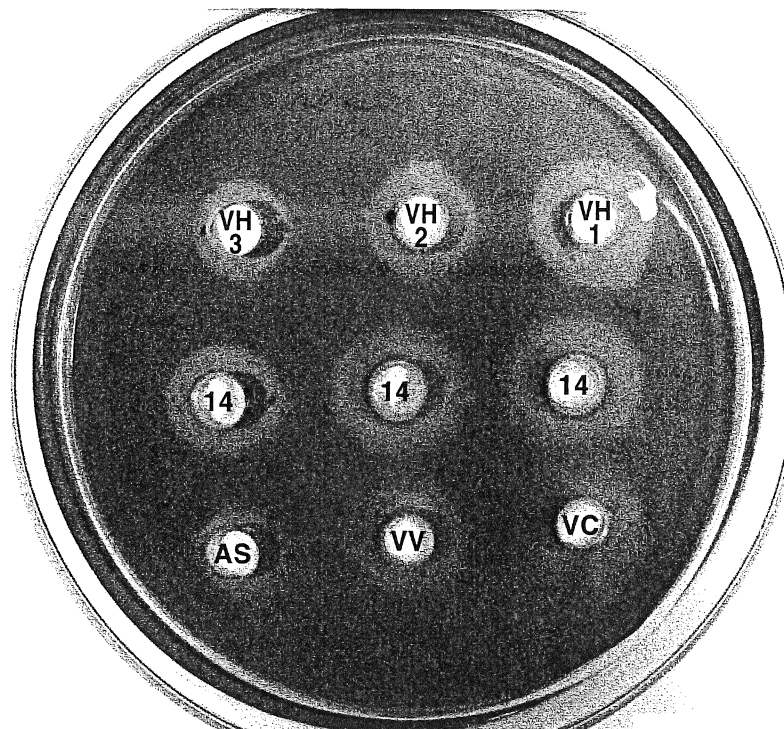


Fig. 3

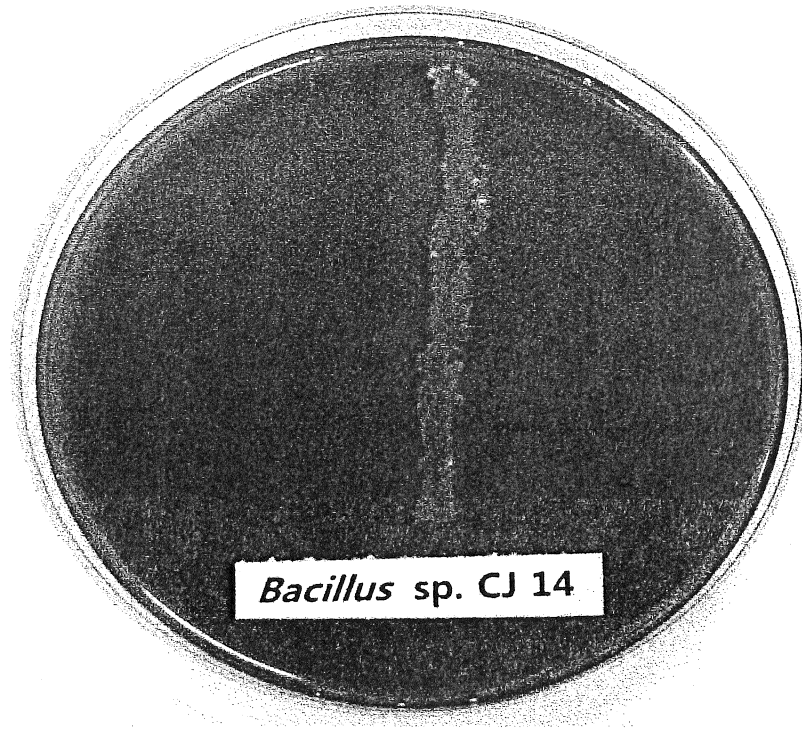


Fig. 4

