



(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)



1-0024487

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

(13) B

(21) 1-2013-02626

(22) 31/01/2012

(86) PCT/KR2012/000763 31/01/2012

(87) WO2012/105805 09/08/2012

(30) 10-2011-0009793 31/01/2011 KR

(45) 27/07/2020 388

(43) 25/12/2013 309A

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

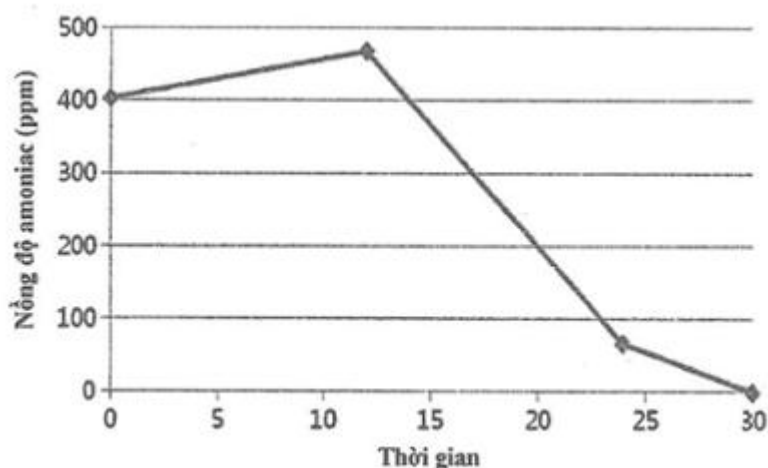
330, Dongho-ro, Ssangnim-dong, Jung-gu, Seoul 100-400, Republic of Korea

(72) YANG, Si Yong (KR); WOO, Seo Hyung (KR); KANG, In Hye (KR); IM, Hyun Jung (KR).

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

(54) CHỦNG VI KHUẨN BACILLUS SP. CJS-26 VÀ CHẾ PHẨM LỢI KHUẨN CHỨA CHỦNG VI KHUẨN NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn Bacillus sp. CJS-26 có thể phân hủy các phân tử tín hiệu thụ cảm mật độ quần thể của vi khuẩn gây bệnh Vibrio sp., và ức chế tạo màng sinh học. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến canh trường, chế phẩm lợi khuẩn, chất phụ gia thực phẩm, chất kháng khuẩn và chất cải thiện chất lượng nước chứa chủng vi khuẩn này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các lợi khuẩn để không chế sinh học đối với *Vibrio* sp., và cụ thể là, đến chủng *Bacillus* mới được phân lập có thể phân hủy các phân tử tín hiệu thụ cảm mật độ quần thể của vi khuẩn gây bệnh *Vibrio* sp., và ức chế tạo màng sinh học; canh trường thu được bằng cách nuôi cấy chủng này, sản phẩm cô đặc của canh trường này hoặc sản phẩm khô của canh trường này; chế phẩm lợi khuẩn, chất phụ gia thực phẩm, chất kháng khuẩn hoặc chất cải thiện chất lượng nước chứa chủng này, canh trường chứa nó, sản phẩm cô đặc của canh trường này hoặc sản phẩm khô của canh trường này; phương pháp nuôi cá hoặc loài giáp xác bằng cách sử dụng chủng này, canh trường chứa nó, sản phẩm cô đặc của canh trường này hoặc sản phẩm khô của canh trường này; phương pháp phân hủy các phân tử tín hiệu thụ cảm mật độ quần thể của *Vibrio harveyi* và ức chế sự tạo màng sinh học bằng cách bổ sung chủng này, canh trường chứa nó, sản phẩm cô đặc của canh trường này hoặc sản phẩm khô của canh trường này vào khu nuôi trồng thủy sản; phương pháp phòng nhiễm khuẩn cho động vật bằng cách bổ sung chủng này, canh trường chứa nó, sản phẩm cô đặc của canh trường này hoặc sản phẩm khô của canh trường này; và phương pháp cải thiện chất lượng nước bằng cách xử lý bằng chủng này, canh trường chứa nó, sản phẩm cô đặc của canh trường này hoặc sản phẩm khô của canh trường này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Ở các nước tiên tiến như Mỹ, châu Âu và Nhật Bản, người ta rất quan tâm đến việc cải thiện chế độ ăn để phòng các bệnh ở người trưởng thành, do dân số thế giới và tiêu chuẩn cuộc sống của con người 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 trong việc sản xuất nuôi trồng thủy sản. Công nghiệp nuôi trồng thủy sản đã trở thành ngành công nghiệp góp phần quan trọng cho nền kinh tế của nhiều quốc gia, và sự bùng phát bệnh ở cá nuôi có thể gây ra thiệt hại kinh tế trầm trọng (Jose Luis Balcazar et al. *Veter.Microbio.* 114(2006):173-186; Laurent venrschuere et al. *Microbio.Mot.*

Biol.Rev. Dec. 2000,655-671).

Vibrio sp., một trong số các mầm bệnh gây nhiễm khuẩn ở các khu nuôi cá và tôm, gây ra vấn đề chính là độc tính, và vấn đề thứ hai là tạo màng sinh học. Nghĩa là, *Vibrio* sp. sản sinh và giải phóng các phân tử tín hiệu có khối lượng phân tử thấp được gọi là các chất tự cảm ứng (hoặc AI (autoinducer)) hoặc pheromon. Việc phát hiện ngưỡng nồng độ kích thích tối thiểu của phân tử tín hiệu sẽ giúp nhận biết mật độ tế bào của các vi khuẩn *Vibrio* xung quanh, dẫn đến thay đổi biểu hiện gen và nhiều hoạt động sinh lý bao gồm cộng sinh, độc lực, tính khả biến, tiếp hợp, sản xuất kháng sinh, di động, hình thành bào tử, và tạo màng sinh học (Miller, M. B. et al. Annu. Rev. Microbiol. 55(2001), 165-199). Như vậy, quá trình giám sát mật độ quần thể của các vi sinh vật và điều hòa biểu hiện gen liên quan được gọi là thụ cảm mật độ quần thể (quorum sensing). Đặc tính thụ cảm mật độ quần thể được tìm thấy ở các vi khuẩn Gram âm và dương. Khi các vi khuẩn đạt đến mật độ quần thể đủ cao, chúng sẽ thay đổi biểu hiện gen gây nhiễm trùng sao cho tạo ra được sự phối hợp của một số lượng lớn các tế bào để gây nhiễm cho vật chủ, và chúng có thể tránh né được các đáp ứng miễn dịch của vật chủ để thiết lập thành công tình trạng nhiễm trùng (Dangl. J. L. et al., Nature. 411(2001) 826-833).

Biểu hiện đặc trưng của thụ cảm mật độ quần thể là tạo màng sinh học. Khi mật độ thấp của các vi sinh vật tạo khuẩn lạc đạt đến mức độ nhất định, việc biểu hiện gen bằng các phân tử tín hiệu thụ cảm mật độ quần thể sẽ tạo ra polysacarit nhầy, dẫn đến tạo thành màng sinh học cấu trúc có liên quan đến 65% các trường hợp nhiễm khuẩn (Kjelleberg, S. et al. Curr Opin Microbiol. 5(3), 2002, 254-258). Màng sinh học tạo thành trên bề mặt vật chủ gây ra các bệnh nhiễm trùng. Cụ thể, ở cá, màng này tạo thuận lợi cho việc cung cấp chất dinh dưỡng và oxy cho vi sinh vật gây bệnh, ngăn cản sự xuyên thấm của thuốc kháng sinh, phong bế hệ thống bảo vệ miễn dịch, và làm giảm tác dụng của các chất tẩy uế và các lợi khuẩn, cũng như gây ra tính kháng kháng sinh (Hall-Stoodley, L. et al., Nat Rev Microbiol. 2(2), 2004, 95-108).

Đã biết chất tự cảm ứng-1 (AI-1) và chất tự cảm ứng-2 (AI-2) là các phân tử tín hiệu hóa học được các vi sinh vật tiết ra ở giai đoạn đầu của quá trình tạo màng sinh học. Chất tự cảm ứng-1 là hợp chất AHL được sản xuất bởi syntaza AHL thuộc

họ LUX-1, và chứa gốc homoserin lacton bất biến và nhóm axyl có chiều dài mạch, mức độ bão hoà, và trạng thái oxy hoá khác nhau, như N-axylhomoserin lacton (AHL) dưới dạng các phân tử tín hiệu trong các vi khuẩn Gram âm. Chất tự cảm ứng-1 còn được báo cáo là chất đặc hiệu chủng được tiết bởi hơn 70 loại vi khuẩn Gram âm, bao gồm *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Yersinia*, *Aeromonas*, *Agrobacterium*, *Serratia*, *Erwinia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Chromobacterium*, và *Rhizobium* sp. (Taga, M.E. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2003)). Ngoài ra, có báo cáo rằng chất tự cảm ứng-2 là hợp chất được sản sinh bởi protein được biểu hiện từ gen luxS, có cấu trúc furanosyl borat dieste và là tín hiệu chung có mặt trong cả vi khuẩn Gram dương và âm (Bassler, B. L. et al. Mol. Microbiol. 9(1993)773-786). Gen luxS có mặt trong *E.coli* cũng như trong các vi khuẩn khác nhau như *salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*), *Hemophilus influenza* (*H. influenzae*), *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), *Borrelia burgdoferi* (*B. burgdoferi*), *Neisseria meningitides* (*N. meningitides*), *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*), *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*), *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*), *Clostridium difficile* (*C. difficile*) và *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*). Cũng có báo cáo rằng gen luxS gây ra sự phát quang ở *Vibrio harveyi*, và ảnh hưởng đến sự biểu hiện gen cần thiết cho độc lực, di động, tạo màng sinh học, và sản xuất kháng sinh (Miller, M. B. et al. Annu. Rev. Microbiol. 55(2001), 165-199).

Trong khi đó, trong trường hợp *Vibrio anguillarum* (*V. anguillarum*), tỷ lệ gây chết ở quần thể cá hồi cầu vồng bị nhiễm vi sinh vật gây bệnh cho cá là từ 80 đến 100%. Tuy nhiên, việc xử lý bằng furanon, một trong số các chất ức chế thụ cảm mật độ quần thể không chế phân tử tín hiệu thụ cảm mật độ quần thể AHL, đã không chế được việc thụ cảm mật độ quần thể, khiến cho tỷ lệ gây chết được giảm xuống còn từ 4% đến 40% (Rasch, M. et al. Syst. Appl. Microbiol. 27(2004), 350-359). Do đó, nhiều nghiên cứu đã tập trung vào các phân tử tín hiệu thụ cảm mật độ quần thể để làm giảm thiệt hại gây ra bởi việc nhiễm vi sinh vật.

Ví dụ, patent Mỹ số 641685 bọc lộ chất kháng khuẩn bao gồm chất cảm quang để quang trị liệu được liên kết với polypeptit có ái lực gắn kết với chất tự cảm

ứng-2 (AI-2), trong đó polypeptit này giết chết vi khuẩn. Patent Mỹ số 6936453 bộc lộ phương pháp sàng lọc hợp chất có khả năng điều biến hoạt tính chất tự cảm ứng bằng cách cho hỗn hợp chất tự cảm ứng và hợp chất này tiếp xúc với các tế bào vi khuẩn có thể phản ứng với chất tự cảm ứng để phát quang, và sau đó so sánh mức phát quang này với mức phát quang của các vi khuẩn chỉ được tiếp xúc với chất tự cảm ứng. US 2004-0009160 A bộc lộ chất ức chế thụ cảm mật độ quần thể, furanon, được điều hòa bởi các phân tử tín hiệu của vi khuẩn gây bệnh, HSL và AHL. KR 2008-0060777 bộc lộ dẫn xuất amit kháng khuẩn dưới dạng chất đối kháng thụ cảm mật độ quần thể và phương pháp ngăn cản tạo màng sinh học bằng cách sử dụng chất này. Patent Hàn Quốc số 832565 bộc lộ dẫn xuất furanon kháng khuẩn làm chất đối kháng thụ cảm mật độ quần thể và phương pháp ngăn cản tạo màng sinh học bằng cách sử dụng chất này. Patent Hàn Quốc các số 841289, 841294 và 841333 bộc lộ dẫn xuất homoserin lacton kháng khuẩn có hoạt tính kháng khuẩn và đồng thời có chức năng như chất đối kháng thụ cảm mật độ quần thể, phương pháp loại bỏ vi khuẩn bằng cách sử dụng nó, và phương pháp ngăn cản tạo màng sinh học bằng cách sử dụng nó.

Trong khi đó, với nhu cầu về nghề nuôi trồng thủy sản thân thiện với môi trường ngày càng tăng, việc sử dụng các lợi khuẩn làm chất làm tăng miễn dịch hiện được chấp nhận rộng rãi. Việc sử dụng lợi khuẩn được R. Fuller phổ biến vào năm 1989 dưới dạng thức ăn bổ sung vi sinh vật sống, ảnh hưởng có lợi đến vật chủ bằng cách cải thiện sự cân bằng vi sinh vật đường ruột của nó. 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 phân loại là GRAS (Generally Recognized As Safe - Thường được coi là an toàn), và không có các gen gây độc cho người hoặc động vật, và cũng không sản sinh các chất gây bệnh. Các lợi khuẩn là các vi sinh vật đã được thừa nhận là có hiệu lực trong việc cải thiện năng suất của vật nuôi. Các lợi khuẩn được đặc trưng bởi khả năng không gây bệnh, dễ tăng sinh *in vitro*, tăng trưởng nhanh trong cơ thể, và bền với axit và mật. Ngoài ra, hoạt tính của chúng không bị ức chế bởi các thành phần thức ăn, tác dụng của chúng được duy trì ở nhiệt độ phòng, và chúng dễ được trộn với thức ăn cho tiện sử dụng.

Các lợi khuẩn có khả năng cạnh tranh với các vi khuẩn gây bệnh đường ruột để ngăn cản sự bám dính mạnh của chúng với biểu mô ruột, và hồi phục nhanh chóng hệ vi sinh vật đường ruột bị thay đổi do hậu quả của việc điều trị bằng thuốc kháng sinh. Ngoài ra, các lợi khuẩn cũng ngăn cản việc nhiễm vi sinh vật gây bệnh và ức chế sự tăng sinh của chúng, thúc đẩy sự tăng sinh của hệ vi sinh vật 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 cản sự tăng sinh của các vi khuẩn gây bệnh, có hại. Do đó, việc cho vật nuôi ăn các lợi khuẩn có tác dụng duy trì hệ vi sinh vật đường ruột và làm tăng năng suất của chúng. Trong nghề nuôi trồng thủy sản, các lợi khuẩn còn được bổ sung vào thức ăn cho cá hoặc bổ sung vào nước. Gần đây đã có các nghiên cứu nhằm làm tăng tính miễn dịch chống lại các mầm bệnh và cải thiện chất lượng nước bằng cách sử dụng các lợi khuẩn trong nghề nuôi cá hoặc tôm (Jiqui Li et al. *Aquaculture* 291(2009) 35-40).

Ví dụ về các lợi khuẩn được sử dụng để khống chế sinh học trong nuôi trồng thủy sản bao gồm các vi khuẩn có lợi như *Lactobacillus*, *Enterococcus*, và *Bacillus*. *Bacillus* là vi khuẩn Gram dương, hình que, tạo thành nội bào tử, và có hình thái học đặc biệt trong số các chủng được sử dụng làm lợi khuẩn. Các chủng 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 các lợi khuẩn. *Bacillus* có tính bền nhiệt tuyệt vời hơn so với *Lactobacillus* không tạo thành nội bào tử. Ngoài ra, *Bacillus* có thể sống sót ở độ pH thấp của hàng rào dạ dày, và do đó hầu hết các vi khuẩn được tiêu hóa tiến đến ruột non một cách nguyên vẹn (Barbosa, T.M. et al. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(2005)968-978; Spinosa, M. R. et al. *Res. Microbiol.* 151(2000):61-368). Đã có báo cáo rằng *Bacillus* được sử dụng làm thực phẩm bổ sung cho người và làm chất thúc đẩy tăng trưởng cho động vật, và cũng được sử dụng để thúc đẩy sự tăng trưởng và khả năng chống bệnh của cá hoặc tôm trong nuôi trồng thủy sản, và cải thiện chất lượng nước và tốc độ tăng trưởng của tôm, và làm giảm các vibrio 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).

Các tác giả sáng chế này đã phân lập được từ nguồn tự nhiên các lợi khuẩn

có hoạt tính kháng khuẩn tuyệt vời chống lại các vi khuẩn gây bệnh trong nuôi cá và tôm và có năng suất enzym tiêu hóa tuyệt vời, và đã đánh giá các đặc điểm hình thái, sinh hóa và di truyền của chúng. Kết quả là đã phát hiện ra rằng các lợi khuẩn là *Bacillus* có tính bền nhiệt tuyệt vời. Đặc biệt, *Bacillus* này có thể khống chế *Vibrio harveyi* trong nuôi trồng thủy sản và phân hủy phân tử tín hiệu thụ cảm mật độ quần thể, chất tự cảm ứng-2, sao cho ức chế được các hoạt động sinh lý học xảy ra khi thụ cảm mật độ quần thể (cộng sinh, độc lực, tính khả biến, tạo màng sinh học, v.v.).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng *Bacillus* sp. mới được phân lập có thể ức chế sự tăng trưởng của *Vibrio harveyi*, và khống chế thụ cảm mật độ quần thể để ức chế tạo màng sinh học, và do đó, có thể được ứng dụng làm chế phẩm lợi khuẩn dùng trong nuôi cá và các loài giáp xác, từ đó thực hiện được sáng chế này.

Giải pháp khắc phục vấn đề

Mục đích của sáng chế là đề xuất chủng *Bacillus* mới được phân lập có thể phân hủy các phân tử tín hiệu thụ cảm mật độ quần thể của các vi khuẩn gây bệnh, *Vibrio* sp., và ức chế tạo màng sinh học.

Một mục đích khác của sáng chế là đề xuất canh trường thu được bằng cách nuôi cấy chủng này, sản phẩm cô đặc của canh trường này hoặc sản phẩm khô của canh trường này.

Một mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất chế phẩm lợi khuẩn chứa chủng này, canh trường chứa nó, sản phẩm cô đặc của canh trường này hoặc sản phẩm khô của canh trường này.

Một mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất chất phụ gia thực phẩm chứa chủng này, canh trường chứa nó, sản phẩm cô đặc của canh trường này hoặc sản phẩm khô của canh trường này.

Một mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp nuôi cá hoặc

các loài giáp xác bằng cách sử dụng chủng này, canh trường chứa nó, sản phẩm cô đặc của canh trường này hoặc sản phẩm khô của canh trường này.

Một mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất chất kháng khuẩn chứa chủng này, canh trường chứa nó, sản phẩm cô đặc của canh trường này hoặc sản phẩm khô của canh trường này.

Một mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp phân hủy các phân tử tín hiệu thụ cảm mật độ quần thể của *Vibrio harveyi* và ức chế tạo màng sinh học bằng cách bổ sung chủng này, canh trường chứa nó, sản phẩm cô đặc của canh trường này hoặc sản phẩm khô của canh trường này.

Một mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp phòng bệnh gây ra bởi các mầm bệnh ở động vật bằng cách bổ sung chủng này, canh trường chứa nó, sản phẩm cô đặc của canh trường này hoặc sản phẩm khô của canh trường này.

Một mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất chất cải thiện chất lượng nước chứa chủng này, canh trường chứa nó, sản phẩm cô đặc của canh trường này hoặc sản phẩm khô của canh trường này.

Một mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp cải thiện chất lượng nước bằng cách xử lý bằng chủng này, canh trường chứa nó, sản phẩm cô đặc của canh trường này hoặc sản phẩm khô của canh trường này.

Các ưu điểm của sáng chế

Bacillus sp. CJS-26 mới được phân lập theo sáng chế không chế được việc thụ cảm mật độ quần thể của *Vibrio harveyi* trong nuôi trồng thủy sản, từ đó ức chế các hoạt động sinh lý học xảy ra khi thụ cảm mật độ quần thể (cộng sinh, độc lực, tính khả biến, tạo màng sinh học, v.v.) và phong bế hiệu quả khả năng gây bệnh. Do đó, nó có thể được áp dụng rộng rãi cho các sản phẩm khác nhau để không chế các bệnh gây ra bởi các vi khuẩn bao gồm *Vibrio harveyi*, như các chất phụ gia thực phẩm cho nghề nuôi trồng thủy sản, chế phẩm lợi khuẩn, và chất cải thiện chất lượng nước.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là đồ thị thể hiện sự phân hủy phân tử tín hiệu thụ cảm mật độ quần thể *Vibrio harveyi*, chất tự cảm ứng-2 bằng *Bacillus* CJS-26 theo sáng chế;

Fig.2 là ảnh thể hiện việc *Bacillus* CJS-26 ức chế tạo màng sinh học của *Vibrio harveyi* khi nó được nuôi cấy trong 30 giờ;

Fig.3 là ảnh thể hiện tác dụng tiêu huyết của *Bacillus* CJS-26 theo sáng chế; và

Fig.4 là đồ thị thể hiện việc tiêu thụ amoniac của *Bacillus* CJS-26 theo sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo một phương án, sáng chế đề xuất *Bacillus* sp. CJS-26 mới được phân lập (KCCM11144P). Chúng này có thể phân hủy các phân tử tín hiệu thụ cảm mật độ quần thể của *Vibrio harveyi* và còn ức chế tạo màng sinh học.

Cụ thể, các mẫu có nguồn gốc từ nước biển được gom từ các khu nuôi tôm quanh Ganghwa Island, và được nuôi cấy trong môi trường BHI rắn được bổ sung 3% natri clorua. Sau đó, các khuẩn lạc được quan sát để nhóm lại, và các chủng được phân lập. Trong số các chủng được phân lập, các chủng thể hiện hoạt tính kháng khuẩn tuyệt vời trên các vi khuẩn gây bệnh điển hình tấn công cá được nuôi, bao gồm *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio anguillarum*, *Edwardsiella tarda*, *Streptococcus iniae*, và *Vibrio haemolyticus*, được chọn bằng cách sàng lọc sơ cấp. Trong số các chủng được sàng lọc sơ cấp có hoạt tính kháng khuẩn tuyệt vời, 6 loại chủng có hoạt tính enzym tiêu hóa tuyệt vời như proteaza, xenlulaza, amylaza, và lipaza được chọn bằng cách sàng lọc thứ cấp. Trong số các chủng được sàng lọc thứ cấp, chủng được chọn cuối cùng là *Bacillus* sp. CJS-26 phân hủy các phân tử tín hiệu thụ cảm mật độ quần thể của *Vibrio harveyi* và ức chế tạo màng sinh học.

Bacillus sp. CJS-26 có hình thái dạng que, Gram dương, và có độ tương đồng 99% với *Bacillus* sp. khi phân tích trình tự bazơ của 16s rDNA. Do đó, các tác

giả sáng chế này đã lưu giữ *Bacillus* sp. mới được phân lập CJS-26 ở Liên đoàn sưu tập chủng vi sinh vật Hàn Quốc (Korean Federation of Culture Collection) (trong Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc, 361-221, Yurim B/D 3F, Hongje-1-dong, Seodaemun-gu, Seoul) vào ngày 14 tháng mười hai năm 2010 với tên "*Bacillus* sp. CJS-26" (KCCM11144P).

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất canh trường của chủng này, sản phẩm cô đặc của canh trường này hoặc sản phẩm khô của canh trường này. Cụ thể, canh trường theo sáng chế có nghĩa là môi trường trong đó chủng *Bacillus* sp. CJS-26 được nuôi cấy, và tốt hơn là môi trường nuôi cấy chứa chủng này.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, môi trường nuôi cấy có nghĩa là môi trường chứa chất dinh dưỡng cần thiết để nuôi cấy tế bào động vật, tế bào thực vật hoặc vi khuẩn, và canh trường có nghĩa là môi trường lỏng trong đó chủng được gây nhiễm và được nuôi cấy. Canh trường có thể là môi trường chứa chủng này, hoặc dịch nuôi cấy được điều chế bằng cách loại bỏ chủng này ra khỏi canh trường trong đó chủng này được gây nhiễm và được nuôi cấy. Sản phẩm cô đặc của canh trường có nghĩa là sản phẩm được điều chế bằng cách cô canh trường, và sản phẩm khô của canh trường có nghĩa là sản phẩm được điều chế bằng cách loại bỏ nước ra khỏi canh trường. Phương pháp làm khô có thể bao gồm làm khô trong không khí, làm khô tự nhiên, sấy phun, và sấy thăng hoa, nhưng không chỉ giới hạn ở các phương pháp này.

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

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “chất mang được dụng” được dùng để chỉ chất mang hoặc chất pha loãng không gây kích ứng đáng kể cho cơ thể và không làm mất hoạt tính sinh học và các đặc tính của hợp chất được dùng. Để bào chế chế phẩm ở dạng lỏng, có thể sử dụng chất mang được dụng vô trùng và tương hợp sinh học như nước muối, nước vô trùng, nước muối được đậm, dịch truyền albumin, dung dịch dextroza, dung dịch maltodextrin, glyxerol, và hỗn hợp

của một hoặc nhiều chất này. Nếu cần, có thể thêm các chất phụ gia thông thường khác như chất chống oxy hóa, chất đệm, chất kìm khuẩn, và các chất tương tự. Ngoài ra, chất pha loãng, chất phân tán, chất hoạt động bề mặt, chất kết dính và chất làm trơn chảy có thể được bổ sung thêm vào chế phẩm này để bào chế chế phẩm để tiêm như dung dịch nước, hỗn dịch, và nhũ tương, hoặc viên tròn, viên nang, thuốc cốm, hoặc viên nén.

Các lợi khuẩn sống trong đường tiêu hóa để ức chế các vi khuẩn có hại và sự tăng sinh của các vi khuẩn gây bệnh. Ngoài ra, các enzym tiêu hóa có lợi được sản xuất bởi các lợi khuẩn tạo thuận lợi cho việc hấp thu và tiêu hóa các chất dinh dưỡng để cải thiện tốc độ chuyển hóa thức ăn.

Chế phẩm theo sáng chế chứa từ 5×10^4 đến 5×10^{10} CFU/ml và tốt hơn là từ 1×10^6 đến 1×10^9 CFU/ml *Bacillus* CJS-26.

Ví dụ về các dạng liều dùng qua đường miệng chứa hoạt chất là chế phẩm theo sáng chế có thể bao gồm viên nén, viên ngậm dẹt, kẹo ngậm, hỗn dịch nước hoặc hỗn nhũ dịch, thuốc bột hoặc thuốc cốm, nhũ tương, viên nang cứng hoặc mềm, xirô, hoặc cồn thuốc. Đối với dạng bào chế như viên nén và viên nang, có thể sử dụng chất kết dính như lactoza, sacaroza, sorbitol, manitol, tinh bột, amylopectin, xenluloza hoặc gelatin, tá dược như đicanxi phosphat, tá dược rã như tinh bột ngô hoặc tinh bột khoai lang, tá dược trơn như magie stearat, canxi stearat, natri stearyl fumarat, hoặc sáp polyetylen glycol. Đối với viên nang, chất mang lỏng như lipid có thể được sử dụng ngoài các chất nêu trên.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất chất phụ gia thực phẩm chứa chủng *Bacillus* sp. mới được phân lập hoặc canh trường chứa nó, sản phẩm cô đặc của canh trường này hoặc sản phẩm khô của canh trường này.

Thông thường, tất cả các loài *Bacillus* có thể tạo thành nội bào tử rất bền với nhiệt. Do đó, *Bacillus* sp. mới được phân lập CJS-26 có thể được điều chế ở dạng chất phụ gia thực phẩm, và sau đó được bổ sung vào thức ăn. Theo cách khác, *Bacillus* sp. mới được phân lập CJS-26 có thể được bổ sung trực tiếp trong quá trình chế biến thức ăn. *Bacillus* sp. CJS-26 trong thức ăn theo sáng chế có thể ở dạng lỏng hoặc khô, và tốt hơn là ở dạng bột khô. Phương pháp làm khô có thể bao gồm làm

khô trong không khí, làm khô tự nhiên, sấy phun, và sấy thăng hoa, nhưng không chỉ giới hạn ở các phương pháp này. *Bacillus* sp. CJS-26 theo sáng chế có thể được trộn ở dạng bột với tỷ lệ nằm trong khoảng từ 0,05 đến 10% khối lượng, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,1% đến 1% khối lượng, tính theo khối lượng thức ăn. Ngoài ra, thức ăn cho nghề nuôi trồng thủy sản có thể còn chứa các chất phụ gia phổ biến để cải thiện khả năng bảo quản, ngoài *Bacillus* sp. CJS-26 theo sáng chế.

Thức ăn chứa *Bacillus* sp. CJS-26 theo sáng chế có thể bao gồm thức ăn trên cơ sở thực vật như thóc, hạnh nhân, sản phẩm phụ trong quá trình chế biến thức ăn, táo, sợi, dầu, tinh bột, bột thô, và phụ phẩm thóc, và thức ăn trên cơ sở động vật như protein, các chất vô cơ, chất béo, chất khoáng, chất béo, protein đơn bào, động vật nổi, và bột cá, nhưng không chỉ giới hạn ở các thức ăn này.

Theo sáng chế, chế phẩm lợi khuẩn chứa *Bacillus* sp. CJS-26 chứa các chất phụ gia để ngăn ngừa sự suy giảm chất lượng, như chất kết dính, chất nhũ hóa và chất bảo quản, và các chất phụ gia để làm tăng tính hữu ích, như các axit amin, vitamin, enzym, chất tạo hương, nitơ không protein, silicat, chất đệm, dịch chiết, và các oligosacarit, nhưng không chỉ giới hạn ở các chất này. Ngoài ra, chế phẩm lợi khuẩn chứa *Bacillus* sp. CJS-26 có thể còn chứa các chất trộn thức ăn, nhưng không chỉ giới hạn ở chất này.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp nuôi cá hoặc các loài giáp xác, bao gồm bước xử lý khu nuôi cá hoặc các loài giáp xác bằng chủng *Bacillus* mới được phân lập, canh trường chứa nó, sản phẩm cô đặc của canh trường này hoặc sản phẩm khô của canh trường này.

Như đã mô tả trên đây, *Bacillus* sp. mới được phân lập CJS-26 theo sáng chế có hoạt tính kháng khuẩn rộng và còn ức chế sự cộng sinh, độc lực, tính khả biến, tạo màng sinh học. Do đó, chủng này được sử dụng để phòng các bệnh gây ra bởi các vi khuẩn gây bệnh phổ biến trong nghề nuôi trồng thủy sản, từ đó cho phép nuôi cá hoặc các loài giáp xác có độ an toàn.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất chất kháng khuẩn chứa chủng *Bacillus* mới được phân lập, canh trường chứa nó, sản phẩm cô đặc của canh trường này hoặc sản phẩm khô của canh trường này. Ngoài ra, sáng chế đề xuất

phương pháp ngăn cản tạo màng sinh học là nguồn ô nhiễm ở các khu nuôi cá hoặc loài giáp xác bằng chủng *Bacillus* mới được phân lập, canh trường chứa nó, sản phẩm cô đặc của canh trường này hoặc sản phẩm khô của canh trường này, hoặc phương pháp phòng bệnh gây ra bởi các mầm bệnh ở động vật ngoại trừ người bằng chủng *Bacillus* mới được phân lập, canh trường chứa nó, sản phẩm cô đặc của canh trường này hoặc sản phẩm khô của canh trường này.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "phòng" được dự định bao trùm tất cả các hoạt động để ngăn cản hoặc làm chậm tiến triển bệnh nhờ việc dùng chế phẩm.

Bacillus sp. mới được phân lập CJS-26 theo sáng chế có hoạt tính kháng khuẩn đối với 6 loại vi khuẩn gây bệnh nêu trên trong nghề nuôi trồng thủy sản, và sản xuất các hợp chất chứa sắt có khả năng giữ sắt tuyệt vời. Do đó, *Bacillus* sp. mới được phân lập CJS-26 phân hủy phân tử tín hiệu thụ cảm mật độ quần thể của *Vibrio harveyi*, chất tự cảm ứng-2 và ức chế tạo màng sinh học, từ đó không chế thụ cảm mật độ quần thể của *Vibrio harveyi* và ức chế sự cộng sinh, độc lực, tính khả biến, và tạo màng sinh học. Do đó, các bệnh gây ra bởi *Vibrio harveyi* có thể được phòng. Ngoài ra, đã xác định được rằng *Bacillus* sp. mới được phân lập CJS-26 có hoạt tính kháng khuẩn đối với 6 loại vi khuẩn gây bệnh điển hình trong nghề nuôi trồng thủy sản và không thể hiện tác dụng tiêu huyết trên đĩa thạch máu. Do đó, *Bacillus* sp. mới được phân lập được sử dụng để phòng các bệnh gây ra bởi các vi khuẩn gây bệnh nêu trên trong nghề nuôi trồng thủy sản.

Các vi khuẩn gây bệnh được dùng để chỉ các vi khuẩn gây ra các bệnh, và các vi khuẩn gây bệnh cụ thể có thể được phòng bao gồm *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio anguillarum*, *Edwardsiella tarda*, *Streptococcus iniae*, và *Vibrio hemolyticus*, và tốt nhất là, *Vibrio harveyi*.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất chất cải thiện chất lượng nước, chứa *Bacillus* sp. mới được phân lập, canh trường chứa nó, sản phẩm cô đặc của canh trường này hoặc sản phẩm khô của canh trường này.

Bacillus sp. mới được phân lập CJS-26 theo sáng chế ức chế các màng sinh học do *Vibrio harveyi* tạo ra, và làm giảm hàm lượng amoniac có mặt trong môi

trường nuôi trồng thủy sản. Để cải thiện chất lượng nước, *Bacillus* sp. mới được phân lập CJS-26 theo sáng chế có thể được bào chế riêng rẽ ở dạng chất để cải thiện chất lượng nước, hoặc chủng và/hoặc chế phẩm lợi khuẩn có thể được phun trực tiếp vào. *Bacillus* sp. CJS-26 trong chất để cải thiện chất lượng nước theo sáng chế có thể ở dạng lỏng hoặc khô, và tốt hơn là ở dạng bột khô.

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

Nếu chất cải thiện chất lượng nước được sử dụng, thì chất lượng nước của khu nuôi trồng thủy sản có thể được cải thiện. Cụ thể, chất cải thiện chất lượng nước có thể được đưa vào khu nuôi trồng thủy sản trước khi nuôi trồng thủy sản hoặc trong khi nuôi trồng thủy sản. Tốt hơn là, chất này có thể được đưa vào khu nuôi trồng thủy sản trước khi nuôi trồng thủy sản và để trong một khoảng thời gian định trước. Do đó, *Bacillus* sp. mới được phân lập CJS-26 theo sáng chế được sử dụng để phân hủy các phân tử tín hiệu thụ cảm mật độ quần thể, từ đó ức chế tạo màng sinh học. Ngoài ra, chất cải thiện chất lượng nước được bổ sung trong khi nuôi trồng thủy sản một hoặc nhiều lần sao cho ngăn cản được việc tạo màng sinh học thêm.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp cải thiện chất lượng nước bao gồm bước xử lý nước bằng *Bacillus* sp. mới được phân lập, canh trường chứa nó, sản phẩm cô đặc của canh trường này hoặc sản phẩm khô của canh trường này. Nước được cải thiện có thể được sử dụng trong khu nuôi trồng thủy sản, và cũng có thể được sử dụng làm nước uống cho vật nuôi hoặc người. Về mặt này, nước được xử lý bằng *Bacillus* sp. mới được phân lập, canh trường chứa nó, sản phẩm cô đặc của canh trường này hoặc sản phẩm khô của canh trường này tốt hơn là được làm sạch trước khi sử dụng, và bước làm sạch nước được thực hiện bằng

phương pháp đã biết.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Dưới đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn bằng các ví dụ. Tuy nhiên, các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa, và sáng chế không chỉ giới hạn ở các ví dụ này.

Ví dụ 1: Phân lập *Bacillus* sp. CJS-26

Ví dụ 1-1: Thu mẫu và phân lập chủng

Xem xét các đặc tính của các lợi khuẩn có tính đặc hiệu môi trường và vật chủ cao, các tác giả sáng chế này đã thu các mẫu có nguồn gốc từ nước biển trong các khu nuôi tôm có tần số xuất hiện bệnh ở khu nuôi thấp và năng suất cao. Pha loãng theo chuỗi các mẫu gom được và phân tán trên thạch BHI (Difco, USA) đã được bổ sung 3% natri clorua, tiếp theo nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ. Tiến hành nhóm các chủng phân lập được từ mỗi mẫu bằng cách quan sát khuẩn lạc, và chọn các chủng. Nuôi cấy các khuẩn lạc được chọn trong môi trường mới ba lần để phân lập. Bảo quản các chủng phân lập được trong môi trường chứa 20% glycerol ở nhiệt độ -70°C hoặc thấp hơn.

Ví dụ 1-2: Chọn lọc các chủng có hoạt tính kháng khuẩn cao

Để chọn lọc sơ cấp các chủng có hoạt tính kháng khuẩn đối với các vi khuẩn gây bệnh điển hình trong nghề nuôi trồng thủy sản, tiến hành thử nghiệm đánh giá hoạt tính kháng khuẩn đối với 6 loại vi khuẩn bao gồm *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio anguillarum*, *Edwardsiella tarda*, và *Vibrio haemolyticus*.

Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn đối với các vi khuẩn gây bệnh bằng phân tích vùng trống. Cụ thể, trộn 3ml thạch 0,7% (% kl/tt) và 150µl mỗi canh trường đã được lacc của 6 loại vi khuẩn gây bệnh (OD₆₀₀=2,0) và phủ lên trên môi trường BHI để điều chế thạch đỉnh. Nhỏ 10µl canh trường của chủng được chọn lên trên thạch đỉnh điều chế được, và nuôi cấy trong 18 giờ ở nhiệt độ 30°C. Sau đó, quan sát sự có mặt của vùng trống xung quanh các chủng được nhỏ (Bảng 1).

Bảng 1

Hoạt tính kháng khuẩn của các chủng được sàng lọc sơ cấp

	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 hoạt tính, +: hoạt tính

AS: *Aeromonas salmonicida*;SI: *Streptococcus iniae*;

ET: *Edwardsiella tarda*;

VH: *Vibrio harveyi*;

VP: *Vibrio hemolyticus*;

VA: *Vibrio anguillarum*.

Như được thể hiện trong bảng 1, trong số 53 loại chủng, các chủng có hoạt tính kháng khuẩn đối với loài bất kỳ trong số 6 loài vi khuẩn gây bệnh trong nghề cá là tổng số 20 chủng (các chủng số 1, 3, 6, 7, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 23, 26, 27, 29, 32, 34, 35, 38, 52 và 53). 6 loại trong số đó (các chủng số 7, 9, 15, 32, 34 và 38) chỉ có hoạt tính kháng khuẩn đối với một loài vi khuẩn gây bệnh, nhưng 14 loại còn lại trong chúng (các chủng số 1, 3, 6, 11, 12, 13, 14, 23, 26, 27, 29, 35, 52 và 53) có hoạt tính kháng khuẩn phức hợp đối với hai hoặc nhiều loài vi khuẩn gây bệnh. Do đó, 14 loại chủng có hoạt tính kháng khuẩn phức hợp được sàng lọc sơ cấp.

Ví dụ 1-3: Chọn lọc các chủng có hoạt tính enzym cao

Ví dụ 1-3-1: Gôm dịch chiết emzym thô

Trong số 14 loại chủng có hoạt tính kháng khuẩn phức hợp, chọn các chủng có hoạt tính enzym tiêu hóa phức hợp.

Cụ thể, nuôi cấy 14 loại chủng có hoạt tính kháng khuẩn phức hợp được chọn trong ví dụ 1-2 trong môi trường BHI trong 8 và 24 giờ, và ly tâm canh trường của chúng ở nhiệt độ 4°C và 13.000 vòng/phút trong 5 phút để thu được mỗi dịch nổi. Mỗi dịch nổi được sử dụng dưới dạng dịch chiết enzym thô để phân tích hoạt tính enzym, và các hoạt tính của proteaza, xenlulaza, amylaza, và lipaza được chứa trong dịch nổi này được xác định như sau.

Ví dụ 1-3-2: Hoạt tính proteaza

Chuẩn bị môi trường YM (Difco, USA) được bổ sung 2% sữa gầy (Sigma, USA) làm cơ chất proteaza. Bổ sung mỗi dịch chiết enzym thô thu được trong ví dụ 1-3-1 vào môi trường cơ chất, và sau đó cho phản ứng ở nhiệt độ 30°C trong 2 giờ. Sau khi hoàn thành phản ứng, xác định hoạt tính proteaza trong mỗi dịch chiết

enzym thô bằng cách đo diện tích của vùng trống, là vùng được tạo thành do sự phân hủy của cơ chất trong môi trường bởi proteaza được chứa trong mỗi dịch chiết enzym thô.

Ví dụ 1-3-3: Hoạt tính xenlulaza

Chuẩn bị môi trường YM đã được bổ sung 1% CMC (carboxyl methyl xenluloza) làm cơ chất xenlulaza, và bổ sung mỗi dịch chiết enzym thô thu được trong ví dụ 1-3-1 vào đó, và sau đó cho phản ứng ở nhiệt độ 30°C trong 2 giờ. Sau khi hoàn thành phản ứng, xác định hoạt tính xenlulaza trong mỗi dịch chiết enzym thô bằng cách đo diện tích của vùng trống, là vùng được tạo thành do sự phân hủy của cơ chất trong môi trường bởi xenlulaza được chứa trong mỗi dịch chiết enzym thô.

Ví dụ 1-3-4: Hoạt tính amylaza

Chuẩn bị môi trường YM đã được bổ sung 1% tinh bột dễ tan làm cơ chất amylaza, và bổ sung mỗi dịch chiết enzym thô thu được trong ví dụ 1-3-1 vào môi trường cơ chất, và sau đó cho phản ứng ở nhiệt độ 30°C trong 2 giờ. Sau khi hoàn thành phản ứng, xác định hoạt tính amylaza trong mỗi dịch chiết enzym thô bằng cách đo diện tích của vùng trống, là vùng được tạo thành do sự phân hủy của cơ chất trong môi trường bởi amylaza được chứa trong mỗi dịch chiết enzym thô.

Ví dụ 1-3-5: Hoạt tính lipaza

Chuẩn bị môi trường YM đã được bổ sung 1% tricaptylin làm cơ chất lipaza, và bổ sung mỗi dịch chiết enzym thô thu được trong ví dụ 1-3-1 vào đó, và sau đó cho phản ứng ở nhiệt độ 30°C trong 2 giờ. Sau khi hoàn thành phản ứng, xác định hoạt tính lipaza trong mỗi dịch chiết enzym thô bằng cách đo diện tích của vùng trống, là vùng được tạo thành do sự phân hủy của cơ chất trong môi trường bởi lipaza được chứa trong mỗi dịch chiết enzym thô.

Ví dụ 1-3-6: So sánh hoạt tính enzym trong các chủng được chọn

So sánh mỗi hoạt tính enzym xác định được trong các ví dụ từ 1-3-2 đến 1-3-5, và chọn lọc thứ cấp 6 loại chủng có hoạt tính tuyệt vời của bốn enzym (các

chủng số 11, 12, 14, 23, 26 và 52) (Bảng 2). 6 loại chủng được chỉ định lần lượt là CJS11, CJS12, CJS114, CJS26, CJS59 và CJS83.

Bảng 2

Năng suất enzym của các chủng được sàng lọc thứ cấp

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 hoạt tính, +: hoạt tính, ++: hoạt tính tuyệt vời, +++: hoạt tính rất tuyệt vời

Ví dụ 2: Chọn lọc chủng có tác dụng khống chế thụ cảm mật độ quần thể và tác dụng ức chế màng sinh học

Từ 6 loại chủng có hoạt tính kháng khuẩn và hoạt tính enzym tuyệt vời được chọn trong ví dụ 1, các chủng có khả năng phân hủy các chất tự cảm ứng bao gồm thụ cảm mật độ quần thể và ức chế tạo màng sinh học được chọn.

Ví dụ 2-1: Chọn lọc chủng có tác dụng khống chế thụ cảm mật độ quần thể

Vibrio harveyi BB120 (ATCC BAA-1116, USA) là chủng thụ cảm mật độ quần thể chuẩn đáp ứng với chất tự cảm ứng-1 và chất tự cảm ứng-2, và *Vibrio harveyi* BB170 là chủng đột biến chỉ đáp ứng với chất tự cảm ứng-2 được sử dụng để chọn lọc các chủng có khả năng ức chế hoạt tính của chất tự cảm ứng-2 giúp thụ cảm mật độ quần thể ở *Vibrio harveyi*, trong số 6 loại chủng có hoạt tính kháng khuẩn và hoạt tính enzym tuyệt vời được chọn trong ví dụ 1. Về vấn đề này, phương pháp chọn lọc chủng có khả năng ức chế hoạt tính chất tự cảm ứng-2 được thực hiện

dựa trên thực tế là *Vibrio harveyi* BB120 và *Vibrio harveyi* BB170 phát quang bởi phản ứng thụ cảm mật độ quần thể khi chúng gần nhau.

Thứ nhất, môi trường đánh giá thụ cảm mật độ quần thể (môi trường AB) trong đó hai loại *Vibrio harveyi* có thể được nuôi cấy được điều chế theo thành phần trong Bảng 3 dưới đây.

Bảng 3

Thành phần môi trường (môi trường AB) để đánh giá thụ cảm mật độ quần thể

Natri clorua (NaCl)	17,5g
Magie sulfat (MgSO ₄)	12,3g
Axit casamino	2,0g
Kali phosphat 1M	10
L-arginin 0,1M	10
Glyxerol	10

Sau đó, gây nhiễm *Vibrio harveyi* BB120 0,5% (thể tích/thể tích) vào môi trường AB, và nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C và 200 vòng/phút trong 12 giờ, và gây nhiễm *Vibrio harveyi* BB170 0,02% (thể tích/thể tích) vào môi trường AB, và nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C và 200 vòng/phút trong 3 giờ. Mỗi trong số 6 loại chủng được chọn trong ví dụ 1 được gây nhiễm ở mức 0,1% (thể tích/thể tích) trong môi trường BHI và được nuôi cấy trong 8 giờ.

Sau khi hoàn thành việc nuôi cấy, mỗi canh trường được ly tâm ở nhiệt độ 4°C và 13.000 vòng/phút, và mỗi dịch nổi được lọc bằng cách sử dụng bộ lọc có cỡ lỗ 0,45µm để thu được phần hoạt tính của mỗi chủng.

Để đánh giá rằng 6 loại chủng lợi khuẩn được chọn có thể phân hủy phân tử tín hiệu thụ cảm mật độ quần thể *Vibrio harveyi*, chất tự cảm ứng-2 (AHL), dịch nổi môi trường nuôi cấy *Vibrio harveyi* BB120 và canh trường của từng chủng lợi khuẩn được chọn được trộn với tỷ lệ 1:1 và được cho phản ứng trong 3 giờ. Sau đó, bổ sung 1% hỗn hợp này vào *Vibrio harveyi* BB120 được nuôi cấy trong 3 giờ, và nuôi cấy tiếp ở nhiệt độ 30°C và 200 vòng/phút trong 4 giờ để đo cường độ phát

quang bằng cách sử dụng máy đo ánh sáng.

Kết quả là, 6 loại trong số các chủng được chọn phân hủy đáng kể chất tự cảm ứng-2 (AHL) *Vibrio harveyi* ($p < 0,001$). Trong số chúng, 3 loại (CJS11, CJS26 và CJS83) thể hiện khả năng phân hủy chất tự cảm ứng-2 (AHL) tuyệt vời nhất được chọn (FIG. 1). Fig.1 là đồ thị thể hiện sự phân hủy phân tử tín hiệu thụ cảm mật độ quần thể *Vibrio harveyi*, chất tự cảm ứng-2 (AHL) bằng *Bacillus* CJS-26 theo sáng chế.

Ví dụ 2-2: Chọn lọc chủng có tác dụng ức chế tạo màng sinh học nhờ *Vibrio harveyi*

Để chọn lọc các chủng lợi khuẩn có khả năng ức chế tạo màng sinh học nhờ *Vibrio harveyi*, các chủng nêu trên có khả năng không chế hiệu quả việc thụ cảm mật độ quần thể được đánh giá. Sau khi *Vibrio harveyi* được nuôi cấy, nhóm tạo màng sinh học được sử dụng làm nhóm đối chứng, và nhóm xử lý được xử lý bằng một trong số các chủng lợi khuẩn được chọn và việc đánh giá được lặp lại ba lần như sau.

Gây nhiễm 200 μ l *Vibrio harveyi* trong 3ml môi trường LB (Difco, USA) đã được bổ sung 3% natri clorua, và nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C trong 6 giờ. Sau đó, bổ sung mỗi 200 μ l các chủng lợi khuẩn được chọn, và nuôi cấy tiếp trong 24 giờ. Mỗi canh trường được nuôi cấy trong tổng cộng 30 giờ được lấy ra, và nhuộm bằng 0,4% tím tinh thể trong 10 phút để kiểm tra sự có mặt của màng sinh học.

Bảng 4

Đánh giá tác dụng ức chế việc tạo màng sinh học bằng cách nuôi cấy 30 giờ

<i>Vibrio harveyi</i>	+++
CJS114	+
CJS26	-
CJS53	+

Như được thể hiện trong bảng 4, *Vibrio harveyi* tạo thành dải màng sinh học màu tím được nhuộm bằng tím tinh thể, còn tất cả các chủng lợi khuẩn ức chế tạo màng sinh học, trong thời gian nuôi cấy 30 giờ (Fig.2). Fig.2 là ảnh thể hiện việc

Bacillus CJS-26 ức chế tạo màng sinh học của *Vibrio harveyi* khi nó được nuôi cấy trong 30 giờ.

Ví dụ 3: Nhận diện chủng được chọn và mô tả đặc điểm sinh lý và sinh hóa của nó

Ví dụ 3-1: Nhận diện chủng

Trong số 3 loại chủng được chọn, chủng CJS-26 không chế hiệu quả việc thụ cảm mật độ quần thể và ức chế tạo màng sinh học được chọn cuối cùng, được nhận diện, và phân tích. Việc nhận diện chủng này được thực hiện bằng các phương pháp sinh lý và sinh hóa và phương pháp hệ thống phân tử. Chủng này được tìm thấy là có đặc điểm hình thái của các vi khuẩn hình que Gram dương. Phân tích trình tự 16s rDNA cho thấy rằng chủng này có độ tương đồng 99% so với *Bacillus* sp., chứng tỏ chủng này là vi sinh vật mới. Trình tự bazơ của 16s rDNA của chủng được phân lập được nêu trong SEQ ID NO. 1.

Việc phân tích trình tự bazơ được thực hiện bằng cách khuếch đại 16s rDNA bằng cách sử dụng PCR premix (Bioneer, Korea) và đoạn mồi chung 27F và 1492R có trình tự bazơ như sau.

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

1492R: 5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3'(SEQ ID NO. 3)

Khuếch đại gen được thực hiện trong tổng thể tích phản ứng bằng 20µl trong tổng số 30 chu trình bao gồm ở nhiệt độ 94°C trong 1 phút, ở nhiệt độ 56°C trong 1 phút, và ở nhiệt độ 72°C trong 1 phút để phân tích trình tự bazơ của ADN được khuếch đại. Vi sinh vật mới theo sáng chế được nhận diện bằng phương pháp nêu trên được lưu giữ ở Liên đoàn sưu tập chủng vi sinh vật Hàn Quốc (trong Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc, 361-221, Yurim B/D 3F, Hongje-1-dong, Seodaemun-gu, Seoul) vào ngày 14 tháng mười hai năm 2010 với tên "*Bacillus* sp. CJS-26" (KCCM11144P).

Ví dụ 3-2: Mô tả đặc điểm sinh lý và sinh hóa

Để phân tích đặc điểm sinh hóa của *Bacillus* sp. CJS-26 theo sáng chế, các

mẫu lên men đường của chủng này được phân tích bằng cách sử dụng hệ thống API 50 CHB (Korean Culture Center of Microorganisms, Korea) (bảng 5).

Bảng 5

Kết quả của các mẫu lên men đường

Đối chứng	-	Salixin	+
Glyxerol	+	Salixin	+
Erythritol	-	Xenlobioza	+
D-Arabinoza	-	Maltoza	+
L-Arabinoza	+	Lactoza	+
Riboza	+	Melibioza	-
D-Xyloza	+	Sacaroza	+
L-Xyloza	-	Trehaloza	+
Adonitol	-	Inulin	-
β metyl-xylosit	-	Melezitoza	-
Galactoza	-	D-Raffinoza	+
D-Glucoza	+	Amidon	+
D-Fructoza	+	Glycogen	+
D-Mannoza	+	Xylitol	-
L-Sorboza	-	β Gentiobioza	-
Ramnoza	-	D-Turanoza	-
Đulxitol	-	D-Lyxzoza	-
Inositol	+	D-Tagatoza	-
Manitol	+	D-Fucoza	-
Sorbitol	+	L-Fucoza	-
α Metyl-Dmannosit	-	D-Arabitol	-
α Metyl-glucosit	+	L-Arabitol	-
N Axetyl glucosamin	-	Gluconat	-

Amygđalin	+	2 xeto-gluconat	-
Arbutin	+	5 xeto-gluconat	-

+, Dương; -, Âm

Ví dụ 4: Độ an toàn và sự tiêu thụ

Ví dụ 4-1: Sự tiêu huyết β

Sự tiêu huyết β là sự tan hoàn toàn các tế bào hồng cầu, gây ra bởi sự thủy phân phospholipit bởi các vi khuẩn sản sinh phospholipaza.

Để kiểm tra sự tiêu huyết của *Bacillus* sp. CJS-26, chuẩn bị đĩa thạch máu chứa TSA (tryptic soy agar - thạch đậu nành triptxin) (Difco, USA) và 5% máu cừu (Kisan Biotech, Korea). Sau khi chủng *Bacillus* CJS26 theo sáng chế được cấy thành vạch trên đĩa thạch máu chuẩn bị được, tiến hành ủ ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ để kiểm tra sự tiêu huyết. Về vấn đề này, khi thạch trở nên trắng hoặc vàng quanh chủng được nuôi cấy, thì được xác định là có sự tiêu huyết. Khi không quan sát thấy sự đổi màu quanh chủng được nuôi cấy, thì được xác định là không có sự tiêu huyết (xem Fig.3). Fig.3 là ảnh thể hiện tác dụng tiêu huyết của *Bacillus* CJS-26 theo sáng chế. Như được thể hiện trên Fig.3, *Bacillus* CJS-26 theo sáng chế không thể hiện tác dụng tiêu huyết.

Ví dụ 4-2: Tiêu thụ amoniac

Để kiểm tra việc tiêu thụ amoniac của *Bacillus* CJS-26 theo sáng chế, môi trường chứa amoniac được chuẩn bị như được thể hiện trong Bảng 6 dưới đây. Gây nhiễm 0,1% *Bacillus* sp. CJS-26 vào môi trường chuẩn bị được, và sau đó, nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C, 200 vòng/phút trong 6 giờ, 12 giờ, và 24 giờ. Gom mẫu canh trường ở mỗi thời điểm nuôi cấy. Ly tâm các mẫu canh trường gom được ở nhiệt độ 4°C, 13.000 vòng/phút trong 5 phút để thu được dịch nổi, và đo hàm lượng của amoniac trong dịch nổi thu được để định lượng mức độ tiêu thụ (xem Fig.4).

Bảng 6

Thành phần môi trường để đánh giá mức độ tiêu thụ amoniac

Amoni sulfat ((NH ₄) ₂ SO ₄)	0,5g/l
Đinatri phosphat (Na ₂ HPO ₄)	13,5g/l
Đikali phosphat (K ₂ HPO ₄)	0,7g/l
Magie sulfat (MgSO ₄ 7H ₂ O)	0,1g/l
Canxi clorua (CaCl ₂)	0,18g/l
Natri bicacbonat (NaHCO ₃)	0,5g/l
Sắt(III) clorua (FeCl ₃ 6H ₂ O)	0,014g/l
Glucoza	0,5g/l

Fig.4 là đồ thị thể hiện việc tiêu thụ amoniac của *Bacillus* CJS-26 theo sáng chế. Như được thể hiện trên Fig.4, nồng độ amoniac ban đầu trong môi trường xấp xỉ 400ppm. Do *Bacillus* sp. CJS-26 phát triển để sử dụng amoniac, không phát hiện được amoniac sau khi nuôi cấy trong 30 giờ (xem Fig.4). Việc không phát hiện thấy amoniac trong môi trường gợi ý rằng *Bacillus* CJS-26 theo sáng chế có thể ngăn ngừa sự ô nhiễm nước do amoniac, và làm giảm amoniac gây ra sự căng thẳng cho cá hoặc các loài giáp xác, từ đó cải thiện chất lượng của cá hoặc các loài giáp xác được nuôi cấy.

Các kết quả trên đây thể hiện rằng *Bacillus* CJS-26 không chế thụ cảm mật độ quần thể của các vi khuẩn gây bệnh bao gồm *Vibrio harveyi*, có hoạt tính kháng khuẩn và sản xuất enzym tiêu hóa phức hợp để tạo thuận lợi cho tốc độ tiêu hóa của cá và tốc độ tăng cân và làm giảm thải trừ, dẫn đến cải thiện chất lượng nước.

Ví dụ 5: Hiệu lực của các lợi khuẩn

Để kiểm tra xem *Bacillus* sp. CJS-26 theo sáng chế thực tế có hoạt tính lợi

khuẩn hay không khi nó được bổ sung vào thức ăn và cá được ăn bằng thức ăn này, *Bacillus* sp. CJS-26 theo sáng chế được trộn với thức ăn, và cá bơn nhỏ được cho ăn bằng thức ăn đã trộn trong 8 tuần, để xác định tốc độ tăng khối lượng, tốc độ tăng trưởng hằng ngày, tỷ lệ chuyển hóa thức ăn, tỷ lệ hiệu quả protein, và tỷ lệ sống.

Cụ thể, thức ăn cơ bản (nhóm đối chứng) được chuẩn bị để có hàm lượng năng lượng bằng 30% protein thô, như được thể hiện trong bảng 7. *Bacillus* sp. CJS-26 theo sáng chế được bổ sung vào thức ăn cơ bản để tạo ra thức ăn đã trộn chứa 5% *Bacillus* sp. CJS-26, và lượng xenluloza được giảm xuống một lượng lợi khuẩn bổ sung cho hàm lượng năng lượng bằng nhau.

Bảng 7

Thành phần thức ăn cơ bản

Nguyên liệu thô	%
Bột cá thịt trắng	36,0
Bột đậu nành	12,0
Bột gluten ngô	8,0
Bột mì	30,4
Dầu gan mực	5,0
Bột đậu nành	5,0
CMC	1,0
Xenluloza	0,5
Chất khoáng trộn sẵn	1,0
Vitamin trộn sẵn	1,0

Cá bơn nhỏ được sử dụng trong thử nghiệm có khối lượng trung bình ban đầu bằng 25g, và 25 con được cho ngẫu nhiên vào bể bằng PP tròn dung tích 150l. Nước biển đã lọc cát được sử dụng làm nước nuôi, và tốc độ dòng được khống chế ở 2-3l/phút. Bể chứa được trang bị đá bọt để cung cấp oxy và tuần hoàn nước nuôi. Chu kỳ sáng được duy trì trong điều kiện 12 sáng : 12 tối bằng cách sử dụng đèn huỳnh quang. Nhiệt độ nước nuôi được duy trì trong điều kiện nhiệt độ tự nhiên

bằng 21-29°C trong toàn bộ giai đoạn thử nghiệm. Cá được cho ăn thoải mái hai lần một ngày. Tốc độ tăng trưởng được đo mỗi ba tuần, và tất cả cá bị bỏ đói trong 24 giờ trước khi đo (xem bảng 8).

Bảng 8

Hiệu lực của các lợi khuẩn ở cá bơn

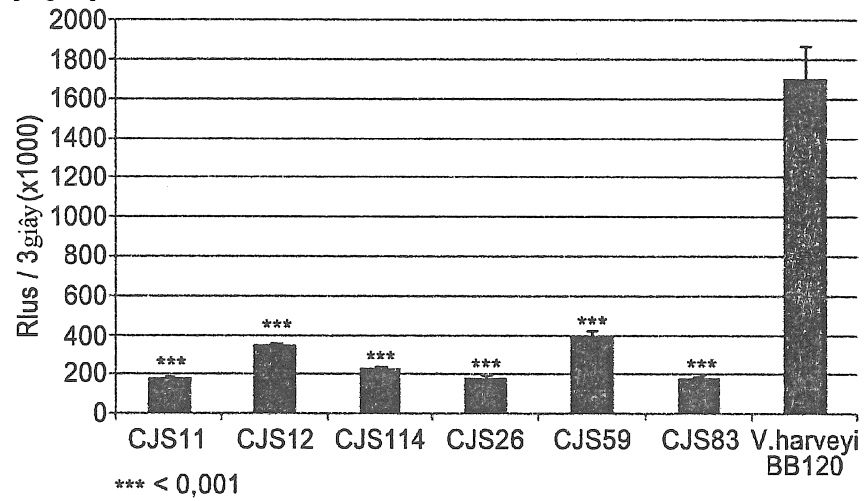
	Nhóm đối chứng	Nhóm thử nghiệm
Khối lượng trung bình cuối cùng (g)	$50,6 \pm 1,7^a$	$55,1 \pm 2,5^b$
Tốc độ tăng khối lượng (%)	$103,03 \pm 5,6^a$	$121,16 \pm 18,3^b$
Tốc độ tăng trưởng hằng ngày (%)	$1,42 \pm 0,06^a$	$1,58 \pm 0,12^b$
Tỷ lệ sống (%)	$77,3 \pm 15,1^a$	$98,7 \pm 2,3^b$
Tỷ lệ chuyển hóa thức ăn	$1,59 \pm 0,15^b$	$1,24 \pm 0,05^b$
Tỷ lệ hiệu lực protein	$1,10 \pm 0,1^a$	$1,30 \pm 0,1^b$

Như được thể hiện trong bảng 8, việc bổ sung *Bacillus* sp. CJS 26 làm tăng tốc độ tăng trưởng lên khoảng 16%, so với nhóm đối chứng, và cũng làm tăng tỷ lệ chuyển hóa thức ăn và tỷ lệ hiệu lực protein, so với nhóm đối chứng. Tỷ lệ sống cũng tăng lên khoảng 21%, so với nhóm đối chứng. Do đó, chủng theo sáng chế tạo thuận lợi hiệu quả cho tốc độ tiêu hóa của cá và tốc độ tăng khối lượng.

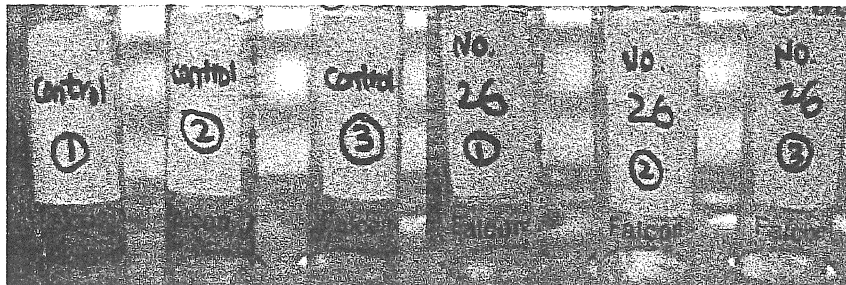
YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. CJS-26 có số hiệu truy cập KCCM11144P.
2. Canh trường chứa chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. CJS-26 (KCCM11144P) theo điểm 1.
3. Canh trường theo điểm 2, trong đó canh trường này ở dạng sản phẩm cô đặc hoặc sản phẩm khô.
4. Chế phẩm lợi khuẩn chứa hoạt chất là chủng vi khuẩn theo điểm 1, hoặc canh trường theo điểm 2 hoặc 3.
5. Chất phụ gia thực phẩm chứa hoạt chất là chủng vi khuẩn theo điểm 1, hoặc canh trường theo điểm 2 hoặc 3.
6. Chất kháng khuẩn chứa chủng vi khuẩn theo điểm 1, hoặc canh trường theo điểm 2 hoặc 3.
7. Chất cải thiện chất lượng nước chứa hoạt chất là chủng vi khuẩn theo điểm 1, hoặc canh trường theo điểm 2 hoặc 3.

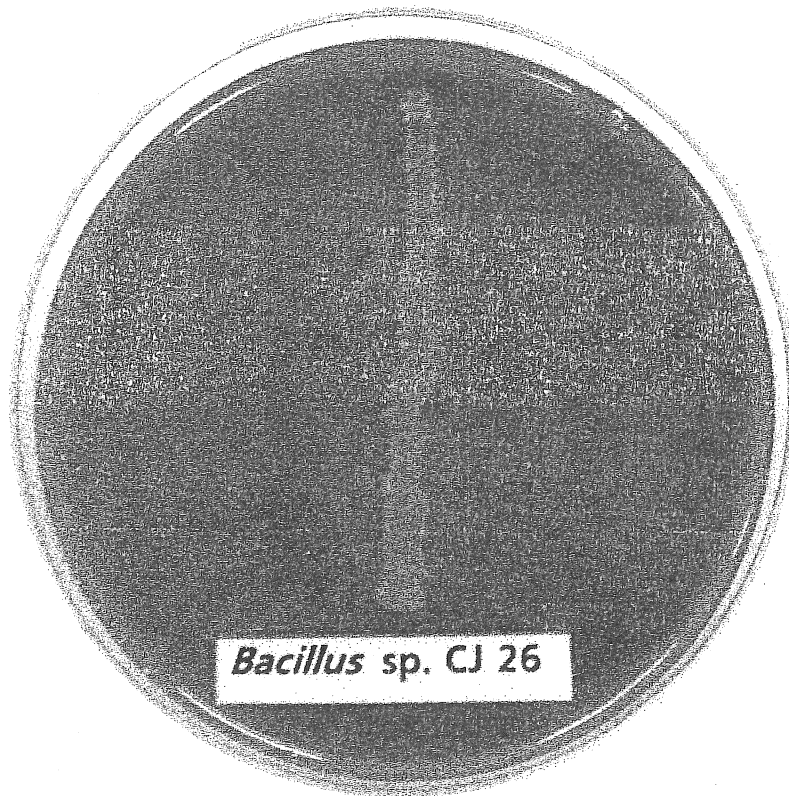
[Fig. 1]



[Fig. 2]



[Fig. 3]



[Fig. 4]

