

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Lê Thị Huệ

**NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG GIỮ ẤM VÀ GIẢM MẶN CHO
CÁT SAN HÔ BẰNG VI KHUẨN CHỊU MẶN, SINH EPS
(EXOPOLYSACCHARIDE) PHÂN LẬP Ở TRƯỜNG SA**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG

Hà Nội - 2025

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

Lê Thị Huệ

**NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG GIỮ ẨM VÀ GIẢM MẶN CHO
CÁT SAN HÔ BẰNG VI KHUẨN CHỊU MẶN, SINH EPS
(EXOPOLYSACCHARIDE) PHÂN LẬP Ở TRƯỜNG SA**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG

Ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 9 42 02 01

**Xác nhận của Học viện
Khoa học và Công nghệ**

Người hướng dẫn 1

Người hướng dẫn 2

GS.TS. Lê Mai Hương

TS. Vũ Duy Nhân

Hà Nội - 2025

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận án: “Nghiên cứu khả năng giữ ẩm và giảm mặn cho cát san hô bằng vi khuẩn chịu mặn, sinh EPS (exopolysaccharide) phân lập ở Trường Sa” là kết quả nghiên cứu độc lập của bản thân tôi, được thực hiện trong khuôn khổ đào tạo nghiên cứu sinh và dưới sự hướng dẫn khoa học của các thầy hướng dẫn. Toàn bộ quá trình thực hiện nghiên cứu, từ việc xây dựng đề cương, thu thập và phân tích dữ liệu đến tổng hợp, đánh giá kết quả, đều được tôi thực hiện một cách nghiêm túc, có hệ thống và tuân thủ các nguyên tắc khoa học. Luận án có tham khảo, sử dụng thông tin từ nhiều nguồn tài liệu chính thống nhằm làm rõ cơ sở lý luận, bối cảnh nghiên cứu cũng như các phương pháp khoa học phù hợp. Tất cả các nội dung trích dẫn đều được ghi rõ nguồn gốc, đảm bảo tính minh bạch và tôn trọng quyền tác giả theo đúng quy định về đạo đức nghiên cứu khoa học. Ngoài ra, trong quá trình thực hiện nghiên cứu, một số kết quả đã được tôi công bố chung với các tác giả khác trên các tạp chí khoa học và hội nghị chuyên ngành. Luận án này được hoàn thành dưới sự hỗ trợ của các đồng nghiệp. Tôi cam kết chịu trách nhiệm về tính chính xác và trung thực của toàn bộ nội dung trình bày trong luận án.

Hà Nội, ngày 10 tháng 11 năm 2025

Tác giả luận án



Lê Thị Huệ

LỜI CẢM ƠN

Với lòng tri ân sâu sắc, tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành đến **GS.TS. Lê Mai Hương** và **TS. Vũ Duy Nhân** vì đã tận tình hướng dẫn, hỗ trợ và đồng hành cùng tôi trong suốt quá trình nghiên cứu. Sự chỉ bảo tận tâm của hai thầy cô đã giúp tôi hoàn thành các giai đoạn quan trọng của luận án, từ xây dựng đề cương, khảo sát thực địa, phân tích số liệu, soạn thảo bài báo khoa học đến công bố các kết quả nghiên cứu và hoàn thiện luận án. Tôi cũng xin bày tỏ lòng biết ơn đến **Ban Lãnh đạo, Phòng Đào tạo và các phòng chức năng của Học viện Khoa học và Công nghệ**, cũng như **Viện Hóa học các Hợp chất thiên nhiên nay là Viện Hóa học (Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam)** vì đã tạo điều kiện thuận lợi và hỗ trợ tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu. Bên cạnh đó, tôi xin trân trọng gửi lời cảm ơn đến **Đảng ủy, Ban Tổng Giám đốc Trung tâm Nhiệt đới Việt-Nga, lãnh đạo Phân viện Công nghệ sinh học, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga**, cùng các đồng nghiệp và bạn bè đã nhiệt tình giúp đỡ, hỗ trợ tôi trong công tác thu thập và phân tích dữ liệu, góp phần quan trọng để hoàn thành của luận án này. Tôi đặc biệt biết ơn gia đình và những người thân yêu, những người đã luôn đồng hành, động viên và tiếp thêm động lực cho tôi trong suốt chặng đường nghiên cứu. Tôi xin cảm ơn sự tài trợ của Trung tâm Nhiệt đới Việt-Nga từ đề tài “Nghiên cứu ứng dụng công nghệ sinh học để cải tạo cát san hô thành đất canh tác bằng màng sinh học polysaccharide, vật liệu kết dính bentonite và vi sinh vật hữu ích” và nhiệm vụ: “Nghiên cứu đặc điểm di truyền chủng vi khuẩn chịu mặn có khả năng sinh exopolysaccharide phân lập từ đất đảo san hô Khánh Hòa, định hướng ứng dụng cho các vùng biển đảo” Mã số SH.Đ2.06/25.

Hà Nội, ngày 10 tháng 11 năm 2025

Tác giả luận án



Lê Thị Huệ

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC.....	iii
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	vi
DANH MỤC HÌNH	vii
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT	x
MỞ ĐẦU.....	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	5
1.1. Tổng quan về đất khô hạn, mặn.....	5
1.1.1. Đặc điểm và tình hình của đất khô hạn, mặn trên thế giới.....	5
1.1.2. Nguyên nhân gây ra đất khô hạn, mặn	7
1.1.3. Tác động tiêu cực của đất khô hạn, mặn đến môi trường và nông nghiệp	8
1.2. Tình hình đất khô hạn, mặn ở Việt Nam	8
1.2.1. Tình hình chung về đất khô hạn, mặn ở Việt Nam.....	8
1.2.2. Điều kiện tự nhiên và thổ nhưỡng tại Trường Sa	9
1.3. Tổng quan về các phương pháp cải tạo đất khô hạn, mặn	13
1.3.1. Các biện pháp cơ học	13
1.3.2. Các biện pháp sinh học và ứng dụng công nghệ sinh học.....	13
1.3.3. Các biện pháp hóa lý	14
1.3.4. Các biện pháp kết hợp khác.....	15
1.3.5. Tình trạng ứng dụng các phương pháp cải tạo đất ở Việt Nam.....	16
1.4. Tổng quan về vi khuẩn chịu mặn, sinh exopolysaccharide và ứng dụng trong cải tạo đất khô hạn mặn	17
1.4.1. Sơ lược về vi khuẩn chịu mặn	17
1.4.2. Sơ lược về vi khuẩn sinh exopolysaccharide	18
1.4.3. Cơ chế sinh tổng hợp exopolysaccharide ở vi khuẩn chịu mặn	19
1.4.4. Vai trò của vi khuẩn chịu mặn, sinh exopolysaccharide trong cải tạo đất khô hạn mặn	25
1.5. Giải trình tự toàn bộ hệ gen.....	27
1.5.1. Giới thiệu chung về công nghệ giải trình tự toàn bộ hệ gen	27
1.5.2. Ứng dụng công nghệ giải trình tự toàn bộ hệ gen trong nghiên cứu vi khuẩn sinh exopolysaccharide.....	28
1.5.3. Ứng dụng công nghệ giải trình tự toàn bộ hệ gen trong nghiên cứu vi khuẩn chịu mặn	29

1.5.4. Tình hình nghiên cứu và ứng dụng công nghệ giải trình tự toàn bộ hệ gen tại Việt Nam	30
CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	32
2.1. Vật liệu nghiên cứu.....	32
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu.....	32
2.1.2. Thiết bị, hóa chất	32
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	32
2.2.1. Phương pháp lấy mẫu đất	32
2.2.2. Nhóm phương pháp vi sinh	33
2.2.3. Phương pháp phân loại vi khuẩn	38
2.2.4. Phương pháp giải trình tự toàn bộ hệ gen	39
2.2.5. Phân tích tin sinh học dữ liệu giải trình tự toàn bộ hệ gen.....	40
2.2.6. Nhóm phương pháp hóa sinh	41
2.2.7. Nhóm phương pháp thử nghiệm.....	46
2.2.8. Phân tích thống kê	50
2.2.9. Sơ đồ nghiên cứu tổng quát trong Luận án	50
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	52
3.1. Phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn bản địa từ Trường Sa có khả năng chịu mặn và sinh exopolysaccharide	52
3.1.1. Kết quả phân lập, sàng lọc các chủng vi khuẩn chịu mặn, sinh exopolysaccharide	52
3.1.2. Kết quả tuyển chọn chủng vi khuẩn chịu mặn, có khả năng sinh tổng hợp exopolysaccharide hàm lượng cao	53
3.1.3. Kết quả định danh chủng vi khuẩn chịu mặn, sinh exopolysaccharide hàm lượng cao	54
3.1.4. Một số đặc tính sinh học của chủng DTA1	56
3.2.1. Kết quả kiểm tra chất lượng DNA geneome chủng DTA1	60
3.2.2. Đặc điểm chung của bộ gen chủng DTA1	61
3.2.3. Phân tích phát sinh loài và xác định vị trí phân loại của chủng DTA1 ..	63
3.2.4. Hệ thống vận chuyển đường của <i>B. velezensis</i> DTA1	64
3.2.5. Con đường sinh tổng hợp đường nucleotide của <i>B. velezensis</i> DTA1 ..	66
3.2.6. Con đường sinh tổng hợp exopolysaccharide ở <i>Bacillus velezensis</i> DTA1	69
3.2.7. Các gen liên quan tới khả năng chống chịu stress ở <i>B. velezensis</i> DTA1	74

3.3. Nghiên cứu môi trường và điều kiện nuôi cấy thu nhận exopolysaccharide từ chủng <i>B. velezensis</i> DTA1	77
3.3.1. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của từng yếu tố môi trường và điều kiện nuôi cấy tới khả năng sinh exopolysaccharide	77
3.3.2. Tối ưu khả năng sinh exopolysaccharide bằng phương pháp đáp ứng bề mặt.....	85
3.3.3. Ảnh hưởng của một số nguồn đường đến thành phần monosaccharide trong exopolysaccharide của <i>B. velezensis</i> DTA1.....	89
3.4. Tinh sạch và xác định cấu trúc exopolysaccharide từ chủng <i>Bacillus velezensis</i> DTA1	92
3.4.1. Tinh sạch exopolysaccharide.....	92
3.4.2. Kết quả chụp SEM cấu trúc bề mặt exopolysaccharide	93
3.4.3. Ước lượng khối lượng phân tử exopolysaccharide	94
3.4.4. Thành phần monosaccharide của exopolysaccharide.....	95
3.4.5. Kết quả phân tích các nhóm chức qua phổ FT-IR	97
3.5. Đánh giá khả năng giữ nước và giảm mặn của EPSDTA1	99
3.5.1. Đánh giá khả năng hấp phụ muối, kim loại của EPSDTA1	99
3.5.2. Nghiên cứu khả năng giữ nước của EPSDTA1 và chủng <i>Bacillus velezensis</i> DTA1 trên cát san hô Trường Sa.....	105
3.6. Thử nghiệm hiệu quả cải tạo cát san hô thành đất canh tác của chủng <i>B. velezensis</i> DTA1 ở quy mô chậu vại	109
3.6.1. Xác định khả năng sinh exopolysaccharide và tạo kết tụ trong đất	109
3.6.2. Đánh giá khả năng giữ nước của đất tại thời điểm thu hoạch rau.....	112
3.6.3. Đánh giá khả năng giảm mặn của đất sau thu hoạch rau	113
3.6.4. Đánh giá một số chỉ tiêu sinh trưởng của rau mùng tơi	114
3.6.5. Đánh giá chỉ số SPAD	116
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	120
KẾT LUẬN	120
KIẾN NGHỊ.....	120
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN.....	121
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	122
DANH MỤC CÁC PHỤ LỤC.....	1

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1. Phân loại đất bị mặn	6
Bảng 2.1. Thiết kế các thí nghiệm Box-Benhken 3 yếu tố	36
Bảng 2.2. Yêu cầu chất lượng DNA	39
Bảng 3.1. Các chủng vi khuẩn có khả năng sinh nhầy từ 9 mẫu đất đảo Trường Sa	52
Bảng 3.2. Bảng mô tả các đặc điểm khuẩn lạc và tế bào của 4 chủng vi khuẩn chọn lọc	54
Bảng 3.3. Kết quả kiểm tra khả năng sử dụng các nguồn carbon của <i>B. velezensis</i> DTA1 sử dụng kit API® 50CHB	57
Bảng 3.4. Khả năng chịu mặn (NaCl/MgSO ₄) và kim loại nặng (Cd, Hg, Cr, Co, As, Pb, Zn, Fe) của chủng <i>B. velezensis</i> DTA1	58
Bảng 3.5. Kết quả kiểm tra e DNA gene omcH của chủng DTA1 tách chiết được	60
Bảng 3.6. Đặc điểm chung của bộ gen lắp ráp của <i>B. velezensis</i> DTA1	61
Bảng 3.7. Các gen liên quan đến hệ thống vận chuyển permease và hệ thống ABC (ATP-binding cassette) trong <i>B. velezensis</i> DTA1	64
Bảng 3.8. Các gen liên quan đến hệ thống PTS ở <i>B. velezensis</i> DTA1	65
Bảng 3.9. Các enzyme chính của quá trình tổng hợp đường nucleotide của <i>B. velezensis</i> DTA1 được chú thích trong cơ sở dữ liệu KEGG	67
Bảng 3.10. Vị trí của các gen trong cụm gen sinh tổng hợp liên quan đến các con đường sinh tổng hợp EPS ở <i>B. velezensis</i> DTA1	72
Bảng 3.11. Các gen liên quan đến phản ứng chống stress ở <i>B. velezensis</i> DTA1	74
Bảng 3.12. Ma trận thực nghiệm Box-Benhken 3 yếu tố và hàm lượng EPS thực tế	86
Bảng 3.13. Kết quả ANOVA về ý nghĩa của mô hình bậc hai mô tả tác động tương tác của nồng độ NaCl, pH và nồng độ sucrose lên hàm lượng EPS	86
Bảng 3.14. Đặc điểm của EPS từ các chủng <i>Bacillus velezensis</i>	89
Bảng 3.15. Hàm lượng carbohydrate và protein tổng số trong EPS DTA1 tinh sạch	93
Bảng 3.16. Cấu trúc hóa học của các thành phần monnosaccharide trong EPS DTA1 từ điều kiện nuôi cấy tối ưu	96
Bảng 3.17. Ảnh hưởng của điều kiện stress muối và/hoặc kim loại nặng đến sự phát triển và sinh tổng hợp EPS của chủng <i>B. velezensis</i> DTA1	100
Bảng 3.18. Kết quả đánh giá khả năng hấp phụ muối của EPS DTA1	104
Bảng 3.19. Kết quả phân tích một số chỉ tiêu rau mồng tơi ở 7 thí nghiệm đánh giá khả năng giữ nước và giảm mặn của vi khuẩn sinh EPS trên quy mô chậu vại	116

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Bản đồ phân bố của các vùng dựa trên chỉ số khô hạn toàn cầu.....	5
Hình 1.2. Bản đồ toàn cầu về sự phân bố của đất mặn, đất kiềm và đất mặn–kiềm..	7
Hình 1.3. Phân loại cấu trúc của exopolysaccharide.....	20
Hình 1.4. Tổng quan chung về 4 con đường sinh tổng hợp EPS ở vi khuẩn.	20
Hình 1.5. Các con đường sinh tổng hợp đường nucleotide (GDP-mannose và UDP-glucose) để sản xuất EPS ở <i>Geobacillus</i> sp. WSUCF1 suy ra từ dữ liệu trình tự bộ gen	22
Hình 2.1. Hình ảnh kéo dài thành sợi >5mm theo phương pháp thử kéo sợi	33
Hình 2.2. Quy trình phân tích tin sinh hệ gen chủng vi khuẩn bao gồm các bước từ xử lý dữ liệu trình tự thô, lắp ráp hệ gen, xây dựng cây phân tích phả hệ, đến chú thích các gen chức năng	40
Hình 2.3. Đồ thị đường chuẩn D-glucose (a) và BSA (b).....	43
Hình 2.4. Phương pháp đo khả năng giữ nước theo lý thuyết (a) [124] và thực nghiệm tiến hành (b)	48
Hình 2.5. Sơ đồ nghiên cứu tổng quát trong Luận án	51
Hình 3.1. Biểu đồ đánh giá khả năng sinh trưởng, sinh EPS của các chủng tuyển chọn sau 48 giờ nuôi lắc trong môi trường LB có bổ sung NaCl 3%.....	53
Hình 3.2. Cây phân tích phả hệ được xây dựng từ trình tự gen 16S rRNA của chủng TSD5, DTA1, TSL5 và TSL6 và các chủng liên quan trên GenBank.....	55
Hình 3.3. (a) Bản đồ bộ gen nháp của <i>B. velezensis</i> DTA1 với kích thước bộ gen 3,9Mb. (b) Sự phân bố của các gen mã hóa của <i>B. velezensis</i> DTA1 trong các nhóm gen chức năng COG.	62
Hình 3.4. Cây phân loại dựa trên trình tự core genome giữa chủng DTA1 (*) và 19 chủng có quan hệ gần gũi thuộc chi <i>Bacillus</i> được xây dựng bằng công cụ chú thích PATRIC. So sánh trình tự thực hiện bởi MAFFT và cây phân loại được xây dựng với RAXML	64
Hình 3.5. Con đường sinh tổng hợp nucleotide–đường của <i>B. velezensis</i> DTA1.....	69
Hình 3.6. Các cụm gen liên quan đến các con đường sinh tổng hợp EPS đã được phát hiện trong <i>B. velezensis</i> DTA1	71
Hình 3.7. Khả năng sinh trưởng (OD600) và sinh EPS của <i>B. velezensis</i> DTA1 trên 6 môi trường khảo sát.....	77
Hình 3.8. Tác động của 13 nguồn carbon đối với giá trị OD600 và sản xuất EPS ở chủng <i>B. velezensis</i> DTA1	78
Hình 3.9. Khả năng sinh trưởng (OD600) và sản xuất EPS của chủng <i>B. velezensis</i> DTA1 khi bổ sung hàm lượng sucrose 0,5–10%	79

Hình 3.10. Kết quả khảo sát khả năng sinh trưởng (OD600) và sinh EPS của chủng <i>B. velezensis</i> DTA1 khi không bổ sung (đối chứng) và bổ sung 5 nguồn nitơ khác nhau	80
Hình 3.11. Kết quả khảo sát khả năng sinh trưởng (OD600) và sinh EPS của chủng <i>B. velezensis</i> DTA1 khi không bổ sung (đối chứng) và bổ sung 4 nguồn muối khoáng	81
Hình 3.12. Ảnh hưởng của nồng độ NaCl (0,25–15%) đến sự tăng trưởng và sinh tổng hợp EPS của chủng <i>B. velezensis</i> DTA1	81
Hình 3.13. Khả năng sinh trưởng (OD600) và sinh EPS của chủng <i>B. velezensis</i> DTA1 khi khảo sát ở các độ pH từ 4–11	82
Hình 3.14. Khả năng sinh trưởng (OD600) và sinh EPS của chủng <i>B. velezensis</i> DTA1 khi khảo sát tốc độ lắc từ 100–250 rpm	83
Hình 3.15. Khả năng sinh trưởng (OD600) và sinh EPS của chủng <i>B. velezensis</i> DTA1 khi khảo sát nhiệt độ nuôi cấy từ 5–57 °C	84
Hình 3.16. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến khả năng sinh trưởng (OD600) và sinh EPS của chủng <i>B. velezensis</i> DTA1	84
Hình 3.17. Ảnh hưởng của tỉ lệ tiếp giống đến khả năng sinh trưởng (OD600) và sinh EPS của chủng <i>B. velezensis</i> DTA1	85
Hình 3.18. Biểu diễn bề mặt đáp ứng minh họa mối tương quan giữa nồng độ NaCl và pH (A); Nồng độ NaCl (g/L) và nồng độ sucrose (g/L) (B); pH và nồng độ sucrose (g/L) (C) đối với hàm lượng EPS	87
Hình 3.19. Hàm kỳ vọng và điều kiện tối ưu lên men thu EPS từ chủng <i>B. velezensis</i> DTA1	88
Hình 3.20. Hàm lượng carbohydrate trong các phân đoạn tinh sạch EPS qua cột Sephadex G75	92
Hình 3.21. Hình ảnh chụp SEM ở độ phóng đại $\times 500$ (A) và $\times 1000$ (B) của mẫu EPSDTA1 tinh sạch	93
Hình 3.22. Sự phụ thuộc của độ nhớt rút gọn η_{red} vào nồng độ EPS trong dung dịch NaNO_3 0,1 M, ở 25 °C	94
Hình 3.23. Kết quả phân tích HPLC của các mẫu monnosaccharide chuẩn (a) và mẫu thủy phân EPS của chủng <i>Bacillus velezensis</i> DTA1 từ điều kiện nuôi cấy tối ưu ..	95
Hình 3.24. Phổ FTIR với các nhóm chức năng chính của EPSDTA1 tinh sạch	97
Hình 3.25. Thế zeta của EPSDTA1 tách chiết từ điều kiện nuôi cấy tối ưu	99
Hình 3.26. Hình ảnh chụp SEM mẫu EPSDTA1 tách chiết từ điều kiện nuôi cấy (i)-không có NaCl (A) và (ii)-có bổ sung 3% NaCl (B) ở độ phóng đại $700\times$	101

Hình 3.27. Kết quả phân tích phổ EDS để xác định thành phần nguyên tố của EPSDTA1 tách từ môi trường (i)-không có NaCl (A) và (ii)-có bổ sung 3% NaCl (B)	102
Hình 3.28. Kết quả phân tích phổ EDS của EPSDTA1 từ môi trường (iii) (A) và môi trường (iv) (B)	103
Hình 3.29. Hình ảnh (A) và đồ thị (B) khả năng giữ nước của EPSDTA1 sau 1-4 giờ ngâm nước. Các giá trị được trình bày dưới dạng trung bình $\pm$ SD; n = 3	105
Hình 3.30. Tốc độ thoát nước (A); WHC (B); hình ảnh các mẫu thí nghiệm sau 2 giờ ngâm mẫu đất trong nước (C) và sau khi lọc nước trên phễu (D); và hình ảnh SEM bề mặt của 5 mẫu đất sau khi thử nghiệm (E) bằng phương pháp đếm giọt.....	107
Hình 3.31. Hàm lượng carbohydrate (a) và hình ảnh phản ứng màu trong quá trình đo (b) ở 7 lô đất thử nghiệm quy mô chậu vại	110
Hình 3.32. Hình ảnh bề mặt 7 mẫu đất thí nghiệm sau thu hoạch rau mồng tơi ở quy mô chậu vại dưới kính hiển vi soi nổi SMZ12701 (Nikson, Nhật Bản), độ phóng đại 10 $\times$	111
Hình 3.33. Độ ẩm đất sau 0; 24 và 72 giờ tưới nước của 7 lô thí nghiệm trong thử nghiệm trồng cây quy mô chậu vại	112
Hình 3.34. Hàm lượng muối trong đất ở các lô TN1, TN6 và TN7 trong thí nghiệm trồng cây trong chậu vại.....	113
Hình 3.35. Hình ảnh các chậu cây rau mồng tơi ở 7 lô thí nghiệm sau 30 ngày trồng thử nghiệm: ảnh chụp ngang (a), chụp từ trên xuống (b) và hình ảnh toàn bộ cả cây sau khi nhổ ra khỏi chậu (c)	115

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

STT	Tên viết tắt	Tên Tiếng Anh	Tên Tiếng Việt
1	ABC	ATP-binding cassette	Băng vận chuyển gắn ATP
2	ANOVA	Analysis of variance	Phân tích phương sai
3	AI	Aridity index	Chỉ số khô hạn
4	ATP	Adenosine triphosphate	Phân tử năng lượng cao
5	BĐKH		Biến đổi khí hậu
6	bp	Base pair	Cặp bazơ
7	BSA	Bovine serum albumin	Albumin huyết thanh bò
8	CDS	Coding sequences	Trình tự mã hóa protein
9	CEC	Cation exchange capacity	Khả năng trao đổi cation
10	COG	Clusters of orthologous groups of protein	Nhóm protein tương đồng có nguồn gốc chung
11	Da	Dalton	Đơn vị đo khối lượng nguyên tử
12	DIN	DNA integrity number	Chỉ số toàn vẹn DNA
13	dS/m	decisiemens per meter	Decisiemens trên mét, đơn vị đo độ dẫn điện
14	DTA	Da Tay A	Đảo Đá Tây A
15	dTDP	deoxythymidine diphosphate	Nucleotide chứa thymine gắn với 2 nhóm phosphate
16	ĐBSCL		Đồng bằng Sông Cửu Long
17	EC	Electrical conductivity	Độ dẫn điện
18	EDS/EDX	Energy-dispersive X-ray spectroscopy	Phổ tán sắc tia X theo năng lượng
19	EPS	Exopolysaccharide	Polysaccharide ngoại bào
20	EPSDTA1		EPS được sinh tổng hợp bởi chủng <i>B. velezensis</i> DTA1
21	ESP	Exchangeable sodium percentage	Phần trăm natri trao đổi
22	FT-IR	Fourier transform infrared	Phổ hồng ngoại biến đổi Fourier
23	GO	Gene ontology	Từ điển phân loại chức năng của gen và protein

24	GT	Glycosyltransferase	Enzyme chuyển gốc đường
25	HePS	Heteropolysaccharide	Polysaccharide được cấu tạo từ 2 hoặc nhiều loại monosaccharide khác nhau
26	HoPS	Homopolysaccharide	Polysaccharide được tạo thành từ một loại monosaccharide duy nhất
27	HPLC	High performance liquid chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
28	ISP2	International streptomyces project 2	Môi trường ISP2 (thuộc Dự án Quốc tế Streptomyces số 2)
29	kDa	kilodalton	ngàn dalton
30	KEGG	Kyoto encyclopedia of genes and genomes	Cơ sở dữ liệu sinh học về gen, protein và con đường chuyển hóa
31	LB	Luria broth	Môi trường Luria
32	meq	milliequivalent	Đơn vị đo điện tích ion
33	mV	millivolt	milivôn
34	NB	Nutrient broth	Môi trường dịch dinh dưỡng
35	NMR	Nuclear magnetic resonance	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân
36	OD600	Optical density at 600 nm	Mật độ quang học tại bước sóng 600 nm
37	OPX	Outer membrane polysaccharide export	Protein xuất polysaccharide qua màng ngoài
38	PCP	Polysaccharide co-polymerase protein	Protein đồng trùng hợp polysaccharide
39	PCR	Polymerase-chain-reaction	Phản ứng chuỗi polymerase
40	PTS	phosphotransferase	Enzyme chuyển nhóm phosphate
41	RSM	Response surface methodology	Phương pháp đáp ứng bề mặt
42	rRNA	ribosomal RNA	RNA ribosome
43	SEM	scanning electron microscope	Kính hiển vi điện tử quét
44	TB	Terrific broth	Môi trường dịch dinh dưỡng giàu chất

45	TCA	Trichloroacetic acid	
46	TCVN		Tiêu chuẩn Việt Nam
47	TN		Thí nghiệm
48	TSD	Truong Sa Dong	Trường Sa Đông
49	TSL	Truong Sa Lon	Trường Sa Lớn
50	UDP	Uridine diphosphate	Uridine gắn với 2 nhóm phosphate
51	YM	Yeast mannitol	Manitol cao nấm men
52	YMG	Yeast extract, pepton, malt extract, glucose	Cao nấm men, pepton, cao mạch nha, glucose
53	WGS	Whole-genome sequencing	Giải trình tự toàn bộ hệ gen
54	WHC	Water holding capacity	Khả năng giữ nước
55	SD	Standard deviation	Độ lệch chuẩn

MỞ ĐẦU

Quần đảo Trường Sa nằm tại vị trí trung tâm Biển Đông, giữ vai trò trọng yếu về địa chiến lược, quốc phòng và an ninh quốc gia. Với vị trí đặc biệt này, việc đảm bảo điều kiện sống ổn định cho lực lượng công tác và cư dân trên đảo là một nhiệm vụ rất thiết thực, góp phần duy trì sự ổn định và thúc đẩy phát triển bền vững tại khu vực tiền tiêu của Tổ quốc.

Những năm qua, nhiều chính sách của Đảng và Nhà nước đã được triển khai để hỗ trợ đời sống, trong đó có hoạt động phát triển nông nghiệp và cải thiện điều kiện tự nhiên cho sản xuất và sinh hoạt ở đảo. Tuy nhiên, dưới tác động ngày càng nghiêm trọng của biến đổi khí hậu (BĐKH), điều kiện tự nhiên tại khu vực này đang trở nên khắc nghiệt hơn với nhiệt độ cao kéo dài, gió mạnh, bão thường xuyên và đặc biệt là tình trạng khan hiếm nước ngọt. Những yếu tố này khiến đất cát san hô – loại đất chủ yếu trên đảo – càng khô cằn, nghèo dinh dưỡng, lại nhiễm mặn, gây khó khăn lớn cho hoạt động trồng trọt và phủ xanh đảo. Do đó, việc nghiên cứu và ứng dụng các giải pháp cải tạo loại đất đặc thù này thành đất nông nghiệp có khả năng canh tác bền vững trên các đảo là yêu cầu cấp thiết và có ý nghĩa thực tiễn sâu sắc.

Việc cải tạo đất cát san hô hiện đang là một thách thức lớn do cấu trúc vật lý của cát có kích thước hạt lớn, rời rạc, độ xốp cao, bị hạn chế trong việc duy trì độ ẩm và lưu giữ chất dinh dưỡng, hơn nữa còn nhiễm mặn. Do đó việc giảm mặn cho đất, tăng cường khả năng giữ nước và kết dính các hạt cấu thành trong đất là vô cùng quan trọng. Trước thực tế này, nhiều giải pháp sinh học thân thiện với môi trường đã và đang được ưu tiên nghiên cứu, bao gồm ứng dụng các chủng vi khuẩn có khả năng tổng hợp exopolysaccharide (EPS). EPS được tiết ra môi trường trong quá trình phát triển của vi sinh vật có đặc tính kết dính, giữ nước, tạo biofilm và đặc biệt là khả năng gắn kết với ion kim loại (trong đó có Na). Các đặc tính này giúp chủng vi sinh vật sinh EPS trở thành ứng viên tiềm năng trong việc cải thiện cấu trúc đất, tăng khả năng giữ ẩm và giảm tác động của muối đến thực vật. Qua đó chúng góp phần duy trì sự sống và phát triển của thực vật tại các hệ sinh thái ngoài đảo và ven biển.

Các nghiên cứu quốc tế gần đây đã làm sáng tỏ EPS từ vi khuẩn chịu mặn có khả năng bảo vệ tế bào khỏi stress thẩm thấu cao, đồng thời hấp phụ ion muối và giữ nước hiệu quả trong môi trường khô hạn. Tuy nhiên, tại Việt Nam, các công bố khai thác tiềm năng và ứng dụng vi khuẩn chịu mặn, sinh EPS trong cải tạo đất cát san hô kiềm mặn – một loại đất điển hình ở các đảo san hô xa bờ như Trường Sa – vẫn còn hạn chế. Trong khi đó, hệ vi sinh vật bản địa tại Trường Sa tiềm ẩn nhiều nguồn gen quý, gồm nhiều chủng vi khuẩn chịu mặn và có khả năng sản xuất EPS tự nhiên để thích nghi với môi trường khắc nghiệt nơi đây. Khai thác hiệu quả nguồn tài nguyên vi sinh vật đặc hữu

này có thể góp phần mở ra những hướng đi mới trong cải tạo đất và phát triển nông nghiệp bền vững tại các đảo xa bờ ở Việt Nam.

Xuất phát từ những cơ sở đó, luận án "**Nghiên cứu khả năng giữ ẩm và giảm mặn cho cát san hô bằng vi khuẩn chịu mặn, sinh EPS (exopolysaccharide) phân lập ở Trường Sa**" được thực hiện. Luận án tập trung vào việc phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn bản địa chịu mặn, có khả năng sinh EPS tại khu vực đảo san hô ở Trường Sa, nghiên cứu đặc điểm sinh học và di truyền của chúng, đồng thời đánh giá, chứng minh khả năng giữ nước và giảm mặn của EPS. Nghiên cứu cũng thử nghiệm đánh giá hiệu quả cải tạo đất cát san hô thành đất canh tác quy mô chậu vại tại nhà lưới, Học viện Nông nghiệp Việt Nam để khẳng định hiệu quả giữ nước, giảm mặn của chủng vi khuẩn sinh EPS tuyển chọn. Kết quả nghiên cứu không chỉ có ý nghĩa khoa học trong việc khai thác và ứng dụng tài nguyên vi sinh vật vùng biển đảo, mà còn góp phần đề xuất hướng tiếp cận mới, bền vững trong cải tạo đất ven biển và các đảo xa bờ, phục vụ cho nông nghiệp sinh thái và bảo đảm an ninh quốc gia.

MỤC TIÊU NGHIÊN CỨU

- 1. Phân lập, tuyển chọn và phân tích được đặc điểm hệ gen chủng vi khuẩn chịu mặn, sinh EPS từ Quần đảo Trường Sa.
- 2. Đánh giá được khả năng giữ nước và giảm mặn của EPS từ chủng vi khuẩn tuyển chọn.
- 3. Bước đầu đánh giá được tiềm năng ứng dụng của chủng vi khuẩn tuyển chọn trong việc cải tạo cát san hô ở quy mô chậu vại.

NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

1. Phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn bản địa từ Trường Sa có khả năng chịu mặn và sinh exopolysaccharide.
2. Giải trình tự hệ gen và dự đoán các con đường sinh tổng hợp exopolysaccharide và các gen liên quan đến khả năng chịu mặn ở chủng vi khuẩn tuyển chọn.
3. Nghiên cứu môi trường và điều kiện nuôi cấy thu nhận exopolysaccharide từ chủng vi khuẩn tuyển chọn.
4. Tinh sạch và xác định cấu trúc exopolysaccharide của chủng vi khuẩn tuyển chọn.
5. Đánh giá khả năng giữ nước và giảm mặn của exopolysaccharide từ chủng vi khuẩn tuyển chọn.
6. Thử nghiệm hiệu quả cải tạo cát san hô của chủng vi khuẩn chịu mặn, sinh exopolysaccharide ở quy mô chậu vại.

NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

1. Luận án là công trình nghiên cứu đầu tiên về chủng vi khuẩn bản địa Trường Sa *Bacillus velezensis* DTA1 từ cấp độ hệ gen đến đặc tính sinh học, khả năng chống chịu stress và tiềm năng ứng dụng đa dạng của chủng vi khuẩn trong cải tạo đất khô hạn, mặn, cũng như xử lý ô nhiễm kim loại nặng.

2. Phát hiện mới về cơ chế sinh tổng hợp EPS độc đáo: ở chủng *B. velezensis* DTA1, nguồn đường quyết định hàm lượng và cấu trúc EPS; đặc biệt, chỉ môi trường có sucrose mới kích hoạt đồng thời hai con đường (phụ thuộc Wzx/Wzy và levansucrase), tạo ra EPS chứa 5 loại monosaccharide – vượt trội so với 2–4 loại ở các chủng *B. velezensis* đã công bố..

3. Lần đầu tiên, luận án chứng minh chủng *B. velezensis* DTA1 chịu mặn, sinh EPS có khả năng cải thiện tính chất đất (giữ nước, kết tụ đất), nâng cao năng suất, chất lượng (qua chỉ số SPAD) và khả năng chịu mặn của rau mùng tơi, đặc biệt khi phối hợp với giá thể hữu cơ và bentonite.

Ý NGHĨA KHOA HỌC VÀ THỰC TIỄN CỦA LUẬN ÁN

Ý nghĩa khoa học:

- Luận án đã cung cấp một tập hợp dữ liệu khoa học tương đối đầy đủ về tiềm năng ứng dụng sinh học cao của 1 chủng vi khuẩn bản địa (*B. velezensis* DTA1), bao gồm: cấu trúc bộ gen, khả năng chịu mặn và kim loại nặng, đặc tính sinh tổng hợp EPS, cũng như hiệu quả cải tạo cát san hô. Từ đó, luận án đã làm rõ mối liên hệ giữa đặc tính di truyền của vi khuẩn; cấu trúc EPS; và hiệu quả sinh học trong môi trường đất, làm tiền đề cho các nghiên cứu kế tiếp sâu hơn về cơ chế giữ nước, kết tụ đất, hấp phụ muối và kim loại nặng trong đất.

- Bên cạnh giá trị học thuật, nghiên cứu đã bổ sung vào tri thức toàn cầu liên quan đến vi khuẩn biển đảo chịu mặn, sinh EPS, qua đó cung cấp các minh chứng khoa học cụ thể về tiềm năng ứng dụng các chủng này trong cải tạo các vùng đất hoang hóa, mặn và khô hạn – một vấn đề cấp thiết trong bối cảnh BĐKH và suy thoái đất toàn cầu ngày càng phức tạp.

Ý nghĩa thực tiễn:

- Nghiên cứu đã xác định và cung cấp một chủng vi khuẩn an toàn cấp 1 (*Bacillus velezensis* DTA1) có khả năng sinh EPS hiệu quả và thích nghi cao với môi trường biển đảo khắc nghiệt. Đây là tiền đề để phát triển các chế phẩm vi sinh thân thiện môi trường, ứng dụng trong cải tạo đất cát san hô tại Trường Sa và các vùng đất mặn ven biển khác. Việc sử dụng EPS từ chủng vi khuẩn này giúp hạn chế sự phụ thuộc vào các vật liệu giữ nước và hóa chất cải tạo đất, hướng đến các giải pháp sinh học bền vững thích ứng với điều kiện tài nguyên tại chỗ ở các đảo xa bờ. Đồng thời, giải pháp này cho thấy triển

vọng nâng cao hiệu quả sản xuất nông nghiệp, đảm bảo an ninh sinh kế tại các đảo tiền tiêu của đất nước.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

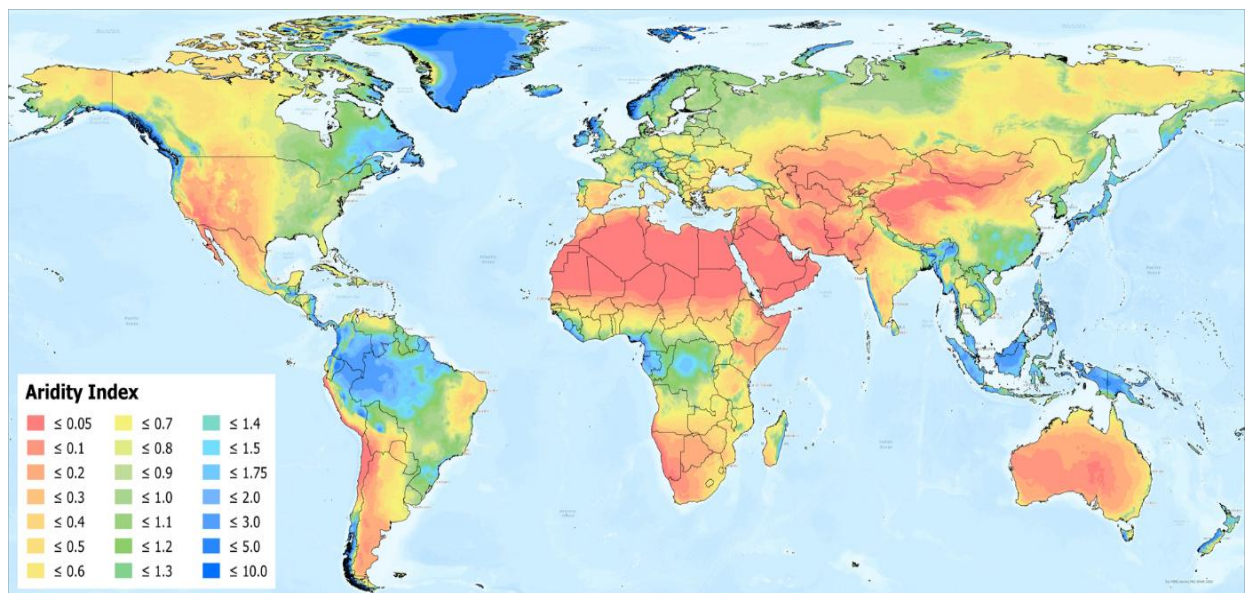
1.1. Tổng quan về đất khô hạn, mặn

1.1.1. Đặc điểm và tình hình của đất khô hạn, mặn trên thế giới

Một trong những tác động đáng lo ngại của biến đổi khí hậu toàn cầu là sự mở rộng nhanh của các vùng đất khô hạn, mặn, làm thay đổi cấu trúc và độ phì nhiêu của đất, ảnh hưởng nghiêm trọng đến năng suất nông nghiệp và cân bằng sinh thái. Hiện tượng này đang trở thành thách thức lớn đối với nhiều quốc gia, đặc biệt ở các vùng ven biển và hải đảo, nơi quá trình xâm nhập mặn và thoái hóa đất diễn ra ngày càng mạnh mẽ.

1.1.1.1. Đất khô hạn

Theo định nghĩa của Chương trình Môi trường Liên Hợp Quốc (United Nations Environment Programme – UNEP), các vùng đất khô hạn (drylands) được xác định dựa trên chỉ số khô hạn (aridity index – AI), là tỷ số giữa lượng mưa trung bình năm và lượng bốc hơi tiềm năng. Khi giá trị AI nhỏ hơn 0,65, khu vực đó được xem là đất khô hạn, phản ánh sự mất cân bằng nghiêm trọng giữa lượng nước nhận được và lượng nước mất đi do bốc hơi và thoát hơi nước. Dựa trên giá trị AI, UNEP (1997) phân chia các vùng đất khô hạn thành bốn nhóm chính: đất cực khô hạn (hyper-arid lands, $AI < 0,03$), đất khô hạn (arid lands, $0,03 \leq AI < 0,20$), đất bán khô hạn (semi-arid lands, $0,20 \leq AI < 0,50$), và đất khô bán ẩm (dry sub-humid lands, $0,50 \leq AI < 0,65$). Phân loại này được sử dụng rộng rãi trong các nghiên cứu môi trường và địa sinh học nhằm đánh giá mức độ khô hạn và tiềm năng suy thoái đất tại các khu vực khác nhau trên thế giới [1].



Hình 1.1. Bản đồ phân bố của các vùng dựa trên chỉ số khô hạn toàn cầu. Các vùng AI cao (màu xanh lá cây/xanh lam) biểu thị điều kiện ẩm ướt hơn, trong khi AI thấp (màu vàng/nâu/đỏ) biểu thị độ khô hạn cao hơn (2023) [2]

Đặc điểm chung của các vùng đất khô hạn là lượng mưa thấp, phân bố không đều, bốc hơi mạnh, thường xuyên xảy ra hạn hán và nhiệt độ khắc nghiệt. Những điều kiện này là rào cản lớn đối với phát triển nông nghiệp do thiếu độ ẩm đất và khan hiếm nguồn nước tưới, đồng thời khiến đất dễ bị suy thoái và sa mạc hóa [3]. Các loại đất này thường là đất cát và bản chất là đất mặn, có độ phì nhiêu thấp do nghèo chất hữu cơ, kết cấu rời rạc, dễ bị xói mòn bởi gió và nước. Ước tính, các vùng đất khô hạn chiếm khoảng 40% diện tích bề mặt Trái đất, tương ứng với khoảng 6.310 triệu ha, phân bố chủ yếu ở Châu Phi, Châu Á và Châu Đại Dương. Những vùng đất này là nơi sinh sống của khoảng 38% dân số toàn cầu [3].

1.1.1.2. Đất mặn

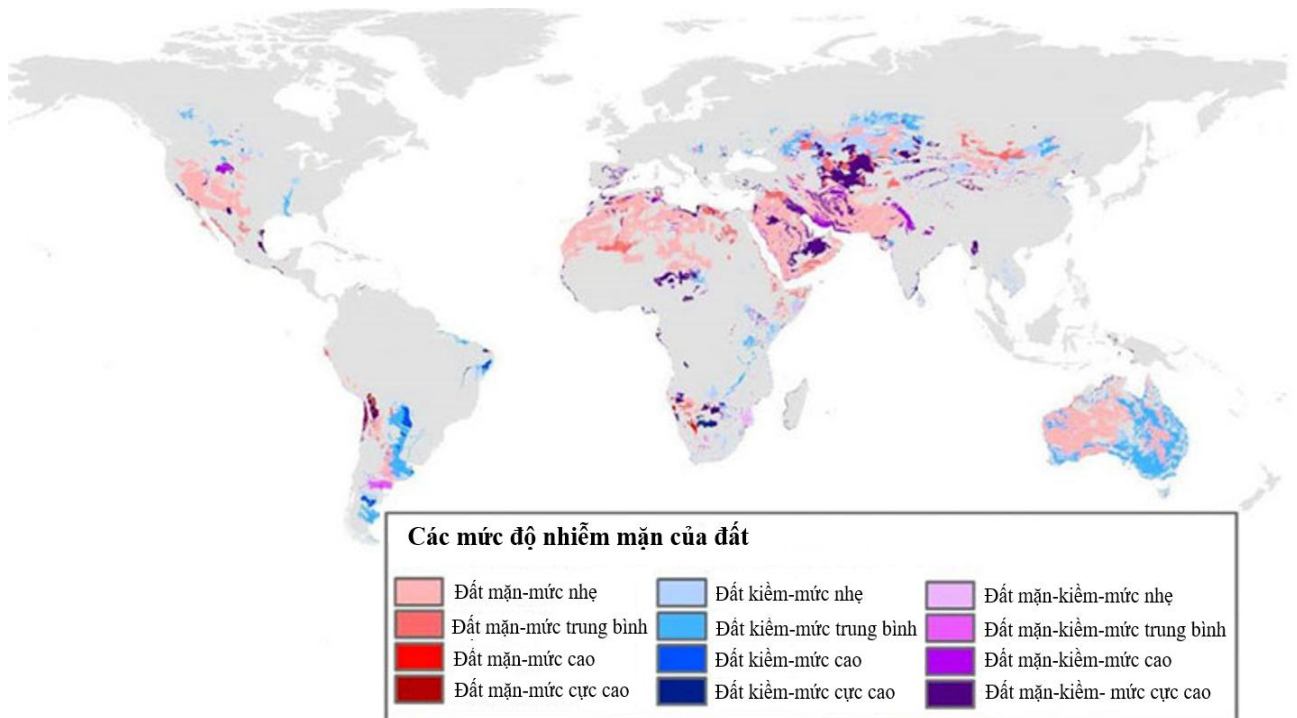
Đất nhiễm mặn bao gồm ba nhóm chính: đất mặn, đất kiềm và đất mặn-kiềm. Các loại đất này đặc trưng bởi nồng độ muối cao, giá trị pH cao và hàm lượng natri trao đổi lớn. Cụ thể, đất mặn có độ dẫn điện (EC – *electrical conductivity*) của dung dịch chiết bão hòa >4 dS/m, tỷ lệ phần trăm natri trao đổi (*exchangeable sodium percentage* – ESP) <15 và pH $<8,5$. Ngược lại, đất kiềm có EC <4 dS/m, ESP >15 và pH $>8,5$ (Bảng 1.1) [4, 5]. ESP là chỉ số phản ánh mức độ kiềm hóa do natri, tác động đến đặc tính hóa lý của đất và hiệu quả hấp thu dinh dưỡng của cây trồng. Khi ESP vượt quá 15%, đất được coi là bị sodic hóa – một dạng suy thoái đất nghiêm trọng.

Bảng 1.1. Phân loại đất bị mặn [4]

Phân loại	Các thông số đất		
	EC (dS/m)	ESP	pH
Đất mặn	>4	<15	$<8,5$
Đất kiềm	<4	>15	$>8,5$
Đất mặn-kiềm	>4	>4	$>8,5$

Quá trình đất nhiễm mặn và nhiễm kiềm chủ yếu đặc trưng cho các vùng đất khô hạn [6] (Hình 1.2). Phạm vi các vùng đất này đang ngày càng mở rộng trên toàn cầu, chủ yếu do BĐKH, nhiệt độ tăng, và tần suất cũng như cường độ hạn hán ngày càng tăng – kể cả ở những khu vực có khí hậu ẩm trước đây. Những yếu tố này góp phần làm cho tình trạng nhiễm mặn và kiềm hóa đất trở thành một thách thức toàn cầu.

Độ mặn của đất là do sự gia tăng nồng độ muối hòa tan trong nước, bao gồm các ion như natri (Na^+), kali (K^+), clorua (Cl^-) và sunfat (SO_4^{2-}). Trong đó, K^+ và SO_4^{2-} có thể đóng vai trò là chất dinh dưỡng đối với cây, trong khi Na^+ và Cl^- thường không được xem là dinh dưỡng thiết yếu. Do vậy, khi đề cập đến độ mặn của đất thường tập trung vào 2 ion chính là Na^+ và Cl^- . Độ kiềm của đất được hiểu là sự dư thừa Na^+ trong số các cation trao đổi của dung dịch đất [7].



Hình 1.2. Bản đồ toàn cầu về sự phân bố của đất mặn, đất kiềm và đất mặn–kiềm [6]

Độ mặn và độ kiềm trực tiếp ảnh hưởng tiêu cực đến sự phát triển của thực vật thông qua việc làm suy giảm khả năng hấp thụ nước, dinh dưỡng, và gây độc ion cho cây trồng. Ngoài ra, chúng còn ảnh hưởng gián tiếp đến các tính chất vật lý của đất, góp phần làm suy thoái cấu trúc và giảm độ phì nhiêu đất [8].

1.1.2. Nguyên nhân gây ra đất khô hạn, mặn

Đất nhiễm mặn và khô hạn là hệ quả của các yếu tố tự nhiên và nhân sinh, đây là một thách thức lớn đối với nông nghiệp toàn cầu, nhất là ở các nước đang phát triển.

Về nguyên nhân tự nhiên, các yếu tố chính gồm: (i) do sự phong hóa khoáng vật sơ cấp, giải phóng ion hòa tan như Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} ; (ii) sự lắng đọng muối từ hơi nước biển và muối do gió mang vào đất liền; (iii) sự dâng cao mực nước biển gây xâm nhập mặn vào sông ngòi và tầng nước ngầm, đặc biệt trầm trọng tại các đảo và vùng ven biển chịu ảnh hưởng của BĐKH toàn cầu [6]. Trong điều kiện khô hạn và bán khô hạn, các ion này không được rửa trôi mà tích tụ, hình thành khoáng muối thứ cấp như CaCO_3 , $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Na_2CO_3 , Na_2SO_4 hay NaCl – thành phần muối hòa tan phổ biến gây mặn hóa đất [9].

Ở nguyên nhân nhân sinh, việc sử dụng nước tưới kém chất lượng trong điều kiện khô hạn, cùng với việc lạm dụng phân bón hóa học, thuốc bảo vệ thực vật và hạn chế trong hệ thống thoát nước là những tác nhân chính làm gia tăng tích lũy muối ở tầng đất mặt [6]. Quá trình bốc hơi mạnh trong khí hậu khô hạn càng làm cô đặc dung dịch đất, gia tăng tỷ lệ Na^+ thay thế Ca^{2+} và Mg^{2+} trong phức hệ hấp phụ, dẫn đến sodic hóa và suy thoái cấu trúc đất [10].

Như vậy, đất khô hạn và mặn là kết quả của sự tương tác phức tạp giữa các yếu tố khí hậu, địa chất và tác động của con người. Sự suy thoái này làm giảm đáng kể khả năng giữ nước, tích lũy dinh dưỡng và độ phì nhiêu của đất, đồng thời thúc đẩy quá trình sa mạc hóa, gây tổn hại nghiêm trọng đến năng suất cây trồng và an ninh lương thực toàn cầu. Ước tính, mỗi ngày có hơn 14 km² đất canh tác bị suy giảm do quá trình mặn hóa [11].

1.1.3. Tác động tiêu cực của đất khô hạn, mặn đến môi trường và nông nghiệp

Đất là nguồn tài nguyên thiết yếu cho an ninh lương thực toàn cầu, với nhu cầu ngày càng tăng khi dân số dự kiến vượt 9,8 tỷ người vào năm 2050 [12]. Tuy nhiên, sự tích tụ muối trong đất làm suy giảm độ phì nhiêu, gây thoái hóa đất và đe dọa năng suất nông nghiệp cũng như cân bằng sinh thái [13].

Khi muối tích lũy ở vùng rễ hoặc tầng đất mặt, các đặc tính vật lý – hóa học bị biến đổi, dẫn đến giảm khả năng giữ và cung cấp nước, tăng dòng chảy bề mặt và xói mòn. Điều kiện khô hạn làm tăng áp suất thẩm thấu đất, hạn chế hấp thu nước và làm giảm sinh trưởng, cũng như năng suất cây trồng [14]. Hàm lượng Na⁺ cao còn gây phân tán keo đất, làm giảm tính thấm, tăng nguy cơ úng và thiếu oxy cho rễ [10]. Đồng thời, Na⁺ cạnh tranh với K⁺ và NH₄⁺, còn Cl⁻ cạnh tranh với NO₃⁻ trong quá trình hấp thu, làm giảm hiệu quả dinh dưỡng [15]. Sự tích tụ ion độc như Na⁺ và Cl⁻ trong mô lá gây biểu hiện cháy mép, khô lá, biến dạng hình thái và giảm khả năng quang hợp [6].

Mức độ ảnh hưởng đến cây trồng phụ thuộc vào ngưỡng mặn: < 2 dS/m, gần như không ảnh hưởng; 2 – 4 dS/m, ảnh hưởng đến các cây nhạy cảm; 4 – 8 dS/m, ảnh hưởng đến phần lớn cây trồng; > 16 dS/m, hầu hết cây không thể sinh trưởng [4]. Ngoài nồng độ mặn, mức độ phản ứng của cây còn chịu chi phối bởi loài cây, giai đoạn sinh trưởng, đặc điểm đất và điều kiện khí hậu.

Trên phạm vi toàn cầu, đất nhiễm mặn hiện ảnh hưởng đến hơn 1 tỷ ha tại hơn 100 quốc gia, và được dự báo có thể chiếm tới 50% diện tích đất canh tác vào năm 2050 [16]. Đây là thách thức hàng đầu đối với nông nghiệp bền vững và an ninh lương thực thế giới.

1.2. Tình hình đất khô hạn, mặn ở Việt Nam

1.2.1. Tình hình chung về đất khô hạn, mặn ở Việt Nam

Việt Nam sở hữu đường bờ biển trải dài khoảng 3.260 km từ Bắc vào Nam, với hơn 3.000 đảo ven bờ cũng như ngoài khơi, tạo lợi thế đáng kể để thúc đẩy các hoạt động kinh tế biển, giao thương và đảm bảo quốc phòng. Tuy nhiên, đặc điểm địa lý này cũng khiến Việt Nam thuộc nhóm các nước chịu ảnh hưởng nặng nề của BĐKH và thời tiết cực đoan. Cụ thể Việt Nam đứng thứ 6 trong 10 nước dễ bị tổn thất nhất trước BĐKH và rủi ro thiên tai toàn cầu [17]. Ước tính, khi mực nước biển dâng lên 1 m, Việt Nam

có thể mất khoảng 5% diện tích đất nông nghiệp, gây thiệt hại đến 7% giá trị sản xuất nông nghiệp, tác động đến 11% dân số và làm giảm khoảng 10% GDP quốc gia [18].

BĐKH ở Việt Nam đang ngày càng phức tạp, biểu hiện rõ qua xu thế tăng của nhiệt độ trung bình năm, sự biến động bất thường về lượng mưa, tình trạng mặn hóa, mực nước biển dâng và sự gia tăng tần suất của các hiện tượng thời tiết cực đoan như hạn hán, nắng nóng, bão nhiệt đới và ngập lụt [19]. Những yếu tố này làm gia tăng nguy cơ suy thoái đất, đặc biệt là quá trình mặn hóa và khô hạn ở các khu vực ven biển.

Theo thống kê, Việt Nam có khoảng 1 triệu ha diện tích đất nhiễm mặn, chiếm gần 3% tổng diện tích đất của cả nước. Khu vực chịu tác động lớn nhất là vùng Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL), nơi xâm nhập mặn diễn ra thường xuyên với mức độ nghiêm trọng. Ngoài ra, các tỉnh ven biển miền Trung (Quảng Bình, Hà Tĩnh, Ninh Thuận) cũng ghi nhận hàng chục nghìn hecta đất bị mặn hóa. Đặc biệt, trong các mùa khô năm 2015–2016 và 2019–2020, ĐBSCL đối mặt với hạn hán nghiêm trọng, xâm nhập mặn sâu và tình trạng thiếu hụt nước ngọt ở mức đỉnh điểm, gây ra những thiệt hại lớn: 10/13 tỉnh thành bị ảnh hưởng, gây tổn thất hơn 405.000 ha cây trồng (2015–2016) và 59.000 ha lúa Đông Xuân bị mất trắng (2019–2020) [20].

Bên cạnh đó, các đảo ngoài khơi như quần đảo Trường Sa cũng đối mặt với điều kiện thời tiết cực đoan, diễn hình như nắng nóng, mưa bão thất thường và đất cát san hô có đặc tính rời rạc, dinh dưỡng thấp, khả năng giữ nước kém và thường xuyên bị nhiễm mặn. Những điều kiện này làm phát sinh nhiều khó khăn trong quá trình canh tác nông nghiệp phục vụ đời sống quân dân trên đảo. Do đó, việc tìm kiếm các giải pháp cải tạo đất phù hợp nhằm nâng cao năng suất và mở rộng diện tích đất trồng cây trên các đảo là yêu cầu cấp thiết, để bảo đảm an ninh sinh kế, quốc phòng tại khu vực biển đảo.

1.2.2. Điều kiện tự nhiên và thổ nhưỡng tại Trường Sa

1.2.2.1. Điều kiện tự nhiên ở Trường Sa

Quần đảo Trường Sa nằm trong khoảng vĩ độ 6°30'–12°00' Bắc và kinh độ 111°20'–117°20' Đông. Khu vực này bao gồm khoảng 130 thực thể địa lý như đảo nổi, bãi cạn và bãi ngầm, phân bố thưa thớt trên vùng biển có diện tích xấp xỉ 180.000 km². Toàn bộ quần đảo trải dài khoảng 800 km theo hướng Đông–Tây và khoảng 600 km theo trục Bắc–Nam [21].

Điều kiện khí hậu ở Trường Sa

Quần đảo Trường Sa, cấu tạo chủ yếu bởi san hô, là một hệ thống đảo điển hình giữa Biển Đông với đặc điểm môi trường khắc nghiệt. Khu vực này chịu tác động của khí hậu á xích đạo hải dương, trung bình trong năm ở mức nhiệt 27 °C và lượng mưa 2.575 mm [22]. Khí hậu tại quần đảo Trường Sa phân hóa rõ rệt thành hai mùa. Mùa mưa diễn ra từ tháng 5–10, với tổng lượng mưa hàng năm khoảng 1.800–2.200 mm,

song phân bố không đều và tập trung chủ yếu vào các tháng 7–9. Đây là giai đoạn thích hợp để quần thể thực vật và hệ sinh thái tự nhiên phát triển. Ngược lại, mùa khô (tháng 11–tháng 4 năm sau) đặc trưng bởi nhiệt độ cao (30–35 °C), độ ẩm thấp, bức xạ mặt trời mạnh và gió mùa Đông Bắc thổi thường xuyên với cường độ cấp 6–7. Dưới ảnh hưởng đồng thời của các yếu tố này dẫn đến tình trạng khô hạn kéo dài, gia tăng bốc hơi nước, làm tăng độ mặn và làm cạn kiệt nghiêm trọng nguồn nước ngọt trên các đảo. Tổng lượng bốc hơi trong mùa khô có thể gấp đôi lượng mưa cùng kỳ, gây áp lực lớn đến cân bằng nước và điều kiện sinh tồn của hệ sinh thái trên đảo.

Ngoài ra, quần đảo Trường Sa còn chịu ảnh hưởng của thời tiết khắc nghiệt, điển hình là bão và áp thấp nhiệt đới thường xuyên, đặc biệt trung bình 6 cơn/ năm vào năm 2013-2017 [23]. Cùng với tác động của sóng lớn, gió mạnh và hệ thống dòng chảy phức tạp đã tạo ra một môi trường vô cùng khắc nghiệt, gây ảnh hưởng đáng kể đến đặc điểm thổ nhưỡng, cấu trúc hệ sinh thái và tính đa dạng sinh học. Đây là những thách thức lớn đối với việc khai thác và phát triển nông nghiệp bền vững và ứng dụng vi sinh vật ở môi trường biển đảo [22].



Điều kiện nước ngọt trên các đảo thuộc quần đảo Trường Sa

Tài nguyên nước ngọt trên các đảo ở Trường Sa rất hạn chế do đặc điểm địa chất và khí hậu đặc thù. Trên một số đảo lớn, các “túi” nước ngầm đã hình thành trong tầng đá san hô, chủ yếu có nguồn gốc từ nước mưa tích tụ và được bổ sung một phần bởi nước biển thẩm thấu ngược từ tầng đá nền. Đây là dạng nước nhạt với hàm lượng khoáng thấp từ 0,32–0,70 g/L. Thành phần chủ yếu bao gồm các ion Cl^- , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , SO_4^{2-} , K^+ và HCO_3^- , với nồng độ tương đối cao so với các nguồn nước lợ thông thường. Mức nước ngầm trên đảo có sự dao động tương ứng với thủy triều hằng ngày, cho thấy mối liên kết thủy lực chặt chẽ với môi trường biển xung quanh.

Trong số 9 đảo nổi lớn tại Trường Sa, chỉ 3 đảo bao gồm Trường Sa Lớn, Song Tử Tây và Nam Yết hiện có khả năng khai thác nước ngọt từ giếng phục vụ sinh hoạt và trồng trọt. Trước đây, nguồn nước tại các đảo này cơ bản đáp ứng đủ nhu cầu, nhưng hiện nay lại bị thiếu hụt do sự gia tăng dân số trên đảo và nhu cầu sử dụng nước trong sinh hoạt, xây dựng cũng như nông nghiệp tăng. Các đảo còn lại không có khả năng khai thác nước ngầm và hoàn toàn phụ thuộc vào nước mưa. Vào mùa mưa, lượng nước mưa thu gom tương đối đáp ứng được nhu cầu cơ bản; ngược lại, trong mùa khô lại khan hiếm nước ngọt, việc sử dụng hàng ngày phải được quản lý chặt chẽ, nhiều nơi giới hạn ở mức 20 lít/người/ngày. Tại các đảo chìm, nguồn nước duy nhất cho hoạt động nông nghiệp và sinh hoạt cũng là nước mưa. Một số đảo nổi như Sinh Tồn có giếng nước, nhưng chất lượng nước chủ yếu là nước lợ và bị nhiễm mặn nghiêm trọng vào mùa khô, với độ mặn có thể đạt tới 70% so với nước biển.

Trong điều kiện khan hiếm nước ngọt, cán bộ chiến sĩ trên các đảo thường tận dụng nước sinh hoạt chưa sử dụng xả phòng để tưới cây, đồng thời phụ thuộc đáng kể vào nguồn nước ngọt tiếp tế từ đất liền, hoặc tưới cây bằng nước lợ lấy từ giếng nhiễm mặn ở đảo. Tình trạng thiếu hụt nguồn nước ngọt vừa ảnh hưởng bất lợi đến đời sống con người, vừa đặt ra những khó khăn lớn cho các nghiên cứu khoa học, nhất là trong các ứng dụng vi sinh vật phục vụ cải tạo đất ở vùng đảo xa [24].

1.2.2.2. Điều kiện thổ nhưỡng ở Trường Sa

Các đảo nổi ở Trường Sa chủ yếu hình thành trên nền san hô được nâng lên, với cấu trúc địa chất điển hình gồm 3 lớp: lớp đá vôi san hô ở đáy, lớp đá vụn thô gắn kết ở trung gian, và lớp trầm tích bờ rời trên bề mặt. Quá trình hình thành đất tại đây diễn ra trong điều kiện đặc biệt, chủ yếu thông qua sự phong hóa của trầm tích san hô kết hợp với sự tích tụ phân chim qua thời gian dài. Thổ nhưỡng trên các đảo được phân thành hai nhóm chính: (i) đất cát san hô, phân bố chủ yếu ven rìa đảo và (ii) đất phân chim – loại đất đặc trưng có hàm lượng hữu cơ cao và giá trị sinh học đáng kể, tập trung chủ yếu ở bề mặt các đảo thuộc quần đảo Trường Sa [22]. Tuy nhiên, các hoạt động xây dựng và quân sự đã làm giảm đáng kể diện tích đất tự nhiên, trong đó đất phân chim bị ảnh hưởng nặng nề nhất. Thảm thực vật tại Trường Sa còn nghèo nàn và ở giai đoạn kế cận nguyên sinh, chủ yếu gồm các loại chịu mặn như muống biển (*Ipomoea pes-caprae*), phi lao (*Casuarina equisetifolia*), bàng vuông (*Barringtonia asiatica*) và phong ba (*Messerschmidia argentea*) [22].

Dựa trên các phân tích trầm tích và thổ nhưỡng tại đảo Trường Sa Lớn, thổ nhưỡng được chia thành năm nhóm diện địa lý đặc trưng gồm: (I) đất phân chim; (II) đất cát thô sơ ven đảo; (III) bãi cát di chuyển theo mùa; (IV) trầm tích vụn thô gắn kết; và (V) đá vôi san hô. Trong đó, hai nhóm I và II nằm trong phạm vi được xây kè kiên cố, nên ít chịu tác động trực tiếp từ các yếu tố tự nhiên và có tiềm năng cải tạo phục vụ mục đích sử dụng [22].

(I) Nhóm đất phân chim tập trung chủ yếu tại khu vực trung tâm các đảo. Loại đất này có màu nâu đen và phổ biến ở những đảo lớn như Trường Sa Lớn và Song Tử Tây. Đất có thành phần giàu hữu cơ, đặc biệt là hàm lượng P_2O_5 có thể đạt từ 15–20%, trong đó phân chim chiếm 30–40%. Đất có phản ứng kiềm yếu, tổng hàm lượng muối lên đến 8,5%, và hàm lượng đạm tổng số dao động trong khoảng 0,65–0,85%. Mặc dù có chứa một số thành phần dinh dưỡng, sự mất cân bằng hàm lượng các chất trong đất khiến loại đất này chỉ phù hợp với một số loài cây đặc thù [25].

(II) Nhóm diện địa lý đất cát thô sơ ven đảo: Phân bố dọc theo rìa đảo, loại đất này có thành phần hạt lớn, nghèo dinh dưỡng, khả năng giữ nước và chất dinh dưỡng rất thấp, dễ bị rửa trôi. Thảm thực vật tại khu vực này chủ yếu bao gồm các loài thân thảo

mọc tự nhiên, thích nghi với môi trường khắc nghiệt. Nhờ các biện pháp xây dựng kè kiên cố, hiện trạng loại đất này đã trở nên ổn định hơn và ít chịu tác động của sóng gió theo mùa. Diện tích đất cát ngày càng tăng do mở rộng đảo nhân tạo, đây là tiền đề cho các hoạt động cải tạo và khai thác sử dụng hiệu quả trong tương lai [22].

Gần đây, các hoạt động xây dựng và phát triển cơ sở hạ tầng nhằm mục tiêu phát triển kinh tế và đảm bảo quốc phòng – an ninh trên một số đảo nổi ở quần đảo Trường Sa được đẩy mạnh đã dẫn đến sự gia tăng rõ rệt diện tích đất bồi đắp nhân tạo. Loại thổ nhưỡng phổ biến tại các khu vực bồi đắp này là đất cát san hô, đây là một dạng vật liệu có nguồn gốc sinh vật biển với đặc tính cơ học và hóa học rất khác biệt so với đất tự nhiên trên đất liền.

1.2.2.3. Đặc điểm của cát san hô

Cát san hô là loại trầm tích sinh học đặc trưng của các đảo san hô, hình thành từ quá trình phong hóa cơ học và hóa học của san hô, vỏ sò, ốc và các sinh vật biển có khung xương bằng đá vôi. Thành phần khoáng chủ yếu là calcium carbonate (CaCO_3), chiếm khoảng 70–95%, tạo cho loại vật liệu này tính kiềm mạnh (pH thường từ 8–9) và làm giảm đáng kể khả năng hòa tan cũng như hấp thu của các nguyên tố dinh dưỡng thiết yếu như phospho (P), sắt (Fe), mangan (Mn) và kẽm (Zn).

Về phương diện vật lý, cát san hô có kích thước hạt thô (0,5–2,0 mm), độ rỗng cao (50–58%) nhưng liên kết yếu, dẫn đến khả năng giữ ẩm và dinh dưỡng rất thấp (độ ẩm thường < 5%, CEC < 5 meq/100 g). Do dung lượng trao đổi cation thấp, đất giữ dinh dưỡng kém, khiến cây trồng thường bị thiếu hụt ngay cả khi được bón phân thường xuyên. Thực tế, hiệu suất sử dụng phân bón trên cát san hô chỉ đạt 30–50% so với đất thông thường, dù lượng bón tăng gấp 2–3 lần [26]. Điều này khiến đất cát san hô dễ bị xói mòn, rửa trôi, và rất khó cải tạo nếu không được bổ sung vật liệu cải tạo hữu cơ hoặc khoáng sét giúp tăng khả năng giữ ẩm, kết dính và trao đổi ion [27].

Xét về phương diện sinh học, hệ vi sinh vật trong cát san hô khá nghèo nàn, hầu như không hình thành tầng vi sinh vật đất đặc trưng như các loại đất tự nhiên khác. Quần thể vi sinh vật tồn tại chủ yếu gồm các nhóm thích nghi với môi trường mặn và kiềm.

Theo một số kết quả khảo sát, cát san hô ở quần đảo Trường Sa có thành phần cơ giới nhẹ, cấu trúc rời rạc, hàm lượng hạt sét thấp (6–16%), pH cao (8–9), độ xốp chỉ 37–38%, độ ẩm trung bình khoảng 5,6%, độ mặn tới 9,4‰, hàm lượng cacbon hữu cơ 0,14–0,60%, nitơ tổng số dưới 0,1% và hàm lượng hữu cơ trung bình khoảng 3,3%. Những đặc điểm này cho thấy đây là nhóm đất kiềm, khô mặn và nghèo dinh dưỡng, không thích hợp cho sản xuất nông nghiệp [22], [28]. Dưới tác động của gió mạnh và bão nhiệt đới thường xuyên, đất trên đảo liên tục bị nhiễm mặn và rửa trôi, làm giảm khả năng tích lũy dinh dưỡng và hình thành cấu trúc đất ổn định. Bên cạnh đó, quá trình san lấp,

mở rộng đảo phục vụ xây dựng hạ tầng trong những năm gần đây đã làm mất đi lớp đất phân chim tự nhiên – nguồn đất quý hiếm, giàu dinh dưỡng, đặc biệt có hàm lượng P_2O_5 cao (15 – 20%). Hệ quả là lớp đất bề mặt hiện nay trên phần lớn các đảo nổi chủ yếu gồm cát san hô và mảnh vụn sinh vật biển, không có tầng mùn tích tụ, hàm lượng hữu cơ rất thấp, nên khó hình thành và duy trì thảm thực vật tự nhiên ổn định.

Trong bối cảnh đó, cải tạo và sử dụng hợp lý nguồn đất cát san hô trở thành hướng đi cần thiết nhằm nâng cao hiệu quả sử dụng tài nguyên đất, giảm chi phí vận chuyển vật liệu từ đất liền, đồng thời tăng khả năng tự chủ sản xuất nông nghiệp và bảo đảm an ninh lương thực tại chỗ cho nhân dân và các cán bộ, chiến sĩ đang công tác, sinh sống tại các đảo tiền tiêu của Tổ quốc.

1.3. Tổng quan về các phương pháp cải tạo đất khô hạn, mặn

Đất khô hạn và nhiễm mặn là trở ngại lớn đối với phát triển nông nghiệp bền vững, đặc biệt tại các khu vực ven biển, đảo xa và vùng bán khô hạn. Những đặc tính bất lợi như nghèo hữu cơ, giữ nước kém và hàm lượng muối hòa tan cao tác động đáng kể đến năng suất nông nghiệp, đa dạng sinh học đất và chu trình dinh dưỡng. Do đó, cải tạo đất khô hạn, mặn là yêu cầu cấp thiết để thích ứng với BĐKH và phục hồi hệ sinh thái đất.

1.3.1. Các biện pháp cơ học

Trong nhiều trường hợp, nồng độ mặn trong đất quá cao không thể giảm chỉ bằng biện pháp canh tác mà cần áp dụng các kỹ thuật cải tạo đất. Biện pháp phổ biến nhất là rửa trôi muối, với hai phương pháp chính:

Rửa trôi theo chiều sâu: bằng cách tưới nước để đẩy muối xuống tầng sâu hơn. Các hình thức thực hiện gồm tạo ao liên tục, tạo ao gián đoạn và tưới phân tán. Trong điều kiện mặn cao, phương pháp tạo ao gián đoạn cho thấy hiệu quả tốt hơn phương pháp ao liên tục [29]. Phương pháp này đòi hỏi lượng nước dồi dào và phụ thuộc vào tính chất thủy lực của đất, chất lượng nước, độ sâu nước ngầm và khả năng chịu mặn của cây trồng.

Rửa trôi bề mặt: thông qua việc xới đất và xả nước tuần hoàn. Phương pháp này áp dụng ở những nơi có mực nước ngầm nông hoặc đất không thấm nước cao và có thể loại bỏ tới 7% muối trong lớp đất mặt 0,3 m. Việc kết hợp rửa trôi với cây trồng tích muối như *Leptochloa fusca* giúp hấp thu Na^+ , góp phần cải thiện hiệu quả giảm mặn [30].

1.3.2. Các biện pháp sinh học và ứng dụng công nghệ sinh học

Giải pháp sinh học trong cải tạo đất cát ngày càng nhận được sự quan tâm do thân thiện với môi trường, mang lại hiệu quả bền vững và có thể triển khai tại các khu vực đảo ven biển hạn chế tiếp cận vật tư nông nghiệp thông thường. Mục tiêu của biện pháp là khôi phục chức năng sinh thái đất, bổ sung mùn và dinh dưỡng tự nhiên, đồng thời

nâng cao độ giữ ẩm và cải thiện cấu trúc đất thông qua vai trò của vi sinh vật và vật liệu hữu cơ.

Cơ chế cải tạo đất cát bằng biện pháp sinh học chủ yếu dựa vào hoạt động sống của hệ vi sinh vật đất, các chủng vi khuẩn hữu ích và việc bổ sung vật liệu sinh học như phân xanh, polysaccharide hoặc các sản phẩm lên men vi sinh. Quá trình này bao gồm: (i) chuyển hóa các nguyên tố dinh dưỡng (N, P, K) từ dạng khó tiêu sang dạng dễ hấp thu, (ii) hình thành keo đất sinh học thông qua EPS của vi sinh vật, và (iii) nâng cao hàm lượng chất hữu cơ, độ tơi xốp và khả năng giữ ẩm trong đất, qua đó hỗ trợ sự phát triển toàn diện của bộ rễ cây trồng.

Một số giải pháp sinh học tiêu biểu có thể kể đến như:

Bổ sung than sinh học (biochar): Biochar có khả năng tăng cường khả năng trao đổi cation (CEC), cải thiện giữ nước, đồng thời tạo điều kiện thuận lợi cho hệ vi sinh vật đất phát triển. Ngoài ra, biochar còn giúp hấp phụ kim loại nặng, hạn chế rửa trôi chất dinh dưỡng và ổn định cấu trúc đất [31].

Bổ sung chất hữu cơ: Việc bổ sung phân chuồng hoai mục, compost hoặc các nguồn hữu cơ dễ phân hủy giúp thay đổi cấu trúc đất, làm cho đất tơi xốp và giữ ẩm tốt hơn, đồng thời cung cấp nguồn carbon và vi chất thiết yếu phục vụ cho hệ vi sinh vật đất. Nghiên cứu trước đó đã cho thấy việc phối hợp giữa phân hữu cơ và biochar có thể cải thiện rõ rệt khả năng giữ nước và hoạt tính sinh học trong đất [32].

Ứng dụng vi sinh vật cải tạo đất: Các chủng vi sinh vật thuộc các nhóm chức năng như *Rhizobium*, *Azotobacter* cố định đạm; phân giải lân (*Bacillus megaterium*); hòa tan kali (*Paenibacillus* spp.); hoặc sinh tổng hợp polysaccharide (*Lipomyces starkeyi*, vi khuẩn sinh EPS) đã được ứng dụng để cải thiện tính chất vật lý, hóa học và sinh học của đất. Những chủng này không chỉ góp phần duy trì độ ẩm và kết dính cho đất cát, mà còn giúp phục hồi tính năng sinh học đất theo hướng phát triển bền vững [33].

Hiện nay có một số chế phẩm vi sinh giúp cải thiện độ ẩm, duy trì cấu trúc đất, cung cấp vi sinh vật có lợi đã được thương mại hóa như Mikrobi (gồm các vi sinh vật *Aycorrhizae*, *Bacillus*, *Trichoderma*); Mycorrhizal Landscape Inoculant (9 loại nấm rễ Endo và 8 loại nấm rễ Ecto); Vegamatrix VX81000 hypHA Microbial (*Streptomyces* và dưỡng chất) [6].

1.3.3. Các biện pháp hóa lý

Nhóm biện pháp này nhằm điều chỉnh các tính chất lý-hóa như độ pH, độ ẩm, trao đổi ion, và cấu trúc đất. Chúng được đánh giá cao về tính linh hoạt, dễ dàng điều chỉnh để phù hợp với đặc điểm đất đai và khí hậu ven biển.

Các phương pháp thường được áp dụng hiện nay gồm:

Bổ sung chất cải tạo hóa lý: Các chất cải tạo hóa học như $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, zeolit và bentonit được sử dụng để thay thế Na^+ trên bề mặt keo đất, giảm độ mặn và tăng khả năng giữ ẩm cho đất. Bentonite là vật liệu khoáng tự nhiên có khả năng trương nở và giữ nước cao, được ứng dụng hiệu quả trong cải tạo đất cát, bạc màu và thoái hóa nhờ khả năng tăng dung tích hấp phụ, cải thiện cấu trúc và giảm rửa trôi dinh dưỡng [34]. Bên cạnh đó, các vật liệu như zeolit với cấu trúc xốp và khả năng trao đổi ion, hay các chất cải tạo thương mại như superabsorbent polymers (SAPs), vôi và thạch cao cũng được áp dụng. Tuy nhiên, hiệu quả phụ thuộc lớn vào điều kiện môi trường, liều lượng và tính chất đất.

Che phủ đất: Biện pháp này hợp với các vùng đất nghèo hữu cơ và dễ bốc hơi nước như cát san hô. Việc sử dụng lớp phủ bằng rơm rạ, lá khô hoặc vật liệu hữu cơ địa phương không chỉ giúp giảm thoát hơi nước, hạn chế cỏ dại, điều hòa nhiệt độ đất mà còn hỗ trợ hệ vi sinh vật phát triển, góp phần cải thiện cấu trúc đất và chu trình dinh dưỡng bền vững.

1.3.4. Các biện pháp kết hợp khác

Xu hướng cải tạo đất hiện nay hướng tới tích hợp nhiều biện pháp đồng thời nhằm tối ưu hóa hiệu quả cải tạo, đảm bảo tính bền vững về lâu dài. Phương pháp tích hợp này cho phép phát huy hiệu ứng cộng hưởng giữa các nhóm: Nâng cao tính chất lý-hóa học của đất, khôi phục hệ vi sinh vật đất và đảm bảo cho cây trồng phát triển thuận lợi. Đây là hướng tiếp cận toàn diện, góp phần xây dựng mô hình sản xuất nông nghiệp thích ứng với BĐKH, hướng tới duy trì ổn định lương thực tại các vùng đất khó canh tác.

Các giải pháp tích hợp này không chỉ hướng tới cải thiện đặc tính lý-hóa của đất mà còn giúp cải thiện chất lượng đất bền vững. Đồng thời, các tác nhân sinh học như EPS từ vi sinh vật, hóa học như bentonite giúp tăng hiệu quả giữ ẩm và kết dính, hay công nghệ tưới tiêu thông minh giúp gia tăng độ ẩm, bảo vệ tính bền vững của cấu trúc đất và hỗ trợ sự phát triển cho cây trồng.

Weijing và cs (2025) đã kết hợp biochar và bentonite giúp cải thiện rõ rệt cấu trúc đất. Sự kết hợp này giúp tăng cường kết tụ đất, tăng độ ẩm và hàm lượng dinh dưỡng cùng với hệ vi sinh vật trong đất. Kết quả cho thấy chiều cao, diện tích lá và năng suất ngô đều tăng [35].

Luo và cs (2024) đã kết hợp vi sinh vật sinh EPS với việc bổ sung cỏ, phân chuồng cho hiệu quả cải tạo đất đáng kể với sự gia tăng mạnh hàm lượng EPS trong đất cũng như các vi sinh vật và dinh dưỡng trong đất. Nghiên cứu cũng cho thấy mối tương quan tích cực đáng kể giữa nồng độ EPS và độ ổn định của cốt liệu đất [36].

Do đó, việc cải tạo đất canh tác cần kết hợp nhiều biện pháp để đạt hiệu quả cao. Đây là hướng tiếp cận phổ biến nhằm nâng cao độ phì nhiêu và tính bền vững của đất.

1.3.5. Tình trạng ứng dụng các phương pháp cải tạo đất ở Việt Nam

Tại Việt Nam, thách thức về đất bạc màu, nhiễm mặn, đất cát biển và khô hạn đang trở nên nghiêm trọng hơn dưới ảnh hưởng của BĐKH, xâm nhập mặn và khai thác đất không hợp lý. Việc phục hồi và cải thiện hệ sinh thái đất được xem là điều kiện tiên quyết để duy trì an ninh lương thực, phát triển nông nghiệp bền vững và tăng cường thích ứng với môi trường biến động. Gần đây, nhiều hướng tiếp cận cải tạo đất đã được thử nghiệm và triển khai trên thực địa, bao gồm giải pháp lý-hóa, bổ sung vật liệu hữu cơ, kết hợp chế phẩm sinh học.

Một số nghiên cứu tiêu biểu khẳng định tác động tích cực của các biện pháp cải tạo. Đặng Duy Minh và cộng sự (2020) sử dụng kết hợp phân hữu cơ từ bã bùn mía, biochar và phân silic để cải tạo đất nhiễm mặn tại vùng ĐBSCL, qua đó ghi nhận sự gia tăng đáng kể trong tăng trưởng và năng suất cây lúa so với các đối chứng [37]. Vũ Thị Quỳnh Chi và cộng sự (2022) ứng dụng chế phẩm hữu cơ chứa các chủng vi sinh vật sinh EPS cùng với vi sinh vật hữu ích trên giá thể tự nhiên để cải tạo đất cát san hô Trường Sa, cho thấy hiệu quả cải thiện rõ rệt trong sinh trưởng của cây rau muống [28]. Bên cạnh đó, Viện Thổ nhưỡng Nông hóa đã phát triển chế phẩm vi sinh chuyên dụng cho đất cát biển, bao gồm các chủng vi sinh vật chức năng như *Bradyrhizobium japonicum* (cố định đạm), *Bacillus megaterium* (phân giải lân), *Paenibacillus castaneae* (hòa tan kali) và *Lipomyces starkeyi* (sinh EPS) [38]. Khi áp dụng tại Bình Định, mô hình này đã góp phần giảm 10–15% nhu cầu phân khoáng, tăng độ ẩm và cải thiện năng suất cây trồng.

Một mô hình cải tạo đất cát ven biển tại miền Trung, do Phạm Thị Diệp và cộng sự (2021) thực hiện, đã chứng minh hiệu quả tích cực khi sử dụng đất sét kết hợp với phân rơm – giúp cải thiện độ phì nhiêu, giữ nước và tái canh tác thành công trên những vùng đất trước đó bị bỏ hoang do nghèo kiệt dinh dưỡng [39].

Ngoài ra, một số sản phẩm phân bón hữu cơ – vi sinh do Việt Nam sản xuất đã được thương mại hóa rộng rãi như TRIMIX-BIO (chứa *Trichoderma spp.*, *Streptomyces spp.*, *Bacillus spp.*), Hà Gianh 311 (chứa *Azotobacter sp.*, *Streptomyces sp.*, *Bacillus sp.*), Sông Gianh VS01 (chứa *Azotobacter*, *Aspergillus*, *Bacillus*),... Các chế phẩm vi sinh cơ bản đều chứa các chủng vi sinh vật hữu ích có khả năng cải tạo đất, tăng khả năng giữ nước, cân bằng sinh thái đất và hỗ trợ cây trồng chống chịu stress.

Tóm lại, các phương pháp cải tạo đất khô hạn, mặn ngày nay ngày càng đa dạng và được tích hợp giữa cơ học, lý hóa và sinh học. Mục tiêu chung của các phương pháp cải tạo đất khô hạn mặn là: (1) giảm nồng độ mặn; (2) tăng hàm lượng dinh dưỡng; (3) cải thiện khả năng giữ nước; và (4) tăng khả năng kết dính các hạt đất. Đối với đất có tính rời rạc, nhiễm mặn, kiềm như cát san hô thì hướng tiếp cận sử dụng vi sinh vật bản

địa sinh EPS đã thích nghi với điều kiện khắc nghiệt như nhiệt độ cao, pH kiềm, và mặn tại các đảo xa bờ được xem là giải pháp chiến lược bền vững nhằm phục hồi các hệ sinh thái đất đặc thù như đất cát san hô và đất thoái hóa ven biển.

1.4. Tổng quan về vi khuẩn chịu mặn, sinh exopolysaccharide và ứng dụng trong cải tạo đất khô hạn mặn

1.4.1. Sơ lược về vi khuẩn chịu mặn

Vi khuẩn chịu mặn là các vi khuẩn có thể phát triển trong cả điều kiện không có muối và nồng độ muối cao. Trong khi đó, vi khuẩn ưa mặn là nhóm vi khuẩn phát triển tốt trong môi trường có nồng độ muối cao, tức là “ưa muối”. Chúng cần ion natri để phát triển và chuyển hóa. Dựa vào khả năng chịu mặn để phân loại vi sinh vật thành ba loại: nhẹ (sinh trưởng được ở 1–3% (w/v) NaCl); trung bình (3–15% (w/v) NaCl); và cực độ (15–30% (w/v) NaCl). Ngược lại với các vi sinh vật chịu mặn, vi sinh vật ưa mặn bắt buộc cần nồng độ NaCl cao hơn 3% NaCl hoặc cao hơn nước biển (khoảng 3,5% (w/v) NaCl). Các thông số chịu mặn và yêu cầu về muối phụ thuộc vào nhiệt độ, độ pH và môi trường phát triển [40].

Vi khuẩn chịu mặn có khả năng chịu đựng nhất định đối với nồng độ mặn, chủ yếu phát triển trong điều kiện môi trường có nồng độ mặn cao, chẳng hạn như đất mặn, hồ muối, trang trại muối. Từ lâu, vi khuẩn chịu mặn đã thu hút sự quan tâm nghiên cứu của các nhà khoa học với cơ chế thích nghi độc đáo của chúng. Hầu hết các vi khuẩn chịu mặn đều thuộc nhóm dị dưỡng. Chúng sử dụng được nhiều nguồn carbon và thích hợp với môi trường kiềm [41]. Quá trình trao đổi chất của vi khuẩn chịu mặn rất đa dạng bao gồm nhiều loại: vi khuẩn quang dưỡng sản xuất oxy và không sản xuất oxy, vi khuẩn dị dưỡng hiếu khí, vi khuẩn lên men, vi khuẩn khử nitrat, vi khuẩn khử sunfat và methanol [42].

Vi khuẩn chịu mặn có cấu trúc sinh lý và cơ chế trao đổi chất rất đặc biệt, do đó chúng có thể chịu được môi trường muối cao và ưu trương, đồng thời sản sinh ra nhiều chất hoạt tính sinh học có tính chất đặc biệt. Hiện nay, vi khuẩn chịu mặn được ứng dụng trong sản xuất lên men nhờ khả năng thích nghi với môi trường có độ mặn cao, đồng thời đóng vai trò quan trọng trong xử lý nước thải mặn và phát triển enzyme chịu mặn cho các ứng dụng công nghệ sinh học [41].

Hiện nay, có 4 cơ chế thích nghi với mặn của vi khuẩn đã được mô tả. (1) Cơ chế điều hòa áp suất thẩm thấu được thực hiện thông qua việc thải ion Na^+ ra ngoài và tích lũy K^+ , Cl^- trong bào tương. Một số loài trực khuẩn phụ thuộc mạnh vào Cl^- như yếu tố cân bằng thẩm thấu, giúp thích ứng với nồng độ muối cao và duy trì hoạt động sinh lý bình thường [43]. Ở nhiều vi khuẩn chịu mặn, hệ thống vận chuyển K^+ được phát triển tương đối hoàn chỉnh, chủ yếu là các protein vận chuyển một chiều. Trong môi trường

có nồng độ muối cao, các vi khuẩn này có thể tích lũy lượng lớn K^+ nội bào để cân bằng áp suất thẩm thấu với môi trường ngoài. So với Na^+ , K^+ có vai trò điều hòa hoạt tính enzyme và đảm bảo quá trình gấp nếp protein diễn ra chính xác hơn [41]. (2) Ổn định cấu trúc bên ngoài tế bào. Thành tế bào của vi khuẩn chịu mặn chứa các lactoprotein có nhiều amino acid mang điện tích âm trên bề mặt. Các amino acid này tạo nên một lớp “lá chắn âm” giúp bảo vệ tế bào khỏi tổn thương do áp suất thẩm thấu cao gây ra. Đồng thời, khi độ mặn tăng, màng tế bào của vi khuẩn chịu mặn có xu hướng gia tăng tỷ lệ phospholipid anion so với phospholipid trung tính, góp phần duy trì trạng thái hydrat hóa của màng và tăng khả năng chống chịu áp suất thẩm thấu từ môi trường ngoài [41]. (3) Chất tan tương thích: Khi vi sinh vật ở trong môi trường có áp suất thẩm thấu cao, tế bào mất nước và co lại, các chức năng sinh lý và sinh hóa bình thường của tế bào sẽ bị ảnh hưởng [43]. Để thích nghi với điều kiện này, vi sinh vật chịu mặn sẽ tích lũy một lượng lớn các chất tan hữu cơ phân tử nhỏ như đường và amino acid để khôi phục thể tích tế bào và áp suất thẩm thấu về mức ban đầu [44]. Quá trình tích lũy này sẽ không ảnh hưởng đến các chức năng sinh lý và chuyển hóa bình thường của tế bào. Khi điều kiện bình thường được khôi phục, các chất tan tương thích trong vi sinh vật chịu mặn sẽ nhanh chóng bị phân hủy, do đó duy trì sự cân bằng của áp suất thẩm thấu và tránh tổn thương tế bào do lượng lớn nước từ môi trường xâm nhập vào tế bào. Ngoài chức năng điều chỉnh thẩm thấu, các chất tan tương thích còn có các chức năng như chống chịu hạn, nhiệt độ cao, nhiệt độ thấp và bức xạ [41]. (4) Ngoài ra vi khuẩn có thể sản sinh ra exopolysaccharide, tạo biofilm giúp tăng khả năng chịu stress mặn cho chính vi khuẩn cũng như các sinh vật trong biofilm [45].

1.4.2. Sơ lược về vi khuẩn sinh exopolysaccharide

Vi khuẩn sinh EPS phân bố rộng rãi trong nhiều nhóm phát sinh loài khác nhau. Ở vi khuẩn Gram âm, các chi tiêu biểu thuộc lớp *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* và *Gammaproteobacteria*. Ở vi khuẩn Gram dương, các chi điển hình gồm *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Sarcina*, và *Bifidobacterium*, *Rhodococcus* [46].

Một số EPS đã được khai thác thương mại gồm: xanthan từ *Xanthomonas*, dextran do *Leuconostoc*, *Streptococcus* và *Lactobacillus*, alginate từ *Azotobacter* và *Pseudomonas*, cũng như curdlan do *Alcaligenes faecalis*, *Rhizobium radiobacter* và *Agrobacterium* tạo ra. Bên cạnh đó còn có gellan (từ *Sphingomonas*, *Pseudomonas*), hyaluronan (từ *Streptococcus*), levan (từ *Bacillus*, *Halomonas*, *Paenibacillus*, *Zymomonas*), cellulose vi khuẩn (từ *Komagataeibacter*), [47].

Việc tìm kiếm các chủng mới, đặc biệt từ vi khuẩn cực đoan (extremophiles) và vi khuẩn biển sinh EPS đang được thúc đẩy mạnh. Các nguồn này thường tổng hợp EPS

mang tính chất độc đáo, mở ra nhiều ứng dụng tiềm năng trong công nghiệp thực phẩm, y dược và công nghệ xử lý môi trường [48].

Bacillus là một chi vi khuẩn Gram dương, sinh bào tử, phân bố rộng rãi trong đất, nước và môi trường liên quan đến thực vật. Điểm đặc trưng nổi bật của chi này là khả năng tiết nhiều hợp chất ngoại bào, trong đó có EPS. EPS từ các loài điển hình như *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* hay *B. cereus* đã được ghi nhận với năng suất từ 2–10 g/L, chứa nhiều nhóm chức ưa nước (carboxyl, hydroxyl, phosphate) và biểu hiện nhiều hoạt tính sinh học quan trọng như chống oxy hóa, ức chế vi khuẩn gây bệnh, ức chế sự phát triển của khối u, đồng thời tăng giữ ẩm và kết tụ đất [49], [40].

Trong số đó, *Bacillus velezensis* được xem là loài có tiềm năng lớn nhờ khả năng sinh tổng hợp EPS phong phú với nhiều dạng khác nhau như levan, glucomannan và EPS axit [50], [51], [52]. EPS của *B. velezensis* thể hiện tính đa dạng cả về hàm lượng lẫn cấu trúc, phụ thuộc mạnh vào từng chủng và nguồn carbon sử dụng. Chẳng hạn, chủng VTX20 nuôi trên sucrose 20% đạt năng suất rất cao (75,5 g/L), với thành phần fructose–glucose đặc trưng cho levan có khả năng giữ nước mạnh [50]. Ngược lại, các chủng AG6 và MHM3 chỉ đạt 5–6 g/L nhưng lại giàu acid uronic, rhamnose hoặc galacturonic, mang nhiều nhóm chức anion có lợi cho sự tương tác với Na^+ và kim loại nặng [53], [52]. Chủng HY23 đạt 2,8 g/L, sản sinh glucomannan (mannose:glucose tỉ lệ 82:18), có khả năng hình thành gel và thúc đẩy tăng trưởng cây dưới stress mặn [51], trong khi KY471306 cho 7,88 g/L EPS dạng heteropolysaccharide (glucose, mannose, galactose), góp phần ổn định cấu trúc đất [54]. Trái lại, chủng OM03 chỉ đạt 0,594 g/L với EPS gồm glucose và mannose, cho thấy hiệu quả sinh EPS thấp [55].

Nhìn chung, EPS của *B. velezensis* dao động trong khoảng 0,6 – 75 g/L, từ các dạng homopolysaccharide như levan, glucomannan đến heteropolysaccharide giàu acid uronic. Sự đa dạng này không chỉ giúp EPS phát huy vai trò sinh thái trong việc giữ nước, cải tạo đất mặn và hạn chế tác hại của ion Na^+ , mà còn mở ra triển vọng ứng dụng trong xử lý kim loại nặng và các lĩnh vực y sinh.

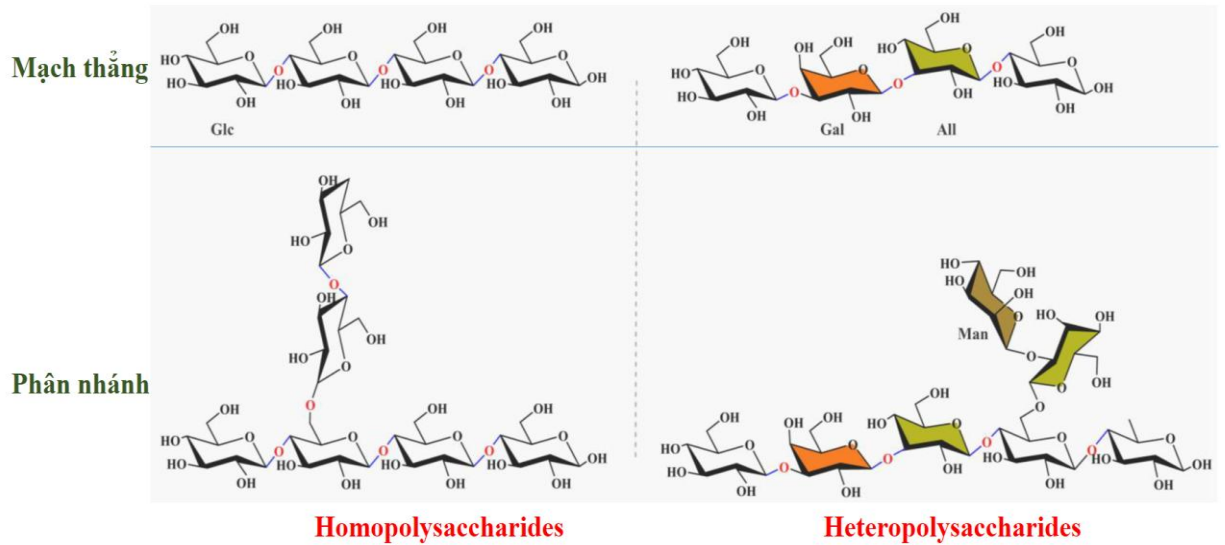
1.4.3. Cơ chế sinh tổng hợp exopolysaccharide ở vi khuẩn chịu mặn

1.4.3.1. Khái niệm exopolysaccharide

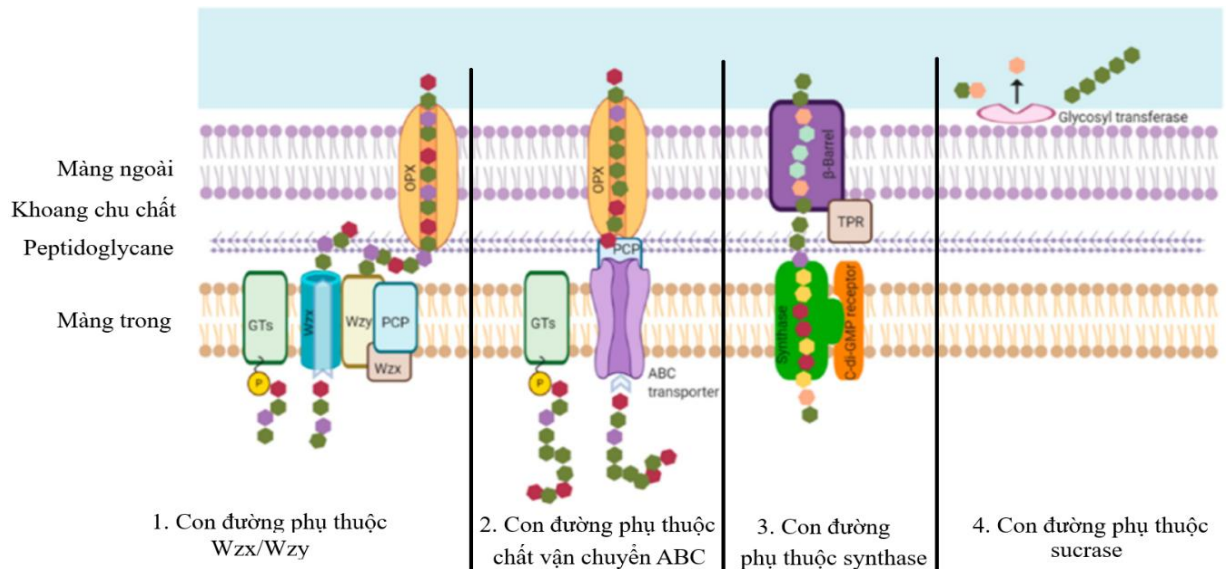
EPS là nhóm polysaccharide ngoại bào được vi sinh vật tiết ra trong quá trình sinh trưởng và chuyển hóa, có vai trò cấu trúc và bảo vệ tế bào trước các điều kiện bất lợi như stress thẩm thấu, kim loại nặng, pH cực đoan và bức xạ tử ngoại [56]. Ở các vi khuẩn chịu mặn, EPS là thành phần thiết yếu giúp tạo biofilm ổn định, giảm mất nước và duy trì cân bằng ion Na^+/K^+ trong môi trường ưu trương. Lớp EPS bao bọc tế bào tạo môi trường vi mô bảo vệ, đồng thời là “lá chắn sinh học” giúp vi khuẩn thích nghi và tồn tại lâu dài trong điều kiện khô hạn và mặn cao [59], [60].

1.4.3.2. Cấu trúc, phân loại và các con đường sinh tổng hợp exopolysaccharide

EPS có cấu trúc polymer phức tạp, bao gồm nhiều loại monosaccharide (glucose, fructose, mannose, rhamnose...) và nhóm thế như acetate, pyruvate, phosphate hoặc succinate [57], [58]. Thành phần và kiểu liên kết glycosidic (α/β) quyết định tính chất lưu biến, khả năng giữ nước, hấp phụ muối và kim loại nặng của EPS. Dựa trên thành phần, EPS được chia thành homopolysaccharide (HoPS) – gồm một loại monosaccharide (như levan, dextran) và heteropolysaccharide (HePS) - gồm nhiều loại monosaccharide lặp lại, thường 3–4 loại [59], [60] (mô phỏng trên Hình 1.3).



Hình 1.3. Phân loại cấu trúc của exopolysaccharide. Các loại monomer được phân biệt bằng màu sắc: trắng/trong suốt (glucose), cam (allose (All)), xanh lá cây (galactose (Gal)), nâu (mannose (Man)) [61]



Hình 1.4. Tổng quan chung về 4 con đường sinh tổng hợp EPS ở vi khuẩn. GTs (glycosyltransferases), PCP (polysaccharide co-polymerase), OPX (outer membrane polysaccharide export), TPR (tetratricopeptide repeat protein) [62]

Quá trình sinh tổng hợp EPS ở vi khuẩn được thực hiện qua 4 con đường chính và được mô phỏng trên Hình 1.4:

(1) Con đường phụ thuộc Wzx/Wzy, đây là con đường phổ biến ở vi khuẩn, gồm ba giai đoạn chính: (i) tổng hợp các đường nucleotide, (ii) lắp ráp các đơn vị lặp lại, và (iii) trùng hợp và tiết ra ngoại bào (Hình 1.4.1). Trong giai đoạn đầu, các đơn phân đường nucleotide được vận chuyển và gắn vào chất mang undecaprenyl phosphate (Und-P) ở màng trong. Sau đó, glycosyltransferase (GT) xúc tác hình thành đơn vị lặp lại, các đơn vị này được chuyển qua màng trong nhờ Wzx flippase. Cuối cùng, Wzy polymerase trùng hợp các đơn vị oligosaccharide đã được sửa đổi (methyl hóa, acetyl hóa...) thành polysaccharide. Các polysaccharide này thường là HePs có thành phần đường phong phú (thường là 4-5 loại đường) và được tiết ra ngoài màng bởi hệ thống vận chuyển liên quan đến protein PCP và OPX [63]. Một số EPS đại diện cho con đường này là gellan, xanthan và kefiran. Đặc trưng của các chủng vi khuẩn tổng hợp EPS theo con đường này là mang các gen flippase (Wzx) và polymerase (Wzy) [64].

(2) Con đường phụ thuộc vào chất vận chuyển ABC (Hình 1.4.2), chủ yếu tổng hợp polysaccharide vỏ nang. Trong cơ chế này, các đơn phân đường hoạt hóa được liên kết với Und-P tạo thành Und-PP-sugar tại màng trong. Sau đó, GT xúc tác tổng hợp chuỗi polysaccharide hoàn chỉnh tại mặt trong của màng sinh chất [62]. Chuỗi polysaccharide được vận chuyển ra ngoài bởi một phức hợp gồm các chất vận chuyển ABC xuyên qua màng trong và các protein chu chất thuộc họ PCP và OPX [63]. Tất cả các EPS được tạo ra thông qua con đường này đều mang một glycolipid được bảo tồn ở đầu khử bao gồm phosphatidylglycerol và một liên kết poly-2-keto-3-deoxyoctulosonic acid (Kdo). Đây là một trong những điểm khác biệt chính của con đường phụ thuộc Wzx/Wzy và con đường phụ thuộc ABC [64].

(3) Con đường phụ thuộc synthase (Hình 1.4.3), thường được sử dụng để lắp ráp các homopolymer chỉ cần một loại tiền chất đường và gồm 1 loại đường đơn như glucose hoặc mannose [62]. Con đường thứ ba này tiết ra các sợi polymer hoàn chỉnh qua màng và thành tế bào độc lập với flippase để chuyển vị trí các đơn vị lặp lại. Quá trình tổng hợp xảy ra trực tiếp trên màng trong thông qua phức hợp synthase tích hợp trong màng, ví dụ như protein BcsA trong tổng hợp cellulose vi khuẩn.

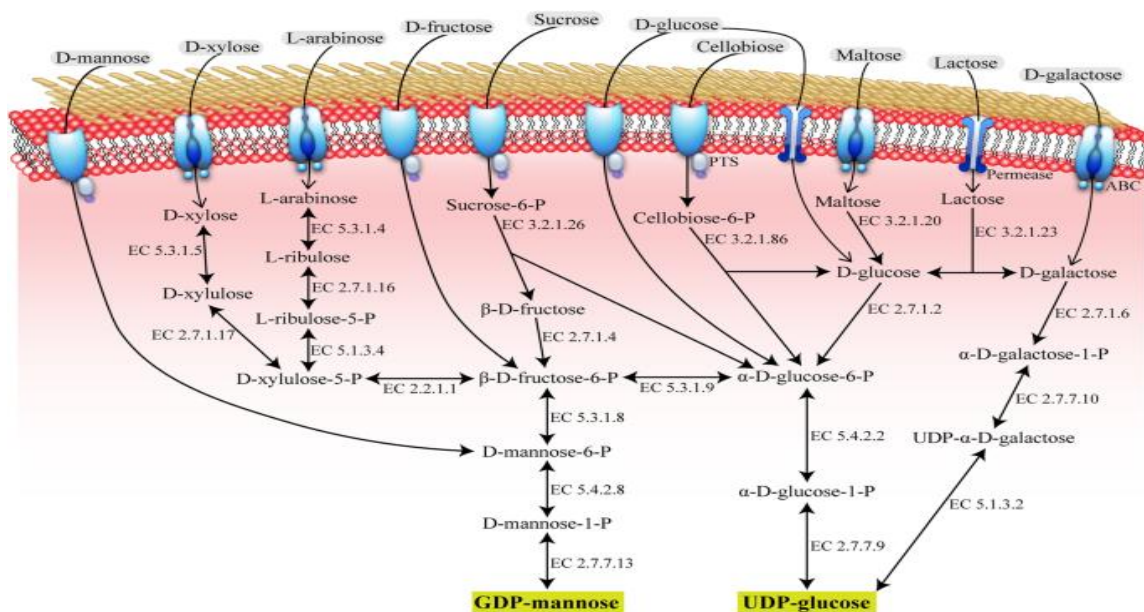
(4) Con đường phụ thuộc sucrase (Hình 1.4.4), được tổng hợp ở ngoại bào nhờ enzyme sucrase (levansucrase hoặc glucansucrase) để hình thành levan, dextran [62], [63].

Trong 4 con đường tổng hợp EPS trên chỉ có con đường phụ thuộc sucrase có quá trình sinh tổng hợp HoPs ở môi trường ngoại bào. Các chuỗi polyme được kéo dài bằng cách thêm trực tiếp các monosaccharide thu được bằng cách cắt di- hoặc trisaccharide.

Trong ba trường hợp còn lại các phân tử tiền chất cần thiết cho các bước kéo dài chuỗi polymer, trải qua nhiều quá trình chuyển đổi enzyme khác nhau bên trong tế bào để tạo ra đường hoạt hóa (nucleotide-đường, nucleotide-sugar) [64]. Sự khác biệt về cơ chế dẫn đến sự đa dạng cấu trúc và tính chất của EPS, phản ánh vai trò của các enzyme như glycosyltransferase, polymerase và các enzyme sửa đổi nhóm đường. Dù nhiều cụm gen (*epsA-O*, *wzx*, *wzy*) đã được xác định ở các vi khuẩn chịu mặn thuộc *Bacillus*, *Halomonas* và *Paenibacillus*, nhưng chức năng của nhiều gen vẫn chưa được làm rõ hoàn toàn [64], [50]. Quá trình này nhìn chung mang tính bảo tồn cao, tuy vậy còn bị chi phối bởi điều kiện môi trường, tác động đến cấu trúc và mức phân nhánh của polymer [65]. Do đó, việc phân tích bộ gen và cụm gen EPS là hướng tiếp cận tiềm năng nhằm làm sáng tỏ cơ chế di truyền và định hướng ứng dụng của vi khuẩn sinh EPS.

1.4.3.3. Mối liên hệ giữa khả năng sinh tổng hợp exopolysaccharide của vi khuẩn với quá trình hấp thụ và chuyển hóa đường

Quá trình sinh tổng hợp EPS ở vi khuẩn có mối liên hệ chặt chẽ với cơ chế hấp thụ và chuyển hóa đường, vốn cung cấp năng lượng và tiền chất cho quá trình hình thành polymer ngoại bào. Trong 4 con đường tổng hợp EPS đã biết, chỉ có con đường phụ thuộc sucrose diễn ra ở ngoại bào và phụ thuộc trực tiếp vào nguồn cơ chất sucrose, nơi enzyme sucrose xúc tác phân cắt sucrose thành các monosaccharide để kéo dài chuỗi HoPS. Ngược lại, ba con đường còn lại chủ yếu tổng hợp HePS trong tế bào, phụ thuộc vào các phản ứng chuyển hóa nội bào tạo nucleotide đường hoạt hóa (UDP-glucose, dTDP-rhamnose) thông qua các con đường đường phân, pentose phosphate và Leloir [64].



Hình 1.5. Các con đường sinh tổng hợp đường nucleotide (GDP-mannose và UDP-glucose) để sản xuất EPS ở *Geobacillus* sp. WSUCF1 suy ra từ dữ liệu trình tự bộ gen. Các số EC đề cập đến các enzyme liên quan đến quá trình chuyển hóa [66]

Quá trình hấp thụ và chuyển hóa đường để tạo đường nucleotide (tiền chất để cấu tạo nên EPS) được mô phỏng trên Hình 1.5. Các đường đơn như glucose, galactose, lactose được vận chuyển vào tế bào qua 3 hệ thống chính: PTS (phosphotransferase system), vận chuyển chủ động phụ thuộc ATP (ABC transporter) và vận chuyển đồng vận ion (symporters/permeases). Trong đó, hệ PTS là cơ chế phổ biến ở vi khuẩn, đóng vai trò then chốt trong việc vận chuyển, phosphoryl hóa và cảm biến nồng độ đường trong môi trường [66]. Các đường phosphoryl hóa này tiếp tục được chuyển hóa thành các nucleotide đường – tiền chất cho hoạt động của hệ thống GT trong quá trình lắp ráp EPS [67].

Các gen tham gia tổng hợp EPS thường chia thành hai nhóm: (i) gen sinh tổng hợp tiền chất như *galU*, *galE*, *rfaA-D*; (ii) gen đặc hiệu EPS như *epsA-O*, *wzx*, *wzy*, mã hóa enzyme trùng hợp, vận chuyển và điều hòa [68], [69]. Ở *Bacillus velezensis*, cụm *epsA-O* chịu trách nhiệm cho quá trình tổng hợp và tiết EPS ra ngoài tế bào [50], cụm gen EPS bao gồm *epsABCDE*, *wzx*, *wzy* và *epsG* [69]; trong khi ở chủng *Geobacillus* sp. WSUCF1 vắng mặt các gen mã hóa Wzx flippase, Wzy polymerase và polysaccharide synthase, thay vào đó là sự có mặt của 15 gen liên quan tới con đường sinh tổng hợp EPS loại phụ thuộc chất vận chuyển ABC [66].

Thực nghiệm cho thấy, thay đổi nguồn carbon có thể ảnh hưởng đáng kể đến năng suất và biểu hiện gen liên quan đến EPS. Ở *Bifidobacterium longum* CRC002 sử dụng lactose thay glucose làm tăng gấp đôi sản lượng EPS và hoạt hóa các gen trong con đường Leloir (*galK*, *galT*, *galE*, *wblE*) [65]. Như vậy, quá trình chuyển hóa và định hướng dòng carbon có thể quyết định hiệu suất và cấu trúc EPS. Việc khai thác cơ chế này mở ra hướng tối ưu hóa sinh tổng hợp EPS phục vụ công nghiệp sinh học, cải tạo đất mặn và phát triển nông nghiệp bền vững.

1.4.3.4. Đặc tính, vai trò và ứng dụng của exopolysaccharide

Đặc tính chung của EPS

EPS có các tính chất hóa lý như: là polymer có khả năng liên kết ion, hấp phụ ion kim loại nặng, hòa tan trong nước, tạo gel, tạo độ nhớt, giữ nước, nhũ hóa dầu, ổn nhiệt và keo tụ. Một số EPS thể hiện đặc tính sinh học đáng chú ý như hoạt tính chống oxy hóa, kháng khuẩn, kháng nấm, kháng virus, chống viêm, chống khối u và điều hòa miễn dịch [67], [70]. Nhờ những đặc tính này, EPS có tiềm năng ứng dụng rộng rãi trong y sinh học, công nghiệp thực phẩm, nông nghiệp bền vững và xử lý môi trường.

Đặc tính của EPS trong việc giảm muối và hấp phụ kim loại nặng

Khi phải đối mặt với điều kiện mặn hoặc ô nhiễm kim loại, nhiều vi khuẩn có xu hướng tăng cường tổng hợp EPS như một cơ chế phòng vệ. Lớp EPS không chỉ là thành phần quan trọng trong cấu trúc biofilm mà còn tạo nên môi trường vi mô giúp vi khuẩn

duy trì hoạt động sống dưới áp suất thẩm thấu cao hoặc khi có sự hiện diện của ion độc hại [71], [72].

Các nghiên cứu cho thấy, hiệu quả hấp phụ muối của EPS liên quan trực tiếp đến đặc tính bề mặt của polymer. Cụ thể, EPS thường mang thể zeta âm và chứa nhiều nhóm chức như carboxyl, hydroxyl, phosphate, carbonyl hoặc thiol. Các nhóm này dễ dàng hấp phụ cation Na^+ thông qua cơ chế tương tác tĩnh điện, trao đổi ion hoặc hình thành phức chất [73]. Nhờ đó, Na^+ được cô lập khỏi dung dịch đất, giảm độc tính với bộ rễ và hỗ trợ cây trồng duy trì cân bằng nước – dinh dưỡng [72]. Ngoài ra, EPS còn có khả năng liên kết với hạt đất, góp phần cải thiện cấu trúc đất và giảm sự dịch chuyển của muối.

Ngoài việc tương tác với muối, EPS còn nổi bật với khả năng hấp phụ kim loại nặng (Cd^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+}). Cấu trúc polymer mang điện tích âm cho phép EPS gắn chặt các ion kim loại, hạn chế sự tích lũy trong cây trồng. EPS có thể điều chỉnh cấu trúc kết tụ đất và cộng đồng vi sinh vật, qua đó làm giảm đáng kể sự xâm nhập Cd và Pb vào mô thực vật [73].

Đặc tính giữ nước của EPS

Về mặt giữ nước, EPS thể hiện tính ưa nước mạnh nhờ kích thước lớn, và cấu trúc dạng mạng lưới polysaccharide giàu nhóm chức ưa nước, cho phép hình thành gel hút ẩm hiệu quả. Chẳng hạn, EPS từ *Lactobacillus kefiranoformans* ZW3 có khả năng giữ nước 496% [74], EPS-F2 từ *Enterococcus sp.* đạt tới 882,5% [75], trong khi EPS của *Bacillus haynesii* CamB6 đạt 266,8% [76]. Những chênh lệch này phản ánh sự khác biệt về khối lượng phân tử, cấu trúc mạng lưới và hàm lượng nhóm chức ưa nước giữa các EPS.

Các nhóm chức carboxyl, hydroxyl và phosphate được xem là yếu tố quyết định khả năng hút nước và tạo gel của EPS [77]. Sự kết hợp với thành phần protein kỵ nước còn giúp tạo cấu trúc keo bền, tăng cường độ kết tụ và khả năng lưu giữ ẩm cho đất [78]. Khả năng này cũng bị chi phối bởi yếu tố môi trường như mức độ mặn hoặc stress khác [79], [50].

Vai trò và ứng dụng của EPS

Về mặt sinh học, EPS đóng vai trò trung tâm trong việc hình thành và duy trì cấu trúc biofilm, giúp vi sinh vật bám dính lên bề mặt rắn, liên kết với nhau, và tạo nên một ma trận bảo vệ [56]. Ma trận EPS bao bọc tế bào giúp vi sinh vật chống chịu với các điều kiện môi trường bất lợi như stress thẩm thấu, nhiệt độ cao, pH khắc nghiệt, kim loại nặng, tia cực tím, và các chất kháng sinh [70]. EPS còn có khả năng giữ nước cao, là yếu tố then chốt trong việc giữ ẩm cho môi trường vi sinh vật, đặc biệt trong điều kiện khô hạn hoặc mặn [70].

Trong lĩnh vực thực phẩm, EPS được sử dụng như một chất ổn định, chất làm đặc, tạo gel và chất nhũ hóa. Một số sản phẩm EPS nổi bật như chất làm đặc xanthan gum được sản xuất bằng cách lên men đường bởi vi khuẩn *Xanthomonas campestris*; chất tạo độ nhớt gellan gum được sản xuất bởi *Pseudomonas elodea*. Nhờ các đặc tính sinh học tốt, EPS được ứng dụng trong lĩnh vực y dược như chất chống oxy hóa, chống viêm, chống ung thư, kích thích miễn dịch, giảm cholesterol [67].

Trong lĩnh vực nông nghiệp và cải tạo đất, EPS do vi khuẩn vùng rễ sản sinh ra được xem là một tác nhân sinh học quan trọng trong việc cải thiện đặc tính vật lý và sinh học của đất. EPS góp phần tăng cường sự kết tụ giữa các hạt đất, từ đó cải thiện cấu trúc đất, nâng cao khả năng giữ nước và giữ lại chất dinh dưỡng thiết yếu, đặc biệt hữu ích trong các loại đất cát nghèo dinh dưỡng hoặc đất nhiễm mặn [73]. Nhờ vậy, EPS tạo điều kiện thuận lợi cho sự thiết lập và phát triển của hệ vi sinh vật có lợi trong vùng rễ, gián tiếp thúc đẩy sinh trưởng và tăng cường sức khỏe cây trồng [73], [72].

Bên cạnh vai trò bảo vệ vi sinh vật trong điều kiện bất lợi, EPS còn đóng vai trò như một yếu tố trung gian quan trọng trong mối tương tác giữa thực vật và vi sinh vật vùng rễ. Việc tiết EPS được xem như một cơ chế sinh tồn của vi khuẩn, giúp chúng không chỉ thích nghi với điều kiện khắc nghiệt mà còn hỗ trợ thực vật trong việc chống chịu các stress phi sinh học như hạn, mặn hay pH bất lợi. Đặc biệt, EPS tham gia tích cực vào quá trình hình thành biofilm – cấu trúc tập hợp vi sinh vật thiết yếu trong vùng rễ, góp phần lưu giữ carbon, ổn định chu trình dinh dưỡng và tăng cường tương tác cộng sinh giữa vi sinh vật với cây trồng [80].

Tóm lại, EPS là hợp chất sinh học đa chức năng, vừa giúp vi khuẩn sinh tồn dưới stress, vừa cải thiện tính chất đất và bảo vệ cây trồng. Với các đặc tính giữ nước, hấp phụ muối và kim loại nặng, EPS hứa hẹn trở thành công cụ sinh học hiệu quả trong xử lý đất thoái hóa, nhiễm mặn, ô nhiễm kim loại và nông nghiệp bền vững.

1.4.4. Vai trò của vi khuẩn chịu mặn, sinh exopolysaccharide trong cải tạo đất khô hạn mặn

Độ mặn được xem là một trong những yếu tố môi trường then chốt gây suy giảm năng suất nông nghiệp trên toàn cầu. Cùng với BĐKH và sự nóng lên toàn cầu đang làm tình trạng hạn hán kết hợp với mặn hóa trở nên nghiêm trọng hơn, đặt ra thách thức lớn đối với an ninh lương thực [45]. Các giải pháp kỹ thuật như nâng cấp hệ thống thủy lợi hoặc cải tạo địa hình thường đòi hỏi chi phí cao, trong khi đó các chiến lược sinh học, đặc biệt là khai thác vi khuẩn chịu mặn, mang lại hướng tiếp cận bền vững và khả thi hơn.

Vi khuẩn vùng rễ thúc đẩy sinh trưởng thực vật (plant growth-promoting rhizobacteria) có khả năng chịu mặn thường đối phó với stress nhờ: tổng hợp chất tan

tương thích, sản xuất enzyme chịu mặn, hormone sinh trưởng và đặc biệt là tạo EPS [45]. EPS giúp vi khuẩn bám dính vào rễ, ổn định cấu trúc đất, giữ ẩm, giảm Na^+ tự do và bảo vệ tế bào trong điều kiện khắc nghiệt.

Trong môi trường biển và ven biển, nhiều chủng vi khuẩn đã được khai thác với EPS có giá trị sinh học cao. Ví dụ: *Bacillus cereus* (EPSR3, có hoạt tính chống oxy hóa và chống viêm) [49]; *Alteromonas macleodii* (EPS HYD657/deepsane, ứng dụng trong mỹ phẩm) [81]; *Pantoea sp.* (EPS-S3, thúc đẩy tái tạo mô da) [82]; *Terribacillus saccharophilus* (EPS nhũ hóa và phân hủy hydrocarbon, ứng dụng xử lý dầu mỏ) [83]. Ngoài ra, các chi *Pseudoalteromonas* và *Vibrio* tiết EPS có khả năng keo tụ, loại bỏ kim loại nặng trong nước thải; EPS từ *Monascus* biển có thể được sử dụng trong xử lý tràn dầu [48].

Trong ứng dụng cải tạo đất, nhiều chủng vi khuẩn sinh EPS đã chứng minh hiệu quả rõ rệt: *Azotobacter chroococcum* và *Lactobacillus fermentum* tạo polysaccharide không tan, bịt kín lỗ rỗng giữa hạt cát, tăng khả năng giữ nước [84]; *Pseudomonas chlororaphis* A20 và *Bacillus proteolyticus* A27 làm tăng kết tụ đất ổn định 128–169% và tăng hoạt tính enzyme đất 153–193% [85]; *Halomonas variabilis* (HT1) và *Planococcus rifietoensis* (RT4) hỗ trợ sinh trưởng thực vật dưới độ mặn cao [73]; chủng *Bacillus amyloliquefaciens*-3B1 đã được nghiên cứu ứng dụng cải tạo đất, chủng thể hiện khả năng sản sinh EPS tốt và ổn định trong đất, giúp tăng kết tụ đất và cải thiện khả năng chịu nước cũng như chịu mặn và tăng năng suất cho cây trồng [33]. Chủng *Bacillus* khác là *B. subtilis* cũng cho thấy được khả năng sản sinh EPS giúp cải tạo đất, tăng tính đàn hồi cho đất, nâng cao sản lượng cây trồng, nhất là khi canh tác trong điều kiện khắc nghiệt [35]; chủng *Paenibacillus polymyxa* đã được triển khai trong thực tiễn sản xuất nông nghiệp giúp tăng cường khả năng chịu mặn và phục hồi môi trường [37]. Những kết quả này cho thấy tính ưu việt của việc sử dụng các chủng vi khuẩn chịu mặn, sinh EPS trong việc cải tạo đất khô, nhiễm mặn, nhằm cải thiện sự phát triển của cây trồng, tăng sức chống chịu mặn, tăng khả năng giữ nước cho đất.

Một số loài vi sinh vật sinh EPS như *Bacillus safensis*, *Paenibacillus polymyxa*, và *Rhizobium meliloti* đã được nghiên cứu và sử dụng trong các chương trình cải tạo đất trên khắp thế giới. Các nghiên cứu thử nghiệm tiên phong đã được thực hiện tại Trung Quốc và cho thấy rằng việc áp dụng vi sinh vật sinh EPS có thể giúp cải tạo đất, tăng sản lượng và tiết kiệm chi phí sản xuất.

Tại Việt Nam, nghiên cứu về vi khuẩn sinh EPS ứng dụng trong cải tạo đất khô hạn mặn còn rất hạn chế, chủ yếu tập trung vào các loại nấm men như *Lipomyces* [86], [87]. *Lipomyces* đã được phân lập từ đất để phát triển chế phẩm vi sinh giúp nâng cao các đặc tính lý, hóa và sinh học của đất dốc tại huyện Mê Linh, tỉnh Vĩnh Phúc [87]. *Lipomyces*

starkeyi (PT5.1) sinh polysaccharide được ứng dụng để tăng khả năng giữ ẩm cho đất cát biển ở Bình Định có đặc tính nghèo dinh dưỡng, độ ẩm thấp, khả năng giữ nước kém để tăng năng suất cho lạc [86]. Ngoài ra còn có một số nghiên cứu ứng dụng chủng vi khuẩn sinh EPS cải tạo đất như: ứng dụng *Lactobacillus plantarum* để cải tạo đất và làm tăng hiệu suất cây trồng ở vùng lũ [38]; hay nghiên cứu về khả năng sản xuất EPS của *Bacillus subtilis*, cũng như tác động của vi sinh vật này đến các tính chất vật lý của đất [40],... Nghiên cứu của Vũ Thị Quỳnh Chi và cs (2022) đã sử dụng chế phẩm sinh học dạng rắn (gồm các phụ gia và vi sinh vật sinh nhầy, phân giải lân, sinh Indole-3-acetic acid, sinh 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase, bào tử nấm rễ cộng sinh *Mycorrhiza*) để cải tạo đất cát san hô lần đầu tiên trên đất cát mới bồi tại các đảo Trường Sa và Sinh Tồn. Kết quả cho thấy, chế phẩm hữu cơ sinh học dạng rắn có hiệu quả rõ rệt trong việc cải thiện tính chất đất, đặc biệt là khả năng lưu giữ chất dinh dưỡng và độ phì nhiêu, thể hiện qua sự gia tăng EC, hàm lượng chất hữu cơ và nitơ tổng số. So với chất điều hòa đất truyền thống như carboxymethyl cellulose, chế phẩm sinh học dạng rắn thể hiện tác động tích cực vượt trội đến sinh trưởng của rau muống trồng trên nền đất cải tạo [28].

Một số chế phẩm vi sinh vật cải tạo đất mặn được phát triển trên thị trường như Chế phẩm vi sinh chuyên dụng cho đất cát biển của Viện Thổ nhưỡng Nông hóa (chứa *Lipomyces starkeyi* sinh EPS); AQ99 (chứa các chủng *Bacillus*), Chế phẩm vi sinh vật cải tạo đất (có *Lipomyces starkeyi* sinh EPS), Nemon (chứa các chủng *Bacillus*),...

Vì vậy, việc nghiên cứu và khai thác các chủng vi khuẩn bản địa sinh EPS chịu mặn ở khu vực Trường Sa mang ý nghĩa quan trọng cả về mặt khoa học lẫn ứng dụng thực tiễn. Các chủng vi sinh này đã tiến hóa để thích nghi lâu dài với điều kiện khắc nghiệt của cát san hô – môi trường khô hạn, mặn và nghèo dinh dưỡng. Nhờ khả năng tiết EPS, chúng không chỉ tăng cường cơ chế tự bảo vệ mà còn có thể cải thiện đặc tính lý – hóa học của đất, nâng cao khả năng giữ nước, gia tăng độ phì nhiêu và mở ra triển vọng phát triển nông nghiệp bền vững trên các đảo xa bờ.

1.5. Giải trình tự toàn bộ hệ gen

1.5.1. Giới thiệu chung về công nghệ giải trình tự toàn bộ hệ gen

Giải trình tự toàn bộ hệ gen (Whole Genome Sequencing – WGS) là công cụ cốt lõi trong sinh học hiện đại, cho phép giải mã toàn bộ vật chất di truyền của sinh vật, từ đó phân tích cấu trúc, chức năng và tiềm năng ứng dụng của hệ gen. Với sự ra đời của các công nghệ giải trình tự thế hệ mới như Illumina, PacBio và Oxford Nanopore, việc thu nhận dữ liệu gen với độ chính xác cao, chi phí thấp và thời gian ngắn đã trở nên phổ biến trong nghiên cứu vi sinh vật [88].

1.5.2. Ứng dụng công nghệ giải trình tự toàn bộ hệ gen trong nghiên cứu vi khuẩn sinh exopolysaccharide

Việc ứng dụng công nghệ WGS trong phân tích đặc điểm di truyền của vi khuẩn sinh EPS đã trở thành một hướng nghiên cứu quan trọng trong vi sinh vật học hiện đại. Các loài vi khuẩn có khả năng sinh EPS như *Bacillus velezensis*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas spp.* và *Rhizobium spp.* đã được giải trình tự toàn bộ hệ gen nhằm mục tiêu xác định các cụm gen mã hóa tổng hợp EPS, phân tích tính an toàn, tiềm năng chuyển hóa, phân tích khả năng thích nghi với điều kiện bất lợi, và tiềm năng ứng dụng trong nông nghiệp, công nghiệp sinh học và y sinh [89], [66], [90]. Qua dữ liệu WGS, các cụm gen liên quan đến sinh tổng hợp EPS, bao gồm các gen mã hóa glycosyltransferase, protein vận chuyển, protein điều hòa và enzyme xúc tác tổng hợp tiền chất nucleotide-đường, hệ thống vận chuyển và các yếu tố điều hòa có thể được xác định chính xác. Các phân tích chức năng như KEGG, COG, GO và antiSMASH hỗ trợ dự đoán con đường sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp như EPS [89]. Đồng thời, WGS còn cho phép đánh giá khả năng thích nghi với điều kiện mặn, khô hạn hoặc nhiệt độ cao thông qua việc phát hiện các gen liên quan đến chống chịu môi trường [66].

Một số nghiên cứu điển hình có thể kể đến là nghiên cứu của Wang và cộng sự (2019) về chủng *Geobacillus* sp. WSUCF1. Thông qua WGS, các gen liên quan đến sinh tổng hợp tiền chất nucleotide-đường, GT, vận chuyển chuỗi polysaccharide ra ngoài bào và điều hòa tổng hợp EPS đã được xác định. Ngoài ra, hệ gen của chủng này còn chứa các gen liên quan đến CRISPR-Cas, quorum quenching, polyketide synthase và kháng kim loại nặng, cho thấy khả năng thích nghi cao với điều kiện nhiệt độ cao và môi trường khắc nghiệt, tiềm năng lớn trong ứng dụng công nghệ sinh học môi trường và y học [66].

Wu và cộng sự (2020) đã phân tích hệ gen chủng LPL061, cho thấy chủng vi khuẩn thuộc loài *B. velezensis* và xác định một cụm gen *eps* hoàn chỉnh gồm 12 gen mã hóa các GT. Các gen này được bảo tồn giữa các loài *Bacillus*, cho thấy vai trò thiết yếu trong sinh tổng hợp EPS. Khoảng 2,54% bộ gen LPL061 được dự đoán tham gia vào chuyển hóa và phân hủy các hợp chất thứ cấp [90].

Gần đây, Zhao và cộng sự (2023) giải trình tự bộ gen của chủng *Lactiplantibacillus plantarum* MC5 và phát hiện 7 con đường sinh tổng hợp nucleotide đường cùng 11 hệ thống vận chuyển phosphate đặc hiệu cho đường. Hệ gen của MC5 có nhiều bản sao gen vận chuyển cellobiose, mannose, fructose..., cho phép dự đoán khả năng sử dụng hiệu quả nhiều nguồn carbon khác nhau. Chủng này cũng sở hữu hai cụm gen *eps* hoàn chỉnh, bao gồm *epsABCDE*, *wzx*, *wzy* và một gen *epsG* đặc trưng, có liên quan đến sản xuất lượng lớn EPS. Kết quả thực nghiệm khẳng định khả năng chuyển hóa đường và năng suất EPS của chủng MC5 phù hợp với dự đoán từ dữ liệu hệ gen [69].

1.5.3. Ứng dụng công nghệ giải trình tự toàn bộ hệ gen trong nghiên cứu vi khuẩn chịu mặn

Trong những năm gần đây, công nghệ WGS đã trở thành công cụ thiết yếu trong nghiên cứu vi sinh vật chịu mặn, đặc biệt trong việc khai thác tiềm năng di truyền phục vụ cải tạo đất và phát triển chế phẩm sinh học. Tại Việt Nam và trên thế giới, WGS đã được ứng dụng để phân tích sâu các chủng vi khuẩn chịu mặn nhằm làm rõ cơ chế chịu mặn, khả năng thích ứng và vai trò kích thích sinh trưởng thực vật. Chẳng hạn, nghiên cứu của Nguyen và cs (2023) đã giải trình tự bộ gen chủng *Salinicola* sp. DM10, một vi khuẩn chịu mặn được phân lập từ đất mặn ở Việt Nam. Phân tích hệ gen cho thấy chủng này sở hữu các gen quan trọng liên quan đến cơ chế điều hòa thẩm thấu và chống chịu ion như hệ vận chuyển K^+ (*trkA*, *kdpABC*), hệ chống Na^+ (*nhaP*, *mrp*), cụm gen tổng hợp chất bảo vệ thẩm thấu (*ectABC*, *betAB*) và các kênh cảm biến áp suất cơ học (*mscKLS*). Ngoài ra, chủng DM10 còn mang các gen liên quan đến chuyển hóa phosphate (*gcd*, *pqqABCDE*, *phoB/R*), phân giải tinh bột (*amyIA*), giảm ethylene (*acdS* mã hóa 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase) và tổng hợp siderophore (*fhu*, *efeB*), cho thấy khả năng thúc đẩy sinh trưởng cây trồng trong điều kiện mặn cao [91]. Tương tự, Belaouni và cs (2022) đã giải trình tự toàn bộ hệ gen chủng *Bacillus* sp. BH32 và xác định đây là một loài mới trong nhóm *Bacillus*, mang nhiều gen liên quan đến bơm ion Na^+/H^+ , tổng hợp chất thích nghi thẩm thấu, enzyme chống oxy hóa, cùng các gen sinh auxin, phân giải cellulose, tổng hợp siderophore và các cụm gen mã hóa chất chuyển hóa thứ cấp (Biosynthetic Gene Clusters – BGCs), hỗ trợ vi khuẩn này tồn tại và tương tác cộng sinh với cây trồng trong điều kiện mặn [50]. Nghiên cứu của Wu và cs (2021) trên chủng *Bacillus halotolerans* KKD1 cũng cho thấy WGS đã làm sáng tỏ cơ chế chịu mặn-kiềm đa tầng, bao gồm gen mã hóa symporter Na^+ /Proline (*gene0757*), vận chuyển Na^+ qua ABC transporter (*gene2977*), các hệ vận chuyển K^+ (*trkA*, *kdpABC*), tổng hợp ectoine và glycine-betaine (*ectABC*, *betAB*), các kênh cảm biến cơ học (*mscK*, *mscL*, *mscS*), và enzyme chống oxy hóa như catalase, peroxidase, protein sửa chữa DNA. Đáng chú ý, KKD1 còn chứa nhiều cụm BGCs mã hóa surfactin và fengycin – các chất có khả năng kháng nấm bệnh thực vật, cho thấy tiềm năng ứng dụng trong nông nghiệp sinh học [92]. Bổ sung vào đó, nghiên cứu gần đây của Wang và cộng sự (2024) về chủng *Bacillus paralicheniformis* G9H01 đã chứng minh WGS có thể đồng thời phát hiện nhiều nhóm gen quan trọng liên quan đến điều hòa ion ($K^+/Na^+/H^+$ antiporter), chuyển hóa betaine và sinh tổng hợp EPS – polymer có vai trò thiết yếu trong việc kết tụ đất, giữ ẩm và bảo vệ vi khuẩn khỏi stress môi trường. Nhờ sự phối hợp của các nhóm gen này, chủng G9H01 có thể sống trong môi trường chứa đến 15% NaCl [93].

Các nghiên cứu trên góp phần khẳng định rằng WGS không chỉ giúp hiểu rõ hơn cơ chế sinh học phân tử của vi khuẩn chịu mặn mà còn mở ra hướng ứng dụng thực tiễn trong phát triển chế phẩm vi sinh phục vụ cải tạo đất khô hạn, mặn và nâng cao năng suất cây trồng ở những vùng đất khắc nghiệt như ven biển và hải đảo của Việt Nam.

1.5.4. Tình hình nghiên cứu và ứng dụng công nghệ giải trình tự toàn bộ hệ gen tại Việt Nam

Tại Việt Nam, công nghệ WGS đã được ứng dụng ngày càng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực nghiên cứu, đặc biệt là vi sinh vật học, y học phân tử, nông nghiệp và môi trường. Trong lĩnh vực y sinh, WGS đã giúp xác định toàn bộ trình tự bộ gen của nhiều tác nhân gây bệnh quan trọng như *SARS-CoV-2*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli* và virus RSV, hỗ trợ tích cực cho điều tra thực trạng tình hình dịch bệnh, giám sát dịch tễ và kiểm soát bệnh để bảo vệ sức khỏe cộng đồng [94], [95], [96]. Ngoài ra, một số nghiên cứu đã sử dụng WGS để khai thác các cụm gen sinh tổng hợp chất chuyển hóa thứ cấp từ vi sinh vật, phục vụ cho việc tìm kiếm hoạt chất mới có khả năng kháng khuẩn, kháng nấm, kháng virus, chống ung thư và ứng dụng probiotic trong bối cảnh gia tăng tình trạng kháng thuốc [97].

Trong lĩnh vực nông nghiệp và môi trường tại Việt Nam, công nghệ WGS đã được ứng dụng nhằm làm rõ tiềm năng sinh học và chức năng di truyền của các vi khuẩn có lợi. Lê Thị Thanh Tâm và cộng sự (2022) đã giải trình tự toàn bộ hệ gen của ba chủng *Bacillus velezensis* phân lập từ vùng rễ cây cà chua và cà phê, qua đó phát hiện sự hiện diện của các gen mã hóa cho hoạt chất sinh học có hoạt tính đối kháng nấm bệnh và tuyến trùng, bao gồm cụm gen *fen* và *pzn*. Những phát hiện này cung cấp cơ sở di truyền cho việc phát triển chế phẩm vi sinh có khả năng kích thích sinh trưởng và bảo vệ cây trồng khỏi tác nhân gây hại trong nông nghiệp bền vững [98]. Trong một nghiên cứu khác, Nguyen và cộng sự (2021) đã sử dụng WGS như một công cụ trọng yếu để phân tích bốn chủng vi khuẩn phân lập từ đất nhiễm độc chất diệt cỏ 2,4-D và 2,4,5-T tại căn cứ quân sự Biên Hòa. Phân tích hệ gen đã giúp nhận diện các cụm gen *tfdABCDEF* và *tfdCDEF*, mã hóa cho các enzyme liên quan đến quá trình phân giải các hợp chất hữu cơ chứa chlorophenoxy. Đồng thời, WGS cũng góp phần làm sáng tỏ khả năng tiếp nhận và tiến hóa của các gen này thông qua hiện tượng chuyển gen ngang giữa các loài vi khuẩn Proteobacteria. Những kết quả này không chỉ củng cố vai trò của WGS trong nghiên cứu vi sinh vật môi trường mà còn mở ra tiềm năng ứng dụng trong xử lý sinh học đất bị ô nhiễm hóa chất độc hại [99].

Đặc biệt, trong nghiên cứu vi khuẩn sinh EPS, Vu và cộng sự (2021) đã giải trình tự hệ gen của chủng *Bacillus velezensis* VTX20 phân lập từ thực phẩm, chủng vi khuẩn có khả năng sinh EPS cao ($75,5 \pm 4,8$ g/L) trong môi trường chứa 200 g/L sucrose. Phân

tích genome xác định sự hiện diện của operon *ls-levB* liên quan đến tổng hợp EPS loại levan. EPS từ VTX20 có hoạt tính chống oxy hóa mạnh, với khả năng quét gốc tự do DPPH đạt 40,1–64,0%, khẳng định tiềm năng ứng dụng của chủng này trong công nghiệp dược phẩm và y sinh [50]. Một nghiên cứu khác của cùng nhóm tác giả đã phân lập chủng *Cellulosimicrobium cellulans* MP1 từ ruột mối, cho thấy hệ gen chứa 30 gen liên quan đến phân hủy cellulose và hemicellulose, cùng với operon *sacC1-levB-sacC2-ls* liên quan đến sinh tổng hợp EPS loại levan. Những kết quả này mở ra tiềm năng ứng dụng của MP1 trong xử lý sinh học và sản xuất EPS [100].

Giải trình tự toàn bộ hệ gen đang khẳng định vai trò trung tâm trong nghiên cứu vi sinh vật học hiện đại nhờ khả năng cung cấp thông tin toàn diện về cấu trúc, chức năng và tiềm năng ứng dụng của hệ gen. Đối với vi khuẩn sinh EPS, WGS cho phép xác định các cụm gen liên quan tới tổng hợp EPS, cơ chế điều hòa và khả năng thích nghi với môi trường khắc nghiệt như mặn, nhiệt, pH cực đoan hoặc ô nhiễm kim loại. Tại Việt Nam, việc ứng dụng WGS trong nghiên cứu các chủng vi khuẩn bản địa không chỉ nâng cao hiểu biết khoa học mà còn thúc đẩy phát triển các chế phẩm sinh học phù hợp với điều kiện nông nghiệp và môi trường đang chịu tác động của biến đổi khí hậu.

Như vậy, qua tổng quan tài liệu có thể nhận thấy rằng đất mặn, khô hạn, đặc biệt là cát san hô tại quần đảo Trường Sa, có đặc điểm vật lý – hóa học rất khắc nghiệt: cấu trúc rời rạc, nghèo dinh dưỡng, khả năng giữ nước và trao đổi cation thấp, đồng thời thường xuyên chịu tác động của muối biển và bức xạ mặt trời mạnh. Các giải pháp cải tạo truyền thống chủ yếu dựa vào vật liệu vô cơ hoặc hóa học, hiệu quả ngắn hạn và thiếu bền vững. Trong khi đó, hướng tiếp cận sinh học sử dụng vi khuẩn bản địa sinh EPS được xem là triển vọng do khả năng tạo polymer ngoại bào giúp kết dính hạt đất, tăng giữ ẩm và giảm mặn tự nhiên, thân thiện với môi trường. Tuy nhiên, tại Việt Nam, các nghiên cứu về EPS và vi khuẩn sinh EPS chủ yếu tập trung ở đất mặn ven biển hoặc nội địa; mà chưa nghiên cứu chuyên sâu trên nền cát san hô xa bờ như Trường Sa, và đặc biệt thiếu các phân tích di truyền ở mức hệ gen nhằm làm rõ cơ chế tổng hợp EPS và khả năng thích nghi mặn của vi khuẩn sinh EPS vùng biển đảo. Trước khoảng trống đó, luận án này thực hiện phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn chịu mặn sinh EPS bản địa từ cát san hô Trường Sa, tiến hành giải trình tự và chú giải hệ gen để xác định cụm gen EPS, làm sáng tỏ mối liên hệ giữa cơ chế di truyền và đặc tính sinh học, đồng thời đánh giá hiệu quả cải tạo đất và sinh trưởng cây trồng trên mô hình chậu vại cát san hô cải tạo. Cách tiếp cận tổng hợp này góp phần bổ sung cơ sở khoa học và thực tiễn cho ứng dụng vi sinh vật bản địa trong cải tạo cát san hô mặn – khô vùng biển đảo Việt Nam, thể hiện rõ tính mới và giá trị ứng dụng của nghiên cứu.

CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

- Các mẫu đất thu thập từ 3 đảo thuộc quần đảo Trường Sa: Trường Sa Đông (kí hiệu TSD); Đá Tây A (kí hiệu DTA); Trường Sa Lớn (kí hiệu TSL). Tọa độ lấy mẫu được trình bày cụ thể ở Phụ lục 1. Các mẫu đất này được sử dụng để phân lập, tuyển chọn các chủng vi khuẩn chịu mặn, sinh EPS.

- Cát san hô sử dụng để thử nghiệm được lấy từ đảo Trường Sa Lớn ngày 29/4/2024 bởi V. D. N.

2.1.2. Thiết bị, hóa chất

Các hóa chất sử dụng: Bộ kit API 50CHB (BioMérieux, Pháp). Các đường: D-glucose, D-fructose, D-galactose, sucrose, lactose, D-maltose, mannose, manitol, trehalose, D-xylose, L-rhamnose, L-arabinose, cellobiose, L-arabinose N-acetylglucosamine của hãng Sigma-Aldrich (độ tinh khiết trên 95%); Yeast extract, peptone, Malt extract, NaCl, glycerol lỏng, agar, acetone, glucose, casein, urea, NH_4NO_3 , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl, K_2HPO_4 , ZnSO_4 , FeSO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,... các hóa chất tinh khiết từ các hãng uy tín như Sigma, Merck.

Môi trường nuôi cấy vi sinh vật:

Thành phần một số môi trường nuôi cấy vi sinh vật sử dụng trong nghiên cứu được pha theo Bảng 1 của Phụ lục 2.

Thiết bị: Các thiết bị được sử dụng chính trong nghiên cứu này được trình bày ở Bảng 2 Phụ lục 2.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp lấy mẫu đất

Mẫu đất được thu thập tại 3 đảo Trường Sa Đông, Đá Tây A và Trường Sa Lớn, đại diện cho các điều kiện địa lý và mức độ cải tạo khác nhau. Ở mỗi đảo, việc lấy mẫu được tiến hành tại 3 khu vực đặc trưng, bao gồm cả các vị trí mới được tôn tạo, bồi đắp bằng cát san hô trong những năm gần đây (như khu vực sau bờ kè, bãi cát ven đảo) và các vị trí cũ, lâu không được tôn tạo (như khu vực gốc cây hoặc gần nhà bếp). Riêng đảo Đá Tây A là đảo mới được tôn tạo toàn bộ trong thời gian gần đây nên các điểm lấy mẫu đều thuộc nhóm vị trí mới tôn tạo. Chi tiết tọa độ và mô tả từng vị trí lấy mẫu được trình bày tại Phụ lục 1.

Công tác lấy mẫu được thực hiện theo tiêu chuẩn TCVN 7538-2:2005 (ISO 10381-2:2002) về *Chất lượng đất – Lấy mẫu – Phần 2: Hướng dẫn kỹ thuật lấy mẫu*, nhằm đảm bảo tính đại diện và độ tin cậy của mẫu. Tại mỗi vị trí, mẫu được thu ở lớp đất mặt (0–20 cm) – tầng canh tác chính và cũng là nơi tập trung phần lớn hoạt động sinh học

trong đất. Phương pháp lấy mẫu hình chữ chi (zig-zag) được áp dụng để đảm bảo tính ngẫu nhiên và phản ánh đặc trưng trung bình của khu vực khảo sát.

Mẫu đất được thu bằng xẻng hoặc dao chuyên dụng đã được khử trùng bằng cồn 70% trước và sau mỗi lần lấy, nhằm hạn chế tối đa nguy cơ nhiễm chéo. Khoảng 500 g đất được lấy tại mỗi vị trí, trộn đều để tạo thành một mẫu tổ hợp đại diện cho khu vực. Mẫu sau khi thu được cho vào túi zip hoặc hộp nhựa có nắp kín, kèm nhãn ghi rõ mã số mẫu, ngày lấy, tọa độ GPS, điều kiện thời tiết và mô tả ngắn gọn đặc điểm vị trí. Toàn bộ quá trình lấy mẫu được tiến hành trong điều kiện thời tiết khô ráo. Sau khi thu thập, các mẫu được bảo quản trong thùng lạnh ở nhiệt độ 4 ± 2 °C và vận chuyển về phòng thí nghiệm để phục vụ cho công tác phân lập các chủng vi khuẩn chịu mặn và sinh EPS.

2.2.2. Nhóm phương pháp vi sinh

2.2.2.1. Phân lập, sàng lọc các chủng vi khuẩn chịu mặn, sinh exopolysaccharide

Dựa vào các cơ sở thực tế là: đất ở các đảo nội thuộc quần đảo Trường Sa do nhóm nghiên cứu khảo sát có độ mặn NaCl 0,45–1,27%; ở một số đảo khan hiếm nước ngọt, các cán bộ chiến sĩ thường tưới cây bằng nước lợ; trong khi đó mục đích sàng lọc chủng vi khuẩn chịu mặn để ứng dụng cải tạo đất cát san hô chủ yếu được khai thác từ dưới biển, vì vậy quá trình phân lập, tuyển chọn các chủng vi khuẩn được tiến hành trên môi trường LB chứa NaCl 3% (ngang độ mặn trung bình của nước biển).



Hình 2.1. Hình ảnh kéo dài thành sợi >5mm theo phương pháp thử kéo sợi

Tiến hành: Cân 10 g mẫu đất cho vào 90 mL nước muối sinh lý vô trùng và pha loãng từ nồng độ 10^{-1} – 10^{-5} . Hút 100 μ L dịch pha loãng trải trên đĩa thạch LB có bổ sung 3% NaCl, mỗi độ pha loãng lặp lại 3 đĩa, và ủ ở 30 °C trong 45–48 giờ. Mật độ vi sinh vật được xác định bằng phương pháp đếm khuẩn lạc trên đĩa thạch theo TCVN 11039-1:2015. Sau khi ủ, các khuẩn lạc được quan sát và phân loại sơ bộ dựa trên hình thái, màu sắc, kích thước và đặc điểm tế bào để ước lượng số nhóm hình thái khác nhau (số chủng vi sinh vật). Việc tuyển chọn các chủng có khả năng sinh EPS được thực hiện dựa trên đặc điểm khuẩn lạc bóng, ướt, có rỉ nhầy và khả năng kéo sợi > 5 mm. Các khuẩn lạc có đặc điểm này được tiếp tục cấy chuyển trên môi trường LB đặc bổ sung 3% NaCl cho đến khi thu được chủng thuần. Khả năng sinh EPS được kiểm tra bằng phương pháp

kéo sợi (Hình 2.1), trong đó khuẩn lạc sinh EPS tạo chất nhầy có thể quan sát bằng mắt thường; khi dùng đầu vòng của que cấy kéo, nếu hình thành sợi nhầy dài > 5 mm thì được xác định là dương tính, có khả năng sinh EPS [101]. Các chủng sinh EPS sau đó được đặt tên dựa theo nguồn gốc đất đảo phân lập được chủng.

2.2.2.2. Phương pháp tuyển chọn chủng vi khuẩn chịu mặn, có khả năng sinh tổng hợp EPS hàm lượng cao

Tiến hành dựa theo phương pháp của Cheng và cs (2020) [85].

Chủng vi khuẩn chịu mặn, có khả năng sinh tổng hợp EPS được giữ trong glycerol 38 % và lưu giữ ở tủ -80 °C tại Phân viện Công nghệ sinh học.

Chủng vi khuẩn được hoạt hóa bằng cách ria trên đĩa LB đặc có bổ sung NaCl 3%, ủ ở 30 °C trong 24 giờ để khuẩn lạc phát triển. Kiểm tra độ thuần khiết của các khuẩn lạc: màu sắc, bề mặt, hình dạng đặc trưng giống như khuẩn lạc chủng mẫu.

Từ đĩa thạch chứa khuẩn lạc thuần khiết, chọn một khuẩn lạc đơn và tiến hành nuôi cấy sơ cấp trong 3–5 mL môi trường LB lỏng, lắc ở tốc độ 150 rpm, 30 °C qua đêm. Sau đó, lấy 5% thể tích dịch nuôi cấy để tiếp giống vào bình tam giác 100 mL chứa 30 mL môi trường LB có bổ sung NaCl ở nồng độ cuối là 3%. Nuôi lắc ở 30 °C, 150 rpm trong 48 giờ.

Dịch sau lên men được đo OD600 xác định khả năng sinh trưởng của tế bào và tách chiết EPS đánh giá khả năng sinh tổng hợp EPS của chủng vi khuẩn để tuyển chọn chủng vi khuẩn cho hàm lượng EPS cao nhất phục vụ cho các nghiên cứu sâu hơn.

2.2.2.3. Khảo sát khả năng sử dụng các nguồn carbon của chủng vi khuẩn tuyển chọn **Nguyên lý**

Sử dụng bộ kit API 50CHB (BioMérieux, Pháp) để khảo sát khả năng lên men 49 loại đường (Bảng 3 Phụ lục 2) của chủng vi khuẩn *Bacillus* khảo sát.

Tiến hành

Các khuẩn lạc vi khuẩn nuôi trên môi trường LB đặc được tạo huyền phù trong ống chứa 10 mL môi trường API 50 CHB. Sau đó dịch môi trường khoáng có chứa vi khuẩn được bổ sung vào các giếng thử của bộ kit. Dùng dầu parafin phủ kín lên bề mặt các giếng. Đặt bộ kit và nuôi ở nhiệt độ 30 °C. Đọc kết quả sau 48 giờ.

Đọc kết quả

Một xét nghiệm dương tính tương ứng với sự axit hóa được thể hiện bởi chỉ thị màu đỏ có trong môi trường đổi thành màu VÀNG. Đối với xét nghiệm esculin (ống số 25), thay đổi màu từ màu tím đến ĐEN. Các ống không đổi màu môi trường là âm tính. Ký hiệu mẫu: (+) dương tính; (-) âm tính; (±) chưa rõ. Ghi kết quả vào bảng kết quả.

2.2.2.4. *Đánh giá khả năng chịu mặn và kim loại nặng của chủng vi khuẩn tuyển chọn*

Chủng vi khuẩn tuyển chọn được đánh giá khả năng chịu mặn dựa theo phương pháp của Sharma (2021) [102], Li (2021) [103]. Để đánh giá khả năng chịu mặn, muối NaCl/MgSO₄ được pha loãng với môi trường LB đến nồng độ cuối cùng sau khi thêm chủng vi khuẩn vào khay 96 giếng đạt được các giá trị sau: 0; 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; 15 và 17,5%. Mỗi mẫu được lặp lại 3 lần; các mẫu đối chứng âm: môi trường LB không thêm vi khuẩn; đối chứng dương: môi trường LB có bổ sung vi khuẩn. Dịch nuôi cấy của chủng vi khuẩn sau 16–18 giờ trong môi trường LB được pha loãng và thêm vào khay 96 giếng sao cho mật độ vi khuẩn trong mỗi giếng đạt khoảng 5×10^5 CFU/mL. Các khay được lắc ở 30 °C, 150 rpm trong 45–48 giờ và sau đó đánh giá khả năng chịu mặn của chủng. Khả năng chịu mặn của chủng vi khuẩn được đánh giá bằng khả năng phát triển của chủng vi khuẩn (dịch nuôi cấy đục hoặc xuất hiện màng biofilm màu trắng đục trên bề mặt giếng) ở các nồng độ muối khác nhau. Kí hiệu: (+) sinh trưởng được; (-) không sinh trưởng được; (±) chưa rõ. Ghi kết quả vào bảng kết quả.

Tương tự như vậy, khả năng chịu stress kim loại nặng của chủng vi khuẩn đã được thử nghiệm bằng cách pha loãng Cd(NO₃)₂, Hg(NO₃)₂, Cr(NO₃)₂, Co(NO₃)₂, Pb(CH₃COO)₂, FeSO₄, NaAsO₂ và ZnCl₂ với môi trường LB sao cho nồng độ cuối cùng sau khi thêm chủng vi khuẩn vào khay 96 giếng đạt các giá trị sau: 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 và 128 µg/mL. Thử nghiệm được tiếp tục ở nồng độ kim loại nặng từ 150–1050 µg/mL nếu chủng vi khuẩn có thể phát triển ở 128 µg/mL.

2.2.2.5. *Khảo sát ảnh hưởng của môi trường và điều kiện nuôi cấy riêng lẻ đến khả năng sinh EPS*

Sau khi tuyển chọn được chủng vi khuẩn sinh EPS tiềm năng, tiến hành khảo sát ảnh hưởng của từng yếu tố nuôi cấy riêng lẻ đến khả năng sinh EPS nhằm xác định điều kiện tối ưu cho quá trình sản xuất. Chủng vi khuẩn được nuôi cấy trong 6 loại môi trường phổ biến gồm: LB (Luria–bertani), NB (Nutrient broth), YPM (Yeast extract–peptone–malt extract), ISP2 (International streptomyces project medium 2), YM (Yeast malt) và TB (Terrific broth) ở điều kiện 30 °C, lắc 150 rpm trong 48 giờ (điều kiện nuôi cấy này được giữ xuyên suốt các quá trình khảo sát, trừ khi có ghi chú khác). Các mẫu dịch sau nuôi cấy được kiểm tra khả năng sinh trưởng (thông qua giá trị OD₆₀₀) và hàm lượng EPS (theo mục 2.2.6.1), và môi trường cho năng suất EPS cao nhất được chọn cho các khảo sát tiếp theo.

Dựa trên kết quả phân tích sinh hóa và dữ liệu genome, lựa chọn các nguồn carbon mà chủng có khả năng sử dụng tốt (D-glucose, D-fructose, D-galactose, sucrose, lactose, D-maltose, mannose, manitol, trehalose, D-xylose, L-rhamnose, L-arabinose, cellobiose) để bổ sung vào môi trường ở nồng độ 1% (w/v). Sau khi xác định nguồn carbon cho hiệu suất EPS cao nhất, tiến hành khảo sát ảnh hưởng của nồng độ carbon

với các mức 0,5; 1; 2,5; 5; 7,5 và 10% (w/v) nhằm chọn nồng độ cho hàm lượng EPS tốt nhất.

Để khảo sát nguồn nitơ, 1% các nguồn nitơ gồm casein, NH_4NO_3 , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, urea được bổ sung vào môi trường để khảo sát.

Ảnh hưởng của muối khoáng đến khả năng sinh EPS được đánh giá bằng cách bổ sung riêng lẻ 0,5% (w/v) các loại muối MgSO_4 , ZnSO_4 , FeSO_4 và NaCl vào môi trường. Loại muối khoáng cho hiệu quả cao nhất tiếp tục được khảo sát sâu ở các nồng độ 0,25; 0,5; 1; 3; 5; 8; 12,5 và 15% nhằm xác định nồng độ cho hàm lượng EPS tốt nhất.

Để khảo sát ảnh hưởng của độ pH, môi trường được điều chỉnh về các giá trị pH 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 và 11 bằng dung dịch NaOH hoặc HCl 1N trước khi hấp tiệt trùng để khảo sát lựa chọn điều kiện pH tốt nhất.

Các khảo sát tốc độ nuôi lắc 100; 150; 200; 250 rpm được lựa chọn. Nhiệt độ 5; 10; 15; 22; 30; 37; 42; 50; 57 °C được khảo sát và thời gian thu mẫu 12; 24; 36; 48; 60; 72; 84 giờ được khảo sát để lựa chọn điều kiện cho khả năng sinh EPS tốt nhất.

Cuối cùng, ảnh hưởng của tỷ lệ tiếp giống được khảo sát với các mức 1%, 2,5%, 5% và 7,5% (v/v).

Tất cả các thí nghiệm đều lặp lại 3 lần, lượng EPS tạo ra trong mỗi điều kiện được tách chiết, định lượng theo như mục 2.2.6.1 để lựa chọn điều kiện cho năng suất EPS cao nhất.

2.2.2.6. Tối ưu hóa các yếu tố môi trường ảnh hưởng đến sinh tổng hợp EPS

Dựa trên kết quả sàng lọc sơ bộ, ba yếu tố môi trường có ảnh hưởng đáng kể nhất đến năng suất sinh tổng hợp EPS đã được lựa chọn để tiến hành tối ưu hóa. Quy trình tối ưu hóa được thực hiện bằng thiết kế Box–Behnken kết hợp với phương pháp đáp ứng bề mặt (Response Surface Methodology – RSM) nhằm xác định điều kiện tối ưu cho quá trình sản xuất EPS [104].

Thiết kế Box–Behnken được xây dựng với 3 biến độc lập, mỗi biến có 3 mức mã hóa: thấp (-1), trung bình (0) và cao (+1). Thiết kế bao gồm 17 thí nghiệm, trong đó có 5 điểm lặp lại tại trung tâm để đánh giá sai số thực nghiệm và tính lặp lại của mô hình. Ma trận thí nghiệm được trình bày trên Bảng 2.1.

Bảng 2.1. Thiết kế các thí nghiệm Box-Benhken 3 yếu tố

Thí nghiệm	X_1	X_2	X_3
1	0	-1	1
2	-1	0	1
3	0	-1	-1
4	1	-1	0
5	1	1	0

6	0	0	0
7	1	0	1
8	1	0	-1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	-1	0	-1
12	-1	1	0
13	-1	-1	0
14	0	1	1
15	0	1	-1
16	0	0	0
17	0	0	0

Phân tích hồi quy được thực hiện bằng phần mềm Design-Expert phiên bản 13 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA). Mối quan hệ giữa các biến độc lập và hàm mục tiêu (hàm đáp ứng – năng suất EPS) được mô hình hóa dưới dạng phương trình đa thức bậc hai như sau:

$$Y = a + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_{12}X_1.X_2 + a_{23}X_2.X_3 + a_{13}X_1.X_3 + a_{11}X_1^2 + a_{22}X_2^2 + a_{33}X_3^2$$

Trong đó, Y là giá trị đáp ứng dự đoán (năng suất EPS); a là hằng số tỉ lệ; X_1 , X_2 , X_3 là các biến độc lập tương ứng với 3 yếu tố môi trường được khảo sát; a_1 , a_2 , a_3 là các hệ số tuyến tính; a_{12} , a_{13} , a_{23} là các hệ số tương tác hai chiều; a_{11} , a_{22} , a_{33} là các hệ số bậc 2.

Phân tích phương sai (ANOVA) được sử dụng để đánh giá độ phù hợp và ý nghĩa thống kê của mô hình hồi quy. Các chỉ số quan trọng bao gồm:

- Hệ số xác định R^2 nhằm phản ánh mức độ giải thích của mô hình đối với biến phụ thuộc.
- Giá trị p (p-value) cho từng yếu tố và mô hình tổng thể, với ngưỡng ý nghĩa là $p < 0,05$.
- Kiểm định Lack of Fit (độ không phù hợp) được áp dụng để đánh giá liệu mô hình hồi quy có thể mô tả chính xác mối quan hệ giữa các biến hay không. Giá trị $p > 0,05$ trong kiểm định này chỉ ra rằng sai số không đáng kể, chứng minh rằng mô hình là phù hợp thống kê với dữ liệu thực nghiệm.

Việc xác định ý nghĩa thống kê và chất lượng mô hình giúp đảm bảo rằng các điều kiện tối ưu dự đoán từ mô hình có thể áp dụng hiệu quả trong thực tế và tạo nền tảng cho các bước xác nhận thực nghiệm tiếp theo.

2.2.2.7. *Đánh giá ảnh hưởng của một số nguồn đường tới thành phần monnosaccharide của EPS*

Chủng tuyển chọn được nuôi cấy trong điều kiện tương tự điều kiện tối ưu, chỉ khác là có thay đổi ở thành phần đường là glucose/sucrose ở các nồng độ 0; 1%; 5%. Dịch nuôi cấy lỏng sau lên men được kiểm tra khả năng sinh trưởng qua giá trị OD600 và tách chiết, xác định hàm lượng EPS tạo ra và xác định thành phần monnosaccharide của EPS ở các điều kiện nguồn đường khác nhau.

2.2.3. *Phương pháp phân loại vi khuẩn*

2.2.3.1. *Xác định đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa*

Các chủng vi khuẩn được cấy rìa trên môi trường LB đặc, ủ ở 30 °C. Sau ủ 24 giờ, quan sát hình thái, màu sắc, kích cỡ, đặc điểm khuẩn lạc, nhuộm Gram, quan sát tế bào trên kính hiển vi quang học.

2.2.3.2. *Phân loại dựa trên trình tự đoạn gen 16S rRNA*

Phân loại dựa trên trình tự đoạn gen 16S rRNA của vi khuẩn sau khi so sánh với trình tự trên GenBank. Kết quả được sử dụng để xác định vị trí phân loại và mối quan hệ tiến hóa của chủng nghiên cứu so với các loài có quan hệ gần.

Nuôi cấy vi khuẩn để thu sinh khối: Chủng vi khuẩn được nuôi trong môi trường LB ở điều kiện 30 °C, lắc 150 rpm trong 16–18 giờ. Sau đó ly tâm với tốc độ 6000 rpm, ở 4 °C, trong 20 phút, thu cặn tế bào.

Tách chiết DNA genome:

Tách chiết DNA genome được thực hiện bằng bộ kit TracePure™ (LabNova) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Quy trình được tiến hành như sau:

Trộn đều 20 mg sinh khối tế bào ướt với 180 µL Digestion Solution và 20 µL Proteinase K, sau đó ủ lắc 1300 rpm trong 1–3 giờ cho đến khi mẫu phân giải hoàn toàn, đồng thời vortex vài lần trong quá trình ủ. Sau khi đưa mẫu về nhiệt độ phòng, thêm 10 µL Rnase A, ủ 10 phút, tiếp đến bổ sung 200 µL Lysis Solution và trộn đều trong 30 giây.

Thêm 300 µL cồn tuyệt đối, trộn đều rồi chuyển toàn bộ hỗn hợp (kể cả phần tủa trắng nếu có) vào cột lọc, ủ 3 phút ở nhiệt độ phòng, ly tâm 8000 rpm trong 1 phút và loại bỏ dịch thu. Tiếp tục rửa cột lần lượt bằng 500 µL Wash Buffer 1 (ly tâm 8000 rpm, 1 phút) và 500 µL Wash Buffer 2 (ly tâm 13000 rpm, 3 phút), lặp lại bước rửa lần hai và ly tâm thêm 1 phút để loại bỏ hoàn toàn dung dịch rửa.

Cuối cùng, chuyển cột lọc sang ống sạch, thêm 50–200 µL Elution Buffer đã gia nhiệt 56 °C, ủ 3 phút ở nhiệt độ phòng, ly tâm 4000 rpm trong 1 phút để thu DNA tổng số. Chất lượng DNA được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0,8%.

- *PCR khuếch đại đoạn gen 16S rRNA*

Vùng gen 16S rRNA được khuếch đại từ khuôn DNA tổng số, sử dụng cặp mồi 27F và 1495R có trình tự 27F: 5' GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG 3'; 1495R: 5'CTA CGG CTA CCT TGT TAC GA 3' [105].

Hỗn hợp phản ứng PCR 25 μL gồm: 8,5 μL nước PCR; 2 μL DNA (~100 ng); 1 μL mồi 27F (10 pmol); 1 μL mồi 1495R (10 pmol); 12,5 μL DreamTaq PCR Master Mix.

Chế độ chạy PCR: 94 °C/5 phút, 35 chu kỳ (biến tính ở 94 °C/1 phút; gắn mồi 52 °C/1 phút; tổng hợp DNA ở 72 °C/1,5 phút); duy trì phản ứng ở 72 °C/10 phút. Sau khi phản ứng kết thúc, lấy 4 μL sản phẩm PCR được điện di trên gel 0,8% agarose để kiểm tra.

- *Xác định trình tự gen 16S rRNA*

Sản phẩm PCR đoạn gen 16S rRNA được tinh sạch bằng cách sử dụng bộ kit tinh sạch QIAquick PCR Purification Kit (Qiagene - Đức) và giải trình tự tại hãng FirstBase. Trình tự thu được so sánh với các dữ liệu gen tương ứng NCBI GenBank bằng cách sử dụng công cụ BLAST.

- *Dựng cây phân tích phả hệ*

Cây phân tích phả hệ được xây dựng dựa trên đoạn trình tự gen 16S rRNA. Tất cả trình tự nucleotide được lấy trên ngân hàng dữ liệu với tên loài và các mã số truy cập đều thể hiện trên Hình cây phân loại). NGPhylogeny (<https://ngphylogeny.fr/tools/>) với Gblocks (Alignment Curation), MAFFT (Multiple Alignment), và PhyML (Tree Inference) được dùng để dựng cây phát sinh chủng loại từ các trình tự gen 16S rRNA.

2.2.4. Phương pháp giải trình tự toàn bộ hệ gen

2.2.4.1. Kiểm tra chất lượng DNA genome

Chất lượng DNA cần đạt các yêu cầu trên Bảng 2.2, chỉ số độ toàn vẹn DNA thông qua DIN (DNA Integrity Number) phải đạt trên 7,2 tương đương với xuất hiện 1 vạch sáng, không đứt gãy trên gel agarose 0,8% là đạt yêu cầu để giải trình tự toàn bộ genome.

Bảng 2.2. Yêu cầu chất lượng DNA

Nồng độ: >20 ng/ μL	Độ tinh sạch (A260/A280): >1,7
Thể tích: >30 μL	Tổng hàm lượng DNA: >0,45 μg
Độ tinh sạch và chất lượng DNA cần được kiểm tra trên gel agarose 0,8%. Chỉ số DIN yêu cầu phải đạt > 7,2 tương đương với sự xuất hiện 1 vạch sáng, không đứt gãy.	

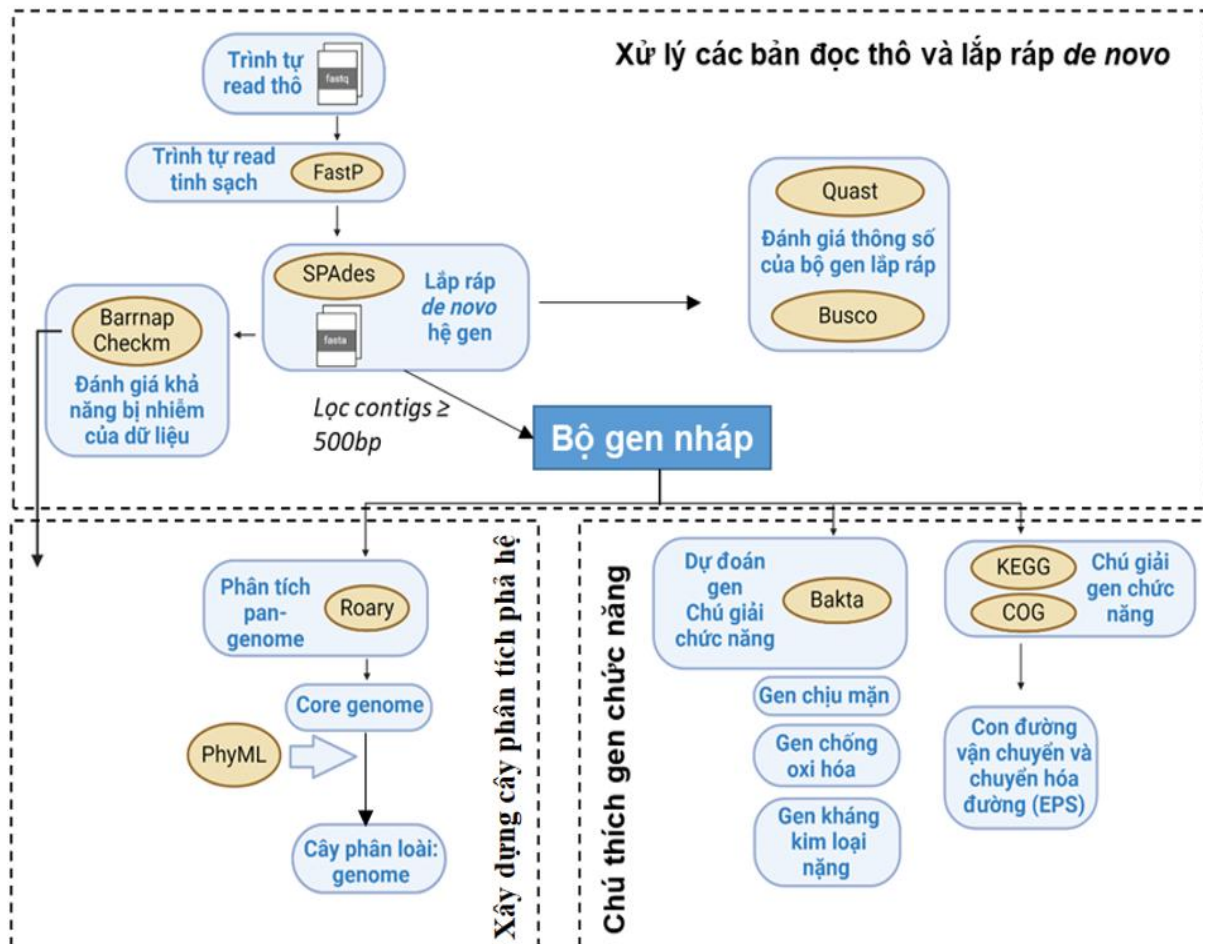
2.2.4.2. Giải trình tự toàn bộ hệ gen vi khuẩn

Mẫu DNA tinh khiết của chủng vi khuẩn được chuyển đến Công ty Novogen AIT (Singapore) để giải trình tự toàn bộ hệ gen trên nền tảng Illumina Novaseq 6000. Giải mã hai chiều với kích thước đoạn đọc 150 bp.

2.2.5. Phân tích tin sinh học dữ liệu giải trình tự toàn bộ hệ gen

Quy trình phân tích tin sinh hệ gen chủng vi khuẩn cơ bản như trên Hình 2.2.

Xử lý các bản đọc thô và lắp ráp de novo: Fastp v0.23.2 [106] được sử dụng đánh giá chất lượng dữ liệu giải trình tự WGS, và loại bỏ các đoạn đọc có điểm chất lượng dưới 20. Các đoạn đọc sạch được giữ lại và lắp ráp *de novo* bằng cách sử dụng SPAdes v3.15.5 [107] để tạo ra các đoạn đọc dài (contig). Chất lượng của bộ gen được lắp ráp được đánh giá bằng QUAST v5.0.2 [108]. Tất cả các contig dưới 500 bp được loại bỏ khỏi bộ gen được lắp ráp. Độ toàn vẹn hệ gen được đánh giá bằng công cụ BUSCO (v5.3.2) với lineage Bacillales.



Hình 2.2. Quy trình phân tích tin sinh hệ gen chủng vi khuẩn bao gồm các bước từ xử lý dữ liệu trình tự thô, lắp ráp hệ gen, xây dựng cây phân tích phả hệ, đến chú thích các gen chức năng

Xây dựng cây phân tích phả hệ:

Core genes được phân tích bằng PATRIC để xây dựng cây phân loại. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa trên core genome. Dữ liệu đầu vào là dữ liệu bộ gen nòng cốt (core genome) của các mẫu được lọc bằng công cụ roary. Để dựng cây phân loại giữa các chủng *Bacillus* khác nhau, tệp fasta của hệ gen đồng nhất được đưa lên Bv-brc “Phylogenetic Tree Service – Codon Tree” - RAxML (<https://www.bv-brc.org/app/PhylogeneticTree>).

Chú thích gen chức năng: Chú thích chức năng của bộ gen nghiên cứu được xác định bằng Bakta v1.8.1 [109] và Prokka v1.14.6 [110]. Các con đường chuyển hóa carbohydrate được xác định thêm bằng COGclassifier v1.0.5 [111] và BlastKOALA [112] so với cơ sở dữ liệu COG và Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) [113]. So sánh và trực quan hóa cụm *eps* của chủng vi khuẩn nghiên cứu và một số chủng tham chiếu *Bacillus* bằng CAGECAT web server [114].

2.2.6. Nhóm phương pháp hóa sinh

2.2.6.1. Phương pháp tách chiết exopolysaccharide thô

Quy trình chiết xuất EPS được tiến hành dựa trên phương pháp [50]:

Tiến hành pha loãng 25 mL dịch sau nuôi cấy trong 20 mL nước cất khử trùng và lắc mạnh trong 3 phút, sau đó dịch được làm nóng ở 100 °C trong 5–10 phút để làm bất hoạt các enzyme liên quan đến quá trình phân hủy EPS. Ly tâm 4000 rpm trong 20 phút để thu dịch nổi và lọc dịch qua màng lọc 0,22 µm để loại các tế bào còn sót lại.

Bổ sung 2 lần thể tích dung dịch acetone lạnh (4 °C) vào mẫu dịch nổi, lắc đều, giữ ở 4 °C trong 16 giờ và tiến hành ly tâm 4000 rpm trong 5 phút để thu cặn. Bổ sung 5 mL dung dịch acetone vào cặn, lắc để rửa cặn trong 1 phút, sau đó ly tâm 4000 rpm trong 5 phút để thu cặn, lặp lại bước rửa 2 lần. Cặn sau đó được hòa trong nước cất và cho vào túi thẩm tích (14 kDa cut-off dialysis membrane, Himedia, Mumbai, India) đặt trong nước, cứ 8 giờ thay nước 1 lần và trong 40 giờ thẩm tích để loại bỏ tạp chất có kích thước nhỏ (đường đơn, muối). Sau đó, mẫu được đông khô và cân lượng EPS thô thu được.

2.2.6.2. Phương pháp tinh sạch exopolysaccharide

Quy trình tinh sạch EPS được thực hiện dựa theo phương pháp đã được công bố bởi Zhao và cs (2019) [115] với một số điều chỉnh phù hợp điều kiện nghiên cứu:

Bước 1: Lấy 25 mL dịch lên men chủng vi khuẩn tuyển chọn trong điều kiện tối ưu, pha loãng với 20 mL nước cất vô trùng và lắc mạnh bằng máy vortex trong 1 phút. Mẫu sau đó được ủ ở 95 °C trong 10–15 phút nhằm bất hoạt enzyme nội bào.

Bước 2: Mẫu được ly tâm ở 4 °C với tốc độ 4500 rpm trong 10 phút để loại bỏ tế bào. Phần dịch nổi được thu hồi và bổ sung trichloroacetic acid (TCA) 80% (w/v) đến

khi đạt nồng độ TCA cuối cùng là 4% (w/v). Sau khi lắc đều, mẫu được ủ tại 4 °C trong 16 giờ nhằm kết tủa protein.

Bước 3: Kết tủa protein được loại bỏ bằng cách ly tâm ở 4500 rpm, 4 °C trong 10 phút. Dịch nổi sau đó được trung hòa về pH 7 bằng dung dịch NaOH. Để kết tủa EPS, acetone lạnh (đã được ủ ở -25 °C tối thiểu trong 1 giờ) được thêm vào theo tỷ lệ 2:1 (v/v, acetone:mẫu). Hỗn hợp được lắc đều và tiếp tục ủ ở -25 °C trong 1 giờ, sau đó ly tâm để thu cặn EPS.

Bước 4: Cặn EPS được hòa tan trong 5 mL nước cất đã làm ấm ở 50 °C và tiến hành thẩm tích bằng màng cut-off 14 kDa (Himedia, Mumbai, India) trong nước cất. Nước được thay mỗi 8 giờ/lần nhằm loại bỏ đường đơn và muối khoáng. Quá trình thẩm tích được kéo dài 48 giờ.

Bước 5: Mẫu sau thẩm tích được bảo quản ở -25 °C trong 16 giờ, sau đó được đông khô. Khối lượng EPS thu được sau đông khô được cân để định lượng. Hàm lượng carbohydrate trong EPS được xác định bằng phương pháp phenol–sulfuric acid [116] dựa trên đường chuẩn D-glucose.

Bước 6: Để tinh sạch EPS, 4 mg EPS sau đông khô được hòa tan trong 2 mL nước cất ấm (50 °C) và được nạp lên cột Sephadex G-75 (kích thước 2,5 × 100 cm). Quá trình rửa giải được thực hiện bằng nước khử ion với tốc độ dòng 0,5 mL/phút. Mỗi phân đoạn 2 mL được thu riêng và kiểm tra hàm lượng carbohydrate bằng phương pháp phenol–sulfuric acid. Các phân đoạn chứa carbohydrate được gom lại, tiếp tục đông khô và cân xác định lượng EPS thu được. Tính hiệu suất tinh sạch EPS qua cột Sephadex G-75 theo công thức:

$$\text{Hiệu suất tinh sạch} = \frac{\text{Khối lượng EPS sau tinh sạch}}{\text{Khối lượng EPS đưa lên cột Sephadex G – 75}} \times 100\%$$

Trong đó khối lượng EPS đưa lên cột Sephadex G-75 ở đây là 4 mg.

Bước 7: Mẫu EPS tinh sạch được đánh giá sơ bộ bằng cách hòa tan trong nước cất, sau đó xác định hàm lượng carbohydrate theo phương pháp Dubois [116], sử dụng đường chuẩn D-glucose, và hàm lượng protein tổng số theo phương pháp Bradford [117], với BSA (Bovine Serum Albumin) làm chất chuẩn. Từ đó tính được khối lượng carbohydrate, khối lượng protein và hàm lượng carbohydrate/protein trong EPS thu được sau tinh sạch.

Công thức tính hàm lượng carbohydrate/protein trong EPS:

$$\text{Hàm lượng carbohydrate/protein} = \frac{\text{Khối lượng carbohydrate/protein}}{\text{Khối lượng EPS}} \times 100\%$$

Độ sạch của EPS chính là hàm lượng carbohydrate trong EPS sau tinh sạch.

EPS sau khi tinh sạch được sử dụng cho các phân tích tiếp theo về cấu trúc và khối lượng phân tử.

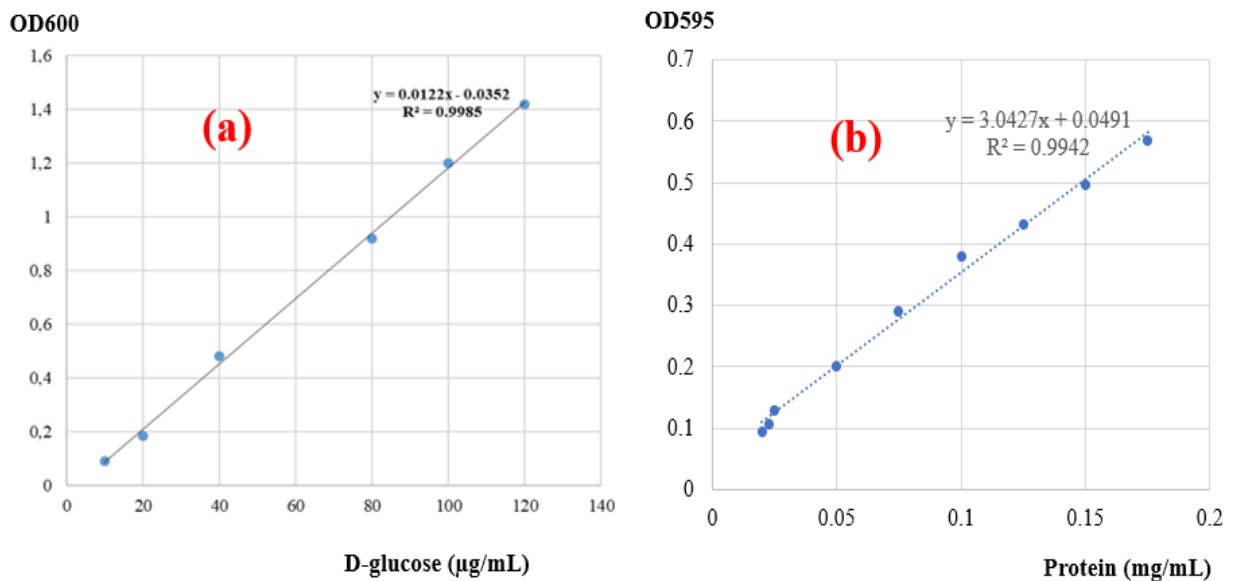
2.2.6.3. Phương pháp xác định hàm lượng carbohydrate

Dựng đường chuẩn D-glucose

Quy trình dựng đường chuẩn D-glucose được thực hiện theo phương pháp của Dubois và cộng sự [116], sử dụng phản ứng giữa đường khử và acid sulfuric đậm đặc trong môi trường có mặt của phenol, nhằm hình thành hợp chất có màu vàng cam đặc trưng, đo được ở bước sóng 490 nm.

Dung dịch phenol 5% được chuẩn bị bằng cách hòa tan 5 g phenol (đối với phenol dạng rắn cần được làm nóng nhẹ) trong 100 mL nước cất. Đồng thời, sử dụng acid sulfuric đậm đặc (H_2SO_4) làm chất xúc tác và môi trường phản ứng.

Dung dịch D-glucose chuẩn được pha với các nồng độ từ 10 đến 120 $\mu\text{g/mL}$ trong nước cất vô trùng. Đối với mỗi phản ứng, trộn đều 0,3 mL dung dịch glucose với 0,3 mL phenol 5%, sau đó thêm 1,5 mL acid sulfuric đậm đặc. Hỗn hợp được để phản ứng trong 20 phút ở nhiệt độ phòng trước khi đo độ hấp thụ quang ở bước sóng 490 nm bằng máy quang phổ UV-Vis. Từ các giá trị mật độ quang đo được, đường chuẩn D-glucose được xây dựng (Hình 2.3a) và phương trình hồi quy tuyến tính được sử dụng để tính toán nồng độ carbohydrate trong các mẫu thử.



Hình 2.3. Đồ thị đường chuẩn D-glucose (a) và BSA (b).

Xác định hàm lượng carbohydrate dựa trên đường chuẩn D-glucose

Để xác định hàm lượng carbohydrate trong mẫu, 0,3 mL dung dịch mẫu được phản ứng với 0,3 mL phenol 5% và 1,5 mL H_2SO_4 đặc theo quy trình tương tự như trên. Mỗi mẫu được thực hiện với 3 lần lặp lại để đảm bảo độ chính xác và tin cậy. Giá trị độ hấp thụ tại bước sóng 490 nm (OD_{490}) của mẫu được đối chiếu với đường chuẩn D-glucose để tính toán hàm lượng carbohydrate tổng số có trong EPS.

2.2.6.4. Phương pháp định lượng protein tổng số

Protein trong dung dịch được định lượng theo đường chuẩn BSA (*Bovine serum albumin*) bằng phương pháp Bradford (1976), sử dụng thuốc nhuộm protein Coomassie Brilliant Blue G-250 và đo độ hấp thụ quang tại bước sóng 595 nm [117].

Dụng đồ thị chuẩn protein: bằng cách sử dụng protein BSA làm chuẩn, BSA được pha loãng về các nồng độ từ 0,02–0,175 mg/mL. Các dịch pha loãng được hút 20 μ L bổ sung vào trong phiên 96 giếng, mỗi nồng độ lặp lại 3 lần. Sau đó bổ sung 180 μ L dung dịch thuốc nhuộm Bradford (0,005 %) vào mỗi giếng, trộn đều và ủ trong 5 phút trong tối. Phiên mẫu được đọc trên thiết bị elisa tại bước sóng 595 nm, sử dụng phần mềm Skalt RE 6.0.2. Sự tương quan giữa nồng độ BSA và cường độ quang thể hiện trên Hình 2.3b.

Định lượng protein tổng số:

Dịch mẫu nghiên cứu được tiến hành tương tự với mẫu đối chứng (blank) là nước. Từ giá trị cường độ quang của mẫu đo được tại bước sóng 595nm sẽ tính được nồng độ protein dựa vào đồ thị chuẩn protein BSA trên Hình 2.3b.

2.2.6.5. Xác định khối lượng phân tử và cấu trúc EPS

EPS sau tinh sạch được sử dụng để xác định khối lượng phân tử và phân tích cấu trúc EPS.

Phương pháp phân tích cấu trúc bề mặt của EPS dựa trên ảnh chụp SEM (Scanning Electron Microscopy): Ảnh hiển vi điện tử của EPS được chụp trên kính hiển vi điện tử quét JSM-IT200 (JEOL, Nhật Bản).

Phân tích thành phần nguyên tố của EPS: Tỷ lệ thành phần các nguyên tố được xác định bằng đầu dò EDS Dry SD60 trong kính hiển vi điện tử JSM-IT200 dựa trên phương pháp phân tích phổ tán xạ năng lượng tia X (EDX hoặc EDS, Energy-dispersive X-ray spectroscopy) với phương pháp hiệu chỉnh định lượng ZAF.

Phân tích EDX và chụp SEM được tiến hành tại Viện Sinh thái nhiệt đới, Trung tâm Nhiệt đới Việt – Nga.

Ước tính khối lượng phân tử EPS: Lấy 7 mg EPS ngâm 24 giờ trong 28 ml dung dịch NaNO_3 0,1M, sau đó vortex hòa tan tạo dung dịch EPS 0,025%, (w/v). Từ dung dịch này, 10 mL được pha loãng với 10 mL NaNO_3 0,1 M để tạo nồng độ 0,0125%, sau đó tiếp tục pha loãng tuần tự để thu được các nồng độ 0,00625%; 0,003125% và 0,0015625%. Thời gian chảy của dung môi (NaNO_3 0,1 M) và các dung dịch EPS ở các nồng độ khác nhau được đo bằng nhớt kế Cannon–Fenske ở 25 °C. Dựa trên số liệu thực nghiệm, đồ thị biểu diễn mối quan hệ giữa độ nhớt rút gọn và nồng độ EPS được xây dựng, từ đó xác định độ nhớt nội tại ($[\eta]$) [118]:

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} (\eta_{sp}/c)$$

$[\eta]$ là độ nhớt nội tại; C là nồng độ EPS, η_{sp} là độ nhớt riêng; độ nhớt rút gọn $\eta_{red} = \eta_{sp}/c$. Từ đó, ước tính khối lượng phân tử EPS dựa trên công thức Mark-Houwink: $[\eta] = KM^\alpha$, trong đó M là khối lượng phân tử EPS cần tính toán, K và α là hằng số phụ thuộc vào bản chất của dung môi và nhiệt độ, α thường có giá trị trong khoảng 0,5–0,8 [118].

Xác định thành phần monnosaccharide của EPS

Thành phần monosaccharide của EPS được xác định bằng phương pháp thủy phân acid và phân tích HPLC. Cụ thể, 20 mg EPS đông khô được thủy phân ở 120 °C trong 2 giờ với 3 mL trifluoroacetic acid 4M. Mẫu thủy phân sau đó được pha loãng trong nước cất vô trùng, ly tâm và lọc qua màng lọc 0,22 μ m trước khi phân tích HPLC.

Thành phần monosaccharide của EPS được phân tích bằng hệ thống HPLC Agilent 1260 được trang bị cột Hi-Plex Ca (300 $\times$ 7,7 mm), đầu dò RI và nước cất làm pha động. Tốc độ dòng chảy được đặt là 0,6 mL/phút, ở 85 °C, với thời gian chạy là 25 phút. Các mẫu EPS thủy phân, cùng với các monosaccharide: glucose, galactose, rhamnose, fructose, mannose, N-acetylglucosamine của hãng Sigma-Aldrich (độ tinh khiết trên 95%) được sử dụng làm chất chuẩn, được tiêm vào cột. Thời gian lưu của mẫu và chuẩn được so sánh.

Phương pháp xác định các nhóm chức bằng phân tích phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy – FT-IR)

Phổ FT-IR của mẫu EPS được ghi nhận bằng thiết bị FTIR Impac-410, sử dụng viên nén KBr làm môi trường truyền dẫn. Quy trình phân tích được thực hiện theo phương pháp của Cheah và cs (2022) [119] tại Học viện Kỹ thuật Quân sự. Dải phổ thu được được sử dụng để xác định các nhóm chức năng chính có mặt trong cấu trúc của exopolysaccharide.

2.2.6.6. Phương pháp đo thế zeta

Thế zeta của EPS được xác định bằng thiết bị Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, UK), sử dụng phương pháp tán xạ laser động.

Thiết bị có dải đo kích thước từ: 0,6 nm–6 μ m, dải đo thế zeta từ (-200)–(+200) mV. Mẫu EPS được hòa tan trong nước cất vô trùng ở nồng độ 1 mg/mL để xác định thế zeta [120].

2.2.6.7. Xác định đặc điểm EPS trong điều kiện stress

Chủng vi khuẩn tuyển chọn được nuôi trong môi trường và điều kiện nuôi cấy gần giống với điều kiện tối ưu, chỉ khác về thành phần muối khoáng và kim loại nặng được bổ sung trong 4 điều kiện: (i) không có NaCl; (ii) có 3% NaCl; (iii) có 1% NaCl, 1 μ g/mL $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$, 1 μ g/mL $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$; và (iv) có 1% NaCl và các muối FeSO_4 , CuSO_4 , Ag_2SO_4 , ZnCl_2 , MgCl_2 , và MnSO_4 đều ở nồng độ 1 μ g/mL. Các mẫu dịch sau nuôi cấy

được kiểm tra bằng cách xác định giá trị OD600 để đánh giá khả năng sinh trưởng; tách chiết định lượng EPS (theo mục 2.2.6.1); phân tích hàm lượng carbohydrate (theo mục 2.2.6.3) và hàm lượng protein trong EPS (theo mục 2.2.6.4). Ngoài ra, mẫu EPS được kiểm tra bề mặt qua hình ảnh chụp SEM và phân tích thành phần nguyên tố và tỷ lệ các nguyên tố trong mẫu EPS dựa trên phương pháp EDS (đã mô tả ở mục 2.2.6.5).

2.2.7. Nhóm phương pháp thử nghiệm

2.2.7.1. Phương pháp đánh giá khả năng giảm độ mặn của nước tự do trong đất

Thí nghiệm được thiết kế nhằm đánh giá khả năng giảm độ mặn của nước tự do trong đất thông qua hoạt tính hấp phụ Na^+ của EPS do chủng vi khuẩn tạo ra. Kết quả phản ánh hiệu quả của EPS trong cố định muối và cải thiện đất mặn.

Chuẩn bị mẫu đất:

Cát san hô (≤ 2 mm) và giá thể hữu cơ (gồm: bã bùn mía : trấu hun : phân bò theo tỷ lệ 40 : 30 : 30, w/w/w, độ ẩm $\leq 30\%$) được khử trùng ở 121 °C trong 20 phút và để nguội về nhiệt độ phòng trước khi thử nghiệm.

Cát san hô được phối trộn với bentonite theo tỷ lệ 97 : 3 (w/w). Sau đó bổ sung thêm 10% khối lượng giá thể hữu cơ để tạo đất hỗn hợp (*) - đây là thành phần đất cát san hô sau cải tạo đã được nhóm nghiên cứu khảo sát và lựa chọn do cho hiệu quả cải tạo đất tốt với năng suất rau tăng mạnh (gấp 4–5 lần) so với cát san hô [121]. EPS sử dụng trong thí nghiệm là EPS thô, được tách chiết từ dịch nuôi cấy của chủng tuyển chọn trong điều kiện gần tương đồng với điều kiện tối ưu, ngoại trừ việc không bổ sung NaCl. Thiết kế này nhằm đảm bảo EPS chưa tiếp xúc với NaCl trước đó, từ đó có khả năng hấp phụ muối tối đa khi tiến hành thử nghiệm.

Thiết kế thí nghiệm:

TN1: 50 g đất hỗn hợp + 10 mL nước cất (đối chứng âm).

TN2: 50 g đất hỗn hợp + 10 mL dịch môi trường tối ưu không có vi khuẩn (đối chứng môi trường mặn).

TN3: 50 g đất hỗn hợp + 70 mg EPS thô + 10 mL dịch môi trường tối ưu không có vi khuẩn.

TN4: 50 g đất hỗn hợp + 10 mL dịch nuôi cấy chủng tuyển chọn trong điều kiện tối ưu sau 18 giờ (khoảng 10^9 CFU/mL).

Tiến hành:

Sau khi phối trộn theo các công thức trên, các cốc mẫu được phủ 1 lớp vải cotton đã khử trùng trên bề mặt để tránh bụi bẩn rơi vào và được ủ ở nhiệt độ phòng (30-32 °C) trong 24 giờ để ổn định mẫu. Sau đó, mỗi mẫu được bổ sung 250 mL nước cất (tỷ lệ 1 : 5), lắc nhẹ trong 10 phút và lọc qua giấy lọc Whatman đặt trong phễu thủy tinh để thu dịch chiết. Hàm lượng muối trong dịch chiết được

đo bằng máy Total Meter EZ-9909SP, kết quả được sử dụng để xác định tổng lượng muối trong toàn bộ dịch chiết (ước tính 250 mL dịch chiết) và đánh giá khả năng làm giảm độ mặn của các mẫu so với đối chứng mặn ở TN2 (môi trường mặn vì trong môi trường tối ưu có NaCl). Từ đó ước lượng được lượng muối hấp phụ trên mỗi mg EPS.

2.2.7.2. Phương pháp xác định khả năng giữ nước của EPS

Khả năng giữ nước WHC (water holding capacity) là lượng nước được giữ lại trong 1 g EPS khô. Đây là tổng lượng nước liên kết, thủy động và bị giữ lại về mặt vật lý.

Tiến hành các thí nghiệm dựa trên việc xác định WHC của EPS bằng phương pháp thay đổi khối lượng [75]: 50 mg EPS thô (tách chiết từ dịch nuôi chủng vi khuẩn trong điều kiện tối ưu) được thêm vào ống eppendorf 2 mL chứa 1 mL nước cất. Mẫu được trộn trong 1 phút và được xử lý theo chu trình: để yên 15 phút, sau đó lắc 5 giây, và lặp lại cho đến thời điểm lấy mẫu. Sau các mốc 1, 2 và 4 giờ, mẫu được ly tâm ở 5000 rpm, 4 °C trong 15 phút để thu phần EPS đã ngậm nước; phần nước thừa bên ngoài được loại bỏ. Mẫu EPS được thấm khô bằng giấy thấm để loại bỏ hoàn toàn nước bám ngoài, sau đó cân khối lượng để xác định lượng nước giữ lại. Khả năng giữ nước của EPS được tính theo công thức sau:

$$WHC (\%) = \frac{m_{trước}}{m_{sau}} \times 100$$

Trong đó WHC là khả năng giữ nước của EPS tính theo đơn vị %; $m_{trước}$ hay m_{sau} là khối lượng EPS tại thời điểm trước thử nghiệm (50 mg) và sau khi ngậm nước 1, 2 hay 4 giờ.

2.2.7.3. Xác định khả năng giữ nước của đất được xử lý bằng exopolysaccharide và dịch nuôi chủng vi khuẩn sinh exopolysaccharide

Chuẩn bị mẫu: Sử dụng cát san hô nghiền (≤ 2 mm) và đất hỗn hợp (*). EPS sử dụng trong thử nghiệm được tách chiết từ dịch nuôi cấy chủng tuyển chọn trong điều kiện tối ưu.

Thiết kế thí nghiệm dựa trên công bố của Vardharajula [122]:

TN1. 50 g đất cát san hô và 10 mL nước cất.

TN2. 50 g đất hỗn hợp và 10 mL nước cất.

TN3. 50 g đất hỗn hợp và 10 mL dung dịch nuôi cấy chủng tuyển chọn (10^9 CFU/mL).

TN4. 50 g đất hỗn hợp bổ sung 10 mL nước cất và 70 mg EPS thô.

TN5. 50 g đất hỗn hợp bổ sung 10 mL nước cất và 140 mg EPS thô.

Sau khi phối trộn theo các công thức trên, các cốc mẫu được phủ 1 lớp vải cotton đã khử trùng trên bề mặt để tránh bụi bẩn rơi vào và được để ở nhiệt độ phòng (30–32 °C) trong 24 giờ.

Các thí nghiệm được lặp lại ba lần; các mẫu được đựng trong cốc thủy tinh dung tích 100 mL, được trộn đều và phủ 1 lớp vải cotton đã khử trùng trên bề mặt, sau đó để ở nhiệt độ phòng (30–32 °C) trong 24 giờ trước khi xác định các chỉ tiêu gồm khả năng giữ nước, tốc độ thoát nước và khả năng kết tụ. Thí nghiệm được tiến hành theo ‘phương pháp đếm giọt’ của Brischke và cộng sự (2019) [123] (Hình 2.4):

Bước 1: Xác định tốc độ thoát nước của đất

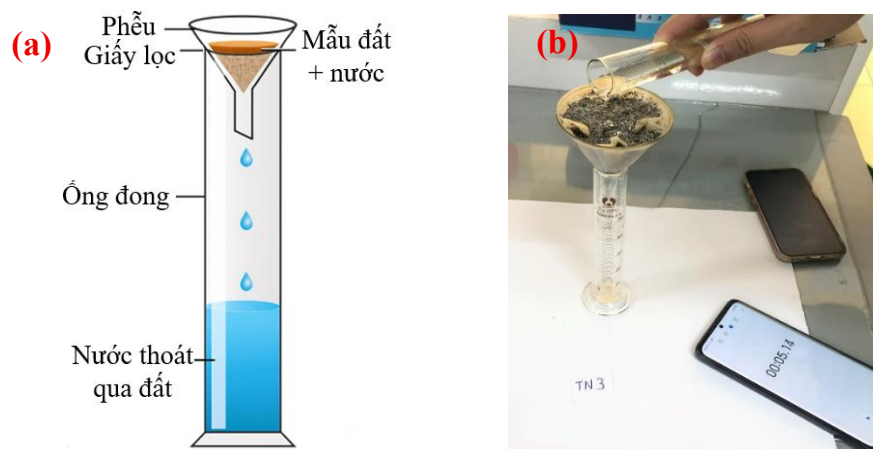
Thêm 25 mL nước vào mỗi mẫu đất của 5 thí nghiệm trên, trộn trong 1 phút, và để trong 2 giờ. Giấy lọc Whatman có đường kính 125 mm được đặt ở đáy phễu (đường kính vành phễu là 70 mm) và làm ẩm bằng nước cất sao cho giấy lọc bám chặt vào phễu. Phễu được đặt trên ống đong. Mẫu thí nghiệm đã chuẩn bị được chuyển vào phễu và dàn đều, thêm 25 mL nước cất vào phễu. Tính thời gian cần thiết để 20 mL nước chảy ra khỏi phễu, sau đó tính tốc độ thoát nước (mL/s).

Bước 2: Xác định khả năng kết tụ đất và khả năng giữ nước của đất.

Lấy 5 mg của mỗi mẫu đất trong phễu thí nghiệm bước 1 đã được xả hết nước để đông khô và chụp ảnh SEM nhằm quan sát bề mặt và đánh giá khả năng kết tụ của EPS trong các mẫu đất thí nghiệm. Đất còn lại được đặt trên đĩa thủy tinh có khối lượng đã biết và cân. Đĩa chứa mẫu đất được sấy khô ở nhiệt độ $103\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ đến khi khối lượng không đổi (4–5 giờ) và cân lại. WHC của các mẫu đất được tính như sau:

$$WHC (\%) = \frac{m_{\text{bão hòa}} - m_{\text{khô}}}{m_{\text{khô}}} \times 100$$

WHC là khả năng giữ nước của đất, được biểu thị bằng %; $m_{\text{bão hòa}}$ là khối lượng đất bão hòa, tính bằng g; $m_{\text{khô}}$ là khối lượng đất khô, tính bằng g.



Hình 2.4. Phương pháp đo khả năng giữ nước theo lý thuyết (a) [124] và thực nghiệm tiến hành (b)

2.2.7.4. Đánh giá hiệu quả giữ nước và giảm mặn cho cây mồng tơi của chủng vi khuẩn chịu mặn, sinh exopolysaccharide quy mô chậu vại

Do trên thực tế đất cát san hô nhiễm mặn và ở một số đảo thiếu nước ngọt nên các chiến sĩ có tưới rau bằng nước lợ có độ mặn 0,2–0,5% nên thí nghiệm chịu mặn được thiết kế ở độ mặn cao hơn 2 lần là 1% NaCl. Tiến hành dựa theo phương pháp của Cheng và cs 2020 [85] và Kasotia và cs (2016) [125]. Thử nghiệm được thực hiện tại nhà lưới, Khoa Nông học, Học Viện Nông nghiệp Việt Nam.

Chuẩn bị nguyên vật liệu:

Mẫu cát san hô và giá thể được chuẩn bị tương tự như mục 2.2.7.1.

Chủng vi khuẩn chịu mặn, sinh EPS được nuôi cấy trong môi trường tối ưu, lắc 150 rpm trong 48 giờ. Sau đó ly tâm 5000 rpm trong 10 phút để thu cặn tế bào, rửa nước cất 2 lần sau đó hòa lại trong nước cất về nồng độ 10^8 tế bào/mL để tạo dịch huyền phù vi khuẩn.

Sử dụng cây giống mồng tơi *Basella alba* của Công ty Phú Nông, cây giống trước khi trồng có 4 lá và có kích thước tương đồng.

Thiết kế 7 lô TN, mỗi lô chứa 800-850 g đất gồm:

TN1: cát san hô + 5 mL nước cất khử trùng

TN2: cát san hô : giá thể (tỉ lệ 9:1, w:w) + 5 mL nước cất khử trùng.

TN3: cát san hô : giá thể (tỉ lệ 9:1, w:w) + 5 mL dịch huyền phù vi khuẩn sinh EPS (mật độ cuối trong đất là 6×10^5 CFU/g đất).

TN4: cát san hô : bentonite (tỉ lệ 97 : 3, w:w) + giá thể 10% .

TN5: cát san hô : bentonite (tỉ lệ 97 : 3, w:w) + giá thể 10% + 5 mL dịch huyền phù vi khuẩn sinh EPS.

TN6: cát san hô : bentonite (tỉ lệ 97 : 3, w:w) + giá thể 10%, tưới bằng dịch NaCl 1%.

TN7: cát san hô : bentonite (tỉ lệ 97 : 3, w:w) + giá thể 10% + 5 mL dịch huyền phù vi khuẩn sinh EPS, tưới bằng dịch NaCl 1%.

Mỗi thí nghiệm lặp lại 3 chậu và trồng 1 cây mồng tơi/1 chậu. Mỗi chậu được tưới 50 mL nước/lần, riêng ở TN 6 và 7 tưới bằng dung dịch NaCl 1%, tưới 3 ngày/lần vào 16 giờ (tưới ít nước để mô phỏng áp dụng ở đảo khan hiếm nước). Sau 30 ngày, tiến hành thu mẫu và phân tích mẫu.

Phân tích các chỉ tiêu

➤ Phân tích sự phát triển của cây qua các chỉ tiêu: trực quan; đo chiều dài, chiều rộng và khối lượng bầu rễ; chiều cao, và khối lượng thân lá; đếm số lá/cây. Chỉ số SPAD được đánh giá bằng máy đo SPAD 502 (Nhật Bản) trên lá cây sau 0; 15 và 30 ngày trồng trên các lô TN.

➤ Phân tích khả năng giữ nước của đất thời điểm thu hoạch rau. Các mẫu đất ngay sau thu hoạch rau được tưới lượng nước theo như quy định trước đó, sau đó đo độ ẩm tại các mốc 0 giờ, 24 giờ và 72 giờ sau tưới. Mục đích của quy trình này là đánh giá khả năng duy trì ẩm của đất theo thời gian sau khi tưới nước, qua đó phản ánh hiệu quả giữ ẩm ổn định của đất có bổ sung vi khuẩn sinh EPS so với đối chứng không có vi khuẩn sinh EPS.

Tiến hành: Lấy 50 g đất từ mỗi mẫu thí nghiệm sấy ở 103 °C trong 5 giờ, sau đó cân xác định khối lượng đất sau khi sấy và xác định khả năng giữ nước như mục 2.2.7.3.

➤ Đánh giá bằng trực quan khả năng kết tụ đất qua hình ảnh chụp qua kính hiển vi soi nổi SMZ12701 (Nikson, Nhật Bản), độ phóng đại 10×.

➤ Xác định hàm lượng carbohydrate trong đất

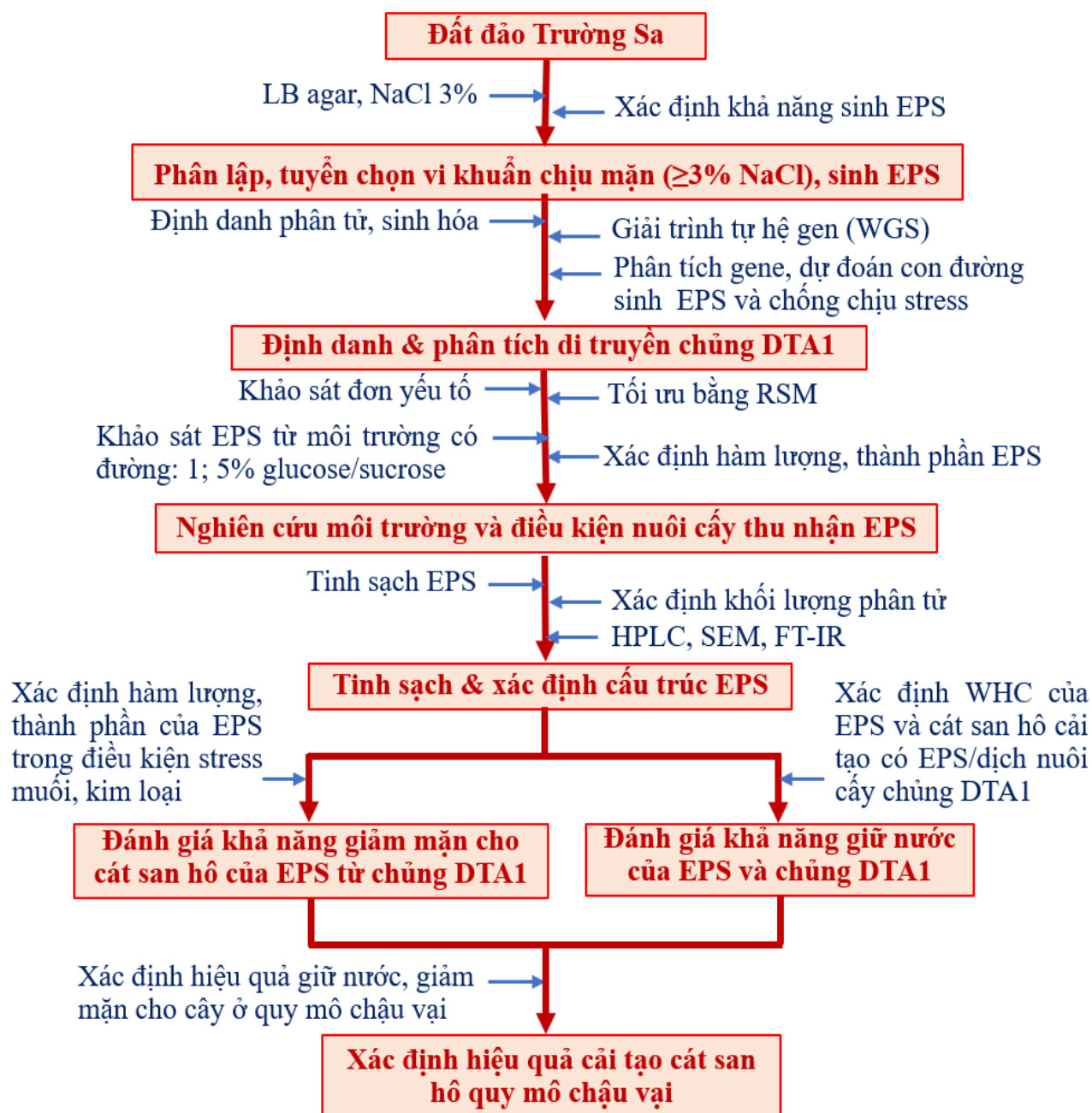
Mỗi mẫu đất sau thu hoạch rau được trộn đều và lấy 5 g đất ở mỗi mẫu hòa vào 50 mL nước cất, lắc ở 200 rpm ở nhiệt độ 50 °C trong 2 giờ, sau đó lọc qua giấy lọc Whatman thu dịch chiết đất. Xác định hàm lượng carbohydrate trong dịch chiết đất theo phương pháp của Dubois và cộng sự [116].

➤ Đánh giá khả năng giảm mặn trong đất: lấy 50 g đất quanh vùng rễ ở các lô TN1, TN6 và TN7, sau đó trộn đều và lấy 10 g đất, hòa vào 50 g nước cất, lắc 150 rpm ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Lọc dịch qua giấy lọc whatman và đo độ mặn bằng máy đo độ dẫn điện Total Meter EZ-9909SP.

2.2.8. Phân tích thống kê

Tất cả các thí nghiệm được lặp lại ba lần. Sự khác biệt về mặt thống kê được xác định bằng One-way ANOVA và so sánh từng cặp Tukey sử dụng phần mềm Minitab Statistical Software. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê được xem xét khi giá trị p nhỏ hơn 0,05.

2.2.9. Sơ đồ nghiên cứu tổng quát trong Luận án



Hình 2.5. Sơ đồ nghiên cứu tổng quát trong Luận án

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn bản địa từ Trường Sa có khả năng chịu mặn và sinh exopolysaccharide

3.1.1. Kết quả phân lập, sàng lọc các chủng vi khuẩn chịu mặn, sinh exopolysaccharide

Kết quả sàng lọc các chủng chịu được mặn trên môi trường LB đặc có NaCl 3% từ 9 mẫu đất thu được ở 3 đảo Trường Sa Lớn, Trường Sa Đông và Đá Tây A được thể hiện ở Phụ lục 1 và Bảng 3.1.

Mật độ vi sinh vật đạt cao nhất là 250×10^2 CFU/g đất ở cạnh cột mốc chủ quyền đảo Trường Sa Đông và thấp nhất là 11×10^2 CFU/g đất ở mép nước thuộc phía bắc đảo Đá Tây A. Số chủng vi sinh vật dao động từ 1–5 chủng/mẫu đất, gồm 0–2 chủng sinh nhầy/mẫu đất (Bảng 3.1). Kết quả cho thấy đa số các mẫu đất ở vị trí mới tôn tạo như khu bãi cát, ven bờ có mật độ vi sinh vật thấp hơn so với các vị trí lâu không được tôn tạo như khu cạnh cột mốc chủ quyền, gốc cây, nơi các vi sinh vật đã phát triển thích nghi ổn định trong thời gian dài.

Bảng 3.1. Các chủng vi khuẩn có khả năng sinh nhầy từ 9 mẫu đất đảo Trường Sa

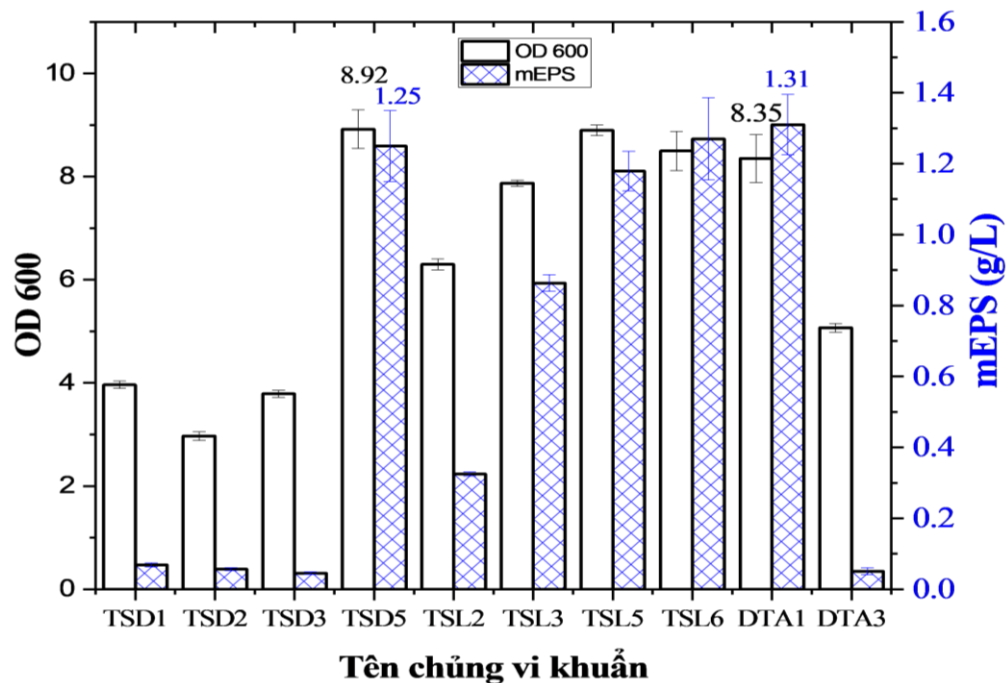
STT chủng	Tên đảo	Vị trí lấy mẫu ở đảo	Mật độ vi sinh vật (CFU/g đất)	Số chủng vi khuẩn sinh EPS/tổng số chủng vi sinh	Kí hiệu chủng vi khuẩn sinh EPS	Kết quả đo độ kéo sợi (mm)
1	TSD	Bãi cát phía tây đảo	25×10^2	1/4	TSD1	$15,0 \pm 0,6$ mm
2		Bãi cát cách cụm dân cư 10 m	32×10^2	2/4	TSD2	$21,0 \pm 1,0$ mm
3					TSD3	$14,3 \pm 0,9$ mm
4		Cạnh cột mốc chủ quyền	250×10^2	1/4	TSD5	$45,0 \pm 2,3$ mm
5	DTA	Sau bờ kè đảo	200×10^2	2/5	DTA1	$42,0 \pm 2,8$ mm
6					DTA3	$18,7 \pm 1,1$ mm
		Sau nhà ăn mới cách bờ kè 5 m	36×10^2	0/4		
		Mép nước ở bắc đảo	11×10^2	0/1		
7	TSL	Ven bờ	28×10^2	1/4	TSL2	$18,0 \pm 1,0$ mm
8		Gần nhà bếp	48×10^2	2/4	TSL3	$38,0 \pm 1,1$ mm
9					TSL5	$40,0 \pm 1,2$ mm
10		Gốc cây	130×10^2	1/4	TSL6	$37,0 \pm 2,1$ mm

Từ 9 mẫu đất đã phân lập được 10 chủng vi khuẩn có khuẩn lạc bóng, sinh rỉ nhầy và kéo sợi dài > 5 mm (Bảng 3.1) trong đó có 4 chủng vi khuẩn từ đảo Trường Sa Đông, 4 chủng từ đảo Trường Sa Lớn, và 2 chủng từ đảo Đá Tây A. Mười chủng vi khuẩn phân lập được đều có khả năng kéo sợi tốt: từ 14,3–45,0 mm. Các chủng cho khả năng kéo sợi tốt nhất là: TSD5 (45,0 mm), tiếp đến chủng DTA1 (42,0 mm) và TSL5 (40,0 mm).

Kết quả này cao hơn nhiều so với tiêu chuẩn kéo sợi đạt > 5 mm được đánh giá là có khả năng sinh EPS như một số công bố trước [101]. Tuy vậy đây chỉ là những thử nghiệm mang tính định tính ban đầu về khả năng sinh EPS của các chủng vi khuẩn bởi không có mối liên hệ trực tiếp nào giữa hình thái của khuẩn lạc trong môi trường rắn và năng suất polysaccharide trong môi trường lỏng của vi khuẩn [101].

3.1.2. Kết quả tuyển chọn chủng vi khuẩn chịu mặn, có khả năng sinh tổng hợp exopolysaccharide hàm lượng cao

Kết quả kiểm tra khả năng sinh EPS của các chủng vi khuẩn trong điều kiện stress mặn (NaCl 3%) trên Hình 3.1 cho thấy các chủng TSD5, TSL5 cho khả năng sinh trưởng tốt nhất ($OD_{600} = 8,9$), tiếp đến là TSL6 và DTA1. Bốn chủng vi khuẩn này có giá trị OD_{600} cao hơn có ý nghĩa thống kê so với các chủng khác ($p < 0,05$) tuy vậy giữa 4 chủng này lại không có sự khác biệt ($p > 0,05$, Phụ lục 3).

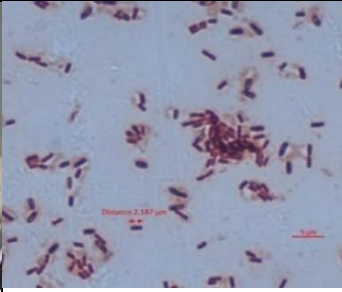
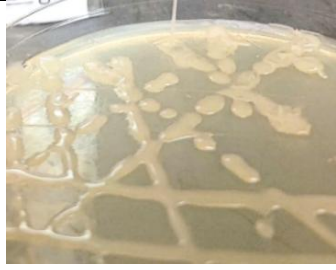
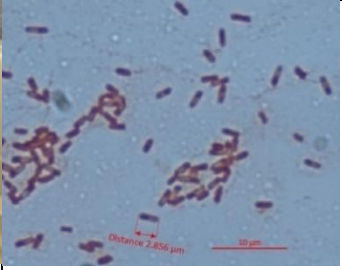
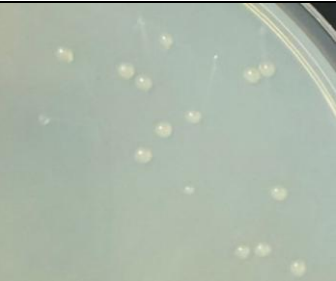
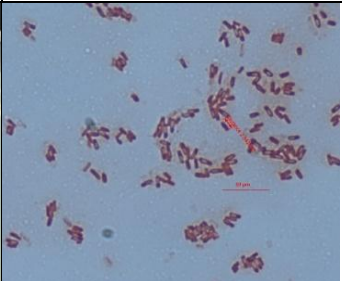


Hình 3.1. Biểu đồ đánh giá khả năng sinh trưởng, sinh EPS của các chủng tuyển chọn sau 48 giờ nuôi lắc trong môi trường LB có bổ sung NaCl 3%

Bốn chủng DTA1, TSL6, TSD5, TSL5 cho khả năng sinh EPS cao hơn hẳn các chủng vi khuẩn khác ($p < 0,05$) trong đó chủng DTA1 cho khả năng sinh EPS cao nhất (1,31 g/L), tiếp đến là các chủng TSL6, TSD5, TSL5, tuy nhiên khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$, Phụ lục 3). Khả năng sinh EPS ở 4 chủng này tương đương với chủng *Pseudomonas chlororaphis* A20 và *Bacillus proteolyticus* A27 (đạt 1,2 g/L) [85], và cao hơn ở các chủng *Peribacillus acanthi* A4, *Priestia flexus* M1 và *Priestia megaterium* P4 tương ứng là 0,847; 1,014 và 1,007 g/L [126]..., tuy vậy lại thấp hơn chủng *Weissella onfusa/cibaria* 3MI3 đạt tới 47,1 g/L [127];....

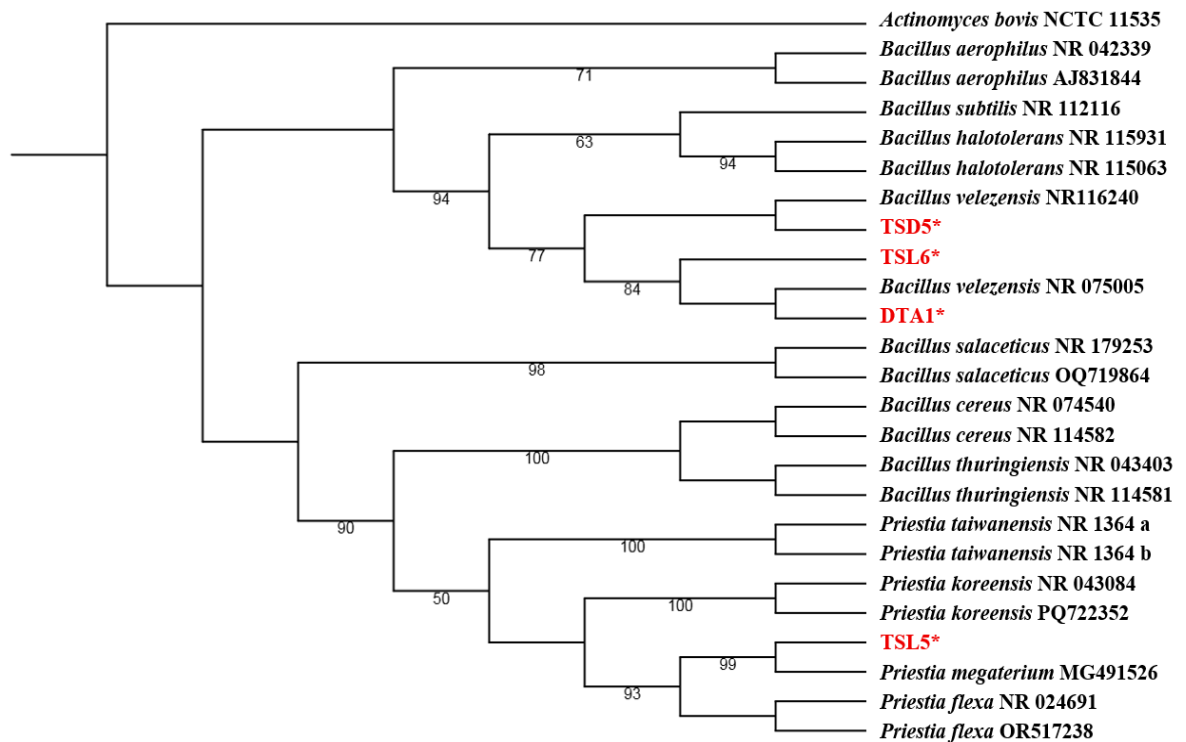
3.1.3. Kết quả định danh chủng vi khuẩn chịu mặn, sinh exopolysaccharide hàm lượng cao

Bảng 3.2. Bảng mô tả các đặc điểm khuẩn lạc và tế bào của 4 chủng vi khuẩn chọn lọc

STT	Chủng	Đặc điểm khuẩn lạc	Ảnh khuẩn lạc	Ảnh nhuộm Gram đo kích thước tế bào
1	TSL5	Khuẩn lạc màu trắng đục hình tròn, bề mặt bóng, mép có chất nhầy, tế bào hình que, kích thước 2-3 μm , Gram dương, có khả năng sinh nội bào tử.		
2	DTA1	Khuẩn lạc màu trắng đục hình tròn, bề mặt bóng, mép có chất nhầy, tế bào hình que, kích thước 2,5–3 μm , Gram dương, có khả năng sinh nội bào tử.		
3	TSD5	Khuẩn lạc màu trắng đục, sinh rỉ nhầy, tế bào thuộc nhóm vi khuẩn Gram dương, hình que ngắn, kích thước 1,7–2,7 μm các tế bào xếp đơn lẻ, sinh nội bào tử.		
4	TSL6	Khuẩn lạc hình tròn, bề mặt bóng, sinh nhầy, tế bào thuộc nhóm vi khuẩn Gram dương, hình que, ngắn, kích thước 2–3 μm , xếp đơn lẻ, sinh nội bào tử		

Bốn chủng vi khuẩn TSL5, TSL6, TSD5, và DTA1 được tuyển chọn do có khả năng sinh EPS cao và được phân lập ở các nơi khác nhau được lựa chọn để xác định đặc điểm hình thái, sinh hóa (Bảng 3.2) và phân loại dựa trên kết quả giải trình tự đoạn gen 16SrRNA (Hình 3.2).

Bốn chủng TSL5, TSL6, TSD5, và DTA1 được định danh bằng phương pháp xác định trình tự gen 16S rRNA.



Hình 3.2. Cây phân tích phả hệ được xây dựng từ trình tự gen 16S rRNA của chủng TSD5, DTA1, TSL5 và TSL6 và các chủng liên quan trên GenBank

Các đoạn gen 16S rRNA của 4 chủng vi khuẩn TSD5, DTA1, TSL5 và TSL6 sau giải trình tự được phân tích và sắp xếp với các gen tương ứng trên GenBank để tạo ra cây phân tích phả hệ như được mô tả trên Hình 3.2. Các chủng TSD5, DTA1, TSL5, và TSL6 có đoạn trình tự gen 16S rRNA có kích thước tương ứng là 1429; 1436; 1405; 1448 bp và tương đồng nhất với lần lượt các chủng *Bacillus velezensis* NR116240 (99,86%), *Bacillus velezensis* NR075005 (99,79%); *Priestia megaterium* MG491526 (100%), và *Bacillus velezensis* NR075005 (99,93%). Kết hợp với các đặc điểm hình thái chủng cho thấy kết quả định danh bằng giải trình tự đoạn gen 16S rRNA rất đáng tin cậy. Loài *Bacillus velezensis* đã được một số công bố về khả năng sinh EPS như chủng KY498625 có khả năng sinh EPS lên tới 5,64 g/L dịch nuôi cấy sau khi tối ưu các điều kiện nuôi cấy [54]; chủng VTX20 sinh EPS đạt 75,5 g/L [50], chủng OM03 đạt 0,594 g/L [55]. Loài *Priestia megaterium* đã được công bố có khả năng sinh EPS và chịu mặn như chủng M1VB5 có khả năng sinh EPS (36,4 g/L), và thích ứng trong nhiều điều kiện khác nhau, phát triển mạnh ở nhiệt độ từ 15–55 °C và độ pH từ 5–9, với khả năng chịu mặn lên tới 7% [128]. Các chủng thuộc chi *Priestia* đã được báo cáo có khả năng sinh EPS như *Priestia flexus* M1, *Priestia megaterium* P4 [126]; chịu stress hạn hán và thiếu dinh dưỡng như *Priestia filosa*, *Priestia aryabhattai* [129], [130]. *P. aryabhattai* BPR-9 chịu được độ mặn tối đa 18% NaCl, hạn hán 15% PEG-6000 và kim loại nặng

($\mu\text{g/mL}$): Cd (1200), Cr (1000), Cu (1000), Pb (800) và Hg (30). Chủng BPR-9 được đánh giá giúp tăng tỉ lệ nảy mầm, tăng sức sống và phát triển ở lúa mỳ dưới áp lực mặn so với đối chứng không bổ sung chủng [130]. Chủng vi khuẩn nội sinh thực vật *P. megaterium* BP-R2 có khả năng chịu mặn, sinh hormone thực vật auxin, Indole-3-acetic acid, giúp tăng sự phát triển của cây chủ và khả năng chống chịu stress với điều kiện muối và hạn hán [131].

Trong các chủng sàng lọc được, chủng *Bacillus velezensis* DTA1 cho hàm lượng EPS cao nhất và sinh trưởng tốt. Đây là loài thuộc nhóm an toàn sinh học cấp 1 (Biosafety level-BSL1) [132], đã có trong một số chế phẩm vi sinh trên thị trường như Kodiak®, Serenade® và Fungifree AB™ [133] nên đảm bảo tính an toàn và được lựa chọn để cho các nghiên cứu đánh giá sâu hơn.

3.1.4. Một số đặc tính sinh học của chủng DTA1

3.1.4.1. Khả năng sử dụng các nguồn carbon

Kết quả khảo sát khả năng sử dụng các nguồn carbon bằng bộ kit API 50CH (bioMérieux, Pháp) được trình bày trên Bảng 3.3 và Phụ lục 4 cho thấy chủng *B. velezensis* DTA1 có khả năng chuyển hóa tốt đa dạng các loại carbohydrate. Cụ thể, chủng vi khuẩn có thể sử dụng được 28 trong tổng số 49 nguồn carbon được thử nghiệm, với mức độ chuyển hóa khác nhau.

Trong đó, các nguồn carbon như D-glucose, D-fructose, D-mannose, D-cellobiose, D-saccharose và esculin được chuyển hóa mạnh, thể hiện qua phản ứng màu rõ rệt: màu vàng đậm đối với các đường có tính acid hóa cao và màu đen đặc trưng của esculin (do phản ứng tạo phức với ion sắt). Đây là các cơ chất chủng vi khuẩn sử dụng tốt, cho thấy hoạt tính enzyme chuyển hóa đường mạnh của chủng DTA1 đối với nhóm monosaccharide và disaccharide phổ biến.

Ngoài ra, các phản ứng dương tính khác (khả năng chuyển hóa tốt) được ghi nhận với các nguồn như: D-sorbitol, D-mannitol, D-maltose, glycerol, tinh bột (amidon), D-arabinose, D-ribose, L-arabinose, D-xylose, arbutin, inositol, L-rhamnose, N-acetylglucosamine, amygdalin, salicin, D-trehalose, D-raffinose, glycogen và gentiobiose. Điều này cho thấy chủng DTA1 có phổ chuyển hóa rộng, bao gồm cả đường đơn, đường đôi, polysaccharide và các dẫn xuất glycoside thực vật.

Ngược lại, 14 nguồn carbon không được chuyển hóa (phản ứng âm tính), bao gồm: dulcitol, erythritol, L-sorbose, xylitol, methyl- β -D-mannopyranoside, D-turanose, D-lyxose, D-fucose, D-arabitol, L-fucose, L-arabitol, potassium 5-ketogluconate, potassium gluconate, và potassium 2-ketogluconate. Các hợp chất này không bị acid hóa, chứng tỏ vi khuẩn không sở hữu hoặc không biểu hiện các enzyme cần thiết để chuyển hóa chúng trong điều kiện thử nghiệm.

Bảng 3.3. Kết quả kiểm tra khả năng sử dụng các nguồn carbon của *B. velezensis* DTA1 sử dụng kit API® 50CHB

TT	Cơ chất	Phản ứng	TT	Cơ chất	Phản ứng
0	Đối chứng	-	25	Esculin	+
1	Glycerol	+	26	Salicin	+
2	Erythritol	-	27	D-cellobiose	+
3	D-arabinose	+	28	D-manltose	+
4	L-arabinose	+	29	D-lactose	+
5	D-ribose	+	30	D-melibiose	+
6	D- xylose	+	31	D-saccharose	+
7	L- Xylose	ND	32	D-trehalose	+
8	D-adonitol	ND	33	Inulin	ND
9	Metyl- β -D-xylopyranoside	ND	34	D-melezitose	ND
10	D-galactose	ND	35	D-raffinose	+
11	D-glucose	+	36	Amidon	+
12	D-fructose	+	37	Glycogen	+
13	D-mannose	+	38	Xylitol	-
14	L-sorbose	-	39	Gentiobiose	+
15	L-rhamnose	+	40	D-turanose	-
16	Dulcitol	-	41	D-lyxose	-
17	Inositol	+	42	D-tagatose	ND
18	D-manitol	+	43	D-fucose	-
19	D-sorbitol	+	44	L-Fucose	-
20	Metyl- β -D- manopyranoside	-	45	D-arabitol	-
21	Metyl- β -D-glucopyranside	+	46	L-arabitol	-
22	N-Acetyl-Glucosamine	+	47	Potassium gluconate	-
23	Amygdalin	+	48	Potassium 2-ketogluconate	-
24	Arbutin	+	49	Potassium 5-ketogluconate	-

(+) Phản ứng dương tính; (-) Phản ứng âm tính; ND: Không xác định rõ (Not defined). Bảng kí hiệu được phiên từ kết quả ở Phụ lục 4.

Ngoài ra, có 7 nguồn carbon cho kết quả không xác định rõ gồm D-galactose, L-xylose, D-adonitol, methyl- β -D-xylopyranoside, D-melezitose, inulin, và D-tagatose. Các phản ứng này có thể do mức acid hóa thấp, không đủ ngưỡng để tạo ra sự thay đổi màu sắc rõ rệt, hoặc do mức độ tăng sinh thấp trong thời gian ủ.

Khả năng sử dụng được đa dạng các nguồn carbon cũng được công bố ở chủng *Bacillus velezensis* AFB2-2 với 22 nguồn carbon khác nhau, trong đó có các monosaccharide và disaccharide được chuyển hóa tốt như: L-arabinose, D-trehalose, D-mannose, D-glucose, D-fructose, tương tự như chủng DTA1, tuy vậy khả năng chuyển hóa nguồn carbon ở chủng AFB2-2 này còn phụ thuộc vào nhiệt độ [134].

Như vậy chủng *B. velezensis* DTA1 có khả năng chuyển hóa nhiều nguồn carbon khác nhau, đặc biệt ưu tiên nhóm đường đơn và đường đôi dễ phân giải như glucose, fructose, sucrose, và cellobiose. Điều này phản ánh tiềm năng thích nghi sinh thái cao của chủng, đặc biệt trong các môi trường giàu đường tự nhiên như vùng rễ thực vật, môi trường lên men và đặc biệt là điều kiện khắc nghiệt trên đảo san hô – nơi nguồn carbon hữu cơ có thể đến từ tảo, xác sinh vật biển hoặc chất hữu cơ phân hủy.

Khả năng này cũng hỗ trợ cho quá trình sinh tổng hợp EPS, vốn đòi hỏi nguồn carbon dồi dào và linh hoạt, và là tiền đề quan trọng cho các nghiên cứu tiếp theo về ảnh hưởng của nguồn carbon đến thành phần monosaccharide và hiệu suất EPS của chủng vi khuẩn này.

3.1.4.2. Đánh giá khả năng chịu mặn và kim loại nặng của chủng DTA1

Bảng 3.4. Khả năng chịu mặn (NaCl/MgSO₄) và kim loại nặng (Cd, Hg, Cr, Co, As, Pb, Zn, Fe) của chủng *B. velezensis* DTA1

Muối	NaCl	MgSO ₄	ĐC âm	Kim loại nặng	Pb	Zn	Fe	ĐC âm	ĐC dương
Nồng độ (%)				Nồng độ (µg/ml)					
0	+	+	-	150	+	+	+	-	+
2,5	+	+	-	300	+	+	+	-	+
5	+	+	-	450	+	+	+	-	+
7,5	+	+	-	600	+	+	+	-	+
10	+	+	-	750	+	+	-	-	+
12,5	+	-	-	900	+	+	-	-	+
15	-	-	-	1050	-	-	-	-	+
17,5	-	-	-						

Kim loại nặng	Cd	Hg	Cr	Co	As	ĐC âm	ĐC dương
Nồng độ (µg/ml)							
1	+	+	+	+	+	-	+
2	+	+	+	+	+	-	+
4	+	-	+	+	+	-	+
8	+	-	+	-	+	-	+
16	+	-	+	-	+	-	+
32	+	-	+	-	+	-	+
64	-	-	+	-	+	-	+
128	-	-	-	-	-	-	+

(+) sinh trưởng được; (-) không sinh trưởng được; Đối chứng âm (ĐC âm): môi trường LB không có vi khuẩn; Đối chứng dương (ĐC dương): môi trường LB có vi khuẩn.; Bảng ký hiệu được xây dựng trên kết quả ở Phụ lục 5.

Khả năng chịu mặn và kim loại nặng được xem là tiêu chí quan trọng để xác định tiềm năng ứng dụng của vi khuẩn trong các hệ sinh thái khắc nghiệt, điển hình như đất mặn hoặc đất ô nhiễm kim loại. Dữ liệu trên Bảng 3.4 cho thấy chủng *Bacillus velezensis* DTA1 thể hiện khả năng thích nghi tốt, chịu được nồng độ muối cao cũng như một số loại kim loại nặng.

Khả năng chịu mặn (NaCl và MgSO₄)

Khi nuôi cấy trong môi trường LB có nồng độ cuối NaCl tăng dần từ 0 đến 17,5% (w/v), chủng DTA1 phát triển tốt trong khoảng từ 0 đến 12,5% NaCl, được biểu hiện qua hiện tượng đục của môi trường nuôi cấy hoặc sự hình thành màng biofilm màu trắng đục tại bề mặt (Phụ lục 5A). Tuy nhiên, không quan sát thấy sự phát triển (dịch trong, không tạo màng) ở nồng độ NaCl từ 15% trở lên, cho thấy ngưỡng chịu mặn tối đa của chủng là khoảng 12,5% NaCl. Kết quả này tương đương với ở chủng TSD5 [135] và cao hơn một số công bố trước như 2–10% NaCl ở *B. paramycoides*, *B. pumilus* và *B. amyloliquefaciens* [102]; 0–9% ở chủng *Rahnella aquatilis* JZ-GX1 [103] nhưng thấp hơn công bố ở chủng *B. subtilis* LR-1 chịu mặn tới 16% [136].

Đối với muối MgSO₄, chủng DTA1 vẫn có khả năng phát triển ở nồng độ từ 0 đến 10% (w/v) (Bảng 3.4, Phụ lục 5A). Sự tăng trưởng ổn định trong dải nồng độ cao của cả hai loại muối cho thấy chủng vi khuẩn này có khả năng thích nghi ưu việt với điều kiện áp suất thẩm thấu cao, phù hợp với môi trường đất nhiễm mặn và đất ven biển.

Khả năng chịu kim loại nặng

Khả năng chịu đựng kim loại nặng của DTA1 được đánh giá thông qua thí nghiệm tiếp xúc với 8 kim loại khác nhau ở nồng độ tăng dần.

- Với nhóm kim loại nặng có độc tính cao như Cr và As, chủng DTA1 vẫn phát triển đến nồng độ 64 µg/mL, trong khi đối với Cd, mức chịu đựng tối đa là 32 µg/mL (Bảng 3.4, Phụ lục 5B).

- Khả năng chịu Hg và Co thấp hơn rõ rệt, với giới hạn phát triển chỉ đạt tương ứng 2 µg/mL và 4 µg/mL. Đây là các kim loại có độc tính cao với hệ vi sinh, có thể ức chế mạnh hệ enzyme nội bào ngay ở nồng độ thấp.

- Đối với các kim loại phổ biến trong đất như Pb, Zn và Fe, chủng DTA1 có thể chịu đựng ở nồng độ cao hơn: lên đến 900 µg/mL đối với Pb và Zn, và 600 µg/mL đối với Fe (Bảng 3.4, Phụ lục 5C). Đây là mức chịu đựng tương đối cao, chứng minh khả năng tồn tại được của chủng vi khuẩn trong môi trường ô nhiễm kim loại nặng.

Khả năng chịu kim loại nặng của *Bacillus velezensis* đã được ghi nhận ở chủng C3-3, với khả năng chịu Cd, Co, Mn và Ni ở nồng độ tới 10 mM (tương đương trên 1000 µg/mL) [137]. So sánh cho thấy chủng DTA1 có mức chịu đựng các kim loại trên thấp hơn C3-3 nhưng tương đương với *Chromohalobacter* sp. – một vi khuẩn sinh EPS ưa mặn có khả năng chịu đa kim loại [138]. Ngoài ra, chủng DTA1 chịu Pb tốt hơn *Priestia aryabhatai* BPR-9 nhưng lại chịu Cd, Cr và Hg kém hơn chủng này [130].

Khả năng chịu được stress mặn và kim loại nặng có thể được giải thích qua khả năng tạo EPS của chủng. Lớp EPS này hoạt động như một hàng rào sinh học, có thể gắn kết và cố định ion muối cũng như kim loại, qua đó hạn chế độc tính trực tiếp lên tế bào vi khuẩn. Bên cạnh đó, EPS còn góp phần hình thành cấu trúc biofilm, tạo vi môi trường bảo vệ giúp vi khuẩn nâng cao sức chống chịu trước điều kiện bất lợi [139]. Ngoài ra cũng có thể chủng vi khuẩn chứa các gen chống chịu mặn, kim loại nặng giúp tăng khả năng sống sót trong điều kiện stress. Để hiểu rõ hơn về các cơ chế phân tử liên quan đến khả năng chịu stress của chủng DTA1, cần tiến hành phân tích đặc điểm di truyền của chủng vi khuẩn thông qua giải trình tự WGS. Phân tích này sẽ giúp làm sáng tỏ các cụm gen liên quan đến sinh tổng hợp EPS, cơ chế vận chuyển ion, phản ứng với stress thẩm thấu và kim loại, từ đó củng cố cơ sở khoa học cho việc ứng dụng chủng vi khuẩn này trong môi trường khắc nghiệt.

Như vậy từ 9 mẫu đất đảo ở Trường Sa đã phân lập được 10 chủng vi khuẩn bản địa có khả năng sinh EPS trong điều kiện mặn (NaCl 3%). Trong số đó, chủng DTA1 thể hiện khả năng sinh trưởng mạnh, chịu mặn tốt (tới 12,5% NaCl), kháng được một số kim loại nặng phổ biến (Pb^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} > 600 µg/mL) và sinh EPS hiệu suất cao (1,31 g/L). Thêm vào đó, khả năng sử dụng được đa dạng các nguồn carbon, nhất là các nguồn thường có trong tự nhiên là những ưu việt cho thấy tiềm năng ứng dụng của chủng DTA1 trong cải tạo đất nghèo dinh dưỡng, nhiễm mặn hoặc ô nhiễm kim loại nặng.

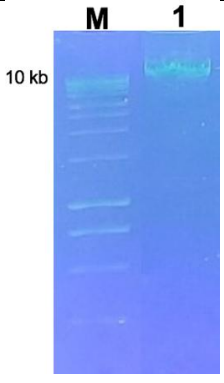
3.2. Giải trình tự hệ gen và dự đoán các con đường sinh tổng hợp EPS và các gen liên quan đến khả năng chịu mặn ở chủng DTA1

3.2.1. Kết quả kiểm tra chất lượng DNA genome chủng DTA1

DNA chủng DTA1 sau tinh sạch được đánh giá chất lượng trước khi chuyển đi phân tích. Như thể hiện ở Bảng 3.5, mẫu DNA genome của chủng *B. velezensis* DTA1 đáp ứng đầy đủ các tiêu chí về nồng độ, độ tinh sạch, hàm lượng và tính toàn vẹn cần thiết cho quá trình giải trình tự toàn bộ hệ gen. Do đó, mẫu DNA này đạt chất lượng phù hợp để tiến hành các bước phân tích di truyền tiếp theo.

Bảng 3.5. Kết quả kiểm tra DNA genome chủng DTA1 tách chiết được

Số mẫu:	Yêu cầu	Mẫu 1	
Tên mẫu		DTA1	

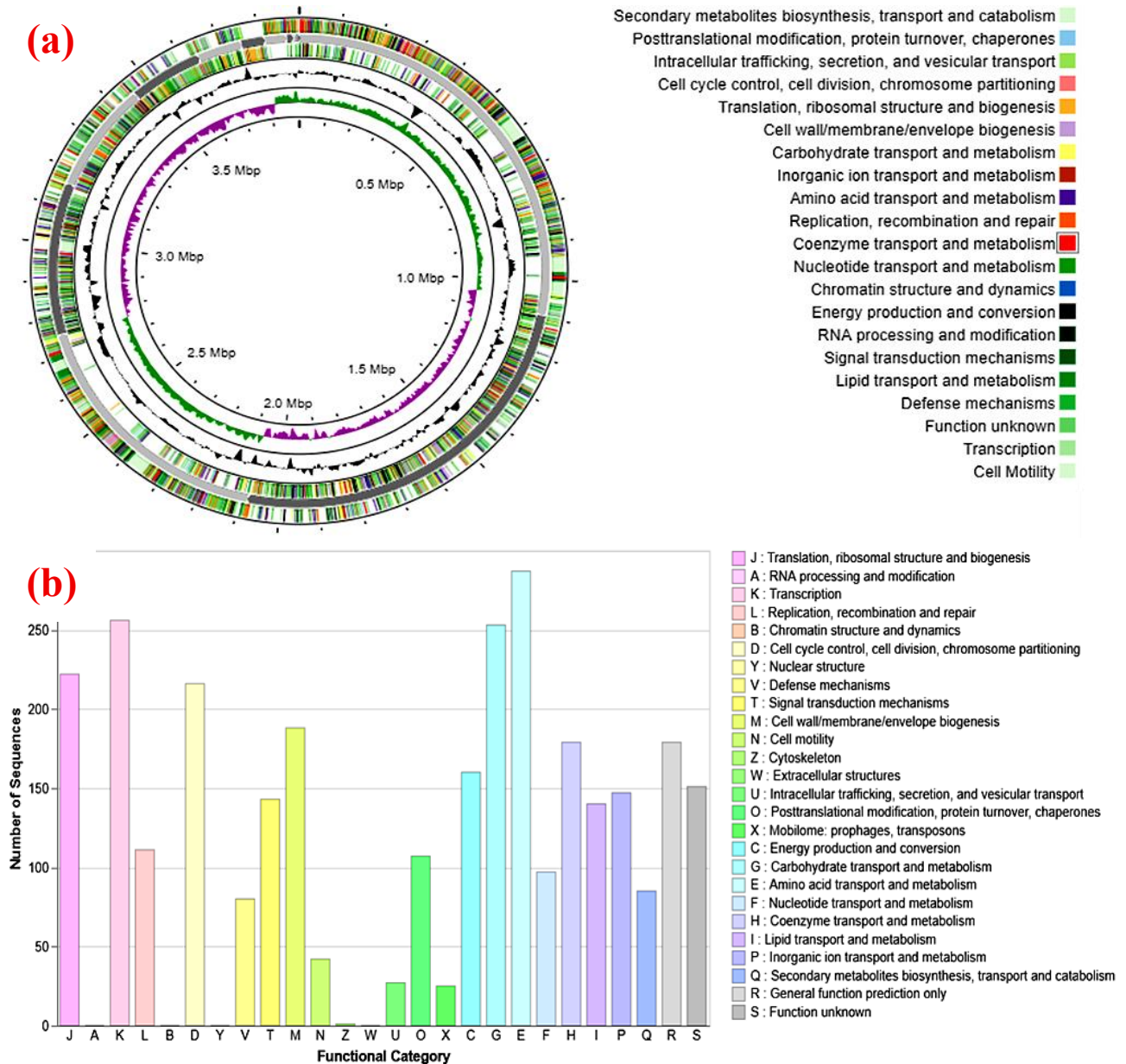
Nồng độ (ng/μL)	>20	132,9	 Ảnh điện di mẫu DNA DTA1 trên gel agarose 0,8%, M: Marker 1Kb
Độ tinh sạch (A260/A280)	>1,7	1,74	
Thể tích (μL)	>30	50	
Hàm lượng DNA (μg)	>0,45	6,645	
DIN	> 7,2. Tương đương với xuất hiện 1 vạch sáng, không đứt gãy trên gel 0,8% agarose	1 vạch sáng, không đứt gãy trên gel 0,8% agarose	

3.2.2. Đặc điểm chung của bộ gen chủng DTA1

Bảng 3.6. Đặc điểm chung của bộ gen lắp ráp của *B. velezensis* DTA1

Đặc điểm bộ gen	<i>B. velezensis</i> DTA1	<i>Bacillus velezensis</i> FZB42 (Bộ gen tham chiếu*)
Số lượng đọc thô	8.275.234	
Độ bao phủ (×)	317	
Cấp độ lắp ráp	Đoạn trình tự dài (Contigs)	Bộ gen hoàn chỉnh
Kích thước bộ gen được lắp ráp (bp)	3.901.259	3.918.596
Số lượng contigs (>500 bp)	13	1
Contig lớn nhất (bp)	1.096.152	3.918.596
Hàm lượng G+C (%)	46,5	46,5
N50	987.412	3.918.596
L50	2	1
Số lượng gen rRNA	11	29
Số lượng gen tRNA	62	88
Số lượng trình tự DNA mã hóa	3.783	3.680

*Bộ gen tham chiếu từ cơ sở dữ liệu trình tự tham chiếu NCBI (NC_009725.2).



Hình 3.3. (a) Bản đồ bộ gen nháp của *B. velezensis* DTA1 với kích thước bộ gen 3,9Mb. (b) Sự phân bố của các gen mã hóa của *B. velezensis* DTA1 trong các nhóm gen chức năng COG

Các vòng tròn trong sơ đồ (từ ngoài vào trong ở Hình a) lần lượt biểu thị: (1) các trình tự mã hóa (Coding sequences-CDS) được dự đoán có hướng phiên mã theo chiều xuôi, với màu sắc thể hiện các nhóm chức năng gen khác nhau; (2) các đoạn contig thu được từ quá trình lắp ráp bộ gen; (3) các CDS được dự đoán có hướng phiên mã theo chiều ngược; (4) tỷ lệ phần trăm GC; (5) độ lệch GC (tính theo công thức $[G - C] / [G + C]$) với giá trị dương được đánh dấu màu xanh lục và giá trị âm màu tím.

Tổng số đoạn đọc thô thu được từ giải trình tự Illumina là 8.275.234, với độ bao phủ giải trình tự trung bình đạt 317×. Dữ liệu sau khi xử lý và lắp ráp thu được 13 contig có chiều dài lớn hơn 500 bp. Chất lượng trình tự đạt mức cao, với 94,6% nucleotide có điểm chất lượng Q30 (tương ứng với độ chính xác trên 99,9%) và 98,2% đạt Q20 (tương

ứng với độ chính xác trên 99%). Độ toàn vẹn hệ gen được đánh giá bằng công cụ BUSCO với lineage Bacillales với độ hoàn thiện của bộ gen đạt 99.63%. Kết quả lắp ráp bộ gen thu được bộ gen *B. velezensis* DTA1 với kích thước 3.901.259 bp và tỷ lệ GC là 46,5%, tương đương với bộ gen tham chiếu, *Bacillus velezensis* FZB42 (kích thước bộ gen: 3.918.596 bp; tỷ lệ GC: 46,5%) (Bảng 3.6, và Hình 3.3a). Mức độ hoàn thiện của bộ gen được đánh giá bằng công cụ BUSCO với lineage *Bacillales*, cho thấy độ toàn vẹn bộ gen đạt 99,63%. Kết quả này cho thấy chất lượng bộ gen của chủng *B. velezensis* DTA1 đạt mức tin cậy cao, đáp ứng yêu cầu cho các phân tích gen chức năng ở các bước tiếp theo.

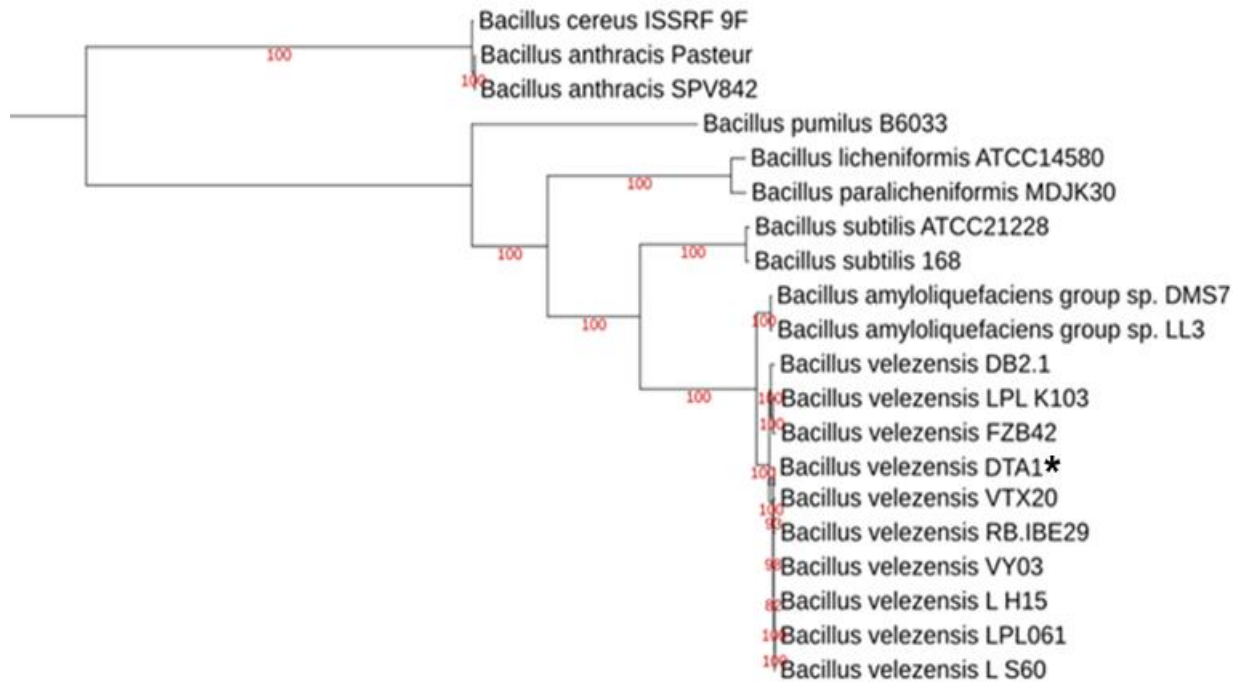
Chú giải chức năng bằng phần mềm Bakta v1.9.2 xác định tổng cộng 3.783 gen mã hóa (CDS), 62 tRNA và 11 rRNA (Bảng 3.6). Trong số các CDS này, 81,8% (3.095/3.783) trong số chúng được phân loại thành 22 loại nhóm gen chức năng COG. Phần lớn các CDS có liên quan đến vận chuyển và chuyển hóa amino acid (E, 9,28%), phiên mã (K, 8,27%), vận chuyển và chuyển hóa carbohydrate (G, 8,18%) và dịch mã, cấu trúc ribosome và sinh tổng hợp (J, 7,18%) (Hình 3.3B). Điều này cho thấy chủng DTA1 có khả năng phân hủy nhiều loại carbohydrate và protein. Đáng chú ý, con đường sinh tổng hợp EPS có khả năng được xác định trong chủng này vì 2,75% CDS được chỉ định cho sinh tổng hợp, vận chuyển và dị hóa chất chuyển hóa thứ cấp (Q). Những đặc điểm này phản ánh bộ gen điển hình của nhóm vi khuẩn *Bacillus velezensis*, đồng thời cung cấp cơ sở quan trọng cho việc phân tích chức năng các gen phụ trách quá trình sinh EPS và cơ chế thích nghi trong môi trường khắc nghiệt.

Mặc dù kết quả lắp ráp cho thấy chỉ số N50 ở mức tương đối cao, bộ gen của *B. velezensis* DTA1 vẫn chỉ đạt mức lắp ráp dạng nháp, với tổng cộng 13 contig và độ hoàn thiện còn thiếu 0,37%. Điều này cho thấy cấu trúc bộ gen chưa thực sự liền mạch, từ đó có thể dẫn đến nguy cơ bỏ sót hoặc chú giải chưa đầy đủ các gen chức năng. Hạn chế này có thể ảnh hưởng đến việc khai thác triệt để tiềm năng sinh học của chủng vi khuẩn. Do đó, trong các nghiên cứu tiếp theo, việc kết hợp nền tảng giải trình tự đoạn ngắn và đoạn dài như giải trình tự Oxford Nanopore hoặc PacBio là cần thiết để cải thiện chất lượng lắp ráp, hướng tới bộ gen hoàn chỉnh và đầy đủ hơn phục vụ cho các phân tích chức năng chuyên sâu.

3.2.3. Phân tích phát sinh loài và xác định vị trí phân loại của chủng DTA1

Việc xác định vị trí phân loại của chủng DTA1 được thực hiện dựa trên cả trình tự gen 16S rRNA (mục 3.1.3) và trình tự core genome, đây là các gen được bảo tồn ở tất cả các loài *Bacillus*. Cây phân loài dựa trên core genome với các loài *Bacillus* (Hình 3.4) cho thấy các chủng thuộc loài *B. velezensis* thuộc 1 nhánh riêng với giá trị độ tin cậy (bootstrap) đạt 100%, loài có họ hàng gần nhất là loài *B. amyloliquefaciens*. Chủng

ngiên cứu DTA1 nằm trong nhánh cùng các chủng *B. velezensis* khác, bao gồm cả các chủng vi khuẩn được tìm thấy ở Việt Nam như VTX20, DB2.1, VY03,... Như vậy, căn cứ vào kết quả này cho phép khẳng định chủng DTA1 thuộc loài *B. velezensis*.



Hình 3.4. Cây phân loại dựa trên trình tự core genome giữa chủng DTA1 (*) và 19 chủng có quan hệ gần gũi thuộc chi *Bacillus* được xây dựng bằng công cụ chú thích PATRIC. So sánh trình tự thực hiện bởi MAFFT và cây phân loại được xây dựng với RAxML

3.2.4. Hệ thống vận chuyển đường của *B. velezensis* DTA1

Bảng 3.7. Các gen liên quan đến hệ thống vận chuyển permease và hệ thống ABC (ATP-binding cassette) trong *B. velezensis* DTA1

Locus tag	Gene	Liên quan đến hệ thống vận chuyển
<i>Hệ thống vận chuyển permease</i>		
ALPNOB_05845		Permease
ALPNOB_17800		Permease
ALPNOB_04315	<i>araQ</i>	Arabinooligosaccharides transport system permease protein AraQ
ALPNOB_04320		Arabinose/arabinan permease
ALPNOB_05080		Metabolite permease
ALPNOB_15980		Metabolite permease
ALPNOB_05015		Multiple sugar transport system permease protein
ALPNOB_06205		Multiple sugar transport system permease protein
ALPNOB_05010	<i>msmF</i>	Multiple sugar-binding transport system permease protein msmF

ALPNOB_07085		High-affinity gluconate permease (GntP family)
ALPNOB_06200		Fructose-amino acid permease
ALPNOB_05730		Simple sugar transport system permease protein
ALPNOB_13470	<i>araJ</i>	putative arabinose efflux permease AraJ, MFS family
ALPNOB_07790		Transport permease protein
ALPNOB_07115	<i>lutP</i>	L-lactate permease LutP
ATP-binding cassette (ABC) transporters		
ALPNOB_15565		Maltose and maltodextrin ABC transporter subunit (ATP-binding protein)

Đối với hệ thống vận chuyển permease đặc hiệu đường của chủng DTA1, các protein đặc hiệu cho arabinose, maltose và các protein vận chuyển permease đa đường đã được tìm thấy. Tiểu đơn vị vận chuyển ABC (protein liên kết ATP) maltose và maltodextrin tạo điều kiện cho sự hấp thụ maltose/maltodextrin cũng đã được phát hiện (Bảng 3.7).

Bảng 3.8. Các gen liên quan đến hệ thống PTS ở *B. velezensis* DTA1

Locus tag	Hệ thống PTS liên quan	Con đường liên quan
MNPMAK_15360	alpha-glucoside PTS system EIICB component [EC:2.7.1.208 2.7.1.-]	Starch and sucrose metabolism
MNPMAK_09075	cellobiose PTS system EIIA component [EC:2.7.1.196 2.7.1.205]	
MNPMAK_09130		
MNPMAK_09085	cellobiose PTS system EIIB component [EC:2.7.1.196 2.7.1.205]	
MNPMAK_09125		
MNPMAK_09015	cellobiose PTS system EIIC component	
MNPMAK_09080		
MNPMAK_09135		
MNPMAK_11925	fructose PTS system EIIBC or EIIC component [EC:2.7.1.202]	Fructose and mannose metabolism
MNPMAK_12170	glucose PTS system EIICBA or EIICB component [EC:2.7.1.199]	Glycolysis/ Glucogenesis
MNPMAK_13085	lactose PTS system EIICB component [EC:2.7.1.207]	Galactose metabolsim
MNPMAK_13080	lactose PTS system EIIA component [EC:2.7.1.207]	
MNPMAK_14125	mannitol PTS system EIICBA or EIICB component [EC:2.7.1.197]	Fructose and mannose metabolism

MNPMAK_14120	mannitol PTS system EIICA component [EC:2.7.1.197]	
MNPMAK_03485	mannose PTS system EIIBCA component [EC:2.7.1.191]	
MNPMAK_15595	N-acetylglucosamine PTS system EIICBA hoặc EIICB component [EC:2.7.1.193]	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism
MNPMAK_12165	phosphocarrier protein Hpr	Phosphotransferase system (PTS)
MNPMAK_12160	phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase (PTS system enzyme I) [EC:2.7.3.9]	
MNPMAK_08855	sucrose PTS system EIIBCA hoặc EIIBC component [EC:2.7.1.211]	Starch and sucrose metabolism
MNPMAK_15065		
MNPMAK_01515	sugar PTS system EIICA component [EC:2.7.1.-]	Gluconeogenesis/ Starch and sucrose metabolism (PTS)
MNPMAK_15560	trehalose PTS system EIIBC hoặc EIIBCA component [EC:2.7.1.201]	Starch and sucrose metabolism

Tổng cộng có 22 protein vận chuyển hệ thống PTS cho các loại đường khác nhau được phát hiện trong bộ gen của chủng *B. velezensis* DTA1 (Bảng 3.8). Các chất vận chuyển này được phân loại thành 11 hệ thống PTS: α -glucoside, fructose, cellobiose, lactose, glucose, N-acetylglucosamine, mannitol, mannose, sucrose, sugar và trehalose PTS dựa trên cơ sở dữ liệu chất vận chuyển. Các con đường tương ứng này là chuyển hóa đường amino và đường nucleotide, chuyển hóa fructose và mannose, chuyển hóa galactose, tạo glucose/ chuyển hóa tinh bột và sucrose, đường phân/tạo glucose, hệ thống phosphotransferase và chuyển hóa tinh bột và sucrose.

Theo các kết quả này, *B. velezensis* DTA1 có thể sử dụng cellobiose, glucoside, glucose, mannose/mannitol, fructose, sucrose, arabinose và N-acetylglucosamine. Hơn nữa, các kết quả trên Bảng 3.7 và Bảng 3.8 cho thấy nhiều bản sao của gen mã hóa hệ thống vận chuyển cho cellobiose, sucrose và arabinose trong bộ gen của chủng *B. velezensis* DTA1, điều này có thể giúp vi khuẩn tăng cường khả năng sử dụng các nguồn carbon kể trên.

3.2.5. Con đường sinh tổng hợp đường nucleotide của *B. velezensis* DTA1.

Kết quả phân tích WGS cho thấy 29 gen trong bộ gen DTA1 mã hóa các enzyme quan trọng giúp chuyển đổi dễ dàng hơn các nguồn carbon khác nhau thành các loại đường nucleotide tương ứng. Quá trình chuyển hóa glucose, sucrose, fructose, maltose, cellobiose, mannose, galactose và arabinose được hỗ trợ bởi các gen này. Một số gen, bao gồm *galU*, *sacA*, *bglA*, *galE*, *MPI* ..., có một số bản sao (Bảng 3.9). Mặc dù có PTS

của lactose và trehalose, bộ gen được lắp ráp lại thiếu các enzyme cần thiết cho quá trình chuyển hóa hai loại đường này.

Dựa trên các gen được phát hiện này, con đường sinh tổng hợp đường nucleotide của *B. velezensis* DTA1 có thể được đơn giản hóa như trên Hình 3.5. Mannose, fructose, sucrose, cellobiose và glucose nằm trong số các loại đường được hệ thống PTS vận chuyển vào tế bào trong bước đầu tiên. Khi đã vào bên trong, các loại đường này trải qua quá trình phosphoryl hóa để tạo thành mannose-6-phosphate, fructose-1-phosphate, sucrose-6-phosphate, cellobiose-6-phosphate và glucose-6-phosphate. Tương tự như vậy, arabinose và galactose được vận chuyển vào tế bào bởi các enzyme permease. Maltose được đưa vào trong tế bào nhờ cơ chế vận chuyển ABC. Tiếp theo, các loại đường đơn được enzyme xúc tác để hình thành các dạng phosphoryl hóa như fructose-6-phosphate, glucose-6-phosphate và galactose-1-phosphate. Nhờ đó, chủng vi khuẩn có khả năng tham gia vào quá trình sinh tổng hợp nhiều loại đường nucleotide khác nhau, điển hình là UDP-N-acetylglucosamine, UDP-N-acetylgalactosamine, UDP-N-acetylmannosamine, dTDP-glucose, dTDP-rhamnose, UDP-glucose, UDP-glucuronate và UDP-galactose.

Bảng 3.9. Các enzyme chính của quá trình tổng hợp đường nucleotide của *B. velezensis* DTA1 được chú thích trong cơ sở dữ liệu KEGG

Mã locus	Tên gen	Trao đổi chất đường	Protein được mã hóa	Số EC	Đường nucleotide
ALPNOB_02935	<i>glk</i>	Glucose	Glucokinase	2.7.1.2	UDP-Glc
ALPNOB_17230	<i>pgm</i>		Phosphoglucomutase	5.4.2.2	
ALPNOB_00410	<i>galU</i>		UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	2.7.7.9	
ALPNOB_07780					
ALPNOB_07265	<i>sacA</i>	Sucrose	Beta-fructofuranosidase	3.2.1.26	
ALPNOB_08975		Sucrose			
ALPNOB_15580	<i>glvA</i>	Maltose	Maltose-6'-phosphate glucosidase	3.2.1.122	
ALPNOB_09270	<i>scrK</i>	Fructose	Fructokinase	2.7.1.4	
ALPNOB_16440		Fructose			
ALPNOB_12070	<i>fruK</i>	Fructose	1-phosphofructokinase	2.7.1.56	
ALPNOB_09815	<i>FBP</i>	Fructose	Fructose-1,6-bisphosphatase III	3.1.3.11	
ALPNOB_04350	<i>araA</i>	Arabinose	L-arabinose isomerase	5.3.1.4	
ALPNOB_04345	<i>araB</i>	Arabinose	L-ribulokinase	2.7.1.16	
ALPNOB_04340	<i>araD</i>	Arabinose	L-ribulose-5-phosphate 4-epimerase	5.1.3.4	
ALPNOB_00105	<i>tktA</i>	Arabinose	Transketolase	2.2.1.1	

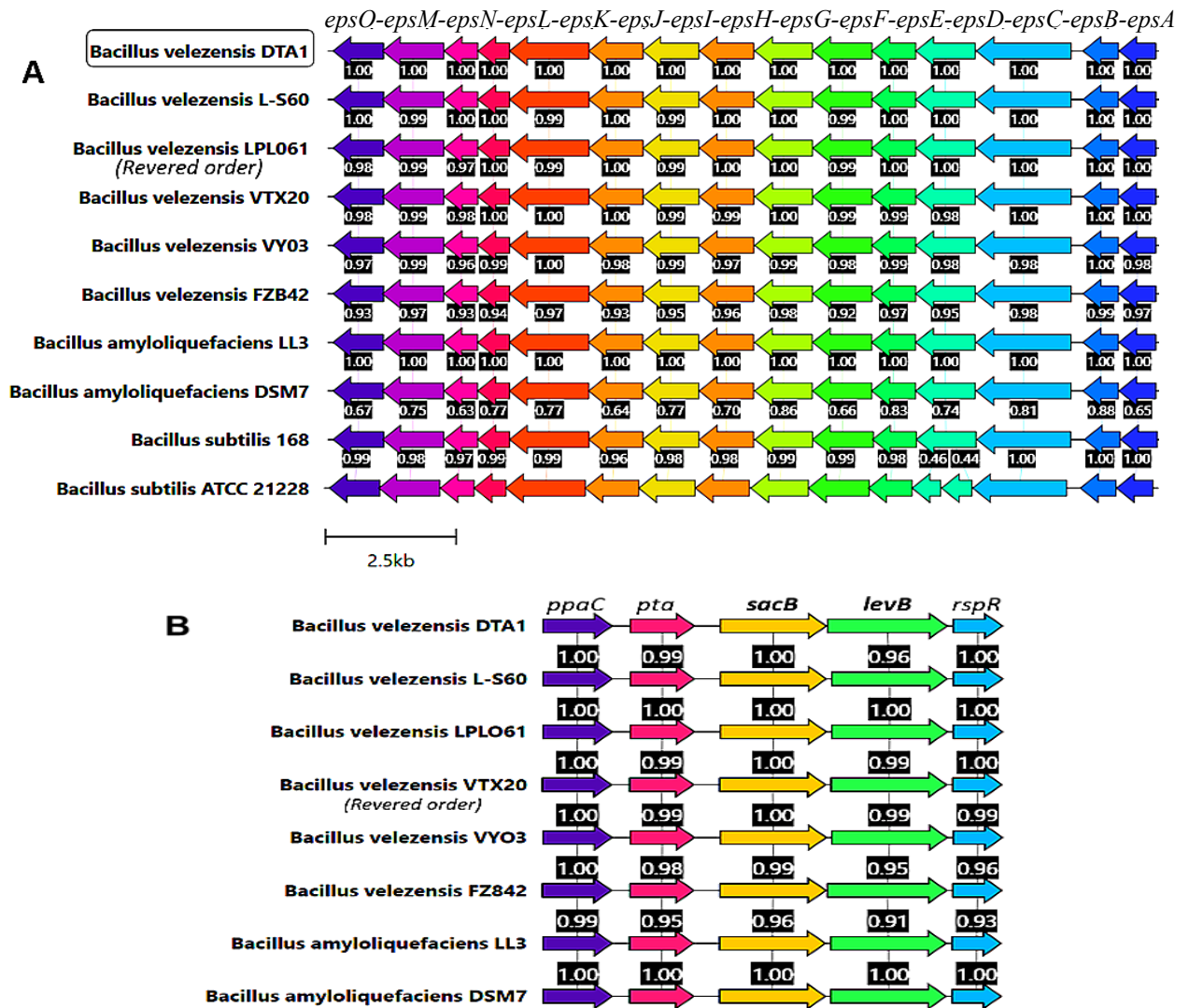
ALPNOB_05610	<i>GPI</i>		Glucose-6-phosphate isomerase	5.3.1.9	
ALPNOB_00940	<i>bglA</i>	Cellobiose	6-phospho-beta-glucosidase	3.2.1.86B	
ALPNOB_09265		Cellobiose			
ALPNOB_09195	<i>celF</i>	Cellobiose	6-phospho-beta-glucosidase	3.2.1.86A	
ALPNOB_09355	<i>galE</i>	Galactose	UDP-glucose 4-epimerase	5.1.3.2	UDP-Gal
ALPNOB_13235		Galactose			
ALPNOB_00495	<i>galM</i>	Galactose	Aldose 1-epimerase	5.1.3.3	
ALPNOB_13230	<i>galK</i>	Galactose	Galactokinase	2.7.1.6	
ALPNOB_09050	<i>galT</i>	Galactose	UDPglucose--hexose-1-phosphate uridylyltransferase	2.7.7.12	
ALPNOB_13240		Galactose			
ALPNOB_07735	<i>ugd</i>		UDPglucose 6-dehydrogenase	1.1.1.22	UDP-GlcA
ALPNOB_08085					
ALPNOB_08880	<i>rmlA</i>		Glucose-1-phosphate thymidylyltransferase	2.7.7.24	dTDP-Rha
ALPNOB_08875	<i>rmlB</i>		dTDP-glucose 4,6-dehydratase	4.2.1.46	
ALPNOB_08865	<i>rmlC</i>		dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase	5.1.3.13	
ALPNOB_08870	<i>rmlD</i>		dTDP-4-dehydrorhamnose reductase	1.1.1.133	
ALPNOB_09275	<i>MPI</i>	Mannose	Mannose-6-phosphate isomerase	5.3.1.8	UDP-N-Acetylglucosamine
ALPNOB_03490		Mannose			
ALPNOB_07825		Mannose			
ALPNOB_15205	<i>glmS</i>		Glutamine---fructose-6-phosphate transaminase (isomerizing)	2.6.1.16	
ALPNOB_15210	<i>glmM</i>		Phosphoglucosamine mutase	5.4.2.10	
ALPNOB_19035	<i>glmU</i>		Bifunctional UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase / glucosamine-1-phosphate N-acetyltransferase	2.7.7.23 2.3.1.157	
ALPNOB_07775	<i>wecB</i>		UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase (non-hydrolysing)	5.1.3.14	UDP-N-Acetylmannosamine

Việc sản xuất EPS đòi hỏi đường nucleotide làm phân tử tiền chất [69]. Chủng *B. velezensis* DTA1 chứa nhiều gen mã hóa 11 hệ thống vận chuyển PTS và permease, cho thấy chủng này có thể sử dụng nhiều nguồn đường có sẵn trong môi trường của nó. Sự thật là 9 loại đường, bao gồm cellobiose, glucoside, glucose, mannose, mannitol,

Qua kết quả phân tích hệ gen của chủng vi khuẩn đã tìm thấy một cụm *epsA-O* được mã hóa bởi một đoạn 15,7 kb chứa 15 gen *eps* bằng cách sử dụng máy chủ chủ thích BlastKOALA. Trong số các gen này, *epsE* mã hóa một enzyme GT môi gắn màng, không xúc tác các liên kết glycosidic. GT này tạo điều kiện cho việc vận chuyển đường-1-phosphate và kích hoạt chất mang undecaprenyl-phosphate-lipid ở phía màng tế bào chất [90]. Bước đầu tiên này cho phép các nucleotide - đường khác được gắn tuần tự để lắp ráp các đơn vị lặp lại nhờ sự xúc tác của các GT trong tế bào chất hoặc liên kết màng khác. Cụ thể, *epsL* mã hóa các GT vận chuyển UDP-glucose hoặc UDP-galactose, trong khi *epsD* vận chuyển UDPGlcA, *epsH* và *epsJ* vận chuyển các loại đường amino. *EpsF*, *epsG*, *epsH*, *epsI*, *epsJ* và *epsK* có thể vận chuyển nhiều loại đường nucleotide khác nhau. Hơn nữa, các gen *epsC*, *epsI*, *epsO*, gen acyltransferase *epsM* và gen aminotransferase *epsN* tất cả đều tham gia vào quá trình biến đổi các đơn vị lặp lại của chuỗi polysaccharide. Các đơn vị lặp lại được vận chuyển qua màng trong vào periplasm bởi *eps K* (Wzx flippase) [50] [144]. Trong khi đó, *epsG* có chức năng trùng hợp các đơn vị lặp lại (polymerase Wzy) bằng cách tạo ra các liên kết glycosid mới ở đầu khử của polyme đang phát triển, hình thành nên cấu trúc polysaccharide ngoại bào [145], [146]. Hai gen quan trọng khác là *epsA* và *epsB*, mã hóa cho protein-tyrosine kinase và chất điều biến protein-tyrosine kinase, có thể cần thiết cho quá trình sản xuất EPS lượng lớn [146]. Ngoài ra, hai gen này được biết là có chức năng xác định độ dài chuỗi polysaccharide [50], *epsA* cũng chịu trách nhiệm cho quá trình xuất polysaccharide ra ngoại bào [147], [50]. Cụ thể, các gen trong operon *epsA-O* của chủng *B. velezensis* DTA1 có độ tương đồng và độ bao phủ đạt 100% so với chủng *B. velezensis* L-S60. Khi so sánh với các chủng *B. velezensis* khác, mức độ tương đồng dao động từ 96% đến 100%. Đáng chú ý, so với chủng *B. velezensis* VTX20 (phân lập tại Việt Nam), các gen trong operon *epsA-O* có độ tương đồng từ 98% trở lên, tuy nhiên cấu trúc sắp xếp của operon ở VTX20 lại theo chiều ngược lại. So sánh với loài *B. amyloliquefaciens*, mức độ tương đồng giữa các gen trong operon *epsA-O* với chủng *B. velezensis* DTA1 dao động từ 93% đến 100%, trong đó có sự tương đồng tuyệt đối (100%) với chủng *B. amyloliquefaciens* DSM7. Khi so sánh với chủng *Bacillus subtilis* 168, độ tương đồng giữa các gen trong operon dao động từ 63% đến 88%. Đặc biệt, ở chủng *Bacillus subtilis* ATCC 21228, mặc dù một số gen đạt độ tương đồng đến 100%, nhưng gen *epsD* chỉ có mức tương đồng dưới 50% (Hình 3.6A).

Con đường sinh tổng hợp EPS thứ hai thông qua một protein sucrose đơn được mã hóa bởi cụm gen sinh tổng hợp levan cũng được phát hiện trên nhiễm sắc thể DTA1 (Hình 3.6B). Đoạn 6,1 kb chứa các gen mã hóa cho manganese-dependent infinite pyrophosphatase (*ppaC*), phosphate acetyltransferase (*pta*), levansucrose (*sacB*),

levanase sản xuất levanbiose (*levB*) và chất ức chế phiên mã loại HTH RspR (*rspR*). Levansucrase SacB từ DTA1, được biết đến với khả năng tổng hợp levan, có trình tự đồng nhất 96,61% và 90,47% tương ứng với protein SacB từ *Bacillus amyloliquefaciens* (ID Uniprot: P21130) và chủng *Bacillus subtilis* 168 (ID Uniprot: P05655). Bên cạnh đó, gen *LevB* mã hóa cho levanase sản xuất levanbiose, nằm cạnh *SacB* và chịu trách nhiệm phân hủy levan. Cụm gen levan ở chủng *Bacillus velezensis* DTA1 được bảo tồn cao ở các chủng *B. velezensis* và *B. amyloliquefaciens*, nhưng không được tìm thấy ở *Bacillus subtilis*. Trong đó, gen *sacB* của DTA1 có mức độ tương đồng trên 99% so với các chủng tham chiếu *B. velezensis*, bao gồm cả chủng *B. velezensis* VTX20 phân lập tại Việt Nam; mức tương đồng này đạt 96% ở *B. amyloliquefaciens* LL3 và 100% ở *B. amyloliquefaciens* DSM7. Tương tự, gen *levB* cho thấy độ tương đồng trên 90% với các chủng *B. velezensis* và *B. amyloliquefaciens* DSM7, trong khi ở *B. amyloliquefaciens* LL3 là 91%.



Hình 3.6. Các cụm gen liên quan đến các con đường sinh tổng hợp EPS đã được phát hiện trong *B. velezensis* DTA1

(A) So sánh operon *epsA-O* trong *B. velezensis* DTA1 và các loài *Bacillus* khác. Các gen tương tự được chỉ ra bằng cùng một màu và tỷ lệ giống nhau giữa các gen tương ứng với ở chủng *B. velezensis* DTA1 được hiển thị bằng số trong hộp đen. Các cụm EPS được trực quan hóa bằng CAGECAT web server.

(B) Một cụm gen sinh tổng hợp levan đã được phát hiện trên nhiễm sắc thể DTA1 và trên các chủng *B. velezensis* khác và *B. amyloliquefaciens*. Các gen tương tự được chỉ ra bằng cùng một màu và tỷ lệ phần trăm giống nhau giữa hai gen được hiển thị bằng số trong hộp đen. *ppaC*, Manganese-dependent infinite pyrophosphatase; *pta*, Phosphate acetyltransferase; *sacB*, Levansucrase; *levB*, Levanbiose-producing levanase; *rspR*, HTH-type transcriptional repressor *RspR*.

Bảng 3.10. Vị trí của các gen trong cụm gen sinh tổng hợp liên quan đến các con đường sinh tổng hợp EPS ở *B. velezensis* DTA1

Con đường/ Cụm	ID gene	Gene	Sản phẩm	ID contig	Bắt đầu	Kết thúc	Mạch DNA
Con đường phụ thuộc Wzx/ Wzy/ Cụm 1	ALPNOB_071 30	<i>epsO</i>	pyruvyl transferase EpsO	contig_ 2	341268	342233	-
	ALPNOB_071 35	<i>epsN</i>	pyridoxal phosphate-dependent aminotransferase EpsN	contig_ 2	342212	343384	-
	ALPNOB_071 40	<i>epsM</i>	acetyltransferase EpsM	contig_ 2	343389	344036	-
	ALPNOB_071 45	<i>epsL</i>	sugar transferase EpsL	contig_ 2	344033	344641	-
	ALPNOB_071 50	<i>epsK</i>	membrane protein EpsK	contig_ 2	344638	346155	-
	ALPNOB_071 55	<i>epsJ</i>	glycosyltransferase EpsJ	contig_ 2	346152	347186	-
	ALPNOB_071 60	<i>epsI</i>	pyruvyl transferase EpsI	contig_ 2	347183	348259	-
	ALPNOB_071 65	<i>epsH</i>	glycosyltransferase EpsH	contig_ 2	348264	349301	-
	ALPNOB_071 70	<i>epsG</i>	transmembrane protein EpsG	contig_ 2	349320	350423	-
	ALPNOB_071 75	<i>epsF</i>	glycosyltransferase EpsF	contig_ 2	350427	351563	-
	ALPNOB_071 80	<i>epsE</i>	glycosyltransferase EpsE	contig_ 2	351556	352398	-

	ALPNOB_071 85	<i>epsD</i>	glycosyltransferase EpsD	contig_ 2	352395	353534	-
	ALPNOB_071 90	<i>epsC</i>	polysaccharide biosynthesis protein EpsC	contig_ 2	353550	353567	-
	ALPNOB_071 95	<i>epsB</i>	protein-tyrosine kinase	contig_ 2	355588	356268	-
	ALPNOB_072 00	<i>epsA</i>	protein tyrosine kinase modulator	contig_ 2	356274	356981	-
Tổng hợp Levan/ Cụm 2	ALPNOB_101 40	<i>ppaC</i>	manganese-dependent inorganic pyrophosphatase	contig_ 2	931942	932871	+
	ALPNOB_101 45	<i>pta</i>	Phosphate acetyltransferase (Phosphotransacetylase)	contig_ 2	933114	933971	+
	ALPNOB_101 50	<i>sacB</i>	levansucrase	contig_ 2	934319	935740	+
	ALPNOB_101 55	<i>levB</i>	levanbiose-producing levanase	contig_ 2	935757	937361	+
	ALPNOB_101 60	<i>rspR</i>	HTH-type transcriptional repressor RspR	contig_ 2	937441	938103	+

Ghi chú: Mạch DNA mã hóa cho gen theo chiều xuôi (+); Mạch DNA mã hóa cho gen theo chiều ngược (-).

Qua phân tích WGS cho thấy chủng *B. velezensis* DTA1 có thể sản xuất 2 loại EPS, đó là levan, được tổng hợp ngoại bào thông qua một enzyme sucrose duy nhất gọi là levansucrase, và một loại EPS khác được tổng hợp bởi operon *epsA-O*. Một cụm levan chứa các gen *sacB* và *levB* đã được phát hiện trong bộ gen của chủng *B. velezensis* DTA1. Đây là 1 loại homopolysaccharide, levan, bao gồm các đơn vị D-fructose liên kết β -2,6. Chúng có thể chứa các nhánh glucose bổ sung với fructose đầu cuối thông qua các liên kết α -glycosidic và được tổng hợp ngoại bào bởi levansucrase trong môi trường giàu sucrose [50]. Levansucrase được mã hóa bởi gen *sacB* và được sucrose cảm ứng mạnh. Ngược lại, levanase sản xuất levanbiose, được mã hóa bởi *levB*, chịu trách nhiệm cho quá trình phân hủy levan [148]. Sự biểu hiện của gen này đã được chứng minh là làm tăng cường sự biểu hiện của levansucrase ở *Bacillus subtilis* [149]. Chủng *B. velezensis* DTA1 còn chứa một cụm *epsA-O* bao gồm 15 gen được mã hóa cho con đường phụ thuộc Wzx/Wzy. Đây là các gen điều hòa, tổng hợp, vận chuyển, trùng hợp, sửa đổi và xuất EPS ra ngoại bào, đã được mô tả rõ trong các nghiên cứu trước đây [146], [90], [144]. Bên cạnh đó, cụm này cho thấy sự tương đồng cao với các cụm ở các

chủng *B. velezensis* khác, và chủng thuộc loài *Bacillus* khác, phù hợp với các kết quả đã công bố trước đây [50], [90].

3.2.7. Các gen liên quan tới khả năng chống chịu stress ở *B. velezensis* DTA1

Chủng *B. velezensis* DTA1 chứa nhiều gen liên quan đến stress thẩm thấu, stress kim loại nặng, stress oxy hóa (Bảng 3.11). Các gen liên quan đến khả năng chịu đựng stress thẩm thấu, chẳng hạn như *degU*, *degS*, *sodA*, *dnaK*, ... đóng vai trò quan trọng trong việc thích nghi của vi khuẩn với stress thẩm thấu, chẳng hạn như độ mặn cao. Cụ thể, hệ thống truyền tín hiệu hai thành phần DegS-DegU có liên quan đến việc cảm nhận stress phi sinh học từ môi trường như nồng độ muối cao qua đó vi khuẩn có thể nhận biết và phản ứng với stress phi sinh học đã được phát hiện [150]. Gen superoxide dismutase *SodA* đóng vai trò quan trọng trong việc giảm thiểu tác động của các gốc tự do được tạo ra trong vi khuẩn ở điều kiện stress [150]. Các gen *dnaJ*, *dnaC*, *dnaK*, và *grpE* mã hóa cho các chaperone proteins và co-chaperones giúp bảo vệ và duy trì cấu trúc protein dưới điều kiện stress, bao gồm stress nhiệt và thẩm thấu. Một trong những cơ chế chống stress thẩm thấu ở vi khuẩn, cụ thể hơn là ở *B. velezensis* đã được biết đến là tăng sự tích tụ thẩm thấu các chất ở nội bào như glycine betaine, proline betaine, trehalose, glycerol và cardiolipin [151]. Sự có mặt của gen *OpuAC* và locus tag ALPNOB_04990 ở chủng *B. velezensis* DTA1 có liên quan đến chức năng tăng tích tụ thẩm thấu, đặc biệt là trong việc vận chuyển và tích lũy các hợp chất như glycine betaine, oligopeptide, polyol hoặc amino acid, các chất này giúp tế bào duy trì cân bằng thẩm thấu trong điều kiện môi trường thay đổi, giúp tế bào chống lại các điều kiện stress thẩm thấu như môi trường có nồng độ muối cao hoặc thiếu nước. Nhờ việc hấp thu, tích tụ các chất bảo vệ thẩm thấu trong tế bào giúp duy trì cân bằng thẩm thấu, ổn định tỉ lệ nước trong tế bào, giảm thiểu tác động tiêu cực của stress thẩm thấu và tăng khả năng sống sót cũng như khả năng sinh trưởng của tế bào trong các điều kiện khắc nghiệt [151]. Ngoài ra, chủng vi khuẩn mang các gen *czcD*, *cadA*, *chrA*, *chrB*, *ydpP*, *mneP*, *mntP*, *mgtE*, *corA* và *asrB* mã hóa cho các protein là các bơm vận chuyển các cation ra ngoài tế bào khi ở điều kiện stress kim loại, giúp vi khuẩn tăng khả năng chống lại stress natri, cadmium, kẽm, coban, cromat, mangan và asen, ... Một số gen có mặt trong hệ gen của chủng *B. velezensis* DTA1 như *nsrR*, *tpx*, *bcp* và *hmpA* mã hóa cho các enzyme và protein đóng vai trò quan trọng trong các quá trình chống oxy hóa, bảo vệ tế bào khỏi stress oxy hóa và điều hòa các phản ứng liên quan đến nitric oxide, thiol và glutathione.

Bảng 3.11. Các gen liên quan đến phản ứng chống stress ở *B. velezensis* DTA1

Locus tag	Gen	Protein mã hóa
<i>Truyền tín hiệu stress</i>		
ALPNOB_07690	<i>degU</i>	two-component system response regulator DegU
ALPNOB_07695	<i>degS</i>	two-component sensor histidine kinase DegS

ALPNOB_03005	<i>sodA</i>	Superoxide dismutase [Mn]
ALPNOB_12655		Transcriptional regulator sensing organic peroxides
ALPNOB_03220	<i>dnaJ</i>	molecular chaperone DnaJ
ALPNOB_16735	<i>dnaC</i>	DNA replication protein DnaC
ALPNOB_03230	<i>dnaK</i>	molecular chaperone DnaK
ALPNOB_03235	<i>grpE</i>	nucleotide exchange factor GrpE

Tích tụ các chất tan hữu cơ

ALPNOB_04990		Glycine betaine transporter
ALPNOB_14760		Glycine betaine-binding protein OpuAC glycine betaine/carnitine/choline/choline sulfate ABC
ALPNOB_06905	<i>opuCD</i>	transporter permease OpuCD osmoprotectant ABC transporter substrate-binding lipoprotein
ALPNOB_06910	<i>opuCC</i>	OpuCC Glycine betaine/carnitine/choline transport system permease
ALPNOB_06915	<i>opuCB</i>	protein OpuCB
ALPNOB_06920	<i>opuCA</i>	osmoprotectant ABC transporter ATP-binding protein OpuCA glycine/proline betaine ABC transporter permease subunit
ALPNOB_14765	<i>opuAB</i>	OpuAB glycine/proline betaine ABC transporter ATP-binding protein
ALPNOB_14770	<i>opuAA</i>	OpuAA
ALPNOB_05425	<i>gbsB</i>	choline dehydrogenase
ALPNOB_14650	<i>putP</i>	sodium/proline symporter PutP

Bơm Natri

ALPNOB_02185	<i>nhaC</i>	Na ⁺ /H ⁺ antiporter NhaC
ALPNOB_02940	<i>nhaC</i>	Na ⁺ /H ⁺ antiporter NhaC
ALPNOB_05745		Na ⁺ /H ⁺ antiporter subunit A
ALPNOB_05750	<i>nha</i>	Na ⁺ /H ⁺ antiporter complex
ALPNOB_05755	<i>mnhC</i>	Na ⁺ /H ⁺ antiporter subunit C
ALPNOB_05760	<i>phaD</i>	Na ⁺ /H ⁺ antiporter subunit D
ALPNOB_05765	<i>mnhC</i>	Na ⁺ /H ⁺ antiporter subunit E
ALPNOB_05770		Na ⁺ /H ⁺ antiporter subunit F1
ALPNOB_06655	<i>nhaK</i>	Na ⁺ /H ⁺ antiporter
ALPNOB_17515		Na ⁺ -efflux ABC transporter (ATP-binding protein)

Bơm Kali

ALPNOB_17490	<i>khtU</i>	K ⁺ /H ⁺ antiporter subunit KhtU
--------------	-------------	--

ALPNOB_17495	<i>khtT</i>	K ⁺ /H ⁺ antiporter KhtSTU, c-di-AMP-binding regulatory subunit KhtT, contains RCK_C (TrkA_C) domain
ALPNOB_17500	<i>khtS</i>	K ⁺ /H ⁺ antiporter modulator KhtS
<i>Stress kim loại nặng</i>		
ALPNOB_13630	<i>czcD</i>	Cadmium, cobalt and zinc/H ⁺ -K ⁺ antiporter
ALPNOB_06695	<i>cadA</i>	Cadmium, zinc and cobalt-transporting ATPase
ALPNOB_08020	<i>chrA</i>	chromate resistance efflux protein ChrA
ALPNOB_08015	<i>chrB</i>	chromate efflux transporter subunit ChrB
ALPNOB_04785		Cation efflux protein
ALPNOB_13950	<i>ydbP</i>	Thioredoxin-like protein YdbP
ALPNOB_00795		Transporter
ALPNOB_14960	<i>mneP</i>	Manganese efflux system protein MneP
ALPNOB_08425	<i>mntP</i>	Putative manganese efflux pump MntP
ALPNOB_11100	<i>mgtE</i>	Magnesium transporter MgtE intracellular domain-containing protein
ALPNOB_15640	<i>corA</i>	magnesium/cobalt transporter CorA
ALPNOB_09245	<i>arsB</i>	Arsenical pump membrane protein
ALPNOB_17360	<i>crcB</i>	fluoride efflux transporter CrcB
<i>Stress oxy hóa</i>		
ALPNOB_17265	<i>nsrR</i>	nitric oxide-sensing transcriptional repressor NsrR
ALPNOB_00830		Superoxide dismutase (Exported lipoprotein)
ALPNOB_09405		Catalase
ALPNOB_04635	<i>tpx</i>	thiol peroxidase
ALPNOB_15365	<i>bcp</i>	thioredoxin-dependent thiol peroxidase
ALPNOB_01325		Glutathione peroxidase
ALPNOB_02655		farnesyl diphosphate synthase
ALPNOB_04760	<i>hmpA</i>	NO-inducible flavohemoprotein

Một số yếu tố stress kim loại đã được chứng minh là kích thích sự gia tăng hàm lượng polysaccharide ngoại bào và protein ở nhiều chủng vi khuẩn khác nhau, chẳng hạn như Pb với chủng *Phanerochaete chrysosporium* [152]; Cd và Pb với chủng *Chlamydomonas reinhardtii* [153]; Cd với các chủng *Pseudomonas aeruginosa* và *Alcaligenes faecalis* [154],.... Chủng *B. velezensis* DTA1 trong nghiên cứu này có khả năng chịu được một số kim loại nặng, bao gồm Cd, Hg, Cr, Co, As, Pb, Zn và Fe. Điều này có thể được giải thích bằng sự hiện diện của các gen mã hóa cho các bơm xuất kim loại nặng ra ngoài như *czcD* và *cadA*, mang lại khả năng kháng Co, Zn và Cd [155] và *arsB*, mang lại khả năng kháng As [156]. Một cơ chế khác liên quan đến sự gia tăng EPS cũng như hàm lượng polysaccharide và protein ngoại bào, đóng vai trò quan trọng trong

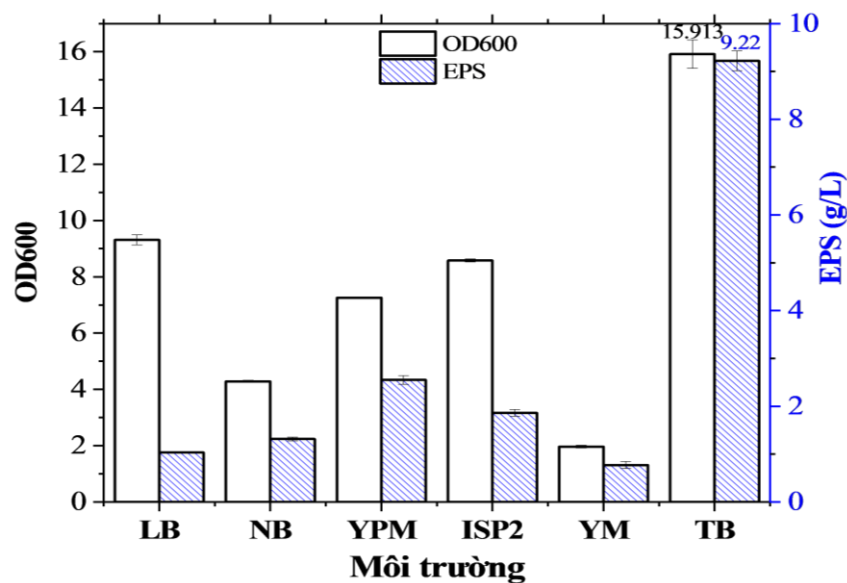
việc giảm độc tính của kim loại nặng vì đây là những yếu tố giúp tế bào chống lại kim loại nặng [154]. EPS có khả năng hấp phụ cation, ngăn chúng tác động xấu tới tế bào. Khả năng hấp phụ cation của EPS có thể được quy cho bản chất đa anion của nó, chứa các nhóm chức năng mang điện tích âm [157].

Các kết quả phân tích hệ gen của chủng *B. velezensis* DTA1 giúp xác định các gen đặc trưng liên quan đến sinh tổng hợp EPS và khả năng chống chịu qua đó cung cấp luận chứng khoa học cho tính nhất quán giữa đặc điểm di truyền và đặc tính sinh học. Chủng DTA mang đầy đủ các cụm gen liên quan đến 2 con đường sinh tổng hợp EPS chủ yếu (Wzx/Wzy và levansucrase), cùng các gen chuyển hóa đường và kháng stress (mặn, oxy hóa, kim loại). Ngoài ra, kết hợp kết quả định danh cho thấy DTA1 thuộc loài *Bacillus velezensis*, thuộc nhóm vi khuẩn an toàn sinh học cấp 1. Với phổ sử dụng carbon rộng và khả năng thích nghi điều kiện bất lợi, *B. velezensis* DTA1 là chủng vi khuẩn tiềm năng, phù hợp cho các nghiên cứu sâu hơn về ứng dụng vi sinh vật sinh EPS trong cải tạo đất mặn, đất cát san hô và nông nghiệp bền vững tại vùng biển đảo Việt Nam. Những phát hiện này góp phần củng cố cơ sở khoa học và nâng cao hiệu quả ứng dụng của *B. velezensis* DTA1 trong thực tiễn.

3.3. Nghiên cứu môi trường và điều kiện nuôi cấy thu nhận exopolysaccharide từ chủng *B. velezensis* DTA1

3.3.1. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của từng yếu tố môi trường và điều kiện nuôi cấy tới khả năng sinh exopolysaccharide

3.3.1.1. Khảo sát môi trường nuôi cấy

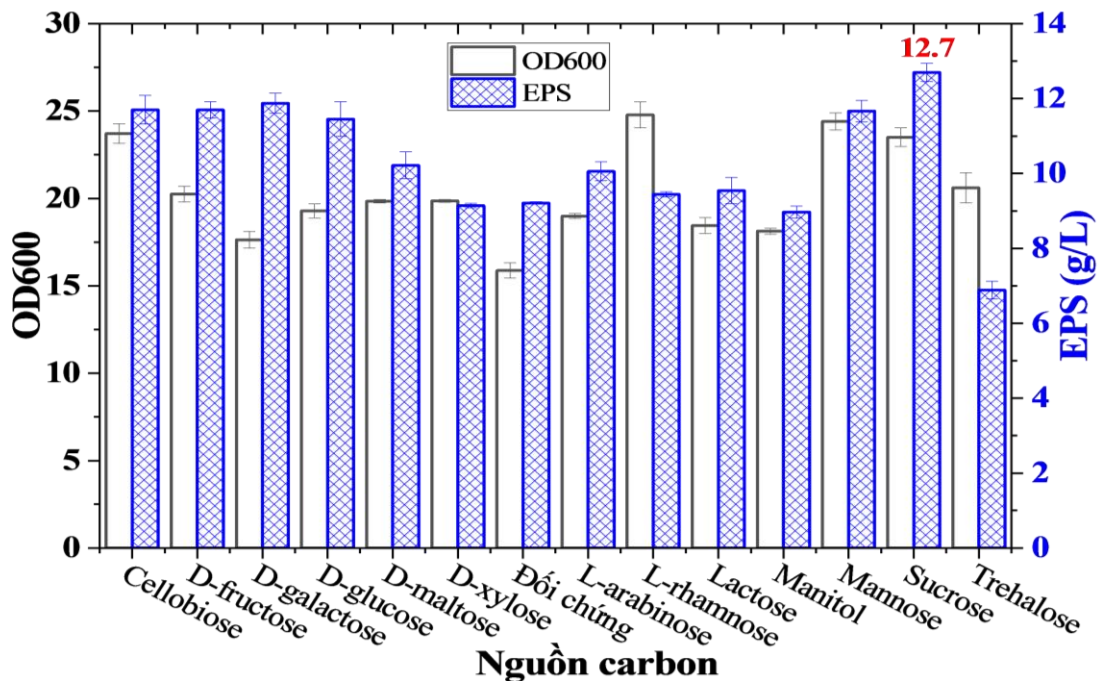


Hình 3.7. Khả năng sinh trưởng (OD600) và sinh EPS của *B. velezensis* DTA1 trên 6 môi trường khảo sát

Theo Hình 3.7, chủng vi khuẩn đạt mức sinh trưởng và sinh EPS cao nhất trong môi trường TB, với OD600 đạt 15,91; hàm lượng EPS đạt 9,22 g/L, cao hơn hẳn các môi trường khác ($p < 0,05$, Phụ lục 6). Giá trị OD600 ở môi trường TB cao gấp 1,71 lần ở môi trường cao thứ 2 là LB (OD600 = 9,31) và cao hơn gấp 8,11 lần ở môi trường YM cho OD600 thấp nhất là 1,96. Hàm lượng EPS ở môi trường TB cao gấp 3,62 lần ở môi trường cao thứ 2 là YPM (2,55 g/L) và gấp 11,97 lần môi trường YM cho lượng EPS thấp nhất là 0,77 g/L. So với các chủng khác cùng loài *B. velezensis*, hàm lượng EPS ở chủng *B. velezensis* DTA1 cao hơn ở các chủng AG6 (5,79 g/L) [53]; HY23 (2,7 g/L) [51],...tuy vậy thấp hơn 8,19 lần ở chủng VXT20 (75,5 g/L) [50].

Như vậy môi trường TB cho khả năng sinh EPS và sinh trưởng tốt nhất được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp.

3.3.1.2. Khảo sát nguồn carbon



Hình 3.8. Tác động của 13 nguồn carbon đối với giá trị OD600 và sản xuất EPS ở chủng *B. velezensis* DTA1

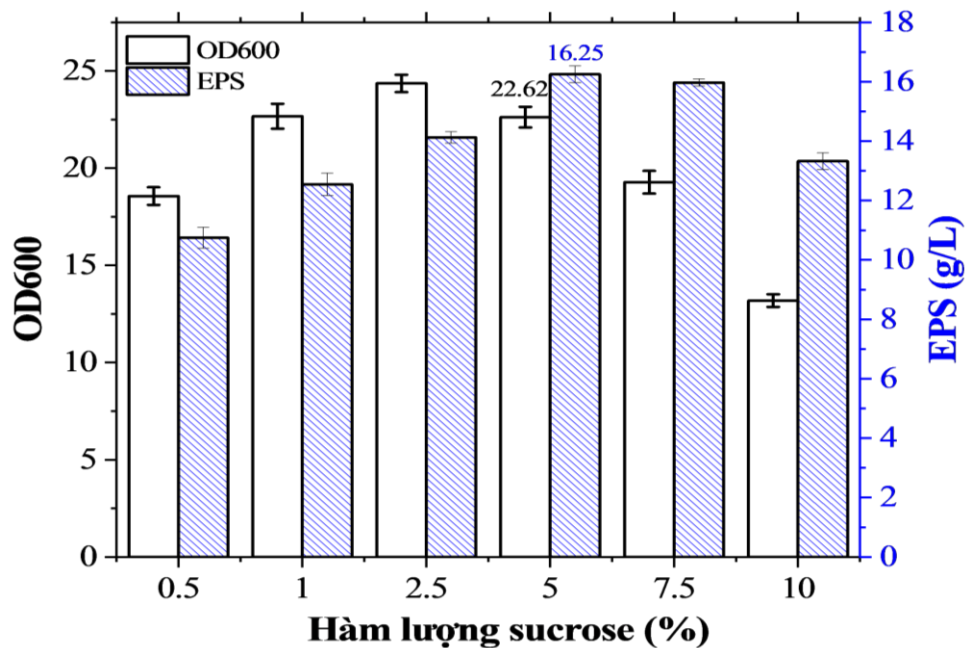
Mười ba nguồn carbon (D-glucose, D-fructose, D-galactose, sucrose, lactose, D-maltose, mannose, manitol, trehalose, D-xylose, L-rhamnose, L-arabinose, cellobiose) đều cho thấy khả năng thúc đẩy sinh trưởng ở chủng *B. velezensis* DTA1 với các giá trị OD600 cao hơn đối chứng ($p < 0,05$, Phụ lục 7, Hình 3.8). Đây là các nguồn carbon đã được dự đoán là chủng *Bacillus velezensis* DTA1 có tiềm năng sử dụng theo kết quả phân tích hệ gen (chủng *B. velezensis* DTA1 có hệ thống vận chuyển PTS hoặc có chứa các cụm gen mã hóa cho enzyme chuyển hóa đường) và test hóa sinh API® 50CHB. L-rhamnose, mannose, cellobiose và sucrose là các nguồn carbon cho khả năng sinh trưởng tốt nhất với chủng *B. velezensis* DTA1 tương ứng với các giá trị OD600 là 24,78; 24,74;

24,41; 23,72 và 23,51. Sự khác biệt về giá trị OD600 giữa năm loại đường không đạt mức ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$, Phụ lục 7).

Khi xét về khả năng kích thích sinh EPS của 13 nguồn carbon khảo sát, có 8 nguồn carbon (sucrose, D-galactose, cellobiose, D-fructose, mannose, D-glucose, D-maltose và L-arabinose) kích thích sinh EPS tốt (cao hơn hẳn đối chứng không bổ sung nguồn carbon, $p < 0,05$) trong đó sucrose cho khả năng sinh EPS tốt nhất đạt 12,70 g/L; 4 nguồn carbon (lactose, L-rhamnose, D-xylose, manitol) không khác biệt so với đối chứng ($p > 0,05$) và chỉ có trehalose gây giảm sinh EPS ($p < 0,05$).

Kết quả đúng như dự đoán 8 nguồn carbon (sucrose, galactose, cellobiose, fructose, mannose, glucose, maltose và arabinose) được dự đoán qua con đường sinh tổng hợp đường nucleotide (Hình 3.5) đều kích thích sinh EPS tốt, đây là các nguồn đường có kích thước nhỏ (đường đơn hoặc đường đôi) dễ hấp thụ và tham gia vào con đường chuyển hóa tạo đường nucleotide – tiền chất tham gia tổng hợp nên EPS.

Sucrose cho khả năng sinh EPS tốt nhất và cũng kích thích sinh trưởng tốt nên được tiếp tục khảo sát thêm ở nồng độ từ 0%–10% (Hình 3.9).



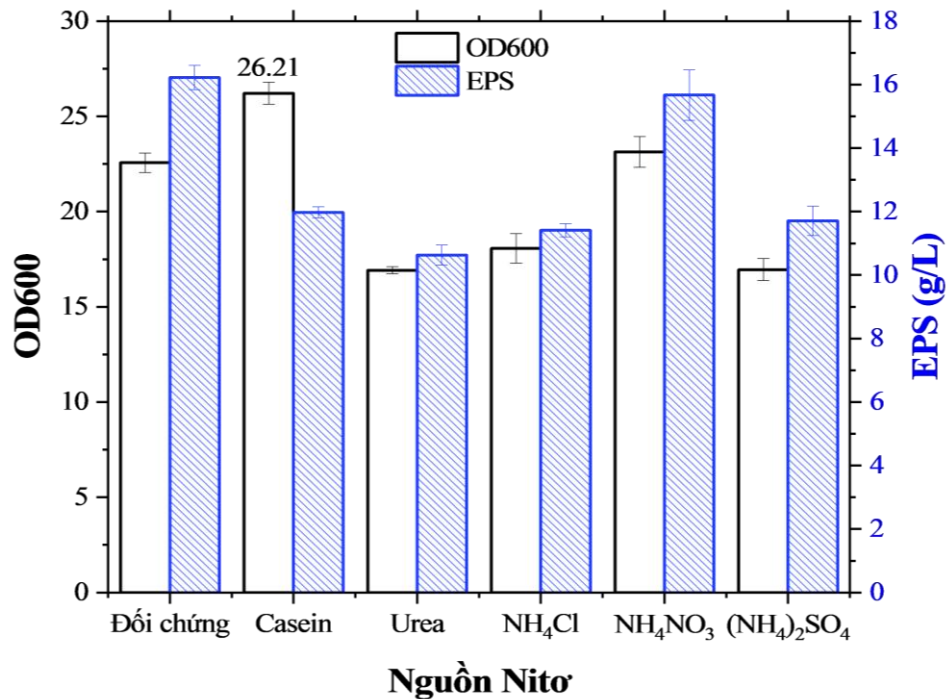
Hình 3.9. Khả năng sinh trưởng (OD600) và sản xuất EPS của chủng *B. velezensis* DTA1 khi bổ sung hàm lượng sucrose 0,5–10%

Chủng *B. velezensis* DTA1 sinh trưởng tăng khi tăng nồng độ sucrose từ 0,5–2,5% và thể hiện khả năng sinh trưởng cao nhất ở nồng độ sucrose 2,5% (OD600 đạt 24,36), sau đó nồng độ sucrose càng tăng khả năng sinh trưởng càng giảm. Chủng *B. velezensis* DTA1 sinh EPS tốt nhất ở nồng độ sucrose 5% đạt 16,25 g/L tuy vậy khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với ở nồng độ sucrose 7,5% với 15,97 g/L EPS ($p > 0,05$, Hình 3.9, Phụ lục 8). Một số công bố trước đó cũng cho thấy sucrose cho năng suất EPS cao

hơn một số nguồn đường khác ở các chủng *Weissella confusa/cibaria* 3MI3 [127], *B. velezensis* TSD5 [135], đặc biệt ở nồng độ 4,5% ở *B. subtilis* [158]. Do đó hàm lượng sucrose 5% được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp.

3.3.1.3. Khảo sát nguồn nitơ

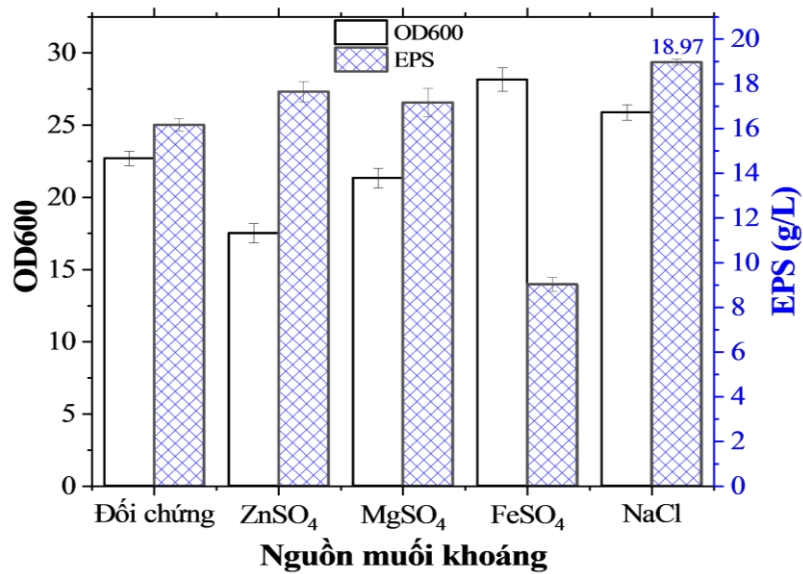
Hình 3.10 cho thấy 5 nguồn nitơ bổ sung vào môi trường chỉ có casein kích thích tăng trưởng tốt trong khi NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, urea ức chế sinh trưởng ở chủng *B. velezensis* DTA1 ($p < 0,05$, Phụ lục 9). Cả 5 nguồn nitơ đều không kích thích sinh EPS thậm chí ức chế khả năng sinh EPS ($p < 0,05$) ngoại trừ NH_4NO_3 thấp hơn không ý nghĩa ($p > 0,05$). Do đó nghiên cứu tiếp theo không bổ sung thêm nguồn nitơ vào môi trường.



Hình 3.10. Kết quả khảo sát khả năng sinh trưởng (OD600) và sinh EPS của chủng *B. velezensis* DTA1 khi không bổ sung (đối chứng) và bổ sung 5 nguồn nitơ khác nhau

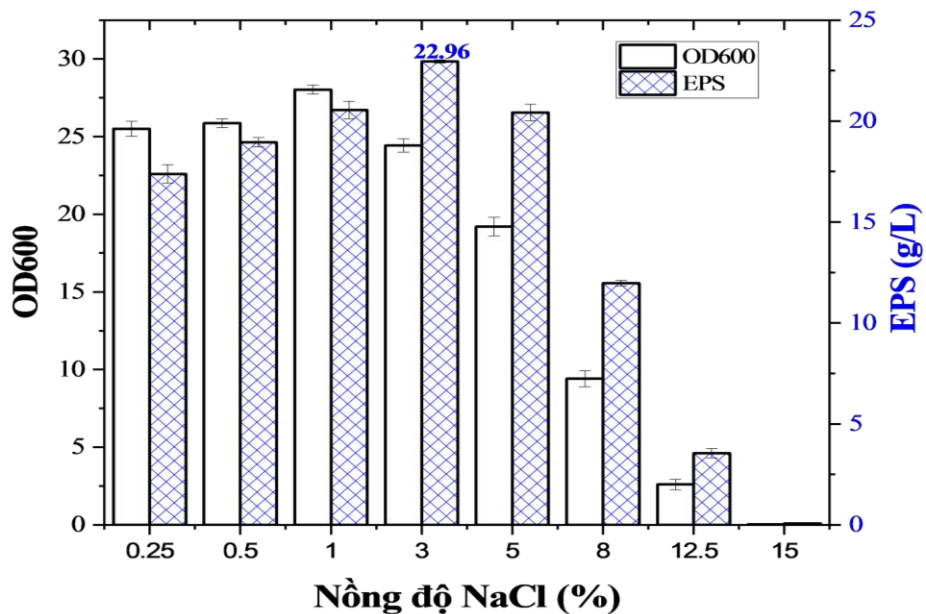
Một số nghiên cứu trước đây cũng chỉ ra rằng bổ sung nguồn nitơ vô cơ không kích thích, thậm chí có thể ức chế quá trình sinh tổng hợp EPS, trong khi các nguồn nitơ hữu cơ như peptone, yeast extract, casein, beef extract hay tryptone lại giúp tăng trưởng và sản xuất EPS nhờ chứa vitamin, acid amin và cofactor cần thiết cho hoạt động enzyme và sinh tổng hợp polysaccharide [159]. Ở chủng *Halomonas xianhensis* SUR308, casein được xác định là nguồn nitơ tốt nhất cho cả tăng trưởng và sinh EPS [159]; ngược lại, ở *Enterobacter* sp. ACD2, peptone 0,5% cho năng suất EPS cao hơn 1,56 lần so với cùng nồng độ casein [160]. Đối với *B. velezensis* DTA1, việc bổ sung casein vào môi trường giàu dinh dưỡng như TB không giúp cải thiện khả năng sinh EPS, có thể do môi trường này đã chứa sẵn nguồn N hữu cơ dễ hấp thu (peptone, yeast extract). Sự dư thừa nitơ có thể khiến dòng carbon ưu tiên cho tổng hợp protein và sinh khối thay vì polysaccharide ngoại bào, dẫn đến sinh EPS giảm [161].

3.3.1.4. Khảo sát nguồn muối khoáng



Hình 3.11. Kết quả khảo sát khả năng sinh trưởng (OD600) và sinh EPS của chủng *B. velezensis* DTA1 khi không bổ sung (đối chứng) và bổ sung 4 nguồn muối khoáng

Trong 4 nguồn muối khảo sát chỉ có FeSO₄ giúp kích thích tăng trưởng ở chủng *B. velezensis* DTA1 với giá trị OD600 cao nhất đạt 28,16, trong khi ZnSO₄ ức chế sinh trưởng với OD600 chỉ đạt 17,51 ($p < 0,05$). FeSO₄ kích thích tăng trưởng tốt nhưng lại ức chế tạo EPS nên cho hàm lượng EPS thấp nhất đạt 9,03 g/L. EPS thu được cao nhất là 18,97 g/L khi bổ sung NaCl vào môi trường, cao thứ 2 là ZnSO₄ đạt 17,65 g/L ($p < 0,05$, Phụ lục 10, Hình 3.11). NaCl cho khả năng sinh EPS tốt nhất trong các muối khoáng thử nghiệm được tiếp tục khảo sát để lựa chọn nồng độ phù hợp nhất.

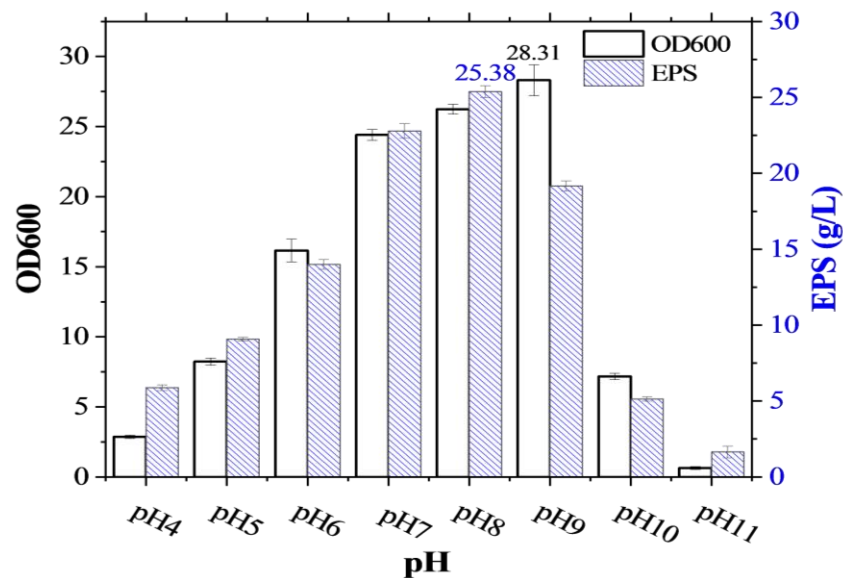


Hình 3.12. Ảnh hưởng của nồng độ NaCl (0,25–15%) đến sự tăng trưởng và sinh tổng hợp EPS của chủng *B. velezensis* DTA1

Kết quả khảo sát nồng độ NaCl từ 0,25% đến 15% cho thấy chủng *B. velezensis* DTA1 phát triển tốt trong khoảng từ 0,25% đến 5% NaCl, với mức tăng trưởng tốt nhất được quan sát thấy ở mức 1%. Chủng này đã chứng minh khả năng chịu muối lên đến nồng độ 12,5% NaCl. Đáng chú ý, nồng độ NaCl 3% dẫn đến sản lượng EPS cao nhất, đạt 22,96 g/L (Hình 3.12, Phụ lục 11). Nồng độ này cũng ảnh hưởng đáng kể đến sản xuất EPS ở *B. velezensis* TSD5, chủng này cũng chịu được nồng độ NaCl lên đến 12,5% [135].

3.3.1.5. Khảo sát pH môi trường

Giá trị pH là một yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến sinh lý của vi sinh vật bằng cách ảnh hưởng đến độ hòa tan và hấp thụ chất dinh dưỡng, hoạt động của enzyme, hình thái màng tế bào, hình thành sản phẩm phụ và phản ứng oxy hóa khử [162]. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của pH đến khả năng sinh EPS được thể hiện trên Hình 3.13.



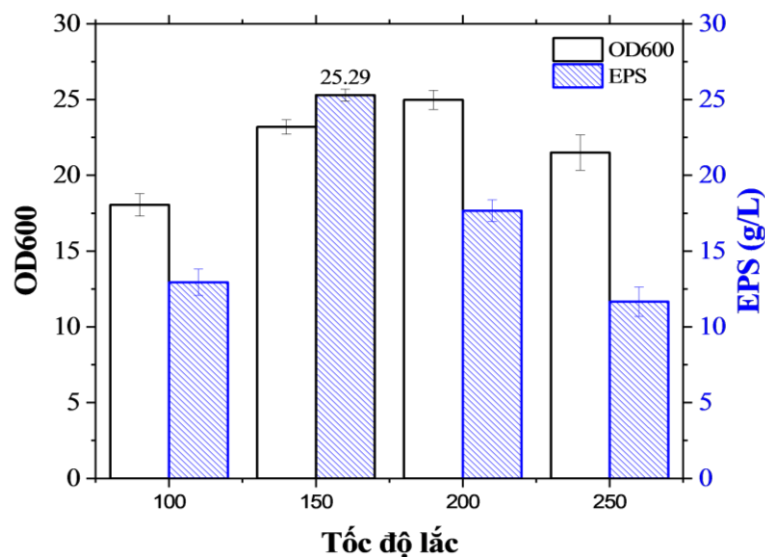
Hình 3.13. Khả năng sinh trưởng (OD600) và sinh EPS của chủng *B. velezensis* DTA1 khi khảo sát ở các độ pH từ 4–11

Kết quả khảo sát độ pH trên Hình 3.13 cho thấy chủng *B. velezensis* DTA1 ưa kiềm, có phạm vi chịu pH rộng, sinh trưởng được trong khoảng pH khảo sát từ 4 đến 11, với mức tăng trưởng tối ưu được quan sát thấy ở pH 9. Năng suất EPS cao nhất là 25,38 g/L đạt được ở pH 8, trong khi năng suất thấp nhất là 1,64 g/L đạt được ở pH 11 ($p < 0,05$, Phụ lục 12). Khả năng sinh EPS tốt trong môi trường kiềm cũng đã được báo cáo ở chủng *B. subtilis* SH1 sinh EPS tốt nhất ở pH9 đạt 24 g/L [162], chủng *Bacillus amyloliquefaciens* BPRGS [163], trong khi đó một số nghiên cứu khác cho hàm lượng EPS ở *Bacillus* tốt nhất ở pH 7 và giảm dần ở pH 8 đến 10 [158]. Chủng *B. velezensis* DTA1 sinh trưởng và sinh EPS mạnh trong môi trường kiềm, pH8–9, trùng với khoảng pH của cát san hô ở Trường Sa. Khả năng sinh trưởng tốt trong môi trường kiềm của chủng này có thể được giải thích do chủng mang các gen chịu mặn-kiềm, chịu stress

(như *nha*, *deg*, *dna*, *sod*, *opu*,...) và các gen liên quan tới sinh tổng hợp EPS (Bảng 3.10 và Bảng 3.11) giúp tăng khả năng chống chịu stress cho tế bào, giúp tế bào sinh trưởng tốt ngay cả trong điều kiện stress [150], [135]. Một số nghiên cứu trước đó cũng cho thấy ở điều kiện stress giúp kích thích sinh EPS tốt hơn để tạo biofilm giúp bảo vệ vi khuẩn chống lại điều kiện bất lợi [71], [72]. Đây là điểm thích nghi rất đáng chú ý ở chủng *B. velezensis* DTA1 với môi trường kiềm của đất đảo san hô. Khả năng chịu được khoảng pH rộng là ưu điểm để chủng *B. velezensis* DTA1 có thể được áp dụng hiệu quả trên nhiều môi trường khác nhau, đặc biệt là trong các môi trường kiềm mặn như cát san hô. Môi trường pH8 cho khả năng sinh EPS tốt nhất được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp.

3.3.1.6. Khảo sát tốc độ nuôi lắc

Chủng *B. velezensis* DTA1 sinh trưởng tốt nhất ở tốc độ lắc 200 rpm với giá trị OD600 đạt 28,64, cao thứ 2 ở tốc độ lắc 150 rpm với giá trị OD600 = 26,19 ($p < 0,05$). Ở tốc độ lắc 150 rpm cho khả năng sinh EPS tốt nhất đạt 25,29 g/L, tăng hay giảm tốc độ lắc đều cho hàm lượng EPS thấp hơn (Hình 3.14, Phụ lục 13). Do đó tốc độ lắc 150 rpm vẫn được giữ trong các nghiên cứu tiếp.

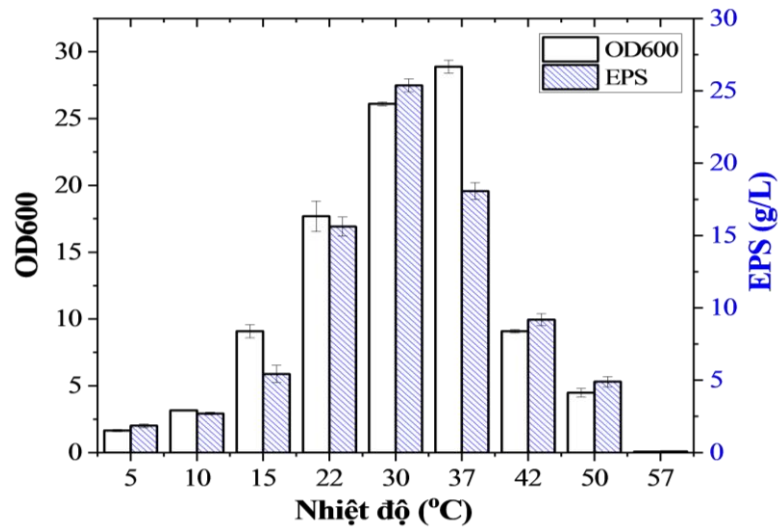


Hình 3.14. Khả năng sinh trưởng (OD600) và sinh EPS của chủng *B. velezensis* DTA1 khi khảo sát tốc độ lắc từ 100–250 rpm

3.3.1.7. Khảo sát nhiệt độ nuôi cấy

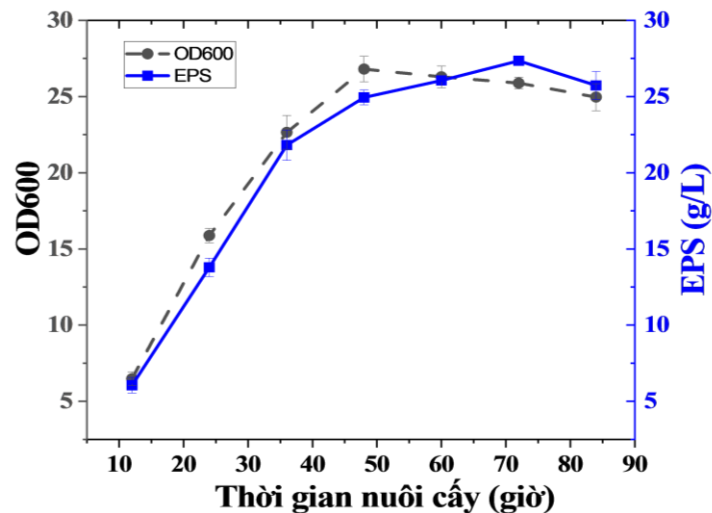
Chủng *B. velezensis* DTA1 có khả năng phát triển trong phạm vi nhiệt độ rộng từ 5–50 °C, tốt nhất là 37 °C, nhưng ở 30 °C vẫn cho khả năng sản xuất EPS tốt nhất ($p < 0,05$, Phụ lục 14, Hình 3.15). Chủng *B. velezensis* DTA1 đã thể hiện khả năng chịu đựng rộng với độ mặn (lên đến 12,5% NaCl), pH (pH 4–11) và nhiệt độ (5–50 °C), khiến chủng đặc biệt phù hợp để ứng dụng trong môi trường khắc nghiệt như hệ sinh thái biển và đảo. Khả năng chịu đựng trên cũng được đóng góp bởi các tế bào sản xuất EPS hoạt động như một bức tường bảo vệ, giúp nó tăng khả năng chống chịu với các điều kiện

stress của môi trường [135]. Như vậy ở điều kiện 30 °C cho hàm lượng EPS cao nhất nên vẫn được duy trì ở các nghiên cứu tiếp.



Hình 3.15. Khả năng sinh trưởng (OD600) và sinh EPS của chủng *B. velezensis* DTA1 khi khảo sát nhiệt độ nuôi cấy từ 5–57 °C

3.3.1.8. Khảo sát thời gian nuôi cấy phù hợp



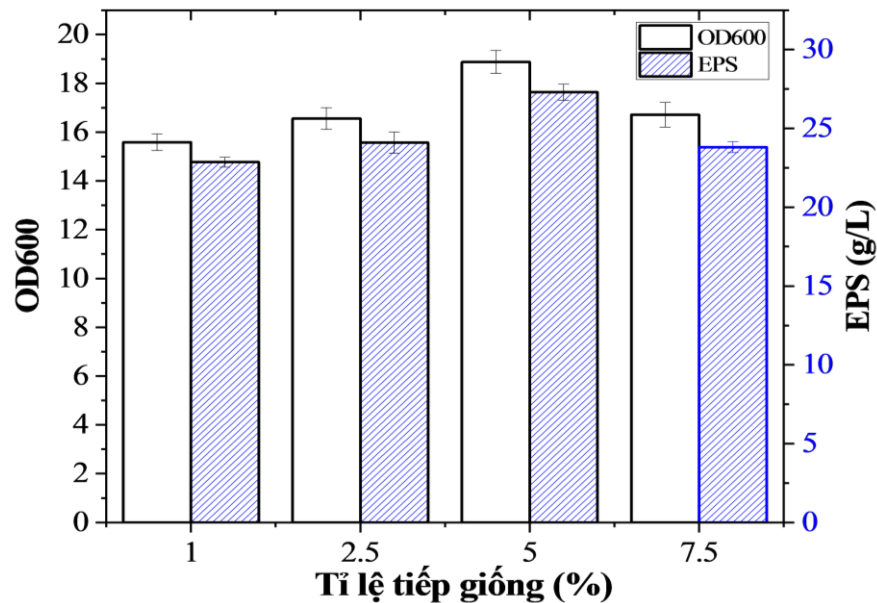
Hình 3.16. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến khả năng sinh trưởng (OD600) và sinh EPS của chủng *B. velezensis* DTA1

Chủng *B. velezensis* DTA1 sinh trưởng cao nhất ở thời điểm 48 giờ với giá trị OD600 đạt 26,8, tuy vậy không khác biệt so với các thời điểm 60-84 giờ. Thời điểm sau 72 giờ cho năng suất EPS cao nhất là 27,35 g/L nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với thời điểm 48; 60 và 84 giờ ($p < 0,05$, Phụ lục 15, Hình 3.16). Thời điểm này phù hợp với các công bố trước đó ở chủng *B. subtilis* của Abou-Dobara và cs (2014) [158], trong khi chủng *B. subtilis* SH1 đạt năng suất EPS cao nhất sau 4 ngày [162]. Thời điểm sau 72 giờ nuôi cấy cho năng suất EPS cao nhất nên được lựa chọn cho nghiên cứu tiếp.

3.3.1.9. Khảo sát tỉ lệ tiếp giống

Trong các tỉ lệ tiếp giống 1; 2,5; 5; 7,5% khảo sát, tỉ lệ 5% cho khả năng sinh trưởng tốt nhất với OD600 đạt 18,87 ($p < 0,05$). Tỉ lệ tiếp giống 5% cũng cho hàm lượng EPS cao nhất (27,30 g/L) ($p < 0,05$, Hình 3.17, Phụ lục 16).

Như vậy qua quá trình khảo sát từng yếu tố đơn đã chọn được môi trường TB có bổ sung sucrose 5%; NaCl 3%, pH8, nuôi lắc ở 150 rpm, nhiệt độ 30 °C và thu mẫu sau 72 giờ cho hàm lượng EPS cao nhất đạt khoảng 27,30 g/L. Vì giá trị pH, nồng độ NaCl và nồng độ sucrose là 3 yếu tố môi trường có ảnh hưởng lớn tới khả năng sinh EPS nên được lựa chọn để tối ưu khả năng sinh EPS.



Hình 3.17. Ảnh hưởng của tỉ lệ tiếp giống đến khả năng sinh trưởng (OD600) và sinh EPS của chủng *B. velezensis* DTA1

3.3.2. Tối ưu khả năng sinh exopolysaccharide bằng phương pháp đáp ứng bề mặt

Kết quả thực nghiệm chứng minh rằng 3 yếu tố thử nghiệm (nồng độ NaCl, giá trị pH và nồng độ sucrose) có tác động đáng kể đến năng suất EPS. Năng suất EPS dao động từ 10,98 g/L đến 31,49 g/L (Bảng 3.12). Dựa trên những phát hiện thực nghiệm này, một phương trình đa thức bậc hai đã được phát triển để mô tả ảnh hưởng của các biến độc lập (X_1 -NaCl, X_2 -pH và X_3 -sucrose) và tương tác của chúng. Năng suất EPS có thể được biểu thị như sau:

$$Y = 27,16 + 2,95X_1 + 2,94X_2 + 3,96X_3 - 1,3X_1X_2 + 2,56X_1X_3 - 2,01X_2X_3 - 6,7X_1^2 - 2,28X_2^2 + 1,7X_3^2$$

Phân tích hồi quy được tiến hành để đánh giá sự phù hợp của mô hình đáp ứng bề mặt (Hình 3.18) từ đa thức bậc 2 thu được với dữ liệu thực nghiệm (Bảng 3.12). Ý nghĩa thống kê của phương trình đa thức bậc hai trên được đánh giá bằng cách sử dụng phân tích F-test và ANOVA (Bảng 3.13).

Bảng 3.12. Ma trận thực nghiệm Box-Benhken 3 yếu tố và hàm lượng EPS thực tế

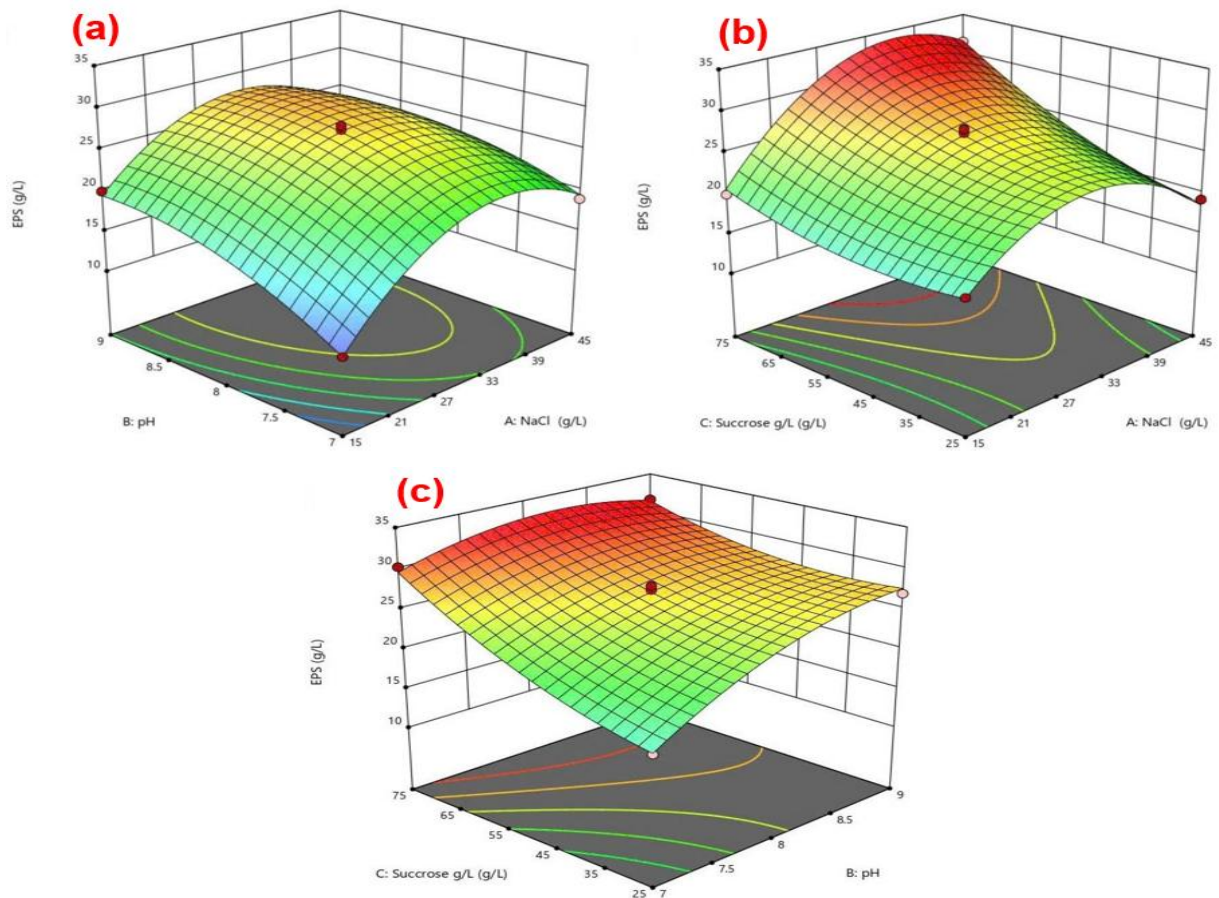
Thí nghiệm	X ₁ (NaCl)		X ₂ (độ pH)		X ₃ (sucrose)		EPS
	Mức mã hóa	Mức thực tế (g/L)	Mức mã hóa	Mức thực tế	Mức mã hóa	Mức thực tế (g/L)	Mức thực tế thu được (g/L)
1	0	30	-1	7	1	75	30,25±1,35
2	-1	15	0	8	1	75	19,95±0,78
3	0	30	-1	7	-1	25	17,54±0,81
4	1	45	-1	7	0	50	18,97±0,91
5	1	45	1	9	0	50	22,76±0,97
6	0	30	0	8	0	50	27,93±1,02
7	1	45	0	8	1	75	31,49±1,42
8	1	45	0	8	-1	25	19,25±0,76
9	0	30	0	8	0	50	26,47±0,96
10	0	30	0	8	0	50	26,12±1,05
11	-1	15	0	8	-1	25	17,94±0,89
12	-1	15	1	9	0	50	19,98±0,92
13	-1	15	-1	7	0	50	10,98±0,77
14	0	30	1	9	1	75	31,61±1,26
15	0	30	1	9	-1	25	26,92±1,18
16	0	30	0	8	0	50	27,39±1,19
17	0	30	0	8	0	50	27,88±1,12

Bảng 3.13. Kết quả ANOVA về ý nghĩa của mô hình bậc hai mô tả tác động tương tác của nồng độ NaCl, pH và nồng độ sucrose lên hàm lượng EPS

Thông số	Tổng bình phương	Df (Bậc tự do)	Trung bình bình phương	Giá trị F	giá trị p	Mức ý nghĩa
Mô hình	537,87	9	59,76	83,2	< 0,0001	có ý nghĩa
X ₁ -NaCl	69,74	1	69,74	97,08	< 0,0001	
X ₂ -pH	69,21	1	69,21	96,35	< 0,0001	
X ₃ -sucrose	125,22	1	125,22	174,31	< 0,0001	
X ₁ X ₂	6,79	1	6,79	9,45	0,018	
X ₁ X ₃	26,16	1	26,16	36,42	0,0005	
X ₂ X ₃	16,08	1	16,08	22,39	0,0021	
X ₁ ²	189,24	1	189,24	263,44	< 0,0001	
X ₂ ²	21,92	1	21,92	30,51	0,0009	
X ₃ ²	12,22	1	12,22	17,01	0,0044	
Residual	5,03	7	0,7183			

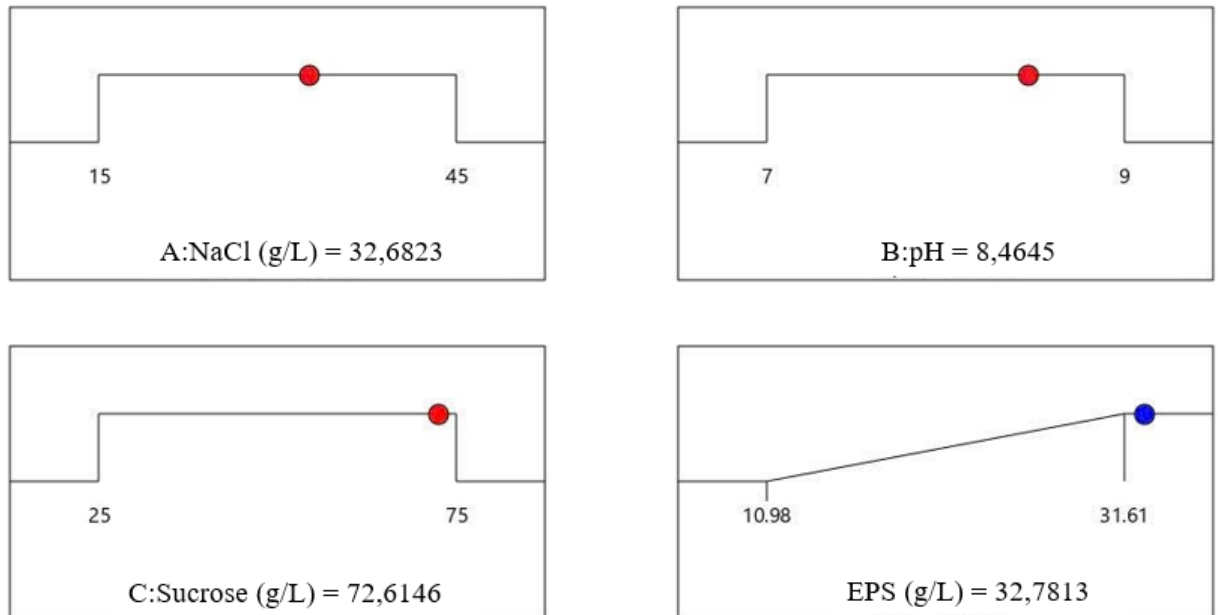
Lack of Fit	2,31	3	0,7688	1,13	0,4371	không đáng kể
Sai số	2,72	4	0,6805			
Tổng số	542,9	16				
R²	R² điều chỉnh		R² dự đoán		Độ chính xác Adeq	
0,9907	0,9788		0,9242		31,7636	

Phân tích ANOVA cho thấy mô hình có ý nghĩa thống kê với giá trị $F = 83,20$, trong khi xác suất xảy ra giá trị F lớn như vậy do nhiễu chỉ ở mức 0,01%. Các hệ số có $p < 0,05$ đều có ý nghĩa, chứng minh rằng cả các biến độc lập, hiệu ứng bậc hai và tương tác giữa chúng đều ảnh hưởng đáng kể đến năng suất EPS. Giá trị F của Lack of Fit = 1,13, không khác biệt có ý nghĩa so với sai số thuần, cho thấy mô hình được xây dựng phù hợp. Hệ số xác định $R^2 = 0,9907$ (lớn hơn 0,8) phản ánh mức độ tương quan cao [164]. Ngoài ra, R^2 dự đoán (0,9242) phù hợp với R^2 hiệu chỉnh (0,9788), với chênh lệch $< 0,2$, chứng tỏ mô hình đầy đủ và ổn định. Giá trị Adeq Precision đạt 31,76 (> 4) khẳng định tín hiệu mạnh. Nhìn chung, kết quả ANOVA xác nhận mô hình có độ tin cậy cao và phù hợp để dự đoán năng suất EPS (Bảng 3.13).



Hình 3.18. Biểu diễn bề mặt đáp ứng minh họa mối tương quan giữa nồng độ NaCl và pH (A); Nồng độ NaCl (g/L) và nồng độ sucrose (g/L) (B); pH và nồng độ sucrose (g/L) (C) đối với hàm lượng EPS

Mô hình bề mặt đáp ứng cho thấy nồng độ sucrose là yếu tố có ảnh hưởng đáng kể nhất đến năng suất EPS. Việc gia tăng nồng độ sucrose cho thấy mối tương quan tích cực đáng kể với sản xuất EPS (Hình 3.18.B, C). Cả NaCl và pH đều có tác động tích cực, nhưng chỉ trong phạm vi tối ưu; các giá trị quá thấp hoặc quá cao dẫn đến giảm năng suất EPS. Sự kết hợp của các yếu tố, đặc biệt là NaCl và sucrose, đóng vai trò quan trọng để đạt được năng suất EPS tối đa, như được chứng minh rõ ràng bằng các vùng đỉnh trên các biểu đồ bề mặt phản ứng 3D (Hình 3.18.A, B, C). Quá trình tối ưu được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp hàm mong muốn trong phần mềm Design-Expert phiên bản 13. Các điều kiện tối ưu được dự đoán là: nồng độ NaCl ở mức 32,7 g/L (tức 3,27%), pH ở mức 8,46 và nồng độ sucrose ở mức 72,6 g/L (tức 7,26%), dẫn đến năng suất EPS dự đoán là 32,78 g/L (Hình 3.19). Việc xác nhận những điều kiện tối ưu này bằng thực nghiệm thu được hàm lượng EPS là 32,80 g/L, chứng tỏ mức độ phù hợp cao với dự đoán của mô hình là 32,78 g/L. Kết quả xác nhận độ tin cậy mạnh của chiến lược tối ưu hóa.



Hình 3.19. Hàm kỳ vọng và điều kiện tối ưu lên men thu EPS từ chủng *B. velezensis* DTA1

Chủng *B. velezensis* DTA1 đã chứng minh khả năng sử dụng nhiều nguồn carbon khác nhau và chịu được khoảng rộng các điều kiện môi trường. Hơn nữa, chủng vi khuẩn này thể hiện khả năng sản xuất EPS ấn tượng, đạt tới 32,80 g/L trong điều kiện tối ưu là môi trường TB có bổ sung sucrose 7,26%; NaCl 3,27%, pH 8,46, nuôi lắc ở 150 rpm, nhiệt độ 30 °C và thu mẫu sau 72 giờ. Sản lượng EPS cao này cũng được coi là một trong những yếu tố chính góp phần vào khả năng chịu được đa dạng các điều kiện môi trường của chủng vi khuẩn [135].

3.3.3. Ảnh hưởng của một số nguồn đường đến thành phần monosaccharide trong exopolysaccharide của *B. velezensis* DTA1

Bảng 3.14. Đặc điểm của EPS từ các chủng *Bacillus velezensis*

Chủng <i>Bacillus velezensis</i>	Nguồn đường (%)	Năng suất EPS (g/L)	Tỷ lệ thành phần monosaccharide trong EPS	Tài liệu tham khảo
DTA1 (TB, pH 8,46, NaCl 3,27% có/không bổ sung đường)	Glucose 1	21,42 ± 0,32 ^c	Glucose:rhamnose:mannose (1,00:9,56:59,94)	Nghiên cứu này
	Glucose 5	23,29 ± 0,34 ^b	Glucose:rhamnose:mannose (1.00:3.70:745.16)	
	Sucrose 1	23,93 ± 0,30 ^b	Glucose:rhamnose:fructose:mannose:N-acetylglucosamine (1,00:17,81:2,23:1,86:24,45)	
	Sucrose 5	30,39 ± 0,42 ^a	Glucose:rhamnose:fructose:mannose:N-acetylglucosamine (2,61:12,86:7,09:1,00:12,30)	
	Đối chứng (không thêm đường)	16,35 ± 0,30 ^d	Glucose:rhamnose:mannose (1,00:5,49:3,92)	
VTX20	Đường sucrose 20	75,5 ± 4,8	Fructose, glucose	[50]
AG6	Đường sucrose 10	5,79	Xylose:galactose:galacturonic acid (2,0:0,5:2,0)	[53]
HY23	Không thêm đường	2,80	Mannose:glucose (82:18)	[51]
KY471306	Mật mía 12	7,88	Glucose, mannose và galactose	[54]
MHM3	Đường sucrose 5	5,80	Glucuronic acid, glucose, Fructose và rhamnose (4,00:2,00:1,00:0,13)	[52]
OM03	Glucose 5	0,594	Mannose (63,52%) và glucose	[55]

Các số liệu được biểu diễn dưới dạng giá trị trung bình ± SD với số lần lặp $n = 3$. Những ký hiệu chữ cái khác nhau (^a, ^b, ^c, ^d) thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $p < 0,05$ (xem Phụ lục 17). Thành phần monosaccharide trong EPS được xác định dựa trên kết quả phân tích HPLC ở Phụ lục 18.

Kết quả nghiên cứu, phân tích được tập hợp trên Bảng 3.14 cho thấy việc bổ sung các nguồn carbon như glucose và sucrose làm thay đổi đáng kể năng suất sinh tổng hợp EPS, đồng thời tác động đến thành phần monosaccharide trong cấu trúc EPS từ chủng *B. velezensis* DTA1 (kí hiệu EPSDTA1). Trong điều kiện không bổ sung đường, năng suất EPSDTA1 đạt mức thấp nhất (16,35 ± 0,30 g/L). Khi bổ sung glucose ở nồng độ

1% và 5%, năng suất EPS tăng lên lần lượt là $21,42 \pm 0,32$ và $23,29 \pm 0,34$ g/L, cho thấy glucose kích thích tổng hợp EPS một cách đáng kể ($p < 0,05$). Đặc biệt, sucrose cho hiệu quả rõ rệt hơn: ở nồng độ 1% và 5%, năng suất EPS tăng lên tương ứng là $23,93 \pm 0,30$ và $30,39 \pm 0,42$ g/L (đạt cao nhất trong các khảo nghiệm). Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê và cho thấy khả năng thúc đẩy sinh tổng hợp EPS mạnh mẽ của sucrose so với glucose ở cùng nồng độ. So sánh với các chủng *B. velezensis* khác đã được công bố, chủng *B. velezensis* DTA1 thể hiện hiệu suất EPS vượt trội hơn so với các chủng AG6, HY23, KY471306, MHM3 và OM03, nhưng vẫn thấp hơn chủng VTX20 (75,5 g/L với sucrose 20%) (Bảng 3.14).

Phân tích thành phần monosaccharide của EPSDTA1 bằng phương pháp sắc ký HPLC, so sánh thời gian lưu của các đỉnh peak so với các mẫu monnosaccharide chuẩn cho thấy EPSDTA1 là heteropolysaccharide, gồm từ 3 đến 5 loại monosaccharide tùy từng môi trường nuôi cấy (Bảng 3.14, Phụ lục 18). Trong môi trường không bổ sung đường hoặc bổ sung glucose, các thành phần chính trong EPS bao gồm glucose, rhamnose và mannose nhưng tỉ lệ các thành phần monosaccharide lại khác nhau. Đặc biệt, mannose là monosaccharide chiếm ưu thế khi bổ sung glucose, và đạt tới 99,37% ở nồng độ 5% (Phụ lục 18), cho thấy khả năng định hướng cấu trúc EPS của glucose đối với chủng *B. velezensis* DTA1. Ở cùng nồng độ glucose 5% bổ sung vào môi trường nuôi cấy, chủng *B. velezensis* OM03 cũng cho EPS với thành phần manose chiếm ưu thế (63,52%), tuy vậy chỉ có 2 loại monosaccharide và năng suất chỉ đạt 0,594 g/L [55], kém xa so với ở chủng *B. velezensis* DTA1 đạt 23,29 g/L trong môi trường bổ sung 5% glucose.

Khi môi trường bổ sung thêm sucrose, cấu trúc EPS trở nên phức tạp hơn, với sự hiện diện thêm của fructose và N-acetylglucosamine. Đáng chú ý, N-acetyl glucosamine là thành phần chiếm tỷ lệ cao khi sucrose được bổ sung ở nồng độ thấp (1% sucrose), trong khi fructose chỉ xuất hiện rõ rệt khi bổ sung sucrose ở nồng độ cao (5%). Điều này cho thấy nguồn carbon không chỉ ảnh hưởng đến năng suất mà còn điều hướng con đường sinh tổng hợp EPS, tác động đến số lượng và tỷ lệ các monosaccharide tạo thành. Đây là điểm khác biệt so với các công bố khác về thành phần và tỉ lệ các monosaccharide ở EPS từ các chủng *B. velezensis* khi mà EPSDTA1 có từ 3–5 loại monosaccharide tùy thuộc vào nguồn đường (môi trường có sucrose cho EPS gồm 5 loại monosaccharide) trong khi ở các chủng khác đã công bố chỉ có 2–4 loại monosaccharide [50], [54], [55], [53], [51], [52]. Ở cùng điều kiện bổ sung 5% sucrose, chủng *B. velezensis* khác là MHM3 cho số loại monosaccharide cao nhất so với các chủng *B. velezensis* đã công bố cũng chỉ có 4 loại glucuronic acid, glucose, fructose và rhamnose (tỉ lệ 4,00 : 2,00 : 1,00 : 0,13) với sự xuất hiện của glucuronic acid chiếm ưu thế [52] và loại này không có ở

EPSDTA1. Sở dĩ khẳng định không có glucuronic acid ở EPSDTA1 bởi nghiên cứu đã thử nhiều loại monosaccharide chuẩn khác trong đó có glucuronic acid nhưng kết quả phân tích HPLC các mẫu thủy phân EPSDTA1 đều không xuất hiện peak trùng với chuẩn glucuronic acid.

Giải thích cho sự xuất hiện của fructose trong EPS khi bổ sung sucrose, phân tích WGS cho thấy chủng *B. velezensis* DTA1 sở hữu cả hệ gen tổng hợp HePS theo con đường phụ thuộc Wzx/Wzy và hệ gen tổng hợp levan (một dạng fructan gồm các monosaccharide fructose) thông qua enzyme levansucrase ở ngoại bào. Levan chỉ được hình thành trong điều kiện môi trường giàu sucrose [50], điều này phù hợp với kết quả thực nghiệm khi fructose chỉ được phát hiện rõ rệt ở mẫu EPS thu được từ môi trường chứa 50 g/L sucrose. Kết quả phân tích thành phần monosaccharide của EPS từ môi trường giàu sucrose ở 2 chủng *B. velezensis* là VTX20 [50] và MHM3 [52] cũng cho thấy sự xuất hiện của fructose, trong khi đó lại vắng mặt ở chủng AG6 [53]. Ở cùng nồng độ sucrose 5% bổ sung vào môi trường nuôi cấy, chủng *B. velezensis* DTA1 sản sinh EPS gồm 5 loại monosaccharide glucose: rhamnose: fructose: mannose: N-acetylglucosamine (rhamnose và N-acetylglucosamine chiếm đa số) trong khi đó chủng *B. velezensis* MHM3 lại vắng mặt mannose và N-acetylglucosamine nhưng xuất hiện thêm glucuronic acid chiếm đa số [52]. Đây là minh chứng cho thấy khi môi trường giàu sucrose có sự sản sinh EPS theo cả 2 con đường phụ thuộc Wzx/Wzy và phụ thuộc levansucrase ở chủng *B. velezensis* DTA1, trong khi môi trường không có sucrose không tạo levan. Điều này không xảy ra ở chủng *B. velezensis* VTX20 cũng phân lập ở Việt Nam, khi phân tích genome cho thấy có cả 2 cụm operon epsA-O và levan nhưng tạo eps chỉ gồm levan [50] (Hình 3.6). Đây là 1 điểm phát hiện mới của nghiên cứu. Qua đó cho thấy sự đa dạng của các loại EPS tạo ra từ các chủng *B. velezensis*. Một số nghiên cứu trước đó cũng đã khẳng định điều kiện môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng tới cấu trúc EPS như ở điều kiện stress hạn hán làm tăng thành phần monosaccharide so với điều kiện không chịu hạn hoặc làm thay đổi tỉ lệ các monosaccharide trong EPS ở các chủng *Bacillus* spp. [122].

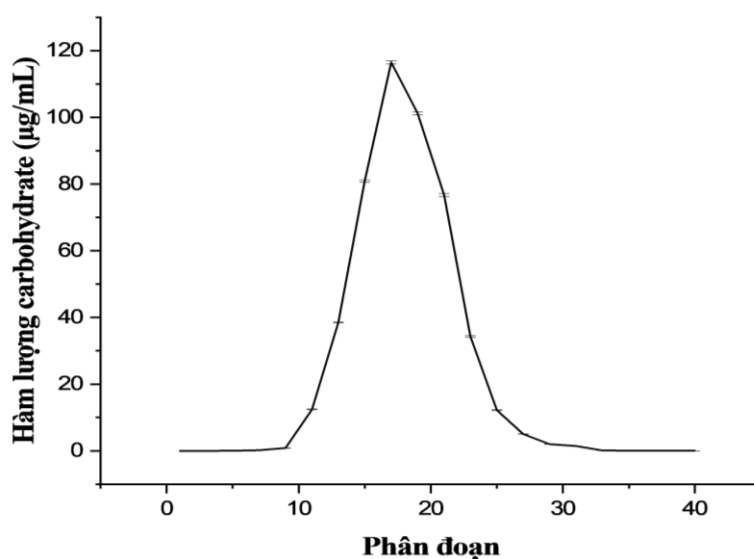
Qua quá trình nghiên cứu môi trường và điều kiện nuôi cấy thu EPS ở chủng *B. velezensis* DTA1 cho thấy chủng có tiềm năng cao trong tổng hợp EPS, đạt 32,80 g/L ở điều kiện tối ưu (TB bổ sung 7,26% sucrose, 3,27% NaCl, pH 8,46, 30 °C, 72 giờ). Chủng thể hiện khả năng thích nghi rộng với các điều kiện pH, nhiệt độ và muối, sinh trưởng và sinh EPS tốt đặc biệt trong môi trường mặn–kiềm, phù hợp với đất san hô mặn kiềm ngoài đảo. Nguồn đường có ảnh hưởng rõ rệt đến năng suất cũng như thành phần monosaccharide trong các loại EPS do chủng *Bacillus velezensis* DTA1 sinh tổng hợp ra. Trong đó, sucrose ở nồng độ 5% không chỉ giúp tăng năng suất EPS mà còn làm

xuất hiện các monosaccharide đặc trưng như fructose và N-acetylglucosamine tạo HePS gồm 5 loại monosaccharide (thường chỉ gồm 2–4 loại). Qua đó góp phần chứng minh sự tổng hợp đồng thời EPS theo cả 2 con đường phụ thuộc Wzx/Wzy và phụ thuộc levansucrase ở *B. velezensis* DTA1 khi môi trường giàu sucrose. Đây là điểm mới so với các công bố khác về EPS ở *B. velezensis*. Ngược lại, khi sử dụng glucose dẫn đến EPS giàu mannose. Kết quả này vừa mở rộng hiểu biết về cơ chế sinh EPS ở *B. velezensis*, vừa khẳng định khả năng kiểm soát có định hướng cấu trúc và tính chất EPS thông qua lựa chọn nguồn đường – cơ sở cho thiết kế chế phẩm sinh học phù hợp với các mục tiêu ứng dụng khác nhau.

3.4. Tinh sạch và xác định cấu trúc exopolysaccharide từ chủng *Bacillus velezensis* DTA1

3.4.1. Tinh sạch exopolysaccharide

Polysaccharide là thành phần phức tạp, có chức năng quan trọng và được nghiên cứu nhiều nhất trong các đại phân tử ngoại bào nói chung. Do đó, để phục vụ cho việc phân tích sâu về cấu trúc của EPS từ chủng *Bacillus velezensis* DTA1, mẫu EPSDTA1 được tinh sạch từ dịch nuôi cấy chủng trong điều kiện tối ưu qua các bước xử lý loại bỏ protein, loại tế bào, loại muối và đường đơn, tinh sạch bằng sắc ký lọc gel qua cột Sephadex G-75.



Hình 3.20. Hàm lượng carbohydrate trong các phân đoạn tinh sạch EPS qua cột Sephadex G75

Trong nghiên cứu này, mục tiêu chính của quá trình tinh sạch là thu được EPSDTA1 có độ tinh khiết phù hợp để phân tích cấu trúc bằng các phương pháp phổ. Do đó, thay vì tập trung tối ưu hiệu suất thu hồi, nghiên cứu hướng đến chất lượng EPS sau tinh sạch. Cách tiếp cận này tương đồng với nhiều nghiên cứu trước đó, trong đó các tác giả chỉ thực hiện các bước cơ bản như loại bỏ tế bào, rửa protein, kết tủa EPS bằng dung môi, thẩm tích để loại muối và đường đơn, đông khô và định lượng EPS bằng

phương pháp phenol–sulfuric acid, cuối cùng sử dụng trực tiếp sản phẩm EPS này cho các phân tích cấu trúc [165], [115]. Một số trường hợp thậm chí không sử dụng bước tinh sạch qua cột tinh sạch [52] mà sử dụng luôn EPS tách chiết được để phân tích khối lượng và cấu trúc EPS.

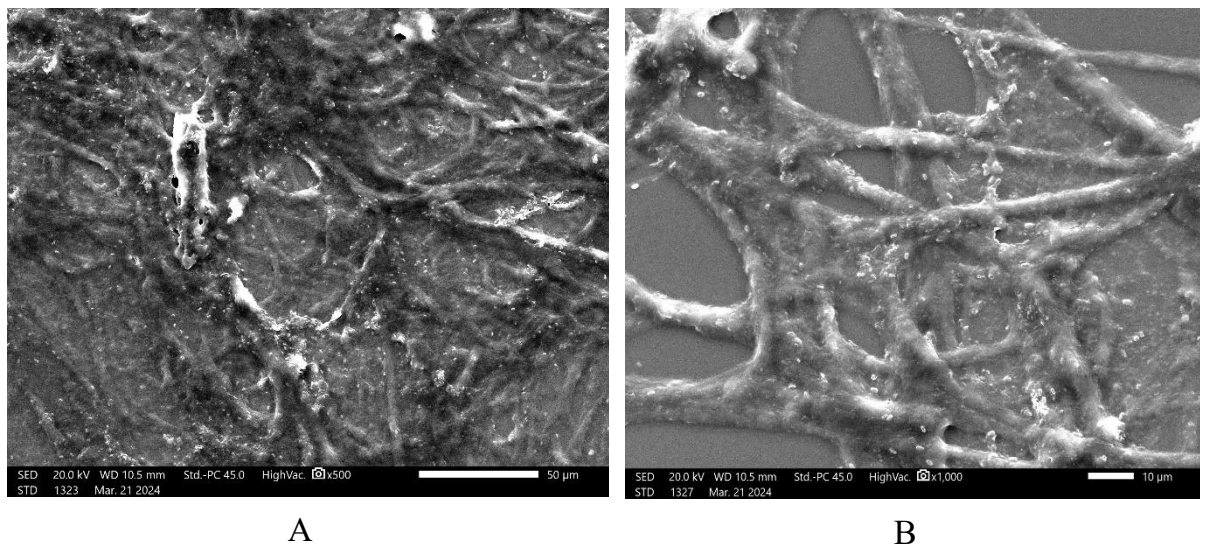
Kết quả trên Hình 3.20 cho thấy các phân đoạn xuất hiện carbohydrate chủ yếu ở khoảng từ 9–29, thu được hàm lượng carbohydrate cao nhất ở phân đoạn 17 (116,53 $\mu\text{g/mL}$). Các phân đoạn chứa EPS cao (từ 9–29) được dồn lại để đông khô và cân lượng EPS tinh sạch được khoảng 2,05 mg EPS. Hiệu suất tinh sạch EPS của *B. velezensis* DTA1 là 51,25%, cao hơn công bố ở chủng *Bacillus sp.* H5 đạt 40,50% [166]. EPS sau tinh sạch được kiểm tra hàm lượng carbohydrate và protein tổng số (thể hiện trên Bảng 3.15).

Kết quả trên Bảng 3.15 cho thấy EPS tinh sạch được có độ sạch 97,07%, độ sạch cao hơn so với EPS tinh sạch được ở chủng *Lactobacillus plantarum* WLPL04 với độ sạch 96,48% [167]. Do đó sản phẩm đảm bảo để xác định cấu trúc và khối lượng phân tử.

Bảng 3.15. Hàm lượng carbohydrate và protein tổng số trong EPSDTA1 tinh sạch

Chỉ tiêu	Khối lượng (mg)	Hàm lượng (%)
EPSDTA1	$2,05 \pm 0,01$	100
Carbohydrate	$1,99 \pm 0,01$	97,07
Protein	$0,02 \pm 0,00$	0,90

3.4.2. Kết quả chụp SEM cấu trúc bề mặt exopolysaccharide

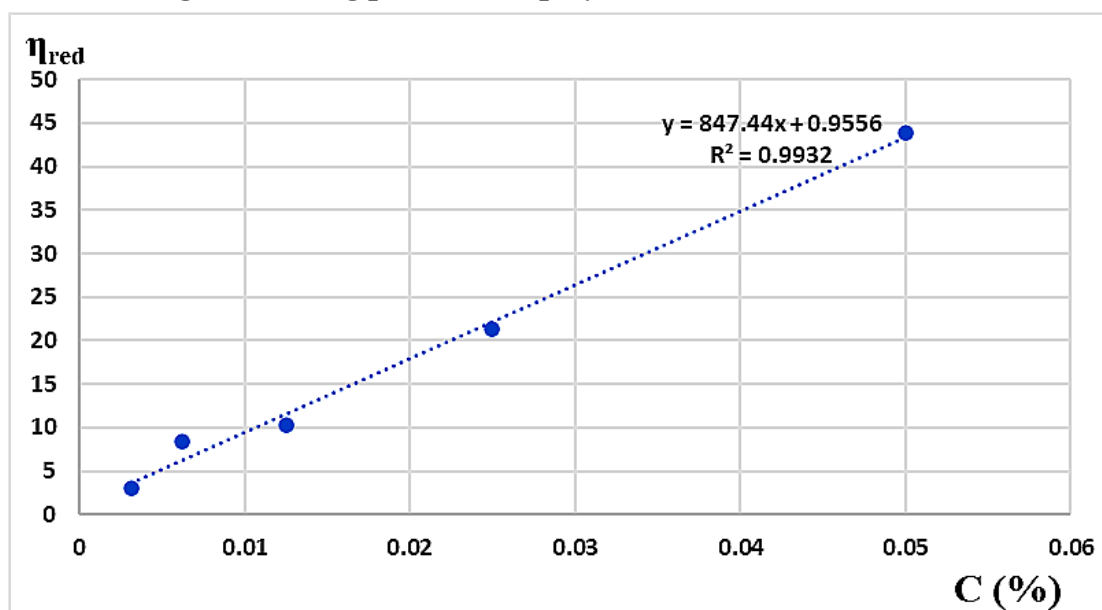


Hình 3.21. Hình ảnh chụp SEM ở độ phóng đại $\times 500$ (A) và $\times 1000$ (B) của mẫu EPSDTA1 tinh sạch

Hình ảnh SEM của mẫu EPSDTA1 tinh sạch tại độ phóng đại $\times 500$ và $\times 1000$ (Hình 3.21) cho thấy cấu trúc đặc trưng với những sợi dài, đan xen lẫn nhau và liên kết thành

mạng lưới không gian dày đặc. Kiểu cấu trúc này là điển hình của các polymer sinh học có trọng lượng phân tử cao, phản ánh tính chất keo dính và ổn định của vật liệu. Cấu trúc mạng lưới chặt chẽ đóng vai trò quan trọng trong việc tạo độ nhớt cao và khả năng giữ nước của EPS, do các sợi polymer tạo nên nhiều khoảng trống vì mô có khả năng giữ lại phân tử nước thông qua liên kết hydro, lực thẩm thấu, mao dẫn và lực hút bề mặt dẫn tới sự trương nở của ma trận và tăng dần khoảng cách giữa các sợi polymer sinh học [168]. Những đặc tính hình thái này củng cố thêm bằng chứng cho tiềm năng ứng dụng EPSDTA1 trong việc cải thiện khả năng giữ nước và kết tụ đất trong môi trường khô hạn hoặc nhiễm mặn.

3.4.3. Ước lượng khối lượng phân tử exopolysaccharide

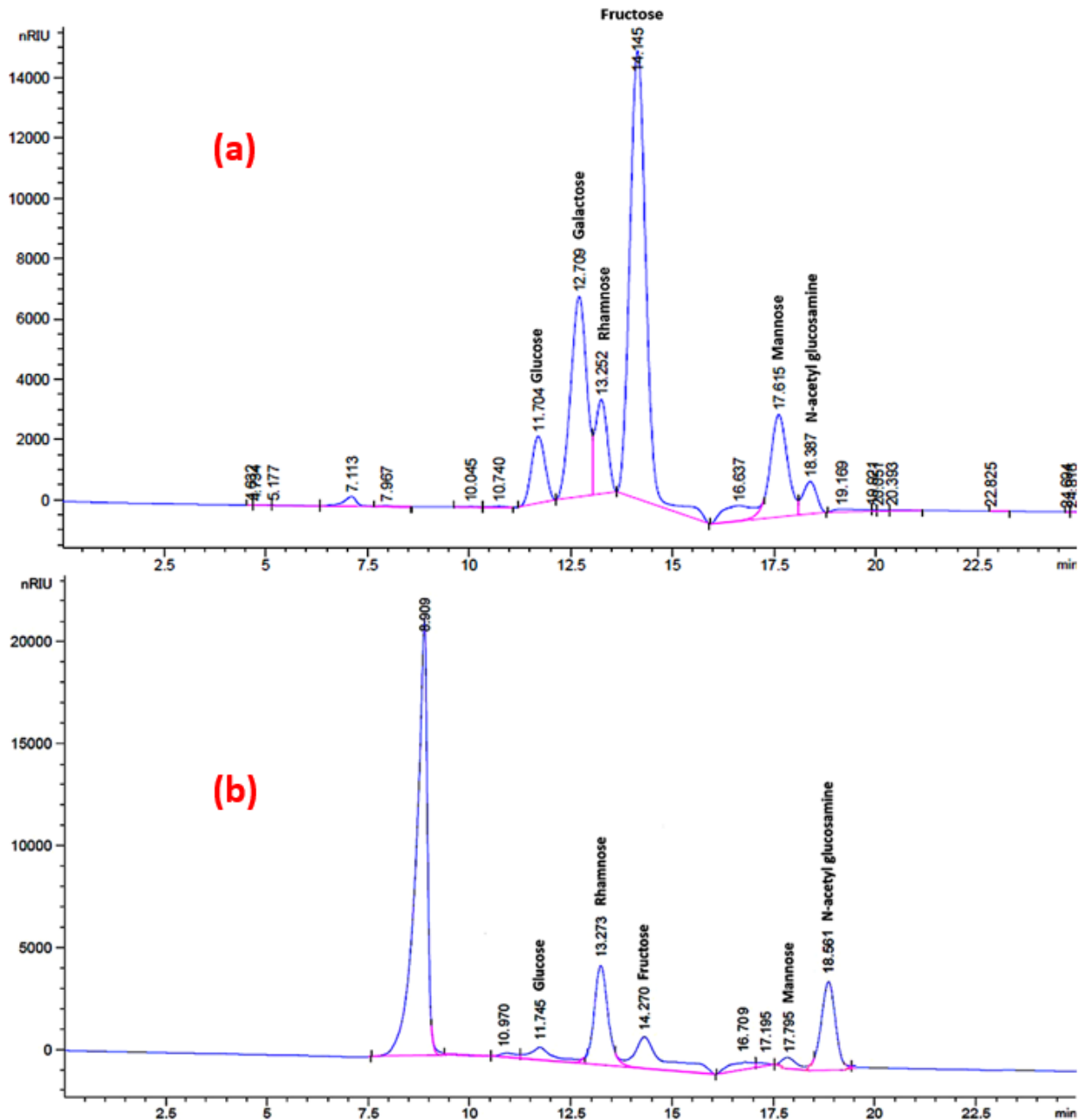


Hình 3.22. Sự phụ thuộc của độ nhớt rút gọn η_{red} vào nồng độ EPS trong dung dịch NaNO_3 0,1 M, ở 25 °C

Trọng lượng phân tử EPS được ước tính dựa trên độ nhớt nội tại. Dựa trên đồ thị trong Hình 3.22, độ nhớt nội tại $[\eta]$ được xác định là 0,9556 dL/g, kết hợp với công thức Mark–Houwink: $[\eta] = KM^\alpha$, trong đó $\alpha=0,687$, $K=2,259 \times 10^{-4}$ [118], từ đây khối lượng phân tử của EPS được xác định là $1,9 \times 10^5$ Da. So với các công bố trước đây về khối lượng phân tử của EPS từ các chủng *B. velezensis*, kết quả này cao hơn ở EPSKY471306 đạt $1,14 \times 10^5$ Da [54]; EPSF6 đạt $2,7 \times 10^4$ Da [53] và MHM3 đạt $1,145 \times 10^4$ Da [52] tuy vậy thấp hơn khối lượng của EPS-SN-1 đạt $2,21 \times 10^5$ Da [169]. Độ nhớt nội tại của EPSDTA1 là 0,9556 dL/g, cao hơn so với ở *Virgibacillus salarius* BM02 đạt 0,12–0,54 dL/g [170] tuy vậy thấp hơn ở *Bacillus megaterium* với 5,2 dL/g [171]. Tuy nhiên, độ nhớt nội tại cũng bị ảnh hưởng rất nhiều bởi các điều kiện môi trường và nuôi cấy [170]. Độ nhớt nội tại cao thường phản ánh sự tồn tại của các chuỗi polysaccharide dài và phức tạp, từ đó góp phần tạo nên độ bền cơ học cao và tăng cường khả năng giữ nước – các

đặc tính có ý nghĩa quan trọng đối với tiềm năng ứng dụng của EPS trong cải tạo đất khô hạn và mặn.

3.4.4. Thành phần monosaccharide của exopolysaccharide



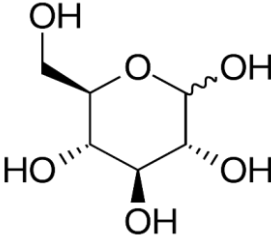
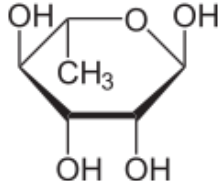
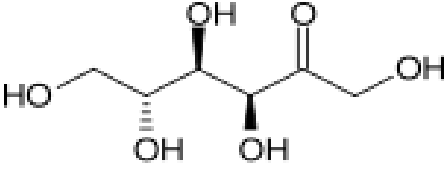
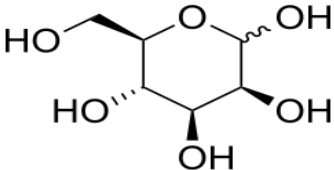
Hình 3.23. Kết quả phân tích HPLC của các mẫu monnosaccharide chuẩn (a) và mẫu thủy phân EPS của chủng *Bacillus velezensis* DTA1 từ điều kiện nuôi cấy tối ưu

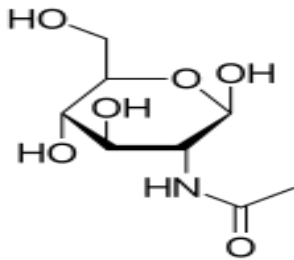
Kết quả phân tích HPLC sản phẩm thủy phân EPSDTA1 tinh sạch từ dịch nuôi cấy trong điều kiện tối ưu trên Hình 3.23 và Phụ lục 18.7 cho thấy sự hiện diện của 5 loại monosaccharide: glucose : rhamnose : fructose : mannose : N-acetylglucosamine (tỉ lệ: 2,59 : 12,75 : 8,49 : 1,00 : 12,18, tỉ lệ này dựa trên diện tích peak từ kết quả HPLC ở Phụ lục 18.7). Các thành phần và tỉ lệ của các loại monosaccharide ở EPS từ dịch nuôi cấy trong điều kiện tối ưu gần giống (chỉ lệch chút về tỉ lệ các monosaccharide) với kết

quả phân tích HPLC mẫu EPS thủy phân từ môi trường tương tự chỉ khác hàm lượng sucrose là 5% (ở Bảng 3.14). Kết quả góp phần khẳng định thêm sự đa dạng của các thành phần monosaccharide trong EPSDTA1 khi môi trường nuôi cấy bổ sung thêm hàm lượng sucrose cao so với ở các chủng *B. velezensis* khác như đã phân tích ở mục 3.3.3.

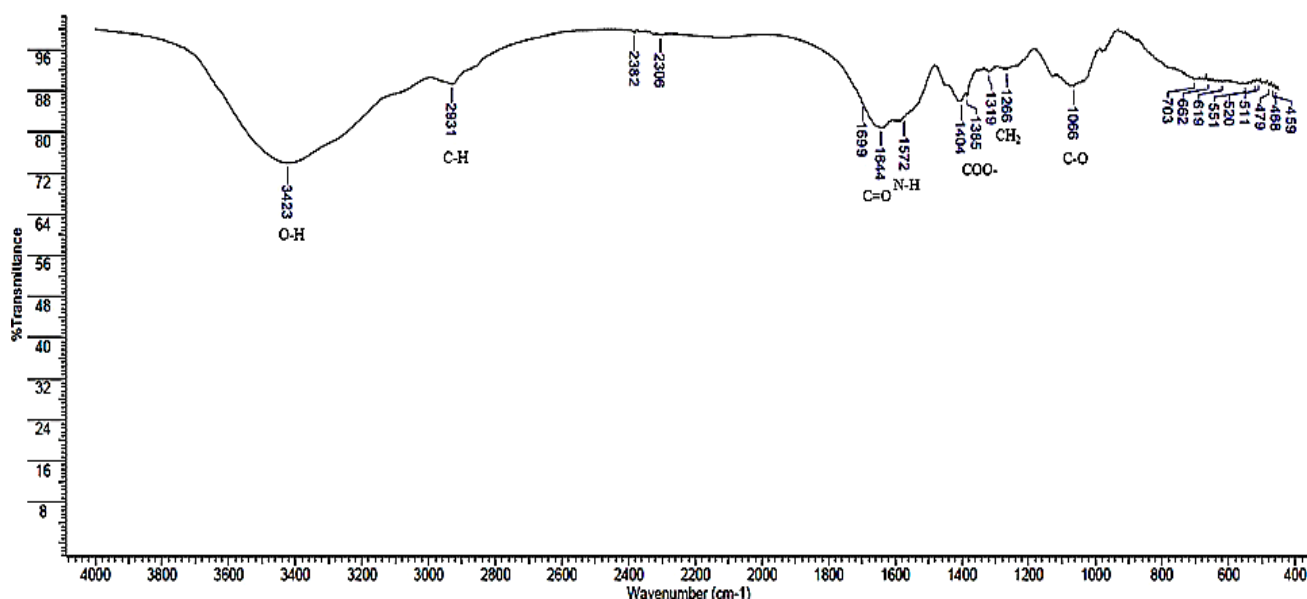
Trong cấu trúc các monnosaccharide của EPSDTA1 từ điều kiện nuôi cấy tối ưu có chứa nhiều các nhóm chức như hydroxyl (rất phong phú, có ở tất cả các monnosaccharide và gồm 4–5 nhóm/monnosaccharide), carbonyl (ở fructose, N-acetylglucosamine) và amide (ở N-acetylglucosamine) (Bảng 3.16), đây là các nhóm chức đã được công bố với đặc tính ưa nước và có khả năng hấp phụ cation [135], [77], [139]. Vì vậy, sự hiện diện của các monosaccharide như glucose, rhamnose, fructose, mannose và N-acetylglucosamine trong cấu trúc EPS-DTA1 có thể liên quan chặt chẽ đến vai trò sinh lý của chúng trong khả năng giữ nước, giảm mặn và hấp phụ ion kim loại - những đặc tính quan trọng giúp *B. velezensis* DTA1 thích nghi và tồn tại trong điều kiện đất mặn, khô hạn đặc trưng của cát san hô Trường Sa.

Bảng 3.16. Cấu trúc hóa học của các thành phần monnosaccharide trong EPSDTA1 từ điều kiện nuôi cấy tối ưu

STT	Thành phần monnosaccharide	Công thức hóa học
1	Glucose	
2	Rhamnose	
3	Fructose	
4	Mannose	

5	N-acetylglucosamine	
---	---------------------	--

3.4.5. Kết quả phân tích các nhóm chức qua phổ FT-IR



Hình 3.24. Phổ FTIR với các nhóm chức năng chính của EPSDTA1 tinh sạch

Phổ FT-IR của EPSDTA1 đo trong vùng 4000–450 cm^{-1} (Hình 3.24) cho thấy nhiều tín hiệu đặc trưng của polysaccharide. Đỉnh rộng tại 3423 cm^{-1} là dao động kéo giãn của nhóm hydroxyl (–OH), đặc trưng cho các polysaccharide có nhiều đơn vị đường liên kết glycosidic [172]. Nhóm –OH này đóng vai trò quan trọng trong khả năng giữ nước và tương tác với ion kim loại nhờ khả năng hình thành liên kết hydro và phối trí bề mặt [173].

Tín hiệu ở 2931 cm^{-1} phản ánh dao động kéo giãn của liên kết C–H trong các nhóm methylene (–CH₂) hoặc methyl (–CH₃), đặc trưng cho mạch khung carbonhydrat [174]. Hai đỉnh hấp thụ rõ tại 1644 và 1572 cm^{-1} thể hiện dao động của nhóm C=O và N–H, gợi ý sự hiện diện của nhóm uronic acid hoặc liên kết amide – yếu tố giúp tăng khả năng hấp phụ ion kim loại [169], [55].

Đỉnh tại 1404 và 1385 cm^{-1} xác nhận có mặt nhóm carboxyl (COO[–]), đồng thời củng cố giả thiết về sự tồn tại của uronic acid trong cấu trúc EPS [54]. Dải 1319 cm^{-1} đặc trưng cho nhóm methylene (–CH₂) [119]. Đặc biệt, đỉnh hấp thụ tại 1066 cm^{-1} đặc trưng cho dao động kéo giãn của liên kết C–O trong nhóm glycosidic, là dấu hiệu rõ ràng cho thấy bản chất polysaccharide của hợp chất [175]. Vùng phổ 1200–1000 cm^{-1} , bao gồm cả đỉnh 1066 cm^{-1} , còn được gọi là vùng “dấu vân tay” của polysaccharide và

phản ánh các liên kết C–O–C trong vòng pyranose, cho thấy sự tồn tại của các liên kết β -1,4-glucosidic và β -1,4-mannosidic trong glucomannan (một polysaccharide tan trong nước có khả năng giữ nước và ion) [176].

So sánh với phổ FT-IR của EPS từ các chủng vi khuẩn *Bacillus velezensis* khác, phổ của chủng *B. velezensis* DTA1 thể hiện các đặc điểm tương đồng với các đỉnh đặc trưng như: O–H tại khoảng 3387–3429 cm^{-1} , C–H tại khoảng 2928 cm^{-1} , C=O tại khoảng 1640 cm^{-1} , carboxyl tại 1447–1380 cm^{-1} và vùng đặc trưng 1200–950 cm^{-1} [54], [169].

Kết quả phổ FT-IR cho thấy sự tương đồng với phân tích thành phần monosaccharide ở mục 3.4.4, đồng thời củng cố bằng chứng về sự hiện diện phong phú của các nhóm hydroxyl. Ngoài ra, các nhóm chức khác như carbonyl và amide cũng được ghi nhận trong cấu trúc EPS-DTA1. Đáng chú ý, phổ FT-IR còn gợi ý sự xuất hiện của uronic acid thông qua tín hiệu đặc trưng của nhóm carboxyl. Nhóm chức này có tính ưa nước và có khả năng tạo liên kết ion với các cation, qua đó góp phần quan trọng vào hoạt tính sinh học cũng như tiềm năng ứng dụng của EPS [139]. Đặc biệt nhóm carboxyl chỉ có ở các uronic acid như glucuronic acid, mannuronic acid, galacturonic acid.... Trong nghiên cứu này, có thể do bộ monosaccharide chuẩn chưa bao phủ đầy đủ các loại uronic acid nên chúng chưa được phát hiện bằng phương pháp HPLC.

Trong luận án này, NMR hoặc X-ray không được đưa vào do cấu trúc EPSDTA1 dạng HePS gồm 5 loại monosaccharide rất phức tạp và khối lượng phân tử lớn ($1,9 \times 10^5$ Da), vốn làm hạn chế hiệu quả các phương pháp này. Hơn nữa, nhiều công bố trước đây về EPS từ *Bacillus* spp. có kích thước phân tử nhỏ hơn, gồm ít loại monosaccharide hơn cũng không đưa ra kết quả phân tích sâu bằng ^{13}C -NMR hay X-ray [52], [54], [53], [165]. Thay vào đó, việc kết hợp SEM, HPLC và FT-IR đã cung cấp bằng chứng cho thấy tiềm năng giữ nước, giảm mặn của EPSDTA1.

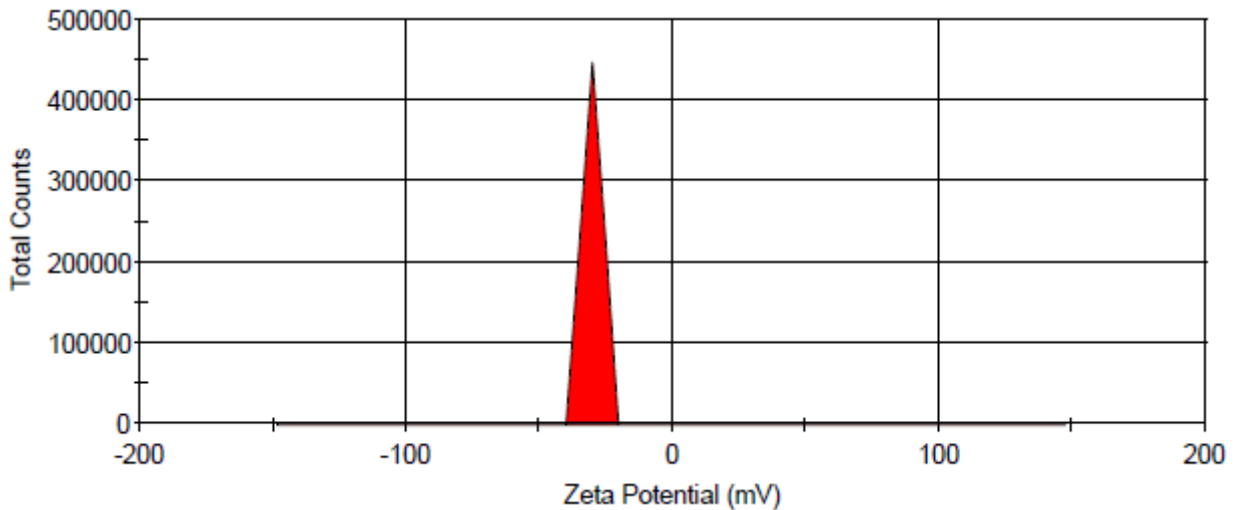
Như vậy qua quá trình tinh sạch đã thu được EPSDTA1 có độ sạch cao (97,07%), có cấu trúc dạng mạng lưới, có kích thước phân tử lớn ($1,9 \times 10^5$ Da), cấu trúc EPS gồm ít nhất 5 loại monosaccharide (glucose, rhamnose, fructose, mannose, N-acetylglucosamine) và có thể có thêm thành phần uronic acid, có chứa nhiều nhóm hydroxyl, carbonyl, amide và carboxyl. Các nhóm chức này tạo nên mạng lưới polymer đan xen, góp phần tạo đặc tính giữ nước, giảm mặn và hấp phụ ion kim loại nặng cho EPS, làm EPS vừa có khả năng hấp thụ nước vào phía trong mạng lưới cao phân tử của nó, lại vừa có khả năng hấp phụ nước ở bề mặt nhờ các nhóm chức ưa nước. Qua đây cho thấy được tiềm năng ứng dụng của EPSDTA1 trong cải tạo đất khô hạn mặn và xử lý ô nhiễm kim loại.

3.5. Đánh giá khả năng giữ nước và giảm mặn của EPSDTA1

3.5.1. Đánh giá khả năng hấp phụ muối, kim loại của EPSDTA1

3.5.1.1. Thế zeta của EPSDTA1

EPS tách chiết từ chủng *B. velezensis* DTA1 trong điều kiện nuôi cấy tối ưu cho thấy giá trị thế zeta âm cao, đạt -30 mV (Hình 3.25). Giá trị này phản ánh đặc tính tích điện âm mạnh mẽ trên bề mặt phân tử EPS. Thế zeta âm cao cho thấy khả năng hấp phụ cation mạnh thông qua tương tác tĩnh điện, đặc biệt là các ion kim loại trong môi trường. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đó, trong đó thế zeta của EPS từ các vi khuẩn khác cũng cho thấy xu hướng tích điện âm: -3,44 mV ở chủng *Enterococcus* sp. F2 [75]; *Paenibacillus tarimensis* REG 0201M đạt -35,2 mV [157]; và -33,83 mV ở EPS từ chủng *B. velezensis* P1 [177]. Điều này cho thấy EPSDTA1 có khả năng tạo tương tác ion hóa cao, là một đặc điểm có lợi cho các ứng dụng như hấp phụ kim loại nặng, giữ nước trong đất và cải thiện đặc tính lý hóa đất trong các hệ sinh thái khắc nghiệt.



Hình 3.25. Thế zeta của EPSDTA1 tách chiết từ điều kiện nuôi cấy tối ưu

3.5.1.2. Đặc tính EPSDTA1 dưới điều kiện stress

Chủng *B. velezensis* DTA1 được nuôi cấy trong điều kiện tương tự điều kiện tối ưu, ngoại trừ sự thay đổi về mức độ stress muối và kim loại nặng, nhằm đánh giá ảnh hưởng của các yếu tố này đến sinh trưởng, hiệu suất tổng hợp EPS cũng như đặc điểm cấu trúc hóa học của EPS. Kết quả được trình bày tại Bảng 3.17, Hình 3.26 và 3.27.

Khi nuôi cấy trong môi trường không chứa NaCl (điều kiện không stress), chủng *B. velezensis* DTA1 cho giá trị OD600 cao nhất ($22,93 \pm 0,35$), phản ánh khả năng sinh trưởng mạnh. Tuy nhiên, trong điều kiện có bổ sung NaCl 3% hoặc kết hợp với kim loại nặng, mặc dù mật độ tế bào giảm (OD600 giảm còn 16,89–20,61), năng suất EPS lại tăng đáng kể ($p < 0,05$). Cụ thể, năng suất EPS trong môi trường có 3% NaCl đạt $30,78 \pm 0,38$ g/L, cao hơn 1,6 lần so với điều kiện không stress ($19,27 \pm 0,26$ g/L) (Bảng 3.17).

Đồng thời, hàm lượng carbohydrate và protein tổng số trong EPS cũng tăng đáng kể dưới điều kiện stress. Cụ thể, carbohydrate đạt $40,81 \pm 0,56\%$, và protein lên đến $25,90 \pm 0,88\%$ trong môi trường 3% NaCl – cao hơn gấp đôi so với các giá trị tương ứng ở điều kiện không stress (Bảng 3.17). Các sự khác biệt đều có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$; Phụ lục 19).

Việc gia tăng sinh tổng hợp EPS trong điều kiện stress muối và kim loại được cho là chiến lược bảo vệ sinh học của vi khuẩn. EPS đóng vai trò then chốt trong việc hình thành biofilm, tạo môi trường vi mô giúp vi khuẩn chống lại các điều kiện bất lợi như áp suất thẩm thấu cao, độc tính ion kim loại, đồng thời hấp phụ muối và duy trì cân bằng nội bào [71], [72].

Bảng 3.17. Ảnh hưởng của điều kiện stress muối và/hoặc kim loại nặng đến sự phát triển và sinh tổng hợp EPS của chủng *B. velezensis* DTA1

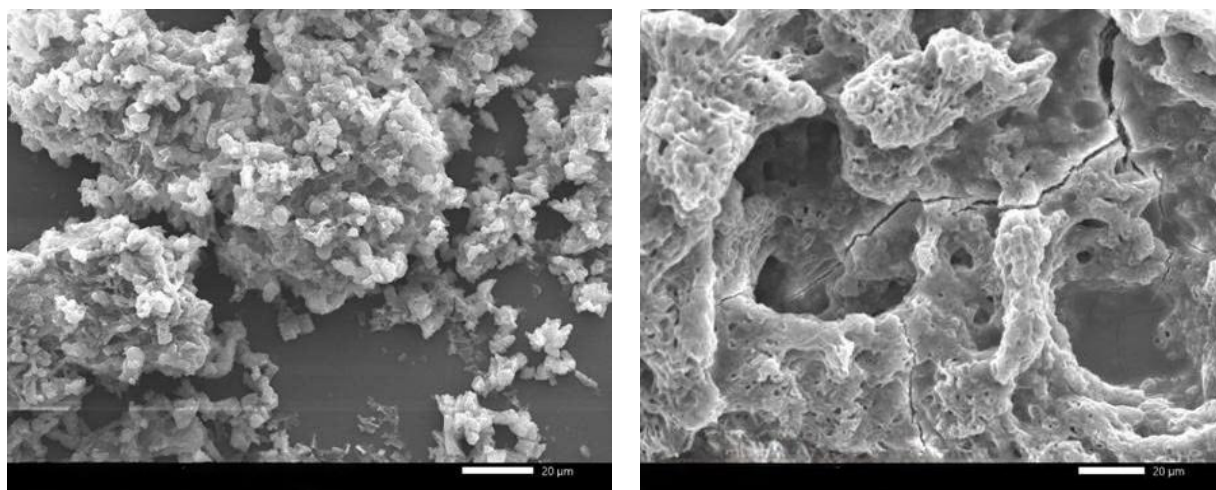
Điều kiện	Môi trường TB, pH 8,46 , sucrose 7,26 %	OD600	Năng suất EPS (g/L)	Hàm lượng carbohydrate (% trong EPS)	Hàm lượng protein (% trong EPS)
i	Đối chứng	$22,93 \pm 0,35^a$	$19,27 \pm 0,26^c$	$19,34 \pm 0,46^c$	$12,06 \pm 0,33^c$
ii	Thêm 3% NaCl	$20,61 \pm 0,26^b$	$30,78 \pm 0,38^a$	$40,81 \pm 0,56^a$	$25,90 \pm 0,88^b$
iii	Thêm 1% NaCl, 1 $\mu\text{g/mL}$ $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$, 1 $\mu\text{g/mL}$ $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$	$18,27 \pm 0,34^c$	$29,33 \pm 0,39^b$	$37,83 \pm 0,52^b$	$26,58 \pm 0,54^b$
iv	Thêm 1% NaCl và các muối FeSO_4 , CuSO_4 , Ag_2SO_4 , ZnCl_2 , MgCl_2 , MnSO_4 đều ở mức 1 $\mu\text{g/mL}$	$16,89 \pm 0,39^d$	$28,73 \pm 0,41^b$	$41,29 \pm 0,52^a$	$28,26 \pm 0,55^a$

Các giá trị được trình bày dưới dạng trung bình $\pm$ SD; $n = 3$. Các chữ cái khác nhau ^{a, b, c, d} ở mỗi cột chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$, Phụ lục 19.

Hình ảnh bề mặt và thành phần nguyên tố của EPSDTA1 dưới điều kiện stress mặn

Hình ảnh SEM (Hình 3.26) cho thấy sự khác biệt rõ rệt về hình thái vi mô của EPS thu được trong hai điều kiện: không có và có 3% NaCl. Ở điều kiện không stress (Hình 3.26A), EPS gồm các hạt đường kính 1–5 μm , với mức độ kết dính giữa các hạt thấp. Trong khi đó, EPS thu được từ môi trường có bổ sung 3%

NaCl (Hình 3.26B) thể hiện cấu trúc liên kết chặt chẽ hơn, các hạt được bao phủ bởi lớp vật liệu keo kết dính, phủ gần như kín ranh giới giữa các hạt. Kết quả này tương đồng với công bố trước đó ở EPSTSD5 [135]. Hiện tượng này có thể được lý giải bởi sự gia tăng đáng kể của hàm lượng polysaccharide và protein trong EPS dưới điều kiện stress, làm tăng tính nhớt và khả năng tạo mạng gel ba chiều, góp phần hình thành biofilm bền vững hơn [72].



A

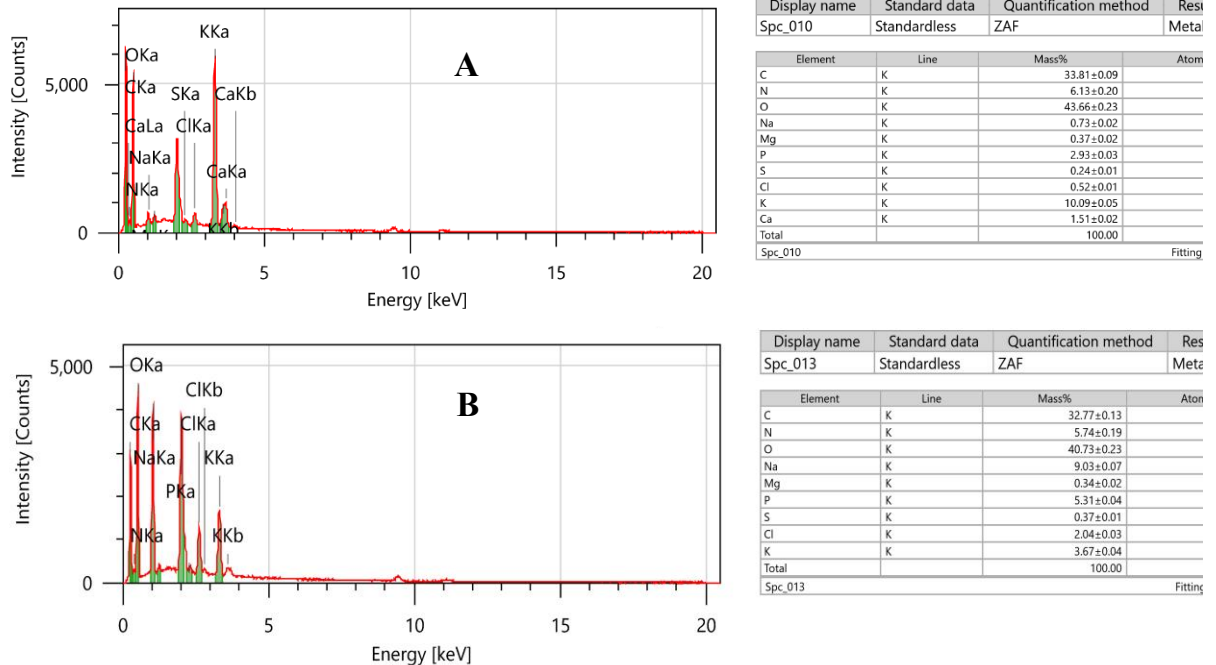
B

Hình 3.26. Hình ảnh chụp SEM mẫu EPSDTA1 tách chiết từ điều kiện nuôi cấy (i)-không có NaCl (A) và (ii)-có bổ sung 3% NaCl (B) ở độ phóng đại 700×

Nhìn chung ở cả 4 điều kiện i-iv (Hình 3.26 và Hình 3.27), phổ EDS của EPS cho thấy các nguyên tố chủ đạo gồm C và O, chiếm tỷ lệ cao nhất, phản ánh bản chất polysaccharide – protein của EPS. Ngoài ra, sự xuất hiện rõ rệt của nguyên tố lưu huỳnh (S) và photpho (P) trong cả 4 mẫu EPS từ các môi trường i-iv là bằng chứng cho thấy sự hiện diện của các nhóm chức năng anion như sulfonat và phosphat, vốn có vai trò chính trong việc liên kết với cation kim loại [120]. Đặc biệt, lưu huỳnh thường được ghi nhận trong EPS của các vi khuẩn biển, phản ánh nguồn gốc môi trường thích nghi đặc thù của chủng *B. velezensis* DTA1 [120].

Kết quả phân tích phổ EDS (Hình 3.27) cho thấy EPS thu được từ môi trường (i)-không chứa NaCl (Hình 3.27A) gồm 10 nguyên tố: C, N, O, Mg, Na, P, S, Cl, K và Ca; trong đó C và O chiếm tỷ lệ cao nhất. Tuy nhiên, ở mẫu EPS từ môi trường (ii)-có 3% NaCl (Hình 3.27B), chỉ phát hiện được 9 nguyên tố, thiếu Ca, trong khi tỷ lệ Na và Cl tăng mạnh. Cụ thể, hàm lượng Na tăng từ 0,73% lên 9,03%, và Cl tăng từ 0,52% lên 2,04% khi EPS được tạo ra trong môi trường stress mặn. Điều này chứng tỏ rằng EPS có khả năng hấp phụ ion Na^+ và Cl^- từ môi trường, đặc biệt là Na^+ , thông qua tương tác với các nhóm chức mang điện tích âm (hydroxyl, carboxyl, carbonyl, amide, và phosphonate) trên cấu trúc polymer. Khả năng hấp phụ ion này không chỉ góp phần vào việc giảm nồng độ

muối hòa tan trong môi trường, mà còn lý giải cho kết quả giảm độ mặn trong đất khi ứng dụng EPS hoặc chủng *B. velezensis* DTA1, sẽ được thể hiện rõ ở các thí nghiệm cải tạo đất mặn ở phần sau.



Hình 3.27. Kết quả phân tích phổ EDS để xác định thành phần nguyên tố của EPSDTA1 tách từ môi trường (i)-không có NaCl (A) và (ii)-có bổ sung 3% NaCl (B)

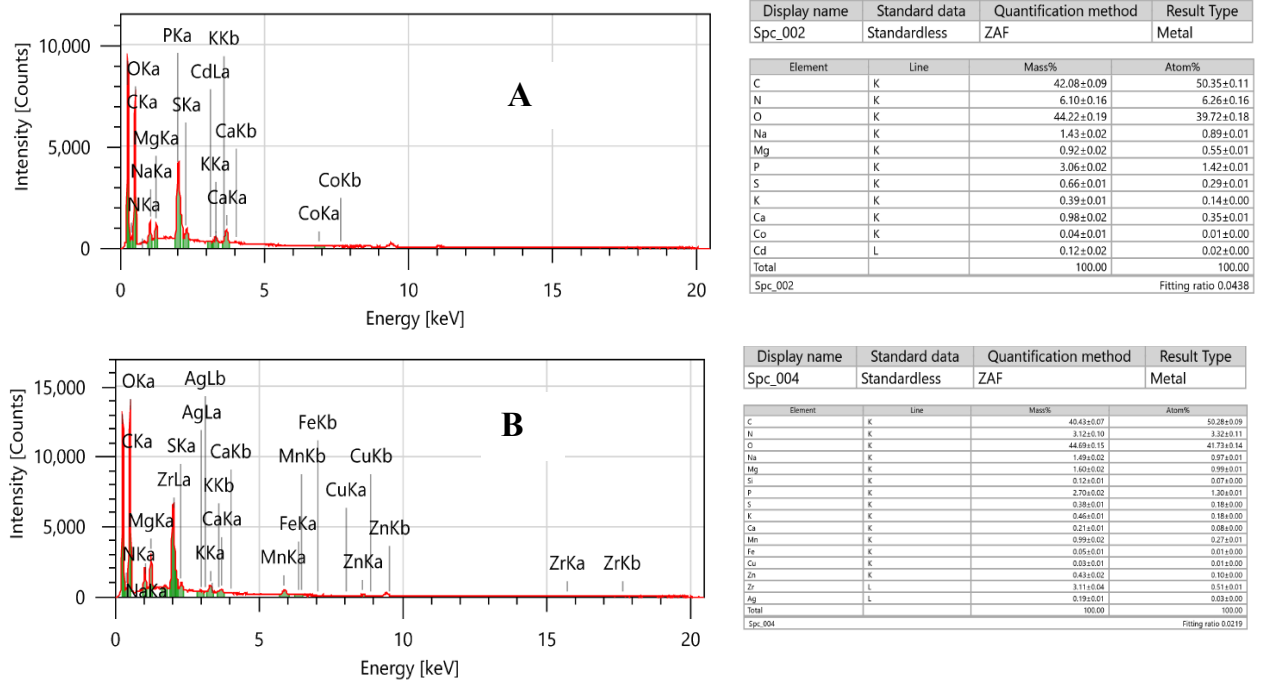
Kết quả cho thấy, mặc dù điều kiện stress muối làm giảm mật độ tế bào, nhưng lại kích thích mạnh mẽ quá trình sinh tổng hợp EPS ở chủng *B. velezensis* DTA1. EPS thu được không chỉ có hàm lượng polysaccharide và protein cao mà còn có khả năng hấp phụ ion Na^+ và Cl^- tốt, góp phần vào quá trình giảm mặn và tăng cường kết dính vật liệu trong đất. Điều này khẳng định tiềm năng ứng dụng thực tiễn của EPSDTA1 trong cải tạo đất nhiễm mặn và phát triển nông nghiệp bền vững tại các vùng ven biển và đảo xa bờ.

Thành phần nguyên tố của EPSDTA1 dưới điều kiện stress mặn và kim loại nặng

Thành phần nguyên tố của EPS được tách chiết từ dịch nuôi cấy chủng *Bacillus velezensis* DTA1 trong 2 điều kiện stress muối và kim loại nặng khác nhau đã được phân tích bằng phương pháp phổ tán xạ năng lượng EDS. Kết quả phân tích thể hiện trên Hình 3.28.

So với kết quả ở môi trường (i) và (ii), ở môi trường (iii) và (iv) ghi nhận sự tăng số lượng các nguyên tố lên tương ứng 11 và 16 nguyên tố. Đáng chú ý các kim loại bổ sung vào môi trường đều cho hàm lượng nguyên tố tăng ở EPS: cụ thể ở EPS từ môi trường (iii) với sự tăng thêm 2 nguyên tố Co và Cd và hàm lượng Na tăng so với đối

chứng (i); ở EPS từ môi trường (iv) có sự xuất hiện thêm của cả 5 kim loại Mn, Fe, Cu, Ag, Zn và sự gia tăng hàm lượng Na và Mg so với đối chứng (i) (Hình 3.28A, B; Hình 3.27 A). Kết quả chứng tỏ khả năng hấp phụ mạnh các cation của EPSDTA1. Cơ chế này được lý giải một phần bởi giá trị zeta âm cao (-30 mV) của EPS, phản ánh bản chất giàu điện tích âm trên bề mặt polymer – một yếu tố thuận lợi cho tương tác tĩnh điện với các ion kim loại mang điện tích dương [157].



Hình 3.28. Kết quả phân tích phổ EDS của EPSDTA1 từ môi trường (iii) (A) và môi trường (iv) (B)

Bên cạnh đó, EPSDTA1 còn chứa nhiều nhóm chức như amide, thiol, carboxyl, hydroxyl, phosphoric là các vị trí liên kết phổ biến với kim loại nặng thông qua quá trình trao đổi ion hoặc tạo phức [152]. Những đặc điểm này gợi mở tiềm năng ứng dụng EPS từ chủng *B. velezensis* DTA1 trong xử lý môi trường, đặc biệt trong việc hấp phụ và cô lập kim loại nặng, muối từ đất hoặc nước ô nhiễm.

3.5.1.3. Khả năng giảm độ mặn của nước tự do trong đất của EPSDTA1

Hàm lượng muối trong dịch chiết đất (được giả định là nước tự do trong đất) ở TN3 (có EPS) và TN4 (dịch nuôi cấy chủng *B. velezensis* DTA1 trong điều kiện tối ưu) được so sánh với ở TN2 (đối chứng môi trường tối ưu, môi trường mặn do chứa NaCl 3,27%) và TN1 (đối chứng nước cất-không mặn). Kết quả thể hiện trên Bảng 3.18.

Bảng 3.18 cho kết quả hợp lý với hàm lượng muối trong dịch chiết ở TN1 (bổ sung nước) đo được là 62,36 mg/L, thấp hơn nhiều so với các mẫu còn lại, đối chứng mặn (TN2) cho hàm lượng muối trong dịch chiết cao nhất đạt 563,67

mg/L. Ở TN3 và 4 có EPS/dịch nuôi cấy chủng vi khuẩn sinh EPS đã cho thấy hiệu quả giảm mặn đáng kể với hàm lượng muối trong dịch chiết đất thấp hơn hẳn so với đối chứng mặn ở TN2 ($p < 0,05$). Chủng tảo EPS và chủng *B. velezensis* DTA1 đều có khả năng giảm độ mặn nước tự do trong đất. Đặc biệt là ở TN3, 1 mg EPS có khả năng hấp phụ 0,25 mg muối. Kết quả này cao hơn so với công bố của Kasotia và cs (2016), NaCl được hấp phụ dưới 0,1g/g EPS [125], và nhỉnh hơn chút so với công bố của Arora và cs (2010), 1g EPS có thể hấp phụ Na^+ khoảng 0,154-0,235 g và giảm mặn 49,5-51,5% [178].

Bảng 3.18. Kết quả đánh giá khả năng hấp phụ muối của EPSDTA1

TN	Hàm lượng muối trong dịch chiết đất (mg/L)	Tổng lượng muối trong 250 mL dịch chiết (mg)	Lượng muối đã giảm so với TN2 (mg)	Lượng muối hấp phụ trên EPS ở TN3 (mg/mg)
(1)	(2)	(3)=(2)/(1000/250)	(4)	(5)=(4)/70
TN1	$62,36 \pm 5,13^d$	15,59		
TN2	$563,67 \pm 7,51^a$	140,92		
TN3	$493,85 \pm 6,67^c$	123,46	17,46	0,25
TN4	$535,27 \pm 7,56^b$	133,82	7,10	

TN1. Đối chứng nước cất; TN2. Đối chứng môi trường mặn; TN3. có EPS và môi trường mặn; TN4. dịch nuôi cấy chủng *B. velezensis* DTA1 trong môi trường mặn; Các giá trị thể hiện trung bình $\pm$ SD; $n = 3$; a, b, c, d khác nhau chỉ ra khác biệt có ý nghĩa, $p < 0,05$, Phụ lục 20.

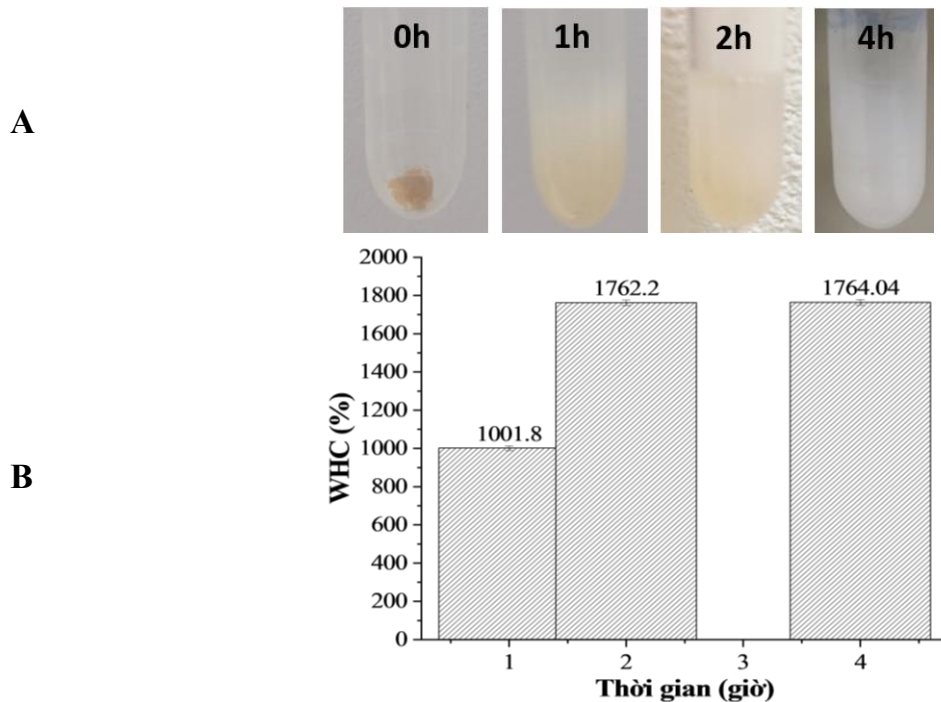
Cơ chế hấp phụ muối của EPS có thể được giải thích dựa trên đặc tính bề mặt của EPS, bao gồm thế zeta âm cao (~ -30 mV) và sự hiện diện của các nhóm chức phân cực và/hoặc mang điện tích âm như carboxyl, hydroxyl, phosphoric, carbonyl và thiol. Các nhóm này có khả năng liên kết với cation Na^+ thông qua các cơ chế chủ yếu là tương tác tĩnh điện, tạo phức phối trí và trao đổi ion [73]. Nhờ đó, EPS góp phần cô lập Na^+ khỏi dung dịch đất, làm giảm độc tính muối đối với rễ cây và tạo điều kiện thuận lợi cho việc hấp thu nước và dinh dưỡng [72]. Ngoài ra, EPS còn có khả năng kết dính và tương tác với các hạt đất, từ đó cải thiện cấu trúc đất và hạn chế sự dịch chuyển tự do của muối.

Tuy nhiên, do cơ chế hấp phụ này mang tính tạm thời, muối vẫn tồn tại trong pha rắn của đất, nên việc ứng dụng EPS nên được kết hợp với các biện pháp cải tạo lâu dài như rửa mặn, luân canh cây trồng hoặc sử dụng các biện pháp hóa-lý-sinh khác. Với tiềm năng đã được chứng minh trong nghiên cứu này, *B. velezensis* DTA1 là một tác nhân sinh học triển vọng trong cải tạo đất mặn, đặc biệt đối với các vùng đất cát ven biển hoặc đất san hô, góp phần hướng đến phát triển nông nghiệp bền vững và thích ứng với biến đổi khí hậu.

3.5.2. Nghiên cứu khả năng giữ nước của EPSDTA1 và chủng *Bacillus velezensis* DTA1 trên cát san hô Trường Sa

3.5.2.1. Khả năng giữ nước của exopolysaccharide

Kết quả đánh giá khả năng giữ nước (WHC) của EPSDTA1 được trình bày trên Hình 3.29. Sau khi ngâm trong nước cất vô trùng, khối lượng của EPS tăng đáng kể theo thời gian. Cụ thể, sau 1 giờ, WHC đạt 1001,80%, tương đương với việc 0,05 g EPS khô hấp thụ được 0,50 g nước (tổng khối lượng đạt 0,55 g). Khi kéo dài thời gian ngâm lên 2 giờ, WHC tiếp tục tăng lên 1762,20%, tương ứng với 0,05 g EPS giữ được 0,88 g nước, tức là mỗi gram EPS có khả năng hấp thụ 17,62 g nước. So với thời điểm 1 giờ, giá trị WHC sau 2 giờ đã tăng 1,76 lần. Tuy nhiên, khi tiếp tục kéo dài thời gian ngâm lên 4 giờ, khả năng giữ nước không tăng đáng kể ($p > 0,05$, Phụ lục 21), cho thấy trạng thái ngâm nước của EPS đạt ngưỡng bão hòa sau 2 giờ. Mức WHC của EPSDTA1 cao hơn rõ rệt so với một số báo cáo trước đó. Cụ thể, Ahmed và cs (2013) cho biết EPS từ *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 có WHC là 496% [74], trong khi EPS-F2 từ *Enterococcus* sp. đạt 882,5% [75], EPS từ chủng *B. haynesii* CamB6 đạt khoảng 266,8% [76]. Sự khác biệt này có thể đến từ bản chất EPSDTA1 là một polymer có khối lượng phân tử cao, cấu trúc mạng lưới, và giàu các nhóm chức ưa nước do đó có khả năng hấp thụ nước vào trong ma trận cao phân tử của nó và hấp phụ nước tốt ở bề mặt do đó có khả năng giữ nước vượt trội.



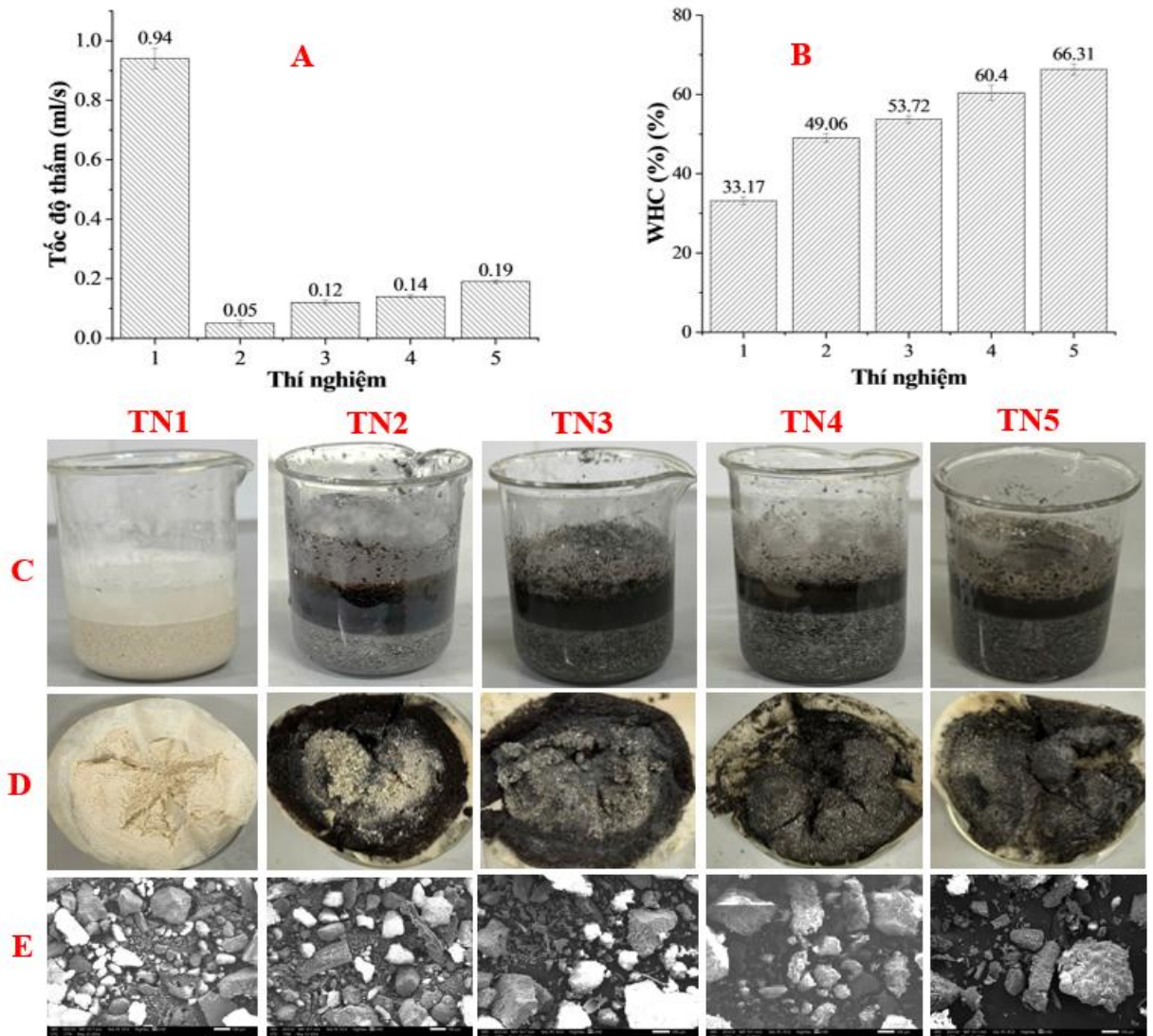
Hình 3.29. Hình ảnh (A) và đồ thị (B) khả năng giữ nước của EPSDTA1 sau 1-4 giờ ngâm nước. Các giá trị được trình bày dưới dạng trung bình $\pm$ SD; $n = 3$

Khả năng giữ nước cao là một trong những đặc tính vật lý – sinh học quan trọng của EPS. Polysaccharide trong EPS thường có đặc tính ưa nước, nhờ vào sự hiện diện của các nhóm chức như carboxyl, hydroxyl, và nhóm phosphate cho phép hình thành mạng lưới gel hút nước hiệu quả [77]. Các phân tử protein kỵ nước trong EPS có thể liên kết cộng hóa trị với polysaccharide, tạo nên cấu trúc keo ổn định, tăng cường khả năng giữ nước cũng như độ kết tụ đất [78]. Ngoài ra, khả năng hút nước hay hấp phụ nước của EPS còn bị chi phối bởi khối lượng phân tử, hình thái EPS và điều kiện môi trường như stress mặn [79], [50].

Như vậy, EPSDTA1 không chỉ sở hữu khả năng giữ nước vượt trội so với một số EPS đã được báo cáo, mà còn hứa hẹn mang lại lợi ích lớn trong cải thiện khả năng trữ ẩm của đất, đặc biệt là trong các hệ đất nghèo hữu cơ như đất cát san hô, đất mặn, đất hoang hóa ven biển, vốn có khả năng giữ nước tự nhiên rất thấp.

3.5.2.2. Khả năng giữ nước của đất được xử lý bằng EPSDTA1 và dịch nuôi cấy chủng *B. velezensis* DTA1

Kết quả thí nghiệm mô phỏng quá trình thoát và giữ nước trên nền đất cát san hô (Hình 3.30 A) cho thấy EPS hoặc dịch nuôi cấy chứa chủng *Bacillus velezensis* DTA1 có ảnh hưởng đáng kể đến đặc tính vật lý của đất. Cụ thể mẫu đất cát san hô (TN1) có tốc độ thoát nước nhanh nhất (0,94 mL/s), cao hơn 18,8 lần so với mẫu đất hỗn hợp (TN2), cho thấy cấu trúc rời rạc của cát san hô hạn chế khả năng giữ nước. Việc bổ sung 3% bentonit (TN2) giúp lấp đầy các khoảng trống giữa các hạt cát, từ đó giữ nước hiệu quả hơn và làm giảm tốc độ thoát nước. Trong các thí nghiệm TN3–TN5, khi đất hỗn hợp được bổ sung thêm EPS hoặc dịch nuôi cấy chủng *B. velezensis* DTA1 sinh EPS, tốc độ thoát nước giảm 4,95–7,83 lần so với đất cát san hô (TN1). Or và cs (2007) cũng đề cập việc bổ sung 1% EPS vào đất cát giúp giảm tốc độ thấm nước gấp 5 lần [168]. Tuy nhiên TN3–TN5 có tốc độ thoát nước tăng 2,4–3,8 lần so với TN2. Điều này có thể được giải thích là do EPS hoạt động như chất kết dính, liên kết các thành phần trong đất lại với nhau, hình thành các khối kết tụ ổn định (thể hiện ở Hình 3.30E), tạo khe thoáng giữa các khối kết tụ giúp nước thoát nhanh hơn TN2 nhưng đồng thời tăng khả năng giữ nước lâu dài bên trong các khối kết tụ [122], [70]. Hàm lượng EPS trong TN5 cao gấp đôi so với TN4, theo lý thuyết có thể tạo ra nhiều kết tụ hơn, do đó khả năng thoát nước tốt hơn. Kết quả thực tế đúng như dự đoán, tốc độ thoát nước trong TN5 cao hơn trong TN4, nhưng sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$, Phụ lục 22). Mặc dù tốc độ thoát nước tăng, các mẫu có bổ sung EPS lại cho khả năng giữ nước cao hơn, do EPS duy trì liên kết nước trong các lỗ mao và vùng vi mô giữa các khối kết tụ đất [122].



Hình 3.30. Tốc độ thoát nước (A); WHC (B); hình ảnh các mẫu thí nghiệm sau 2 giờ ngâm mẫu đất trong nước (C) và sau khi lọc nước trên phễu (D); và hình ảnh SEM bề mặt của 5 mẫu đất sau khi thử nghiệm (E) bằng phương pháp đếm giọt.

TN1. đất cát san hô; TN2. đất hỗn hợp; TN3. đất hỗn hợp + dung dịch nuôi cấy chủng *B. velezensis* DTA1; TN4. đất hỗn hợp + 70 mg EPS; TN5. đất hỗn hợp + 140 mg EPS. Các giá trị được trình bày dưới dạng trung bình $\pm$ SD; $n = 3$.

Kết quả đánh giá khả năng giữ nước (WHC) cho thấy rõ hiệu quả tích cực của bentonite, EPS, cũng như dịch nuôi cấy chủng *B. velezensis* DTA1 sinh EPS trong việc cải thiện đặc tính giữ nước của đất cát san hô ($p < 0,05$; Phụ lục 23; Hình 3.30B). WHC ở TN2 cao hơn TN1 do bentonite là loại sét đã được sử dụng để cải tạo khả năng giữ nước ở nhiều vùng đất trên thế giới do có khả năng trương nở, giữ ẩm hiệu quả [179]. Thêm vào đó thành phần giá thể hữu cơ chiếm 10% (w/w) có diện tích bề mặt lớn, cấu trúc xốp, nhiều mao quản nhỏ cũng góp phần làm tăng khả năng giữ nước cho đất ở các TN2-5. Đặc biệt việc bổ sung EPS hoặc dịch nuôi cấy chủng DTA1 giúp tăng WHC từ

1,6 đến 2 lần so với mẫu đối chứng (TN1 – đất cát san hô), trong đó WHC thấp nhất ghi nhận ở TN1 (33,17%) và cao nhất ở TN5 (66,31%) khi bổ sung 140 mg EPS. Ở điều kiện bổ sung 70 mg EPS (TN4), WHC đạt 60,40%, tương đương với việc mỗi gam đất giữ được 0,604 g nước. Trong khi đó, mẫu đối chứng có bổ sung bentonit nhưng không có EPS (TN2) chỉ giữ được 0,4906 g nước/g đất (WHC = 49,06%). Như vậy, EPS giúp tăng khả năng giữ nước trong đất lên 11,34%, tương ứng với tăng khả năng lưu giữ thêm 0,11 g nước/g đất. Với hàm lượng EPS trong TN4 là 1,4 mg/g đất, ước tính 1 g EPS có thể giữ được 158,7 g nước. Kết quả này vượt xa các giá trị từng được báo cáo về khả năng giữ nước của EPS như 15–20 g nước/g EPS gần bão hòa [168], hoặc 50–70 g nước/g EPS [180]. Tuy vậy kết quả này thấp hơn so với công bố của Rosenzweig et al. (2012) khi bổ sung 1% xanthan vào đất giúp tăng lượng nước giữ trong đất lên khoảng 45% với đất cát và 24% với đất Hamra giàu hữu cơ. Bên cạnh đó việc bổ sung thêm xanthan cũng giúp WHC của đất đạt đến 270% (với cát) và 230% (với Hamra) [181].

So với thí nghiệm độc lập ngâm riêng EPS trong ống eppendorf chứa nước (mục 3.5.2.1), nơi 1 g EPS chỉ giữ được 17,62 g nước, kết quả tại TN4 cao hơn 9 lần, cho thấy hiệu ứng cộng hưởng rõ rệt khi EPS tương tác với các thành phần trong đất. Công bố của Or và cs (2007) cũng cho kết quả tương tự [168]. Cơ chế này có thể lý giải thông qua việc EPS không chỉ giữ nước bằng liên kết hydro, liên kết cation và tính trương nở mà còn cải thiện cấu trúc đất bằng cách tạo ra mạng lưới polymer bao quanh hạt đất tạo khối kết tụ, giúp tăng thể tích lưu trữ nước mao dẫn và hạn chế thất thoát nước trong chính các khối đó [72].

Ở TN3 là mẫu đất hỗn hợp có bổ sung dung dịch nuôi cấy chủng *B. velezensis* DTA1 nên trong dịch nuôi cấy đã có EPS do chủng sản sinh ra. Điều này góp phần vào tăng khả năng giữ nước cho đất (Hình 3.30 B), tăng kết tụ đất (Hình 3.30 C, D, E), tạo khe thông thoáng nên khả năng thoát nước cao hơn ở TN2 (Hình 3.30 A), tuy vậy hàm lượng EPS TN3 không cao bằng ở TN4 và TN5 nên cho hiệu quả giữ nước, kết tụ kém hơn ở TN4 và TN5.

Quan sát trực quan trong Hình 3.30C–D cho thấy, sau khi ngâm trong nước 2 giờ, mẫu TN2 xuất hiện hiện tượng tách lớp rõ rệt: cát san hô lắng xuống đáy (màu trắng) và lớp giá thể hữu cơ nổi phía trên (màu đen). Tuy nhiên, ở các TN3–5, hiện tượng phân lớp giảm đáng kể. Các thành phần đất được trộn đều hơn, nhờ vào khả năng liên kết của EPS – giúp gắn kết cát và vật liệu hữu cơ thành các khối kết tụ đồng nhất. Hình ảnh SEM (Hình 3.30E) xác nhận sự hiện diện của các khối đất kết tụ lớn hơn và ít hạt riêng lẻ trong các mẫu có xử lý EPS, trái ngược với cấu trúc rời rạc ở TN1 và 2.

Cơ chế hình thành kết tụ này có thể được lý giải bởi khả năng bám dính của EPS lên bề mặt các tiểu phần trong đất thông qua liên kết hydro, liên kết cation, hấp phụ

anion và lực van der Waals đất [72]. Kết tụ này giúp cải thiện cấu trúc đất, tăng khả năng giữ ẩm và cung cấp độ ổn định cơ học cho đất.

Kết quả nghiên cứu về khả năng giữ nước và giảm mặn của EPS từ *Bacillus velezensis* DTA1 đã khẳng định tiềm năng ứng dụng của chủng này trong cải tạo cát san hô khô hạn, mặn. EPSDTA1 thể hiện thế zeta âm cao (~ -30 mV), chứa nhiều nhóm chức ưa nước, đồng thời có khả năng hấp phụ NaCl và đa dạng các cation. Đáng chú ý, điều kiện stress mặn và/hoặc kim loại nặng đã kích thích mạnh mẽ quá trình sinh tổng hợp EPS cũng như làm gia tăng hàm lượng carbohydrate và protein trong cấu trúc EPS. EPSDTA1 cho thấy hiệu quả hấp phụ muối ấn tượng (0,25 g NaCl/g EPS) và khả năng giữ nước vượt trội (17,62 g nước/g EPS khi thử nghiệm độc lập; giúp đất san hô cải tạo tăng khả năng giữ nước lên 158,7 g nước/g EPS). Việc bổ sung EPSDTA1 hoặc trực tiếp sử dụng chủng *B. velezensis* DTA1 giúp giảm độ mặn, tăng cường kết tụ đất và nâng cao khả năng giữ nước của đất lên 1,6–2 lần so với cát san hô chưa cải tạo. Những kết quả này cho thấy tiềm năng ứng dụng của *B. velezensis* DTA1 trong cải tạo đất mặn và đất khô hạn.

3.6. Thử nghiệm hiệu quả cải tạo cát san hô thành đất canh tác của chủng *B. velezensis* DTA1 ở quy mô chậu vại

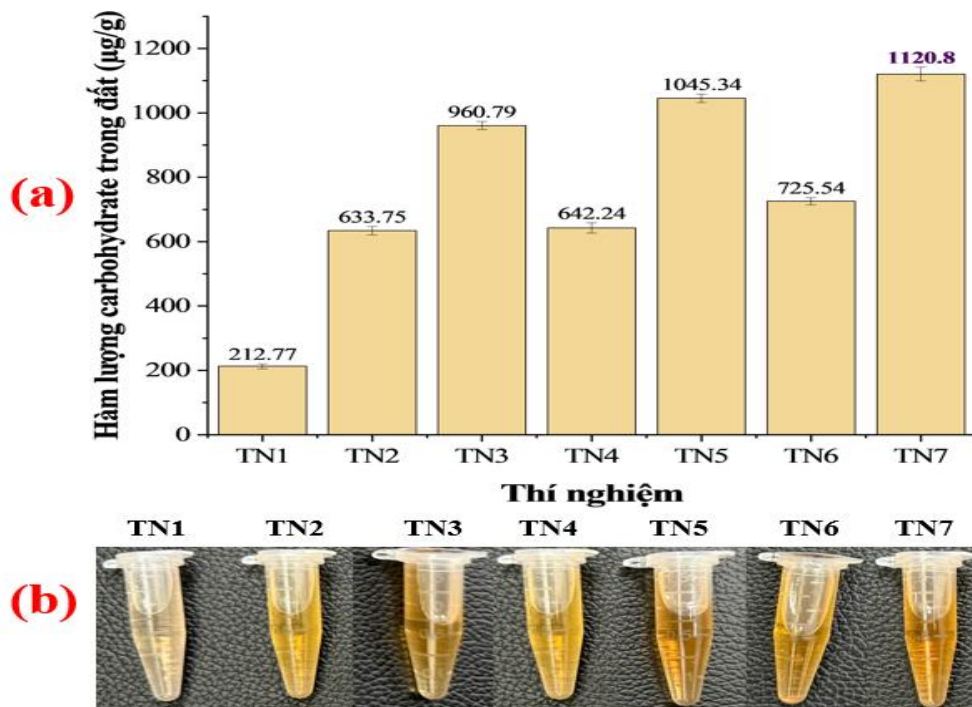
Ứng dụng vi sinh vật sinh EPS trong cải tạo đất khô cằn và nhiễm mặn đang nổi lên như một giải pháp tiềm năng cho phát triển nông nghiệp bền vững, đặc biệt tại các vùng đất cát ven biển và đảo san hô. Trên cơ sở các kết quả phân tích, EPSDTA1 và chủng *Bacillus velezensis* DTA1 thể hiện khả năng vượt trội trong giữ nước, tăng cường kết tụ đất và giảm độ mặn. Để khẳng định giá trị ứng dụng của chủng *B. velezensis* DTA1 trong cải tạo cát san hô, nghiên cứu đã tiến hành thử nghiệm quy mô chậu vại trên rau mồng tơi trong điều kiện nhà lưới tại Học viện Nông nghiệp Việt Nam. Sau thời gian thử nghiệm 30 ngày, các mẫu ở 7 lô TN được thu hoạch và đánh giá các chỉ tiêu sinh trưởng, chất lượng rau, khả năng giữ nước, giảm mặn, kết tụ và hàm lượng EPS trong đất.

3.6.1. Xác định khả năng sinh exopolysaccharide và tạo kết tụ trong đất

3.6.1.1. Kết quả xác định hàm lượng carbohydrate trong đất

Kết quả phân tích hàm lượng carbohydrate (đại diện cho EPS) trong đất cho thấy sự khác biệt đáng kể giữa các công thức thí nghiệm (Hình 3.31, Phụ lục 24). Lô đối chứng (TN1, cát san hô) có giá trị thấp nhất, chỉ đạt 212,77 $\mu\text{g/g}$ đất, phản ánh điều kiện nghèo hữu cơ và vi sinh vật của loại đất này. Ở TN2 (cát san hô + giá thể) và TN4 (cát san hô + giá thể + bentonite) hàm lượng carbohydrate tăng lên 633,75–642,24 $\mu\text{g/g}$, cao gấp khoảng 3 lần so với đối chứng. Tuy nhiên, mức tăng này phần lớn có thể liên quan tới bản thân giá thể hữu cơ (bã bùn mía, trấu, phân bò) vốn chứa sẵn một lượng

carbohydrate hòa tan, bên cạnh đó còn có vai trò cung cấp nguồn carbon dễ sử dụng cho vi sinh vật trong đó có thể có nhóm sinh EPS. Ở các công thức bổ sung vi khuẩn sinh EPS (TN3 và TN5), hàm lượng carbohydrate tăng mạnh, đạt 960,79–1045,34 $\mu\text{g/g}$, cho thấy sự đóng góp rõ rệt của chủng *B. velezensis* DTA1 vào việc tạo ra EPS, vượt xa ảnh hưởng đơn thuần của giá thể. Đặc biệt, sự kết hợp với bentonite ở TN5 giúp tăng sinh EPS–lượng carbohydrate cao gấp 4,91 lần cát san hô (TN1), gấp 1,63 lần ĐC không bổ sung vi khuẩn (TN4), có thể nhờ đặc tính giữ ẩm và cung cấp bề mặt hấp phụ cho vi sinh vật phát triển. Như đã được chứng minh ở trên trong điều kiện stress mặn giúp kích thích sinh EPS qua đó góp phần bảo vệ tế bào trước áp lực thẩm thấu. Điều này được thể hiện rõ ở TN7 (cát san hô + giá thể + bentonite + vi khuẩn + muối) cho hàm lượng carbohydrate cao vượt trội so với các TN khác đạt 1120,8 $\mu\text{g/g}$, cao hơn gấp 1,54 lần so với đối chứng không có *B. velezensis* DTA1 (TN6); và cao hơn gấp 5,27 lần cát san hô (TN1). Hàm lượng carbohydrate trong đất cát san hô cải tạo ở nghiên cứu này nhìn chung cao hơn so với các công bố trên các loại đất nông nghiệp phổ biến 100–900 $\mu\text{g/g}$ [182], [183] tuy vậy khi điều kiện tách chiết tối ưu có thể đạt tới 2417 $\mu\text{g/g}$ ở đất đỏ trồng lúa [183].



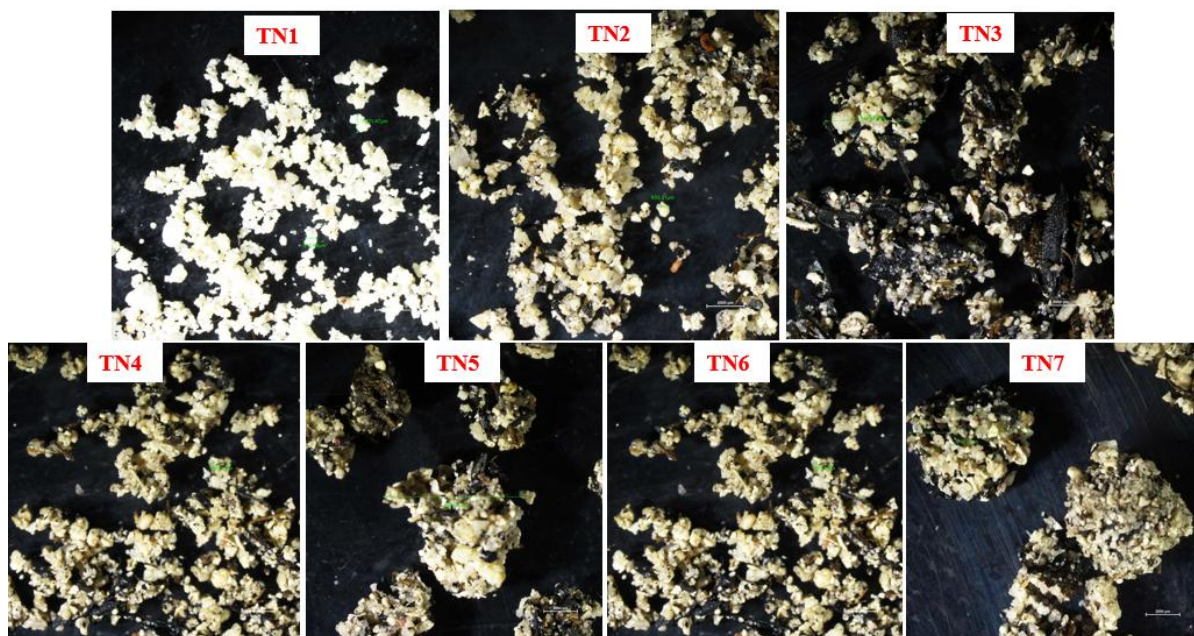
Hình 3.31. Hàm lượng carbohydrate (a) và hình ảnh phản ứng màu trong quá trình đo (b) ở 7 lô đất thử nghiệm quy mô chậu vại

TN1. Cát san hô; TN2. Cát san hô + giá thể; TN3. Cát san hô + giá thể + vi khuẩn; TN4. Cát san hô + giá thể + bentonite; TN5. Cát san hô + giá thể + bentonite + vi khuẩn; TN6. Cát san hô + giá thể + bentonite + muối; TN7. Cát san hô + giá thể + bentonite + vi khuẩn + muối.

3.6.1.2. Khả năng tạo kết tụ đất

Kết cấu đất – đặc biệt là khả năng kết tụ của các tiểu phần đất – đóng vai trò quan trọng trong việc điều hòa khả năng giữ nước, trao đổi khí và ổn định cơ học của môi trường xung quanh rễ. Hình ảnh dưới kính hiển vi soi nổi (Hình 3.32) cho thấy sự khác biệt rõ rệt về cấu trúc hạt đất giữa các lô thí nghiệm sau 30 ngày trồng rau mồng tơi.

Cụ thể, các mẫu đất ở TN1, TN2, TN4 và TN6 (không bổ sung vi khuẩn sinh EPS) chủ yếu gồm các hạt rời rạc, có kích thước $< 2000 \mu\text{m}$. Trong khi đó, các lô TN3, TN5 và TN7 xuất hiện nhiều khối kết tụ lớn, có kích thước vượt quá $2000 \mu\text{m}$; đặc biệt tại TN5 và TN7, các kết tụ có thể đạt kích thước lên tới $\sim 8000 \mu\text{m}$. Điều này có thể giải thích dựa trên kết quả xác định hàm lượng EPS (dựa trên lượng carbohydrate) ở mục 3.6.1.1. Do ở TN3,5,7 có bổ sung chủng *Bacillus velezensis* DTA1 đã sinh ra EPS giúp tăng khả năng kết tụ đất, đặc biệt ở TN7 hàm lượng EPS cao nhất nên tạo nhiều kết tụ hơn.



Hình 3.32. Hình ảnh bề mặt 7 mẫu đất thí nghiệm sau thu hoạch rau mồng tơi ở quy mô châu vại dưới kính hiển vi soi nổi SMZ12701 (Nikson, Nhật Bản), độ phóng đại $10\times$

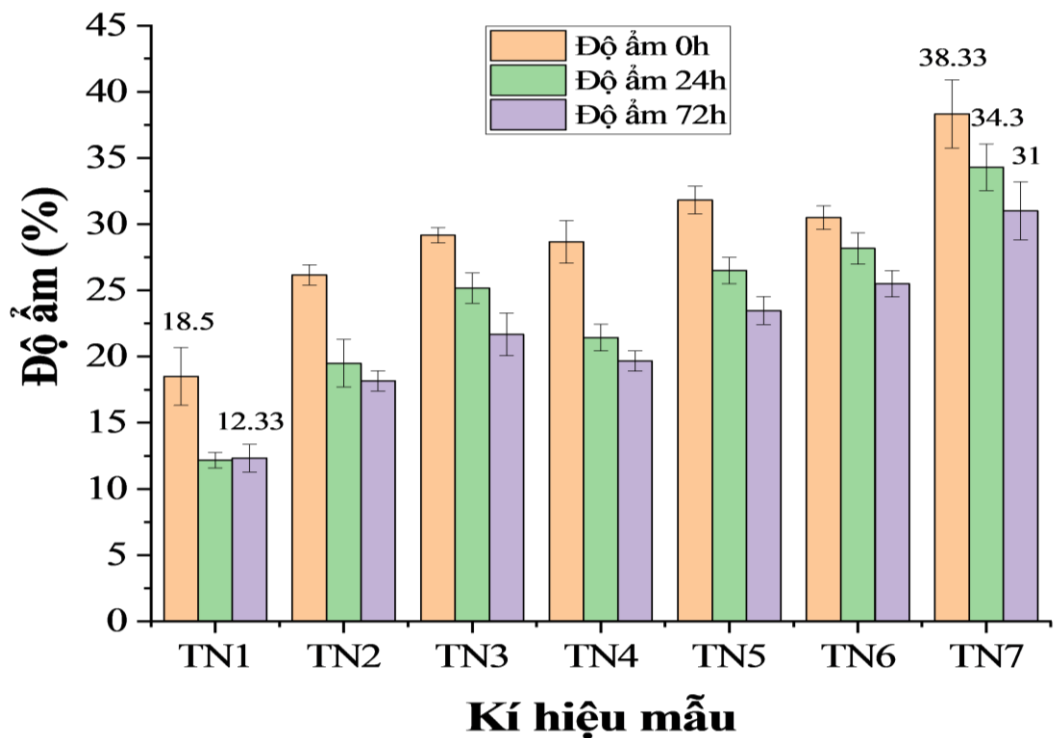
Sự hình thành kết tụ là kết quả của các tương tác sinh học – hóa học giữa hạt đất, chất hữu cơ, vi sinh vật và các chất tiết ngoại bào như EPS. EPS có khả năng bao bọc các hạt đất và kết dính chúng lại với nhau thông qua các liên kết hydro, lực van der Waals và tương tác ion, từ đó hình thành các khối kết tụ ổn định hơn [70] [72]. Các kết tụ này không chỉ giữ nước trong các vi mao quản mà còn giúp cải thiện cấu trúc đất, hạn chế rửa trôi và tăng khả năng giữ dinh dưỡng.

3.6.2. Đánh giá khả năng giữ nước của đất tại thời điểm thu hoạch rau

Kết quả theo dõi độ ẩm đất tại các thời điểm 0, 24 và 72 giờ sau tưới nước được trình bày ở Hình 3.33 cho thấy xu hướng giảm dần độ ẩm theo thời gian ở tất cả các lô thử nghiệm, phản ánh quá trình bốc hơi và thoát nước tự nhiên sau tưới. Tuy nhiên, mức độ giữ nước của từng lô có sự khác biệt rõ rệt.

So sánh giữa các lô thí nghiệm cho thấy, TN1 (chỉ sử dụng cát san hô) có độ ẩm thấp nhất tại mọi thời điểm, cho thấy khả năng giữ nước kém - đặc trưng của loại đất này. Khi bổ sung thêm giá thể hữu cơ, các lô TN2–TN7, đều ghi nhận độ ẩm cao hơn đáng kể so với TN1 ($p < 0,05$, Phụ lục 25), cho thấy vai trò tích cực của giá thể trong cải thiện cấu trúc đất và tăng cường giữ nước. Giá thể hữu cơ thường có độ xốp cao, khả năng giữ ẩm tốt và có thể tạo điều kiện thuận lợi cho hoạt động của hệ vi sinh vật đất [184].

Đặc biệt, việc bổ sung vi khuẩn sinh EPS (TN3, TN5, TN7), giúp tăng hàm lượng EPS trong đất, do đó tăng thêm khả năng giữ nước so với các lô đối chứng (tương ứng là TN2, TN4, TN6). Sự khác biệt này là kết quả của sự hiện diện của EPS được tiết ra từ vi khuẩn *Bacillus velezensis* DTA1 đã được chứng minh về khả năng giữ nước ở các phân trên. EPS là polymer cao phân tử có khả năng hút ẩm và tạo biofilm bao quanh hạt đất, từ đó giúp giảm thất thoát nước, tăng ổn định cấu trúc đất, và cải thiện vi cấu trúc vùng rễ [78], [122], [70].

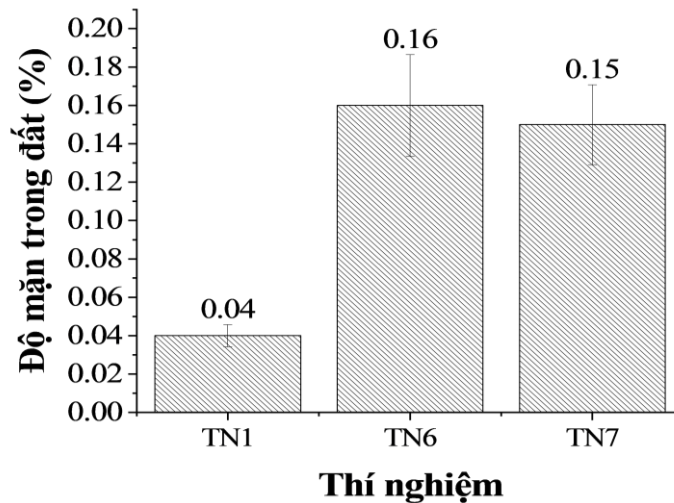


Hình 3.33. Độ ẩm đất sau 0; 24 và 72 giờ tưới nước của 7 lô thí nghiệm trong thử nghiệm trồng cây quy mô chậu vại

Trong các lô thí nghiệm có bổ sung muối (TN6 và TN7), độ ẩm đất vẫn được duy trì tốt, đặc biệt là ở TN7 – có sự kết hợp đầy đủ giữa giá thể, bentonite, vi khuẩn sinh EPS và muối – đã cho độ ẩm đất cao nhất tại cả 3 thời điểm: 38,33% (0h), 34,3% (24h), và 31,0% (72h), cao hơn gấp 2–2,5 lần so với cát san hô (TN1). Điều này rất phù hợp với kết quả hàm lượng EPS ở TN7 cao nhất, cho thấy sự tương tác cộng hưởng giữa các yếu tố, trong đó: Bentonite – một loại khoáng sét chứa montmorillonite – có khả năng trương nở và giữ nước hiệu quả và khả năng trao đổi ion cao [179]; EPS là chất giữ nước, kết tụ sinh học và hấp phụ muối, giảm mặn cho đất như đã chứng minh ở các phần trên và ở các công bố trước đó [72], [185]; Sự hiện diện của NaCl ở nồng độ nhất định có thể tạo ra độ chênh áp thẩm thấu nhẹ giúp giữ lại nước trong vùng rễ [184], đặc biệt khi kết hợp với bentonite và EPS có khả năng liên kết với ion Na^+ , hạn chế độc tính và đồng thời ổn định độ ẩm đất.

Như vậy, kết quả cho thấy rằng việc phối hợp đồng thời giá thể hữu cơ, bentonite và vi khuẩn sinh EPS, đặc biệt trong điều kiện đất cát nghèo dưỡng chất và có mặn nhẹ, giúp cải thiện rõ rệt khả năng giữ nước của đất. Đây là tiền đề quan trọng để ứng dụng các giải pháp cải tạo đất cát san hô ven biển hoặc trên các đảo san hô như Trường Sa, hướng đến canh tác bền vững và giảm phụ thuộc vào nguồn nước tưới thường xuyên.

3.6.3. Đánh giá khả năng giảm mặn của đất sau thu hoạch rau



Hình 3.34. Hàm lượng muối trong đất ở các lô TN1, TN6 và TN7 trong thí nghiệm trồng cây trong chậu vại

Để đánh giá hiệu quả giảm mặn của chủng *Bacillus velezensis* DTA1 thông qua hoạt động sinh EPS trong đất, hàm lượng muối hòa tan trong đất sau thu hoạch được đo ở các lô TN1 (đối chứng âm – cát san hô, không muối, không bổ sung vi khuẩn sinh EPS), TN6 (đối chứng dương – có muối, không bổ sung vi khuẩn sinh EPS) và TN7 (có muối và bổ sung *B. velezensis* DTA1 sinh EPS). Kết quả được trình bày trên Hình 3.34.

Hàm lượng muối tại lô TN7 thấp hơn TN6, cho thấy xu hướng giảm mặn khi bổ sung chủng vi khuẩn sinh EPS. Tuy nhiên, sự khác biệt giữa 2 lô không đạt mức ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$; Phụ lục 26). Kết quả này gợi ý rằng việc bổ sung *B. velezensis* DTA1 có thể hỗ trợ làm giảm hàm lượng muối hòa tan trong đất, tuy vậy mức độ khác biệt còn thấp. Điều này có thể lý giải do khi tưới nước muối vào lô đối chứng dương (TN6) lượng nước thoát ra từ đáy chậu có thể mang theo muối thoát ra ngoài do trồng cây trong chậu có lỗ thoát nước thoáng, trong khi đó ở lô thí nghiệm TN7 có bổ sung chủng *B. velezensis* DTA1 đã được chứng minh kích thích sinh EPS mạnh đã hấp phụ muối nên lượng nước tự do thoát ra từ đáy chậu có hàm lượng muối thấp hơn ở TN6 (đã được chứng minh mô phỏng ở mục 3.5.1.3.).

Mặc dù chưa có sự khác biệt rõ ràng về mặt thống kê trong điều kiện thí nghiệm quy mô chậu này, nhưng xu hướng giảm mặn tại TN7 phù hợp với các kết quả trước đó: Khả năng sinh EPS trong đất của chủng *B. velezensis* DTA1 (mục 3.6.1.1) với hàm lượng EPS cao nhất tại TN7 (1120,8 $\mu\text{g/g}$ đất), cho thấy hoạt động sống và tiết EPS mạnh trong điều kiện mặn của chủng *B. velezensis* DTA1; Kết quả thử nghiệm trong điều kiện mô phỏng (mục 3.5.1.3), trong đó EPSDTA1 đã làm giảm hẳn hàm lượng muối hòa tan so với đối chứng không có EPS.

Hiệu quả giảm mặn ở đây có thể được lý giải chủ yếu bởi khả năng hấp phụ muối của EPS thông qua các tương tác điện tích với các nhóm chức như carboxyl, hydroxyl và phosphonate có trong cấu trúc polymer EPS [72]. Ngoài ra, EPS còn giúp giữ muối trong các khối kết tụ đất, hạn chế sự di chuyển tự do của muối trong vùng rễ, từ đó làm giảm áp lực thẩm thấu lên cây.

Những kết quả trên đã cho thấy xu hướng giảm mặn hiệu quả của chủng *B. velezensis* DTA1 khi áp dụng trên cát san hô cải tạo ở quy mô chậu vại.

3.6.4. Đánh giá một số chỉ tiêu sinh trưởng của rau mùng tơi

Quan sát trực quan (Hình 3.35) cho thấy sự khác biệt rõ rệt giữa các lô không tưới mặn (TN1–TN5) và có tưới mặn (TN6, TN7). Trong nhóm không tưới mặn, cây mùng tơi ở TN1 (cát san hô nguyên bản) có biểu hiện sinh trưởng kém nhất với thân nhỏ và lá hơi ngả vàng. Ngược lại, TN5 (bổ sung đồng thời giá thể, bentonite và chủng vi khuẩn sinh EPS *Bacillus velezensis* DTA1) cho cây phát triển tốt nhất, với thân cao, tán rộng và hệ rễ phát triển vượt trội. Các lô TN3 và TN4 (bổ sung giá thể kết hợp với vi khuẩn sinh EPS hoặc với bentonite) cũng cho kết quả khả quan, trong khi TN2 chỉ bổ sung giá thể cho kết quả thấp hơn. Hình ảnh hệ rễ cho thấy TN3, TN4 và TN5 hình thành bầu rễ lớn hơn rõ rệt so với TN1 và TN2.



Hình 3.35. Hình ảnh các chậu cây rau mồng tơi ở 7 lô thí nghiệm sau 30 ngày trồng thử nghiệm: ảnh chụp ngang (a), chụp từ trên xuống (b) và hình ảnh toàn bộ cả cây sau khi nhổ ra khỏi chậu (c)

Đối với các lô tưới mặn, cây ở TN6 (không bổ sung vi khuẩn EPS) có biểu hiện sinh trưởng kém hơn với hiện tượng vàng lá và còi cọc. Trong khi đó, cây ở TN7 (bổ sung chủng *B. velezensis* DTA1) có bộ lá xanh hơn, sinh trưởng tốt hơn so với TN6, cho thấy vai trò tiềm năng của EPS trong cải thiện khả năng chịu mặn cho cây.

Kết quả đo lường các chỉ tiêu sinh trưởng (Bảng 3.19) củng cố thêm nhận định trên. Cụ thể xét về chỉ tiêu chiều dài rễ ghi nhận chỉ có ở TN3 cho chiều dài rễ dài hơn có ý nghĩa so với ở TN1, 6, 7 ($p < 0,05$, Phụ lục 27). Xét về chiều rộng bầu rễ ghi nhận sự vượt trội ở lô TN5 so với lô TN2, 6, 7. Khối lượng bầu rễ ở TN5 cũng cao hơn hẳn so với các TN4, 7, 2, 1, 6. Về chỉ tiêu chiều cao thân lá cho thấy TN5 đạt cao nhất 26,43 cm tuy vậy không khác biệt so với các TN1, 2, 3, 4, 7 nhưng cao hơn hẳn ở TN6. Đặc biệt liên quan đến hiệu suất của rau là khối lượng thân lá cho thấy TN5 cao nhất (25,23 g), tuy không khác biệt so với TN3 nhưng cao hơn hẳn các TN khác, gấp 2,36 lần so với cát san hô. Số lượng lá ở TN5, 4, 3 cho số lá nhiều nhất, cao hơn hẳn ở TN2, 6, 7. Như vậy các thí nghiệm trên cho thấy khi bổ sung thêm giá thể, bentonite và vi khuẩn sinh

EPS (TN5) về cơ bản cho khả năng sinh trưởng tốt hơn, tạo bầu rễ tốt hơn các thí nghiệm khác.

Bảng 3.19. Kết quả phân tích một số chỉ tiêu rau mồng tơi ở 7 thí nghiệm đánh giá khả năng giữ nước và giảm mặn của vi khuẩn sinh EPS trên quy mô chậu vại

Thí nghiệm	Dài rễ (cm)	Rộng bầu rễ (cm)	Khối lượng bầu rễ (g)	Chiều cao thân lá (cm)	Khối lượng thân lá (g)	Số lượng lá (cái)
TN1	13,6±1,93 ^b	7,83±1,04 ^{a,b,c}	61,6±22,5 ^c	14,67±2,25 ^{a,b}	10,67±0,87 ^d	8±1 ^{a,b}
TN2	15±1,5 ^{a,b}	6,83±1,61 ^{b,c}	64,9±20,1 ^{b,c}	16,33±2,75 ^{a,b}	14,73±1,21 ^c	7±1,73 ^{b,c}
TN3	23,43±5,69 ^a	10,67±0,58 ^{a,b}	184,7±52,8 ^{a,b}	20,33±4,54 ^{a,b}	22,83±0,93 ^{a,b}	10±1 ^a
TN4	15,93±2,7 ^{a,b}	9,67±1,63 ^{a,b,c}	173,4±46,6 ^{b,c}	18,83±2,84 ^{a,b}	20,67±0,9 ^b	10,33±0,58 ^a
TN5	16,5±4,27 ^{a,b}	12,83±3,62 ^a	302,1±85,3 ^a	26,43±10,97 ^a	25,23±1,01 ^a	10,33±0,58 ^a
TN6	8,63±4,05 ^b	5,33±1,26 ^c	60,17±8,98 ^c	12,23±0,93 ^b	10,2±0,85 ^d	5,33±0,58 ^c
TN7	10,33±2,52 ^b	4,67±1,26 ^c	96,03±6,56 ^{b,c}	14,77±1,75 ^{a,b}	11,63±1,03 ^d	6,33±0,58 ^{b,c}

Các giá trị được trình bày dưới dạng trung bình ± SD; n = 3. Các chữ cái khác nhau a, b, c, d chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với p < 0,05, Phụ lục 27.

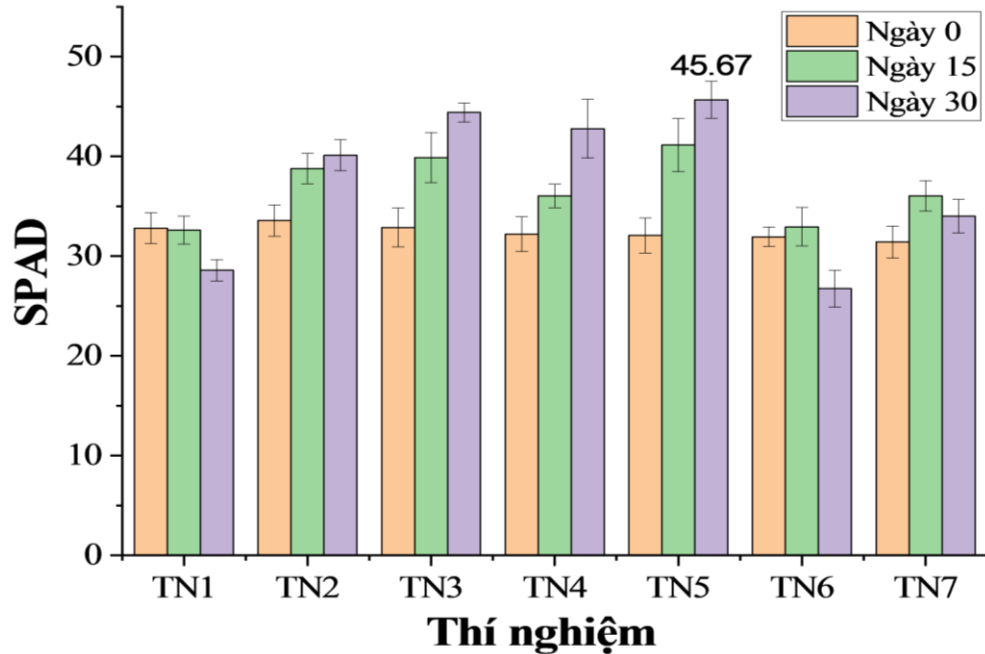
Về khả năng chịu mặn, việc bổ sung vi khuẩn sinh EPS (TN7) giúp cải thiện các chỉ tiêu sinh trưởng (số lá, chiều cao thân, khối lượng thân lá, khối lượng và chiều dài rễ) so với lô đối chứng TN6 không bổ sung vi khuẩn sinh EPS. Mặc dù các khác biệt chưa đạt mức ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$), nhưng xu hướng cây xanh hơn và sinh trưởng tốt hơn ở TN7 so với TN6 cho thấy vai trò tiềm năng của EPS trong tăng cường sức chống chịu mặn của cây mồng tơi. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đó cho thấy EPS giúp cây tăng khả năng chống chịu stress mặn nhờ cơ chế hấp phụ ion Na^+ và tạo môi trường thuận lợi quanh rễ [71], [72].

3.6.5. Đánh giá chỉ số SPAD

Chỉ số SPAD là thông số gián tiếp phản ánh hàm lượng diệp lục trong mô lá, qua đó cung cấp thông tin nhanh về tình trạng dinh dưỡng nitơ của cây trồng. Do diệp lục giữ vai trò trung tâm trong quang hợp và có mối liên hệ mật thiết với hàm lượng nitơ tổng số, sự biến động của SPAD là chỉ thị quan trọng để đánh giá hiệu quả của các biện pháp cải tạo đất và bổ sung dinh dưỡng đối với cây.

Kết quả theo dõi chỉ số SPAD (Hình 3.36, Phụ lục 28) cho thấy ở thời điểm ban đầu (ngày 0), không có sự khác biệt giữa các công thức ($p < 0,05$). Tuy nhiên, sau 15 và 30 ngày, chỉ số SPAD phân hóa rõ rệt. TN2 (cát san hô + giá thể) có SPAD cao hơn TN1 (cát san hô), chứng tỏ vai trò cải thiện dinh dưỡng ban đầu của giá thể hữu cơ. Tuy vậy, SPAD ở TN3 (cát san hô + giá thể + vi khuẩn) và TN4 (cát san hô + giá thể + bentonite) còn cao hơn, cho thấy việc bổ sung vi khuẩn sinh EPS hoặc bentonite bước đầu cải thiện tình trạng dinh dưỡng lá, mặc dù chưa đạt ý nghĩa thống kê. Đáng chú ý, TN5 (cát san hô + giá thể + bentonite + vi khuẩn) đạt SPAD cao nhất (45,67), vượt 1,26–1,6 lần so

với ở TN1, vượt trội so với TN2, TN6 và TN7 ($p < 0,05$), đồng thời cao hơn nhưng không khác biệt có ý nghĩa so với TN3 và TN4. Điều này cho thấy sự phối hợp giữa chủng *B. velezensis* DTA1 với bentonite và giá thể đã phát huy hiệu quả cộng hưởng trong cải thiện khả năng giữ nước, duy trì dinh dưỡng và nâng cao hàm lượng diệp lục.



Hình 3.36. Chỉ số SPAD ở 7 lô thí nghiệm sau 0; 15 và 30 ngày trồng rau mồng tơi quy mô chậu

Ngược lại, TN6 (cát san hô + giá thể + bentonite + muối) có SPAD thấp nhất, phản ánh tác động bất lợi rõ rệt của stress mặn. Trong khi đó, TN7 (cát san hô + giá thể + bentonite + vi khuẩn + muối) duy trì SPAD ở mức khá, cao hơn TN6 tại cả thời điểm 15 ngày (36,03 so với 32,93) và 30 ngày (34,0 so với 26,73), cho thấy *B. velezensis* DTA1 giúp giảm thiểu tác động tiêu cực của stress mặn. Sự giảm sút SPAD ở TN6 từ 32,93 (ngày 15) xuống 26,73 (ngày 30) phản ánh tình trạng ức chế tích lũy diệp lục dưới điều kiện stress mặn, trong khi sự ổn định tương đối ở TN7 khẳng định vai trò bảo vệ của vi khuẩn sinh EPS.

Có 2 lí do có thể giải thích cho hiệu quả tăng chỉ số SPAD và chỉ số sinh trưởng của rau trong điều kiện thường cũng như stress mặn của chủng *B. velezensis* DTA1 bao gồm: (i) Loài *B. velezensis* đã được báo cáo có khả năng sinh EPS, hòa tan phosphate và kẽm, tiết indole-3-acetic acid, amoniac, HCN, cellulase và protease, từ đó thúc đẩy hấp thu dinh dưỡng và kích thích sinh trưởng [186]; (ii) EPS được sản xuất mạnh dưới stress mặn, giúp hấp phụ NaCl, giảm độ mặn nước tự do, tạo biofilm, tăng kết tụ và giữ nước – dinh dưỡng, đồng thời đóng vai trò như hàng rào bảo vệ rễ, giảm tác động trực tiếp của muối [73], [80].

Những kết quả này phù hợp với các báo cáo trước đây về vai trò của vi sinh vật sinh EPS và vật liệu cải tạo đất: *B. velezensis* QA2 làm tăng SPAD và giảm tích lũy Na^+ dưới điều kiện tưới mặn ($p < 0,05$) [186]; biochar làm tăng SPAD 17–19% ở rau bina [187]; bentonite nâng thông số quang hợp và chlorophyll trong thí nghiệm dài hạn [179]. Nghiên cứu của Nguyen và cs. (2024) cũng cho thấy SPAD của rau mồng tơi tăng dần sau 15 và 30 ngày gieo, đạt cực đại 43–43,7 tại 43 ngày [188], tương đồng với xu hướng quan sát được trong thí nghiệm này.

Các thử nghiệm quy mô chậu vai đã khẳng định vai trò quan trọng của chủng *B. velezensis* DTA1 sinh EPS cũng như hiệu quả cộng hưởng giữa các thành phần cải tạo (giá thể hữu cơ, bentonite và vi khuẩn chịu mặn sinh EPS). Sự kết hợp này đã làm tăng hàm lượng carbohydrate trong đất cát san hô lên 4,91–5,27 lần so với đất cát san hô nguyên trạng, đồng thời cải thiện rõ rệt khả năng kết tụ và giữ nước của đất, đặc biệt trong điều kiện mặn, với hiệu quả cao gấp 2–2,5 lần. Nhờ vậy, năng suất rau thu được trên đất cát san hô cải tạo cao hơn 2,36 lần so với cát san hô, các chỉ tiêu sinh trưởng khác cũng được cải thiện, trong đó chỉ số SPAD tăng 1,26–1,60 lần, phản ánh dinh dưỡng và hàm lượng diệp lục của cây được nâng cao. Đáng chú ý, dưới điều kiện stress mặn do tưới nước muối thường xuyên thay nước, việc bổ sung *B. velezensis* DTA1 đã góp phần giảm lượng muối tự do trong dung dịch đất, nhờ đó hạn chế tác động bất lợi của mặn lên cây. Mặc dù sự khác biệt về sinh trưởng chưa đạt mức ý nghĩa thống kê, nhưng giá trị SPAD cao hơn hẳn so với đối chứng, cho thấy sự hỗ trợ tích cực của EPS và vi khuẩn sinh EPS trong duy trì hiệu suất quang hợp và sức khỏe cây trồng.

Ngoài đánh giá quy mô chậu vai tại Học viện Nông nghiệp Việt Nam (Phụ lục 29), nghiên cứu cũng đã bước đầu thử nghiệm quy mô đồng ruộng nhỏ ở Nhà lưới, Trạm Nghiên cứu và Thử nghiệm Biển Đầm Báy thuộc đảo Hòn Tre, phường Nha Trang, tỉnh Khánh Hòa – nơi có điều kiện tự nhiên gần giống với ở Trường Sa (Phụ lục 30), công thức cải tạo cát san hô có sự kết hợp của các nhóm vi khuẩn sinh EPS, phân giải lân, cố định đạm, với giá thể hữu cơ và bentonite đã thu được kết quả khả quan với khả năng giữ nước, cấu trúc, hàm lượng dinh dưỡng trong đất được cải thiện, đặc biệt năng suất rau ở nhóm cát san hô cải tạo cao gấp 4–5 lần nhóm cát san hô nguyên trạng và ngang với đất canh tác thường [121].

Như vậy, *Bacillus velezensis* DTA1 là chủng vi khuẩn bản địa có giá trị sinh học kép, vừa thích nghi tốt với điều kiện khắc nghiệt của cát san hô mặn – khô tại Trường Sa, vừa có khả năng sinh tổng hợp EPS giàu nhóm chức ưa nước và hấp phụ cation. Kết quả cho thấy chủng này có tiềm năng ứng dụng trong cải tạo đất mặn, khô hạn và xử lý ô nhiễm môi trường, đặc biệt trong hấp phụ kim loại nặng và ổn định cấu trúc đất. Việc phát triển công nghệ nuôi cấy và chế phẩm vi sinh từ chủng DTA1 có thể góp phần phục

hồi đất thoái hóa ven biển, hướng tới nông nghiệp sinh học và kinh tế tuần hoàn bền vững. Tuy nhiên, cần tiếp tục nghiên cứu ở quy mô đồng ruộng và tối ưu quy trình sản xuất để đánh giá hiệu quả thực tiễn và khả năng ứng dụng lâu dài của chủng *Bacillus velezensis* DTA1 này.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

1. Đã tuyển chọn được chủng vi khuẩn bản địa *Bacillus velezensis* DTA1 (thuộc nhóm an toàn sinh học cấp 1) từ đất đảo Trường Sa, có khả năng chịu mặn lên tới 12,5% NaCl, chịu được stress mặn, kim loại nặng.

2. Giải trình tự toàn bộ hệ gen cho thấy chủng DTA1 mang đầy đủ hai cụm gen sinh tổng hợp EPS (theo con đường Wzx/Wzy và levansucrase) cùng nhiều gen chống chịu stress muối, oxy hóa và kim loại, làm sáng tỏ cơ chế di truyền liên quan đến khả năng thích nghi và sinh EPS.

3. Chủng *Bacillus velezensis* DTA1 sử dụng đa dạng nguồn carbon, sinh trưởng và sinh EPS ổn định trong khoảng rộng điều kiện muối, pH, nhiệt độ, đạt năng suất 32,80 g/L ở điều kiện tối ưu (7,26% sucrose, 3,27% NaCl, pH 8,46, 30 °C, 72 giờ). Nghiên cứu lần đầu chứng minh sucrose kích hoạt đồng thời 2 con đường tổng hợp EPS (Wzx/Wzy và levansucrase), tạo polymer gồm 5 monosaccharide với cấu trúc đa dạng và vượt trội hơn so với các điều kiện nuôi cấy không có sucrose cũng như so với các chủng *B. velezensis* khác (2–4 loại).

4. EPS tinh sạch có khối lượng phân tử $1,9 \times 10^5$ Da, cấu trúc mạng lưới đan xen, gồm các loại monosaccharide (glucose, rhamnose, fructose, mannose, N-acetylglucosamine) mang nhiều nhóm chức ưa nước và có khả năng hấp phụ ion kim loại.

5. EPSDTA1 có khả năng hấp phụ muối 0,25 g/g EPS, giữ nước tới 158,7 g/g EPS, và khi bổ sung vào cát san hô giúp tăng khả năng giữ nước 1,6–2 lần, tăng kết tụ và giảm mặn cho đất.

6. Thử nghiệm trồng rau mùng tơi quy mô chậu vai khẳng định hiệu quả của chủng *Bacillus velezensis* DTA1, đặc biệt khi kết hợp với giá thể hữu cơ và bentonite, giúp tăng hàm lượng carbohydrate đất 4,9–5,3 lần, khả năng giữ nước 2–2,5 lần và năng suất rau 2,36 lần so với đối chứng cát san hô; đồng thời giảm độ mặn và duy trì chỉ số SPAD cao hơn 1,26–1,60 lần ngay cả trong điều kiện stress mặn.

KIẾN NGHỊ

1. Tiếp tục nghiên cứu các đặc tính sinh học và đánh giá an toàn sinh học của chủng *B. velezensis* DTA1 trên động vật để phát triển chế phẩm vi sinh vật sinh EPS cải tạo đất.

2. Thử nghiệm hiệu quả cải tạo đất cát san hô để trồng nhiều loại cây xanh và rau khác.

3. Triển khai thử nghiệm ở quy mô đồng ruộng tại các đảo san hô Trường Sa và các vùng đất khô hạn, nhiễm mặn.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. **Lê Thị Huệ***, Vũ Duy Nhân, Lê Mai Hương, Đỗ Thị Tuyền (2024), Tuyển chọn chủng vi khuẩn chịu mặn, có khả năng sinh exopolysaccharide từ các đảo san hô ở Khánh Hòa, *TNU Journal of Science and Technology*, 229(13), tr. 386 – 393. doi.org/10.34238/tnu-jst.10566. (ACI, 1 điểm)
2. **Thi Hue Le***, Duy Nhan Vu, Thi Hoai Phuong Nguyen, Mai Huong Le, Cong Tinh Nguyen, Thi Tuyen Do, Van Thang Le, Mai Phuong Pham, Dinh Duy Vu* (2025), Amending coral soil using exopolysaccharide from salt-tolerant *Bacillus velezensis* TSD5 bacteria from an atoll in Vietnam, *Journal of Applied Biology & Biotechnology* 13(5), pp. 151-162. doi: 10.7324/JABB.2025.229116. (Scopus, Q3, 1,5 điểm)
3. **Thi Hue Le***, Hoang Tuan Dinh, Duy Nhan Vu, Mai Huong Le, Cong Tinh Nguyen, Quang Cuong Hoang (2025), Characterization and exopolysaccharide production of *Bacillus velezensis* DTA1 from Vietnamese atoll soil, *Journal of degraded and mining lands management*, 12(4), pp. 8305 - 8314, doi:10.15243/jdmlm.2025.124.8305. (Scopus, Q3, 1,5 điểm)
4. **Le H.T.***, Tran T.T.T.*, Nguyen S.T., La D.D., Vu N.D., Le M.H., Nguyen H.T. (2025), Genomic insights into salt-tolerant, exopolysaccharide-producing *Bacillus velezensis* DTA1 isolated from coral island soil in Vietnam: Implications for soil remediation, *One Ecosystem*, 10, pp. e158806. doi: 10.3897/oneeco.10.e158806. (ESCI/Scopus, Q1, 2 điểm)

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. UNEP, 1997, *World atlas of desertification - Second Edition*, United Nations Environment Program.
2. Zomer R.J., Xu J., Trabucco A., 2022, Version 3 of the global aridity index and potential evapotranspiration database, *Scientific Data*, 9(1), pp. 409.
3. Osman K.T., Osman K.T., 2018, Dryland soils, *Management of soil problems*, pp. 15-36.
4. Singh A., 2022, Soil salinity: A global threat to sustainable development, *Soil Use and Management*, 38(1), pp. 39-67.
5. Seifi M., Ahmadi A., Neyshabouri M.R., Taghizadeh-Mehrjardi R., Bahrami H.A., 2020, Remote and Vis-NIR spectra sensing potential for soil salinization estimation in the eastern coast of Urmia hyper saline lake, Iran, *Remote Sensing Applications: Society and Environment*, 20, pp. 100398.
6. Stavi I., Thevs N., Priori S., 2021, Soil salinity and sodicity in drylands: A review of causes, effects, monitoring, and restoration measures, *Frontiers in Environmental Science*, 9, pp. 712831.
7. Qadir M., Oster J.D., Schubert S., Noble A.D., Sahrawat K.L., 2007, Phytoremediation of sodic and saline-sodic soils, *Advances in agronomy*, 96, pp. 197-247.
8. Driessen P., Deckers J., Spaargaren O., Nachtergaele F., 2001, *Lecture notes on the major soils of the world*, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
9. Anjos L., Gaistardo C.C., DECKERS J., Dondeyne S., Eberhardt E., Gerasimova M., Harms B., Jones A., Krasilnikov P., Reinsch T., 2015, *World reference base for soil resources 2014 International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps*, World Soil Resources Reports.
10. Ramos T.B., Castanheira N., Oliveira A.R., Paz A.M., Darouich H., Simionesei L., Farzamian M., Gonçalves M.C., 2020, Soil salinity assessment using vegetation indices derived from Sentinel-2 multispectral data. application to Lezíria Grande, Portugal, *Agricultural Water Management*, 241, pp. 106387.
11. Metternicht G., Zinck A., 2008, *Remote sensing of soil salinization: Impact on land management*, CRC Press.
12. Division U., 2019, *World Population Prospects: 2019 Revision*, United Nations New York NY.

13. Díaz F.J., Sanchez-Hernandez J.C., Notario J.S., 2021, Effects of irrigation management on arid soils enzyme activities, *Journal of Arid Environments*, 185, pp. 104330.
14. Whitney K., Scudiero E., El-Askary H.M., Skaggs T.H., Allali M., Corwin D.L., 2018, Validating the use of MODIS time series for salinity assessment over agricultural soils in California, USA, *Ecological indicators*, 93, pp. 889-898.
15. Reid R., Hayes J., 2003, Mechanisms and control of nutrient uptake in plants, *International review of cytology*, 229(3), pp. 73-114.
16. Butcher K., Wick A.F., DeSutter T., Chatterjee A., Harmon J., 2016, Soil salinity: A threat to global food security, *Agronomy Journal*, 108(6), pp. 2189-2200.
17. Eckstein D., Künzel V., Schäfer L., Winges M., 2020, *Global Climate Risk Index 2020*, Germanwatch eV.
18. Buys P., Dasgupta S., Deichmann U., Laplante B., Meisner C., Pandey K., Wheeler D., Yan J., 2006, Sea level rise from global warming: potential impact on developing countries, *Washington DC, World Bank*.
19. Vien T.D., 2011, Climate change and its impact on agriculture in Vietnam, *Journal of the International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences*, 17(1), pp. 17-21.
20. Lương Văn Anh, 2023, Giải pháp phòng chống hạn hán, thiếu nước, xâm nhập mặn vùng đồng bằng sông Cửu Long, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ thủy lợi*, 79, tr. 14-23.
21. Đỗ Huy Cường (Chủ biên), Bùi Bảo Anh, Nguyễn Thị Nhân, Nguyễn Xuân Dũng, Phạm Hồng Cường, Lê Đình Nam, Nguyễn Thế Luân, 2019, *Xây dựng cơ sở dữ liệu WEBGIS quản lý môi trường biển đảo vùng quần đảo Trường Sa*, Nxb. Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, Hà Nội.
22. Trần Anh Tuấn, 2014, Nghiên cứu đặc điểm cảnh quan các đảo nổi san hô quần đảo Trường Sa, *Tạp chí khoa học và công nghệ biển*, 14(3), tr. 238-245.
23. Lê Đình Mậu, Nguyễn Thị Thùy Dung, Phạm Sỹ Hoàn, Nguyễn Văn Tuấn, Nguyễn Chí Công, Phan Thành Bắc, Nguyễn Đức Thịnh, 2019, Đặc điểm hoạt động của bão và áp thấp nhiệt đới tại vùng biển quần đảo Trường Sa, tỉnh Khánh Hòa, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Biển*, 19(4A), tr. 35–41.
24. Nguyễn Xuân Tình, 2015, Trường Sa: Qua chuyến đi khảo sát của các nhà khoa học, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Hải Dương*, 6.
25. Trần Duy Tứ, 1998, Khái quát một số nét về các điều kiện tự nhiên và lớp phủ thổ nhưỡng của một số đảo thuộc quần đảo Trường Sa, *Tuyển tập các công trình nghiên cứu về điều kiện tự nhiên và tài nguyên thiên nhiên vùng quần đảo Trường Sa*. Nxb. Khoa học & Kỹ thuật, Hà Nội., tr. 271-276.

26. Ray P., Meena B.L., Nath C., 2014, Management of coastal soils for improving soil quality and productivity, *Popular khети*, 2(1), pp. 95-99.
27. Lv C., Wu H., Shi M., Zhang D., 2024, Experimental study on the mechanical strength, deformation behavior and infiltration characteristics of coral sand, *Sustainability*, 16(8), pp. 3479.
28. Vũ Thị Quỳnh Chi, Nguyễn Công Việt, Ngô Thị Xinh, Nguyễn Thị Ngọc Anh, Lương Sơn Đại, 2022, Hiệu quả của chế phẩm, phụ gia trong cải thiện đặc tính đất cát san hô trên một số đảo thuộc quần đảo Trường Sa, *Tạp chí phân tích Hóa, Lý và Sinh học* 3(27), tr. 143-150.
29. Al-Busaidi A., Cookson P., 2004, Leaching potential of sea water in saline soils, *Journal of Agricultural and Marine Sciences*, 9(1), pp. 27-30.
30. Qadir M., Ghafoor A., Murtaza G., 2000, Amelioration strategies for saline soils: a review, *Land Degradation & Development*, 11(6), pp. 501-521.
31. Lehmann J., Joseph S., 2012, *Biochar for environmental management: science, technology and implementation*, Routledge.
32. Liu Q., He X., Wang K., Li D., 2023, Biochar drives humus formation during composting by regulating the specialized metabolic features of microbiome, *Chemical Engineering Journal*, 458, pp. 141380.
33. Vessey J.K., 2003, Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers, *Plant and soil*, 255, pp. 571-586.
34. Zhang H., Chen W., Zhao B., Phillips L.A., Zhou Y., Lapen D.R., Liu J., 2020, Sandy soils amended with bentonite induced changes in soil microbiota and fungistasis in maize fields, *Applied Soil Ecology*, 146, pp. 103378.
35. Weijing L., Jiaxi T., Yu L., Sizhu S., Xiaoyu J., Liyu H., Shuyu T., Miaomiao H., 2025, Biochar and bentonite application improves aeolian sandy soil health and enhances soil carbon sequestration and emission reduction potential, *Scientific Reports*, 15(1), pp. 2205.
36. Luo Y., Lopez J.B.G., van Veelen H.P.J., Kok D.-J.D., Postma R., Thijssen D., Sechi V., ter Heijne A., Bezemer T.M., Buisman C.J., 2024, Effects of different soil organic amendments (OAs) on extracellular polymeric substances (EPS), *European Journal of Soil Biology*, 121, pp. 103624.
37. Đặng Duy Minh, Trần Bá Linh, Trần Anh Đức, Châu Minh Khôi, 2020, Hiệu quả của chế phẩm cải tạo đất trong cải thiện đặc tính đất và sinh trưởng của lúa trong điều kiện đất nhiễm mặn, *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, 56, tr. 159-168.
38. Nguyễn Thu Hà, 2015, Chế phẩm vi sinh vật cải tạo đất chuyên dùng cho vùng trồng lạc, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 1, tr. 28.

39. Phạm Thị Diệp, Nguyễn Thị Hằng Nga, Trần Viết Ôn, 2021, Cải thiện các đặc tính giữ nước và chất dinh dưỡng của đất cát ven biển khu vực miền Trung bằng vật liệu đất giàu sét và phụ phẩm nông nghiệp, *Khoa học kỹ thuật thủy lợi và môi trường*, 74(6/2021), tr. 112-119.
40. Corral P., Amoozegar M.A., Ventosa A., 2019, Halophiles and their biomolecules: recent advances and future applications in biomedicine, *Marine drugs*, 18(1), pp. 33.
41. Yu F., Zhao C., Li K., Su L., Zhang S., Yue Q., Zhao L. *Salt-tolerant mechanism and application of salt-tolerant bacteria*. in *2022 International Conference on Green Environmental Materials and Food Engineering*, 2022: 111-116. 2022.
42. Mokashe N., Chaudhari B., Patil U., 2018, Operative utility of salt-stable proteases of halophilic and halotolerant bacteria in the biotechnology sector, *Int J Biol Macromol*, 117, pp. 493-522.
43. Zhang X., Lin Y., Chen G.Q., 2018, Halophiles as chassis for bioproduction, *Advanced Biosystems*, 2(11), pp. 1800088.
44. Uma G., Babu M.M., Prakash V.S.G., Nisha S.J., Citarasu T., 2020, Nature and bioprospecting of haloalkaliphilics: a review, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36, pp. 1-13.
45. Banerjee A., Sarkar S., Cuadros-Orellana S., Bandopadhyay R., 2019, Exopolysaccharides and biofilms in mitigating salinity stress: the biotechnological potential of halophilic and soil-inhabiting PGPR microorganisms, *Microorganisms in saline environments: Strategies and functions*, pp. 133-153.
46. Díaz-Cornejo S., Otero M.C., Banerjee A., Gordillo-Fuenzalida F., 2023, Biological properties of exopolysaccharides produced by *Bacillus* spp, *Microbiological Research*, 268, pp. 127276.
47. Barcelos M.C., Vespermann K.A., Pelissari F.M., Molina G., 2020, Current status of biotechnological production and applications of microbial exopolysaccharides, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(9), pp. 1475-1495.
48. Qi M., Zheng C., Wu W., Yu G., Wang P., 2022, Exopolysaccharides from marine microbes: Source, structure and application, *Marine Drugs*, 20(8), pp. 512.
49. Selim S., Almuhayawi M.S., Alharbi M.T., Nagshabandi M.K., Alanazi A., Warrad M., Hagagy N., Ghareeb A., Ali A.S., 2022, In vitro assessment of antistaphylococci, antitumor, immunological and structural characterization of acidic bioactive exopolysaccharides from marine *Bacillus cereus* isolated from Saudi Arabia, *Metabolites*, 12(2), pp. 132.
50. Vu T.H.N., Quach N.T., Nguyen N.A., Nguyen H.T., Ngo C.C., Nguyen T.D., Ho P.H., Hoang H., Chu H.H., Phi Q.T., 2021, Genome mining associated with analysis

of structure, antioxidant activity reveals the potential production of levan-rich exopolysaccharides by food-derived *Bacillus velezensis* VTX20, *Applied Sciences*, 11(15), pp. 7055.

51. Zou P., Ma S., Yuan Y., Ma J., Yang X., Hu X., Meng Q., Jing C., Li Y., 2024, A glucomannan produced by *Bacillus velezensis* HY23 and its growth promoting effect on soybeans under salt stress, *International Journal of Biological Macromolecules*, 275, pp. 133474.

52. Mahgoub A.M., Mahmoud M.G., Selim M.S., Awady M.E.E., 2018, Exopolysaccharide from marine *Bacillus velezensis* MHM3 induces apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells through a mitochondrial pathway, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 19(7), pp. 1957.

53. Alharbi M.A., Alrehaili A.A., Albureikan M.O.I., Gharib A.F., Daghistani H., Bakhuraysah M.M., Aloraini G.S., Bazuhair M.A., Alhuthali H.M., Ghareeb A., 2023, In vitro studies on the pharmacological potential, anti-tumor, antimicrobial, and acetylcholinesterase inhibitory activity of marine-derived *Bacillus velezensis* AG6 exopolysaccharide, *RSC advances*, 13(38), pp. 26406-26417.

54. Moghannem S.A., Farag M.M., Shehab A.M., Azab M.S., 2018, Exopolysaccharide production from *Bacillus velezensis* KY471306 using statistical experimental design, *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(3), pp. 452-462.

55. Chirakkara S.P., Abraham A., 2023, Exopolysaccharide from the mice ovarian bacterium *Bacillus velezensis* OM03 triggers caspase-3-dependent apoptosis in ovarian cancer cells, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 13(6), pp. 154-164.

56. Flemming H.C., Wingender J., 2010, The biofilm matrix, *Nature reviews microbiology*, 8(9), pp. 623-633.

57. Sutherland I.W., 2001, Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework, *Microbiology*, 147(1), pp. 3-9.

58. Badel S., Bernardi T., Michaud P., 2011, New perspectives for *Lactobacilli* exopolysaccharides, *Biotechnology advances*, 29(1), pp. 54-66.

59. Leemhuis H., Pijning T., Dobruchowska J.M., van Leeuwen S.S., Kralj S., Dijkstra B.W., Dijkhuizen L., 2013, Glucansucrases: three-dimensional structures, reactions, mechanism, α -glucan analysis and their implications in biotechnology and food applications, *Journal of biotechnology*, 163(2), pp. 250-272.

60. Kambourova M., Oner E.T., Poli A., 2015, *Exopolysaccharides from prokaryotic microorganisms—promising sources for white biotechnology processes*, Elsevier.

61. Liu W., Wei Y., Xiang R., Dong B., Yang X., 2025, Lactic acid bacteria exopolysaccharides unveiling multifaceted insights from structure to application in foods and health promotion, *Foods*, 14(5), pp. 823.
62. Mohd Nadzir M., Nurhayati R.W., Idris F.N., Nguyen M.H., 2021, Biomedical applications of bacterial exopolysaccharides: A review, *Polymers*, 13(4), pp. 530.
63. Cuthbertson L., Mainprize I.L., Naismith J.H., Whitfield C., 2009, Pivotal roles of the outer membrane polysaccharide export and polysaccharide copolymerase protein families in export of extracellular polysaccharides in gram-negative bacteria, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73(1), pp. 155-177.
64. Schmid J., Sieber V., Rehm B., 2015, Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies, *Frontiers in microbiology*, 6, pp. 496.
65. Audy J., Labrie S., Roy D., LaPointe G., 2010, Sugar source modulates exopolysaccharide biosynthesis in *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* CRC 002, *Microbiology (Reading)*, 156(Pt 3), pp. 653-664.
66. Wang J., Goh K.M., Salem D.R., Sani R.K., 2019, Genome analysis of a thermophilic exopolysaccharide-producing bacterium-*Geobacillus* sp. WSUCF1, *Scientific reports*, 9(1), pp. 1608.
67. Madhuri K., Vidya Prabhakar K., 2014, Microbial exopolysaccharides: biosynthesis and potential applications, *Oriental journal of chemistry*, 30(3), pp. 1401-1410.
68. Welman A.D., Maddox I.S., 2003, Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges, *Trends in Biotechnology*, 21(6), pp. 269-74.
69. Zhao X., Liang Q., Song X., Zhang Y., 2023, Whole genome sequence of *Lactiplantibacillus plantarum* MC5 and comparative analysis of eps gene clusters, *Frontiers in Microbiology*, 14, pp. 1146566.
70. Costa O.Y., Raaijmakers J.M., Kuramae E.E., 2018, Microbial extracellular polymeric substances: ecological function and impact on soil aggregation, *Frontiers in microbiology*, 9, pp. 1636.
71. Qurashi A.W., Sabri A.N., 2012, Bacterial exopolysaccharide and biofilm formation stimulate chickpea growth and soil aggregation under salt stress, *Brazilian Journal of Microbiology*, 43, pp. 1183-1191.
72. Bhagat N., Raghav M., Dubey S., Bedi N., 2021, Bacterial exopolysaccharides: Insight into their role in plant abiotic stress tolerance, *Journal of microbiology and biotechnology*, 31(8), pp. 1045.
73. Zhang H., Wang K., Liu X., Yao L., Chen Z., Han H., 2024, Exopolysaccharide-producing bacteria regulate soil aggregates and bacterial communities to inhibit the uptake of cadmium and lead by lettuce, *Microorganisms*, 12(11), pp. 1800088.

74. Ahmed Z., Wang Y., Anjum N., Ahmad A., Khan S.T., 2013, Characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir–Part II, *Food Hydrocolloids*, 30(1), pp. 343-350.
75. Jiang G., Gan L., Li X., He J., Zhang S., Chen J., Zhang R., Xu Z., Tian Y., 2021, Characterization of structural and physicochemical properties of an exopolysaccharide produced by *Enterococcus* sp. F2 from fermented soya beans, *Frontiers in Microbiology*, 12, pp. 744007.
76. Banerjee A., Mohammed Breig S.J., Gómez A., Sánchez-Arévalo I., González-Faune P., Sarkar S., Bandopadhyay R., Vuree S., Cornejo J., Tapia J., 2022, Optimization and characterization of a novel exopolysaccharide from *Bacillus haynesii* CamB6 for food applications, *Biomolecules*, 12(6), pp. 834.
77. Huang X., Wang S., Fu L., Fang F., 2022, Characterization of Extracellular Polymeric Substances by Microscopic Imaging Techniques in Wastewater Biotreatment: A Review, *Environmental Engineering Science*, 39(6), pp. 493-585.
78. Yang H., Wu D., Li H., Hu C., 2023, The extracellular polysaccharide determine the physico-chemical surface properties of *Microcystis*, *Frontiers in Microbiology*, 14, pp. 1285229.
79. Insulkar P., Kerkar S., Lele S.J.I.j.o.b.m., 2018, Purification and structural-functional characterization of an exopolysaccharide from *Bacillus licheniformis* PASS26 with in-vitro antitumor and wound healing activities, 120, pp. 1441-1450.
80. Li Y., Narayanan M., Shi X., Chen X., Li Z., Ma Y., 2024, Biofilms formation in plant growth-promoting bacteria for alleviating agro-environmental stress, *Science of the total environment*, 907, pp. 167774.
81. Le Costaouëc T., Cérantola S., Ropartz D., Ratiskol J., Siquin C., Collicec-Jouault S., Boisset C., 2012, Structural data on a bacterial exopolysaccharide produced by a deep-sea *Alteromonas macleodii* strain, *Carbohydrate polymers*, 90(1), pp. 49-59.
82. Sahana T., Rekha P., 2020, A novel exopolysaccharide from marine bacterium *Pantoea* sp. YU16-S3 accelerates cutaneous wound healing through Wnt/ β -catenin pathway, *Carbohydrate polymers*, 238, pp. 116191.
83. Su Z., Cao Y., Li M., Chen Y., Li G., Yu Q., Ma T., 2023, Bismuth oxychloride microsphere-assisted construction of bacterial consortia for enhanced petroleum hydrocarbon degradation under high-salt stress, *Chemical Engineering Journal*, 474, pp. 145668.
84. Mohamed L., Mohamed S., El Saeid F., Sayed M., Ali N., Abd El Rahman E., Wahab M.A., Ibrahim M., Ghaly A., 2020, Enhancing the structure of sandy soil by biological molecules: An innovative approach to water conservation in newly reclaimed

desert-agricultural land, *International Journal of Bioprocess & Biotechnological Advancements*, 6(1), pp. 188-214.

85. Cheng C., Shang-Guan W., He L., Sheng X., 2020, Effect of exopolysaccharide-producing bacteria on water-stable macro-aggregate formation in soil, *Geomicrobiology Journal*, 37(8), pp. 738-745.

86. Nguyễn Thu Hà, Phạm Văn Toàn, 2015, Tiềm năng sử dụng vi sinh vật đối với cây lạc trên đất cát biển tại Bình Định, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, tr. 98-105.

87. Nguyễn Kiều Băng Tâm, 2009, *Nghiên cứu ứng dụng chế phẩm nấm men *Lipomyces sinh màng nhầy* nhằm giữ ẩm và cải thiện một số tính chất đất dốc tại huyện Mê Linh, tỉnh Vĩnh Phúc*, Luận án Tiến sĩ Thổ nhưỡng học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.

88. Goodwin S., McPherson J.D., McCombie W.R., 2016, Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies, *Nature reviews genetics*, 17(6), pp. 333-351.

89. Yuan J., Zong M., Chen J., Liu Z., Wang Y., Chu C., Zhong Y., Yi J., Wang T., 2025, Whole genome sequencing analysis of a novel exopolysaccharide-producing *Bacillus velezensis* and its impact on the quality of soy sauce, *Food Chemistry: X*, 28, pp. 102585.

90. Wu R., Qin Y., Shen Q., Li P., 2020, The complete genome sequence of *Bacillus velezensis* LPL061, an exopolysaccharide-producing bacterium, *3 Biotech*, 10(6), pp. 243.

91. Nguyen N.L., Van Dung V., Van Tung N., Nguyen T.K.L., Quan N.D., Giang T.T.H., Ngan N.T.T., Hien N.T., Nguyen H.-H., 2023, Draft genome sequencing of halotolerant bacterium *Salinicola* sp. DM10 unravels plant growth-promoting potentials, *3 Biotech*, 13(12), pp. 416.

92. Wu X., Wu H., Wang R., Wang Z., Zhang Y., Gu Q., Farzand A., Yang X., Semenov M., Borriss R., 2021, Genomic features and molecular function of a novel stress-tolerant *Bacillus* halotolerans strain isolated from an extreme environment, *Biology*, 10(10), pp. 1030.

93. Wang Z., Li N., Xu Y., Wang W., Liu Y., 2024, Functional activity of endophytic bacteria G9H01 with high salt tolerance and anti-*Magnaporthe oryzae* that isolated from saline-alkali-tolerant rice, *Science of The Total Environment*, 926, pp. 171822.

94. Nguyen T.L.H., Hijikata M., Maeda S., Thuong P.H., Ohashi J., Van Huan H., Hoang N.P., Miyabayashi A., Cuong V.C., Seto S., 2019, Whole genome sequencing, analyses of drug resistance-conferring mutations, and correlation with transmission of

- Mycobacterium tuberculosis* carrying katG-S315T in Hanoi, Vietnam, *Scientific reports*, 9(1), pp. 15354.
95. Le H.T.T., Hoang T.T., Nguyen N.A.T., Nguyen S.N., Nguyen U.D., Hoang C.X., Vo N.S., Le D.Q., Nguyen S.H., Cao M.D., Ho T.H., 2024, Whole-genome sequencing reveals temporal trends in antibiotic resistance genes in *Escherichia coli* causing pediatric urinary tract infections in central Vietnam, *Antibiotics (Basel)*, 13(9), pp. 830.
 96. Đặng Thị Thanh Sơn, Trần Thị Nhật, Phan Thị Phương Thảo, Nguyễn Thị Thanh Thủy, Etienne Loire, Trương Nhật Mỹ, 2024, Đặc điểm các gen kháng colistin và một số kháng sinh quan trọng của vi khuẩn *Escherichia coli* phân lập từ chất thải của lợn và người chăn nuôi tại Sóc Sơn, Hà Nội, *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 22(11), tr. 1468-1478.
 97. Le N.G., Le T.H.M., Vu T.Q., Nguyen M.A., Nguyen T.K.C., Vu T.T.H., 2020, Genome mining of a marine-derived *Streptomyces* sp. PDH23 isolated from sponge in Da Nang sea for secondary metabolite gene clusters, *Vietnam Journal of Biotechnology*, 18(4), pp. 709-721.
 98. Lê Thị Thanh Tâm, Phạm Thị Lương, Lê Thị Phương Thảo, Jennifer Jähne, Peter Lasch, Rainer Borriss, 2023, Phân lập, tuyển chọn và xác định các chủng vi khuẩn bản địa có khả năng kích thích sinh trưởng và đối kháng chống lại nấm bệnh *Fusarium oxysporum* và tuyến trùng nốt sưng *Meloidogyne* sp. ở Việt Nam, *Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 65(9), tr. 39-45.
 99. Nguyen T.L.A., Dang H.T.C., Koekkoek J., Braster M., Parsons J.R., Brouwer A., de Boer T., van Spanning R.J., 2021, Species and metabolic pathways involved in bioremediation of Vietnamese soil From Bien Hoa Airbase contaminated With herbicides, *Frontiers in Sustainable Cities*, 3, pp. 692018.
 100. Vu N.T., Quach T.N., Dao X.T., Le H.T., Le C.P., Nguyen L.T., Le L.T., Ngo C.C., Hoang H., Chu H.H., Phi Q.T., 2021, A genomic perspective on the potential of termite-associated *Cellulosimicrobium cellulans* MP1 as producer of plant biomass-acting enzymes and exopolysaccharides, *PeerJ*, 9, pp. e11839.
 101. Ramya P., Sangeetha, Anooj E.S., Gangadhar L., 2020, Isolation, identification and screening of exopolysaccharides from marine bacteria, *Annals of Tropical Medicine and Public Health*, 23(2020), pp. 923-940.
 102. Sharma A., Dev K., Sourirajan A., Choudhary M., 2021, Isolation and characterization of salt-tolerant bacteria with plant growth-promoting activities from saline agricultural fields of Haryana, India, *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(1), pp. 99.

103. Li P.-S., Kong W.-L., Wu X.-Q., 2021, Salt tolerance mechanism of the rhizosphere bacterium JZ-GX1 and its effects on tomato seed germination and seedling growth, *Frontiers in Microbiology*, 12, pp. 657238.
104. Box G.E., Behnken D.W., 1960, Some new three level designs for the study of quantitative variables, *Technometrics*, 2(4), pp. 455-475.
105. Miller C.S., Handley K.M., Wrighton K.C., Frischkorn K.R., Thomas B.C., Banfield J.F., 2013, Short-read assembly of full-length 16S amplicons reveals bacterial diversity in subsurface sediments, *PloS one*, 8(2), pp. e56018.
106. Chen S., Zhou Y., Chen Y., Gu J., 2018, fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor, *Bioinformatics*, 34(17), pp. i884-i890.
107. Prjibelski A., Antipov D., Meleshko D., Lapidus A., Korobeynikov A., 2020, Using SPAdes De Novo Assembler, *Curr Protoc Bioinformatics*, 70(1), pp. e102.
108. Gurevich A., Saveliev V., Vyahhi N., Tesler G., 2013, QUAST: quality assessment tool for genome assemblies, *Bioinformatics*, 29(8), pp. 1072-5.
109. Schwengers O., Jelonek L., Dieckmann M.A., Beyvers S., Blom J., Goesmann A., 2021, Bakta: rapid and standardized annotation of bacterial genomes via alignment-free sequence identification, *Microbial genomics*, 7(11), pp. 000685.
110. Seemann T., 2014, Prokka: rapid prokaryotic genome annotation, *Bioinformatics*, 30(14), pp. 2068-9.
111. Shimoyama Y., 2022, COGclassifier: a tool for classifying prokaryote protein sequences into COG functional category, *Computer software. Available from: <https://github.com/moshi4/COGclassifier>*.
112. Kanehisa M., Sato Y., Morishima K., 2016, BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG tools for functional characterization of genome and metagenome sequences, *Journal of molecular biology*, 428(4), pp. 726-731.
113. Kanehisa M., Goto S., 2000, KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes, *Nucleic acids research*, 28(1), pp. 27-30.
114. van den Belt M., Gilchrist C., Booth T.J., Chooi Y.H., Medema M.H., Alanjary M., 2023, CAGECAT: The CompArative GEne Cluster Analysis Toolbox for rapid search and visualisation of homologous gene clusters, *BMC Bioinformatics*, 24(1), pp. 181.
115. Zhao D., Jiang J., Du R., Guo S., Ping W., Ling H., Ge J., 2019, Purification and characterization of an exopolysaccharide from *Leuconostoc lactis* L2, *International Journal of Biological Macromolecules*, 139, pp. 1224-1231.

116. DuBois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F., 1956, Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Analytical chemistry*, 28(3), pp. 350-356.
117. Bradford M.M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical biochemistry*, 72(1-2), pp. 248-254.
118. Shao L., Wu Z., Tian F., Zhang H., Liu Z., Chen W., Guo B., 2015, Molecular characteristics of an exopolysaccharide from *Lactobacillus rhamnosus* KF5 in solution, *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, pp. 1429-1434.
119. Cheah C., Cheow Y.L., Ting A.S.Y., 2022, Co-cultivation, metal stress and molasses: strategies to improving exopolymeric yield and metal removal efficacy, *Sustainable Environment Research*, 32(1), pp. 9.
120. Andrew M., Jayaraman G., 2022, Molecular characterization and biocompatibility of exopolysaccharide produced by moderately halophilic bacterium *Virgibacillus dokdonensis* from the Saltern of Kumta coast, *Polymers (Basel)*, 14(19), pp. 3986.
121. Nguyễn Công Tinh, Vũ Minh Tiến, Vũ Duy Nhân, Lê Thị Huệ, Võ Thị Hoài Thu, Đinh Thị Thu Trang, Đỗ Thị Thuý, Nguyễn Văn Tú, Đỗ Vĩnh Trường, 2025, Nâng cao hiệu quả giữ nước, dinh dưỡng của cát san hô bằng chế phẩm vi sinh vật sinh màng nhầy polysaccharide và vi sinh vật hữu ích chịu mặn, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ nhiệt đới*, 38(06-2025), tr. 60-74.
122. Vardharajula S., 2014, Exopolysaccharide production by drought tolerant *Bacillus* spp. and effect on soil aggregation under drought stress, *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 4(1), pp. 51.
123. Brischke C., Wegener F.L., 2019, Impact of Water Holding Capacity and Moisture Content of Soil Substrates on the Moisture Content of Wood in Terrestrial Microcosms, *Forests*, 10(6), pp. 485.
124. Water holding capacity of garden soil and roadside soil, *12th Botany : Practicals*, pp. https://www.brainkart.com/article/Water-holding-capacity-of-garden-soil-and-roadside-soil_38350/.
125. Kasotia A., Varma A., Tuteja N., Choudhary D.K., 2016, Amelioration of soybean plant from saline-induced condition by exopolysaccharide producing *Pseudomonas*-mediated expression of high affinity K⁺-transporter (HKT1) gene, *Current Science*, pp. 1961-1967.
126. Kurniati T.H., Syahbani N., Rahayu S., 2024, *Screening and identification of exopolysaccharide-producing bacteria from pickled fruit*. in *AIP Conference Proceedings*, AIP Publishing LLC.

127. Buksa K., Kowalczyk M., Boreczek J., 2021, Extraction, purification and characterisation of exopolysaccharides produced by newly isolated lactic acid bacteria strains and the examination of their influence on resistant starch formation, *Food Chemistry*, 362, pp. 130221.
128. Dang N.T., Phan T.T.H., Tran H.T., 2024, Biofilm biosynthesis of *Priestia megaterium* M1VB5 strain Muc Son Thanh Hoa paper mill, *Journal of Science and Technology Development*, 27(1), pp. 3301-3307.
129. Abiala M., Sadhukhan A., Sahoo L., 2023, Isolation and characterization of stress-tolerant priestia species from cowpea rhizosphere under drought and nutrient deficit conditions, *Current Microbiology*, 80(5), pp. 140.
130. Shahid M., Zeyad M.T., Syed A., Singh U.B., Mohamed A., Bahkali A.H., Elgorban A.M., Pichtel J., 2022, Stress-tolerant endophytic isolate *Priestia aryabhattai* BPR-9 modulates physio-biochemical mechanisms in wheat (*Triticum aestivum* L.) for enhanced salt tolerance, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(17), pp. 10883.
131. Hwang H.H., Chien P.R., Huang F.C., Yeh P.H., Hung S.H.W., Deng W.L., Huang C.C., 2022, A plant endophytic bacterium *Priestia megaterium* strain BP-R2 isolated from the halophyte *Bolboschoenus planiculmis* enhances plant growth under salt and drought stresses, *Microorganisms*, 10(10), pp. 2047.
132. <https://bacdiv.dsmz.de/strain/23706?utm>.
133. Rabbee M.F., Hwang B.S., Baek K.H., 2023, *Bacillus velezensis*: a beneficial biocontrol agent or facultative phytopathogen for sustainable agriculture, *Agronomy*, 13(3), pp. 840.
134. Kim M.J., Shim C.K., Park J.H., 2021, Control efficacy of *Bacillus velezensis* AFB2-2 against potato late blight caused by *Phytophthora infestans* in organic potato cultivation, *The Plant Pathology Journal*, 37(6), pp. 580.
135. Le T.H., Vu D.N., Nguyen T.H.P., Le M.H., Nguyen C.T., Do T.T., Le V.T., Pham M.P., Vu D.D., 2025, Amending coral soil using exopolysaccharide from salt-tolerant *Bacillus velezensis* TSD5 bacteria from an atoll in Vietnam, *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 13(5), pp. 151-162.
136. Zhao X., Chen G., Wang F., Zhao H., Wei Y., Liu L., Zhang H., 2022, Extraction, characterization, antioxidant activity and rheological behavior of a polysaccharide produced by the extremely salt tolerant *Bacillus subtilis* LR-1, *LWT*, 162(4), pp. 113413.
137. Herrera-Calderon A.C., Leal L., Suárez-Bautista J.D., Manotas-Viloria H.S., Muñoz-García A., Franco D., Arenas N.E., Vanegas J., 2024, Metagenomic and genomic analysis of heavy metal-tolerant and-resistant bacteria in resource islands in a

semi-arid zone of the Colombian Caribbean, *Environmental Science and Pollution Research*, 31(4), pp. 5596-5609.

138. Pereira F., Kerkar S., Dias D.S., Gobre V.V., 2023, A halophilic *Chromohalobacter* species from estuarine coastal waters as a detoxifier of manganese, as well as a novel bio-catalyst for synthesis of n-butyl acetate, *Frontiers in Microbiology*, 14, pp. 1159018.

139. Zadeh H.P., Feroso F.G., Collins G., Serrano A., Mills S., Abram F., 2023, Impacts of metal stress on extracellular microbial products, and potential for selective metal recovery, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 252, pp. 114604.

140. Chen X.H., Koumoutsi A., Scholz R., Eisenreich A., Schneider K., Heinemeyer I., Morgenstern B., Voss B., Hess W.R., Reva O., 2007, Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, *Nature biotechnology*, 25(9), pp. 1007-1014.

141. Tchieu J.H., Norris V., Edwards J.S., Saier Jr M.H., 2001, The complete phosphotransferase system in *Escherichia coli*, *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 3(3), pp. 329-46.

142. Hengstenberg W., Penberthy W., Hill K.L., Morse M., 1969, Phosphotransferase system of *Staphylococcus aureus*: its requirement for the accumulation and metabolism of galactosides, *Journal of Bacteriology*, 99(2), pp. 383-388.

143. Morabbi Heravi K., Altenbuchner J., 2018, Cross talk among transporters of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system in *Bacillus subtilis*, *Journal of bacteriology*, 200(19), pp. 10-1128.

144. Arbour C.A., Nagar R., Bernstein H.M., Ghosh S., Al-Sammarraie Y., Dorfmueller H.C., Ferguson M.A., Stanley-Wall N.R., Imperiali B., 2023, Defining early steps in *Bacillus subtilis* biofilm biosynthesis, *MBio*, 14(5), pp. e00948-23.

145. Zeidan A.A., Poulsen V.K., Janzen T., Buldo P., Derkx P.M., Øregaard G., Neves A.R., 2017, Polysaccharide production by lactic acid bacteria: from genes to industrial applications, *FEMS microbiology reviews*, 41(Supp_1), pp. S168-S200.

146. Dogsa I., Bellich B., Blaznik M., Lagatolla C., Ravenscroft N., Rizzo R., Stopar D., Cescutti P., 2024, *Bacillus subtilis* EpsA-O: A novel exopolysaccharide structure acting as an efficient adhesive in biofilms, *npj Biofilms and Microbiomes*, 10(1), pp. 98.

147. Marvasi M., Visscher P.T., Casillas Martinez L., 2010, Exopolymeric substances (EPS) from *Bacillus subtilis*: polymers and genes encoding their synthesis, *FEMS microbiology letters*, 313(1), pp. 1-9.

148. Pereira Y., Petit-Glatron M.-F., Chambert R., 2001, *yveB*, encoding endolevanase LevB, is part of the *sacB–yveB–yveA* levansucrase tricistronic operon in *Bacillus subtilis*, *Microbiology*, 147(12), pp. 3413-3419.
149. Daguer J.P., Geissmann T., Petit-Glatron M.F., Chambert R., 2004, Autogenous modulation of the *Bacillus subtilis sacB-levB-yveA* levansucrase operon by the *levB* transcript, *Microbiology (Reading)*, 150(Pt 11), pp. 3669-3679.
150. Ayaz M., Ali Q., Jiang Q., Wang R., Wang Z., Mu G., Khan S.A., Khan A.R., Manghwar H., Wu H., 2022, Salt tolerant *Bacillus* strains improve plant growth traits and regulation of phytohormones in wheat under salinity stress, *Plants*, 11(20), pp. 2769.
151. Na H.E., Heo S., Kim Y.S., Kim T., Lee G., Lee J.H., Jeong D.W., 2022, The safety and technological properties of *Bacillus velezensis* DMB06 used as a starter candidate were evaluated by genome analysis, *Lwt*, 161, pp. 113398.
152. Li N., Liu J., Yang R., Wu L., 2020, Distribution, characteristics of extracellular polymeric substances of *Phanerochaete chrysosporium* under lead ion stress and the influence on Pb removal, *Scientific Reports*, 10(1), pp. 17633.
153. Li C., Zheng C., Fu H., Zhai S., Hu F., Naveed S., Zhang C., Ge Y., 2021, Contrasting detoxification mechanisms of *Chlamydomonas reinhardtii* under Cd and Pb stress, *Chemosphere*, 274, pp. 129771.
154. Lian Z., Yang Z., Song W., Sun M., Gan Y., Bai X., 2022, Effects of different exogenous cadmium compounds on the chemical composition and adsorption properties of two gram-negative bacterial EPS, *Science of the Total Environment*, 806, pp. 150511.
155. Silver S., 1996, Bacterial resistances to toxic metal ions-a review, *Gene*, 179(1), pp. 9-19.
156. Sato T., Kobayashi Y., 1998, The *ars* operon in the skin element of *Bacillus subtilis* confers resistance to arsenate and arsenite, *Journal of bacteriology*, 180(7), pp. 1655-1661.
157. Boukhelata N., Taguett F., Kaci Y., 2019, Characterization of an extracellular polysaccharide produced by a Saharan bacterium *Paenibacillus tarimensis* REG 0201M, *Annals of Microbiology*, 69, pp. 93-106.
158. Abou-Dobara M., El-Fallal A., Toson E., Abbas A., El-Feky F., 2014, Optimization of exopolysaccharides production by *Bacillus subtilis*, *Scientific Journal for Damietta Faculty of Science*, 3(1), pp. 11-21.
159. Biswas J., Paul A., 2017, Optimization of factors influencing exopolysaccharide production by *Halomonas xianhensis* SUR308 under batch culture, *AIMS Microbiology*, 3(3), pp. 564–579.

160. Almutairi M.H., Helal M.M., 2021, Exopolysaccharide production from isolated *Enterobacter* sp. strain ACD2 from the northwest of Saudi Arabia, *Journal of King Saud University-Science*, 33(2), pp. 101318.
161. Radchenkova N., Yaşar Yıldız S., 2025, Advanced optimization of bioprocess parameters for exopolysaccharides synthesis in extremophiles, *Processes*, 13(3), pp. 822.
162. Hassan S.W., Ibrahim H.A., 2017, Production, characterization and valuable applications of exopolysaccharides from marine *Bacillus subtilis* SH1, *Polish Journal of Microbiology*, 66(4), pp. 449.
163. Rao B., Sudharsan K., Sekaran R., Mandal A., 2013, Characterization of exopolysaccharide from *Bacillus amyloliquefaciens* BPRGS for its biofloculant activity, *International Journal of Scientific and Engineering Research*, 4(10), pp. 1696-1704.
164. Guan X., Yao H., 2008, Optimization of Viscozyme L-assisted extraction of oat bran protein using response surface methodology, *Food chemistry*, 106(1), pp. 345-351.
165. Singh R.P., Shukla M.K., Mishra A., Kumari P., Reddy C., Jha B., 2011, Isolation and characterization of exopolysaccharides from seaweed associated bacteria *Bacillus licheniformis*, *Carbohydrate polymers*, 84(3), pp. 1019-1026.
166. Wei M., Geng L., Wang Q., Yue Y., Wang J., Wu N., Wang X., Sun C., Zhang Q., 2021, Purification, characterization and immunostimulatory activity of a novel exopolysaccharide from *Bacillus* sp. H5, *International Journal of Biological Macromolecules*, 189, pp. 649-656.
167. Liu Z., Zhang Z., Qiu L., Zhang F., Xu X., Wei H., Tao X., 2017, Characterization and bioactivities of the exopolysaccharide from a probiotic strain of *Lactobacillus plantarum* WLPL04, *Journal of Dairy Science*, 100(9), pp. 6895-6905.
168. Or D., Phutane S., Dechesne A., 2007, Extracellular polymeric substances affecting pore-scale hydrologic conditions for bacterial activity in unsaturated soils, *Vadose Zone Journal*, 6(2), pp. 298-305.
169. Cao C., Liu Y., Li Y., Zhang Y., Zhao Y., Wu R., Wu J., 2020, Structural characterization and antioxidant potential of a novel exopolysaccharide produced by *Bacillus velezensis* SN-1 from spontaneously fermented Da-Jiang, *Glycoconjugate Journal*, 37, pp. 307-317.
170. Gomaa M., Yousef N., 2020, Optimization of production and intrinsic viscosity of an exopolysaccharide from a high yielding *Virgibacillus salarius* BM02: study of its potential antioxidant, emulsifying properties and application in the mixotrophic

cultivation of *Spirulina platensis*, *International journal of biological macromolecules*, 149, pp. 552-561.

171. Gandhi H.P., Ray R.M., Patel R.M., 1997, Exopolymer production by *Bacillus* species, *Carbohydrate polymers*, 34(4), pp. 323-327.

172. Kačuráková M., Wilson R., 2001, Developments in mid-infrared FT-IR spectroscopy of selected carbohydrates, *Carbohydrate polymers*, 44(4), pp. 291-303.

173. Yu H., Yang A., Wang K., Li Q., Ye D., Huang H., Zhang X., Wang Y., Zheng Z., Li T., 2021, The role of polysaccharides functional groups in cadmium binding in root cell wall of a cadmium-safe rice line, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 226, pp. 112818.

174. Li S.W., Sheng G.P., Cheng Y.Y., Yu H.Q., 2016, Redox properties of extracellular polymeric substances (EPS) from electroactive bacteria, *Scientific reports*, 6(1), pp. 39098.

175. Tareb R., Bernardeau M., Amiel C., Vernoux J.-P., 2017, Usefulness of FTIR spectroscopy to distinguish rough and smooth variants of *Lactobacillus farciminis* CNCM-I-3699, *Microbiology Letters*, 364(2), pp. fnw298.

176. Nikonenko N., Buslov D., Sushko N., Zhbakov R., 2002, Analysis of the structure of carbohydrates with use of the regularized deconvolution method of vibrational spectra, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 4(2), pp. 13-16.

177. Binmad S., Numnuam A., Kaewtatip K., Kantachote D., Tantirungkij M., 2022, Characterization of novel extracellular polymeric substances produced by *Bacillus velezensis* P1 for potential biotechnological applications, *Polymers for Advanced Technologies*, 33(8), pp. 2470-2479.

178. Arora M., Kaushik A., Rani N., Kaushik C., 2010, Effect of cyanobacterial exopolysaccharides on salt stress alleviation and seed germination, *Journal of Environmental Biology*, 31(5), pp. 701-704.

179. Mi J., Gregorich E.G., Xu S., McLaughlin N.B., Liu J., 2020, Effect of bentonite as a soil amendment on field water-holding capacity, and millet photosynthesis and grain quality, *Scientific Reports*, 10(1), pp. 18282.

180. Chenu C., 1993, *Clay—or sand—polysaccharide associations as models for the interface between micro-organisms and soil: water related properties and microstructure*, Elsevier.

181. Rosenzweig R., Shavit U., Furman A., 2012, Water retention curves of biofilm-affected soils using xanthan as an analogue, *Soil Science Society of America Journal*, 76(1), pp. 61-69.

182. Marchus K.A., Blankinship J.C., Schimel J.P., 2018, Environmental controls on extracellular polysaccharide accumulation in a California grassland soil, *Soil Biology and Biochemistry*, 125, pp. 86-92.
183. Wang S., Redmile-Gordon M., Mortimer M., Cai P., Wu Y., Peacock C.L., Gao C., Huang Q., 2019, Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from red soils (Ultisols), *Soil biology and biochemistry*, 135, pp. 283-285.
184. Weil R.R., Brady N.C., Weil R.R., 2017, *The nature and properties of soils*, Pearson London, UK.
185. Tewari S., 2023, *Pseudomonas* exopolysaccharides: A game changer for attaining environmental sustainability, *Austin Environmental Sciences*, 8(3), pp. 1100.
186. Mahdi I., Allaoui A., Fahsi N., Biskri L., 2022, *Bacillus velezensis* QA2 potentially induced salt stress tolerance and enhanced phosphate uptake in quinoa plants, *Microorganisms*, 10(9), pp. 1836.
187. Herts A., Kononchuk O., Pidlisnyuk V., Herts N., Khomenchuk V., Markiv V., Horyn O., 2024, Influence of two types of biochars on the photosynthetic apparatus of prickly-seeded spinach (*Spinacia oleracea* L.), *Agricultural Science and Practice*, 11(1), pp. 56-69.
188. Nguyen T.K., 2024, Optimization of biochar and compost dosage to improve yield and quality of *Malabar spinach* (*Basella alba*), *International Journal of Advanced Research*, 12(7), pp. 1217-1225.

DANH MỤC CÁC PHỤ LỤC

- Phụ lục 1. Vị trí lấy mẫu đất và hình ảnh đĩa khuẩn lạc tổng số trên môi trường LB đặc chứa NaCl 3% từ các mẫu đất thu thập ở 3 đảo tại Trường Sa
- Phụ lục 2. Các thiết bị, hóa chất và môi trường sử dụng
- Phụ lục 3. Ý nghĩa thông kê của các sai khác về giá trị OD600 và hàm lượng EPS giữa các chủng vi khuẩn khảo sát
- Phụ lục 4. Kết quả kiểm tra khả năng sử dụng các nguồn carbon của *B. velezensis* DTA1 sử dụng kit API® 50CHB ở các thời điểm bắt đầu (A) và sau 48 giờ ủ (B)
- Phụ lục 5. Khả năng sinh trưởng của chủng *B. velezensis* DTA1 ở nồng độ muối NaCl/MgSO₄ từ 0–17,5% (w/v) (A), nồng độ kim loại nặng Cd, Hg, Cr, Co, As 1–128 µg/ml (B) và Pb, Zn, Fe từ 150–1050 µg/mL (C)
- Phụ lục 6. Ý nghĩa thông kê của các sai khác về giá trị OD600 và hàm lượng EPS giữa các môi trường nuôi cấy khảo sát
- Phụ lục 7. Ý nghĩa thông kê của các sai khác về giá trị OD600 và hàm lượng EPS giữa các nguồn carbon khảo sát
- Phụ lục 8. Ý nghĩa thông kê của các sai khác về giá trị OD600 và hàm lượng EPS giữa các nồng độ sucrose khảo sát.
- Phụ lục 9. Ý nghĩa thông kê của các sai khác về giá trị OD600 và hàm lượng EPS giữa các nguồn nitơ khảo sát
- Phụ lục 10. Ý nghĩa thông kê của các sai khác về giá trị OD600 và hàm lượng EPS giữa các nguồn muối khoáng khảo sát
- Phụ lục 11. Ý nghĩa thông kê của các sai khác về giá trị OD600 và hàm lượng EPS giữa các nồng độ NaCl khảo sát
- Phụ lục 12. Ý nghĩa thông kê của các sai khác về giá trị OD600 và hàm lượng EPS giữa các giá trị pH khảo sát
- Phụ lục 13. Ý nghĩa thông kê của các sai khác về giá trị OD600 và hàm lượng EPS giữa các tốc độ lắc khảo sát
- Phụ lục 14. Ý nghĩa thông kê của các sai khác về giá trị OD600 và hàm lượng EPS giữa các nhiệt độ khảo sát
- Phụ lục 15. Ý nghĩa thông kê của các sai khác về giá trị OD600 và hàm lượng EPS giữa các thời điểm thu mẫu khảo sát
- Phụ lục 16. Ý nghĩa thông kê của các sai khác về giá trị OD600 và hàm lượng EPS giữa các tỉ lệ tiếp giống khảo sát
- Phụ lục 17. Ý nghĩa thông kê của các sai khác về hàm lượng EPS khi khảo sát ảnh hưởng của nguồn glucose và sucrose đến thành phần monosaccharide trong EPS ở chủng *B. velezensis* DTA1

Phụ lục 18. Kết quả phân tích HPLC của các mẫu monnosaccharide chuẩn và các mẫu thủy phân EPSDTA1 khi đánh giá ảnh hưởng của nguồn đường glucose và sucrose

Phụ lục 19. Ý nghĩa thông kê của các sai khác về giá trị OD600 và EPSDTA1 nuôi trong môi trường TB, pH 8,46, sucrose 72,6 g/L ở các điều kiện stress muối và/hoặc kim loại nặng

Phụ lục 20. Ý nghĩa sai khác thống kê giữa các giá trị độ mặn của các mẫu nước từ 4 thí nghiệm giảm độ mặn của đất

Phụ lục 21. Ý nghĩa sai khác thống kê giữa các giá trị WHC của EPS DTA1

Phụ lục 22. Ý nghĩa thông kê của các sai khác về tốc độ thấm nước của 5 thí nghiệm đánh giá khả năng giữ nước của đất được xử lý bằng EPS và dịch nuôi cấy chủng *B. velezensis* DTA1

Phụ lục 23. Ý nghĩa thông kê của các sai khác về WHC của 5 thí nghiệm đánh giá khả năng giữ nước của đất được xử lý bằng EPS và dịch nuôi cấy chủng *B. velezensis* DTA1

Phụ lục 24. Ý nghĩa thông kê của các sai khác về hàm lượng carbohydrate trong các mẫu đất thí nghiệm quy mô chậu vại

Phụ lục 25. Ý nghĩa thống kê các sai khác về WHC của các mẫu đất thí nghiệm ở các thời điểm sau tưới nước

Phụ lục 26. Ý nghĩa của các sai khác giữa nồng độ NaCl trong đất ở các lô thí nghiệm 1, 6 và 7 trong thí nghiệm trồng cây trong chậu vại

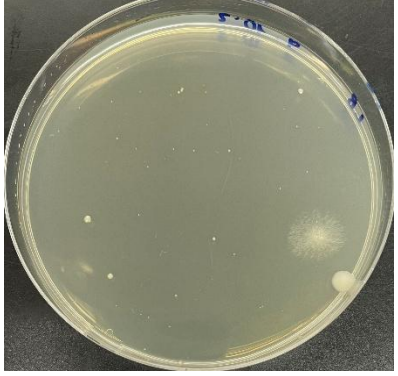
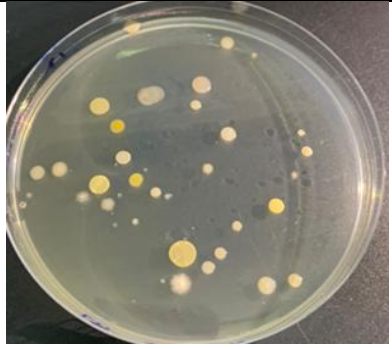
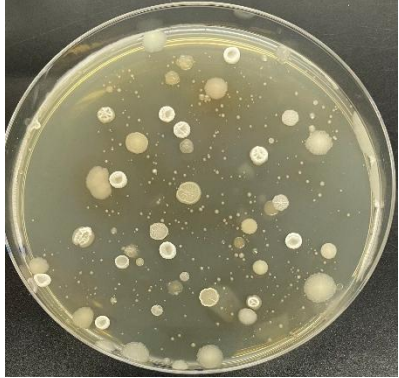
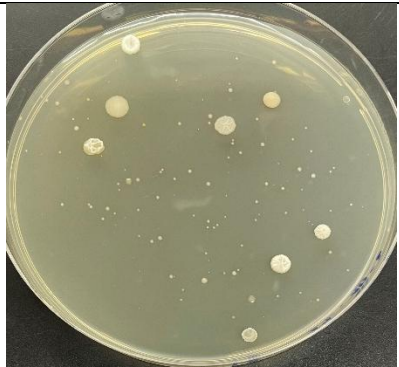
Phụ lục 27. Kết quả so sánh ý nghĩa khác biệt ở một số chỉ tiêu rau mồng tơi ở 7 thí nghiệm đánh giá khả năng giữ nước và giảm mặn của vi khuẩn sinh EPS trên quy mô chậu vại.

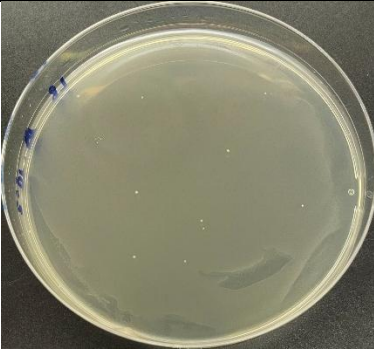
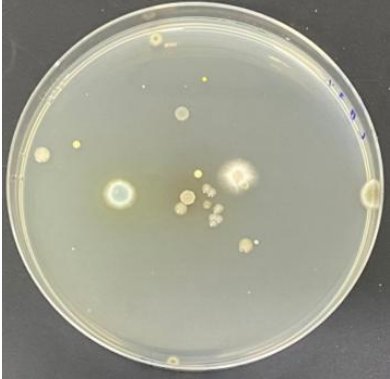
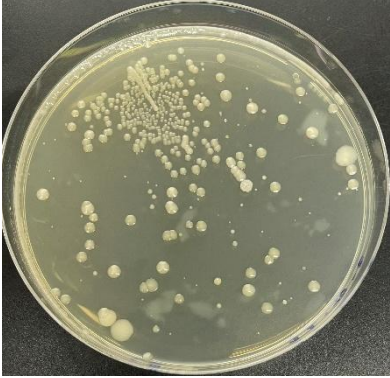
Phụ lục 28. Ý nghĩa của các sai khác giữa các chỉ số SPAD ở 7 lô thí nghiệm trồng cây trong chậu vại

Phụ lục 29. Hình ảnh thử nghiệm trồng rau quy mô chậu tại Nhà lưới, Khu thực nghiệm và đào tạo nghề, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Phụ lục 30. Hình ảnh trồng rau trên đất cát san hô cải tạo quy mô đồng ruộng tại Nhà lưới, Trạm nghiên cứu thử nghiệm biển Đầm Báy

Phụ lục 1. Vị trí lấy mẫu đất và hình ảnh đĩa khuẩn lạc tổng số trên môi trường LB đặc chứa NaCl 3% từ các mẫu đất thu thập ở 3 đảo tại Trường Sa.

TT	Tên đảo	Vị trí lấy mẫu ở đảo	Toạ độ	Hình ảnh đĩa khuẩn lạc sau 48 giờ ủ ở 30°C (độ pha loãng mẫu 10^{-2})
1	Trường Sa Đông	Bãi cát phía tây đảo (khu vực mới tôn tạo)	8°55'50'' N 112°21'7'' E	
		Bãi cát cách cụm dân cư 110m (khu vực mới tôn tạo)	8°55'51'' N 112°21'8'' E	
		Cạnh cột mốc chủ quyền (khu vực cũ)	8°55'53'' N 112°21'11'' E	
2	Đá Tây A	Sau bờ kè đảo (khu vực mới tôn tạo)	9°53'12'' N 114°19'46'' E	

		Sau nhà ăn mới cách bờ kè 5 m (khu vực mới tôn tạo)	08°51'57,9'' N 112°15'27,6'' E	
		Mép nước ở bắc đảo (khu vực mới tôn tạo)	08°52'09,6'' N 112°15'26,6'' E	
3	Trường Sa Lớn	Ven bờ (khu vực mới tôn tạo)	8°38'34.2"N 111°55'11.3"E	
		Gần nhà bếp (khu vực cũ)	8°38'41.2"N 111°55'10.2"E	
		Gốc cây (khu vực cũ)	8°38'46.3"N 111°55'13.6"E	

Phụ lục 2. Các thiết bị , hóa chất và môi trường sử dụng

Bảng 1. Thành phần môi trường nuôi cấy vi sinh vật

Tên môi trường	Thành phần (g/L)
Lysogeny broth (LB)	Pepton 10, yeast extract 5, NaCl 5, pH 7
LB đặc	Pepton 10, yeast extract 5, NaCl 5, agar 15, pH 7
Nutrient broth (NB)	Pepton 5, yeast extract 2, NaCl 5
Yeast extract, pepton, malt extract, glucose (YMG)	Pepton 5, yeast extract 3, malt extract 3, glucose 10
International streptomyces project 2 (ISP2)	Yeast extract 4, glucose 4, malt extract 10
Yeast mannitol (YM)	Yeast extract 0,5; mannitol 4
Terrific Broth (TB)	Yeast extract 24; peptone 20; glycerol 4; K ₂ HPO ₄ 0,072 M; KH ₂ PO ₄ 0,017 M, pH 7

Bảng 2. Các thiết bị sử dụng trong nghiên cứu

STT	Tên thiết bị	Tên hãng (nước) sản xuất
1	Máy lắc ổn nhiệt	IKA (Đức)
2	Máy lắc ổn nhiệt	Certomat BS1 (Đức)
3	Máy lắc tròn	IKA KS 260 (Đức)
4	Nồi hấp khử trùng	Sanyo (Nhật)
5	Box nuôi cấy vi sinh	Sanyo (Nhật)
6	Máy li tâm Hermle Z126M	Hermle (Đức)
7	Máy li tâm để bàn Hermle Z446	Hermle (Đức)
8	Máy li tâm lạnh Mikro 22R	Hettich (Đức)
9	Hệ thống PCR Mastercycler X50S	Eppendorf (Đức)
10	Máy điện di DNA ngang	Cleaver (Anh)
11	Box nuôi cấy vi sinh Biosafety Cabinet	Trung tâm chuyển giao công nghệ mới (Trung tâm Nhiệt đới Việt – Nga)
12	Máy rung	Vortex V1 (Đức)
13	Máy ủ kèm lắc rung	Thermo Scientific (Mỹ)
14	Tủ lạnh -25 °C	Sanyo MDF-136 (Nhật)
15	Tủ lạnh 4 °C	Sanyo (Nhật)
16	Tủ lạnh sâu -80°C	Sanyo (Nhật)
17	Máy uv-vis	Agilent (Mỹ)
18	Hệ thống kính hiển vi điện tử quét JSM-IT200 kèm đầu dò EDS Dry SD60	JEOL (Nhật Bản)

19	Hệ thống HPLC	Agilent 1260 (Mỹ)
20	Kính hiển vi quang học	Axiocam 503 color (Imager.Z2)
21	Máy khuấy từ gia nhiệt	ARE-VELP (Italia)
22	Máy đo pH để bàn WTW Inolab 7110	WTW (Đức)
23	Tủ hút Laboratory Fume Hoods	Trung tâm chuyển giao công nghệ mới (Trung tâm Nhiệt đới Việt – Nga)
24	Máy đông khô ALPHA 1-2 LD plus	MARTIN CHRIST (Đức)
25	Cân phân tích	Mettler Toledo AB204
26	Cân kỹ thuật	Ohaus (Mỹ)
27	Thiết bị FTIR Impac-410	Thermo Fisher Scientific (Mỹ)
28	Thiết bị Zetasizer-Nano ZS	Malvern (Anh)
29	Thiết bị đo độ ẩm đất cầm tay Fieldscout TDR 350	Spectrum Technologies (Mỹ)
30	Thiết bị đo độ nhớt	Cannon-Fenske (Trung Quốc)
31	Máy đo độ dẫn điện Total Meter EZ-9909SP	Total Meter (Đài Loan)
32	Kính hiển vi soi nổi SMZ12701	(Nikson, Nhật Bản)
33	Máy đo SPAD 502	Konica Minolta (Nhật Bản)
34	Thiết bị đọc Elisa Multiskan FC	Thermo Scientific (Mỹ)

Bảng 3. Các chỉ tiêu sinh hóa của bộ kit API 50CHB

TT	Phản ứng	Cơ chất		TT	Phản ứng	Cơ chất
0		Đối chứng		25	ESC	Esculin
1	GLY	Glycerol		26	SAL	Salicin
2	ERY	Erythritol		27	CEL	D-cellobiose
3	DARA	D-arabinose		28	MAL	D-manltose
4	LARA	L-arabinose		29	LAC	D-lactose
5	RIB	D-ribose		30	MEL	D-melibiose
6	DXYL	D- xylose		31	SAC	D-saccharose
7	LXYL	L- Xylose		32	TRE	D-trehalose
8	ADO	D-adonitol		33	INU	Inulin

9	MDX	Metyl- β -D-xylopyranoside		34	MLZ	D-melezitose
10	GAL	D-galactose		35	RAF	D-raffinose
11	GLU	D-glucose		36	AMD	Amidon
12	RRU	D-fructose		37	GLYG	Glycogene
13	MNE	D-manose		38	XLT	Xylitol
14	SBE	L-sorbose		39	GENE	Genetiobiose
15	RHA	L-rhamnose		40	TUR	D-turanose
16	DUL	Dulcitol		41	LYX	D-lyxose
17	INO	Inositol		42	TAG	D-tagatose
18	MAN	D-manitol		43	DFUC	D-fucose
19	SOR	D-sorbitol		44	LFUC	L-Fucose
20	MDM	Metyl- β -D-manopyranoside		45	DARL	D-arabitol
21	MDG	Metyl- β -D-glucopyranside		46	LARL	L-arabitol
22	NAG	N-Acetyl-Glucosamine		47	GNT	Potassium gluconate
23	AMY	Amygdalin		48	2KG	Potassium 2-ketogluconate
24	ARB	Arbutin		49	5KG	Potassium 5-ketogluconate

Phụ lục 3. Ý nghĩa thống kê của các sai khác về giá trị OD600 và hàm lượng EPS giữa các chủng vi khuẩn khảo sát

➤ **OD600**

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Tên mẫu	N	Mean	Grouping	
TSD5	3	8.923	A	
TSL5	3	8.8973	A	
TSL6	3	8.497	A	B
DTA1	3	8.347	A	B
TSL3	3	7.8700		B
TSL2	3	6.2967		C
DTA3	3	5.0683		D
TSD1	3	3.9633		E
TSD3	3	2.9700		F
TSD2	3	2.9700		F

Means that do not share a letter are significantly different.

➤ **mEPS**

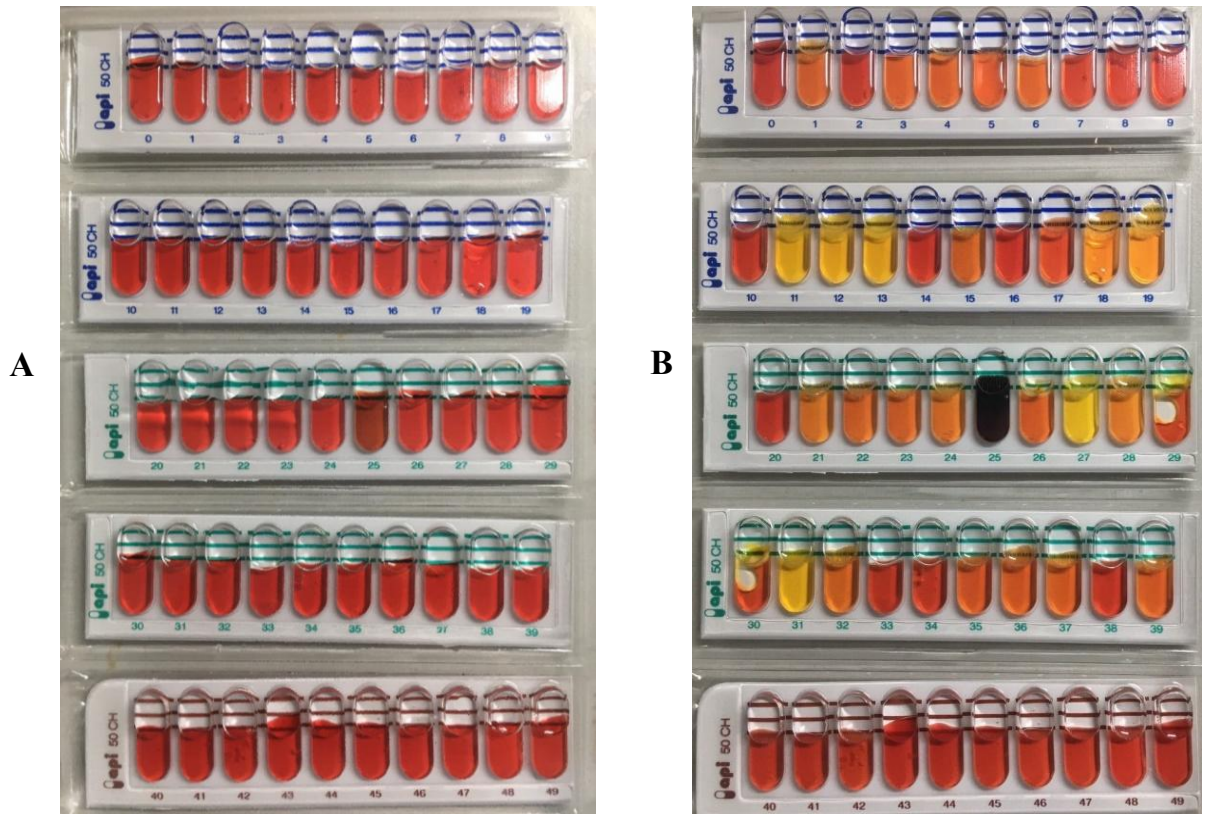
Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Tên mẫu	N	Mean	Grouping	
DTA1	3	1.3067	A	
TSL6	3	1.2733	A	
TSD5	3	1.2467	A	
TSL5	3	1.1790	A	
TSL3	3	0.8630		B
TSL2	3	0.32500		C
TSD1	3	0.06833		D
TSD2	3	0.05667		D
DTA3	3	0.05067		D
TSD3	3	0.04533		D

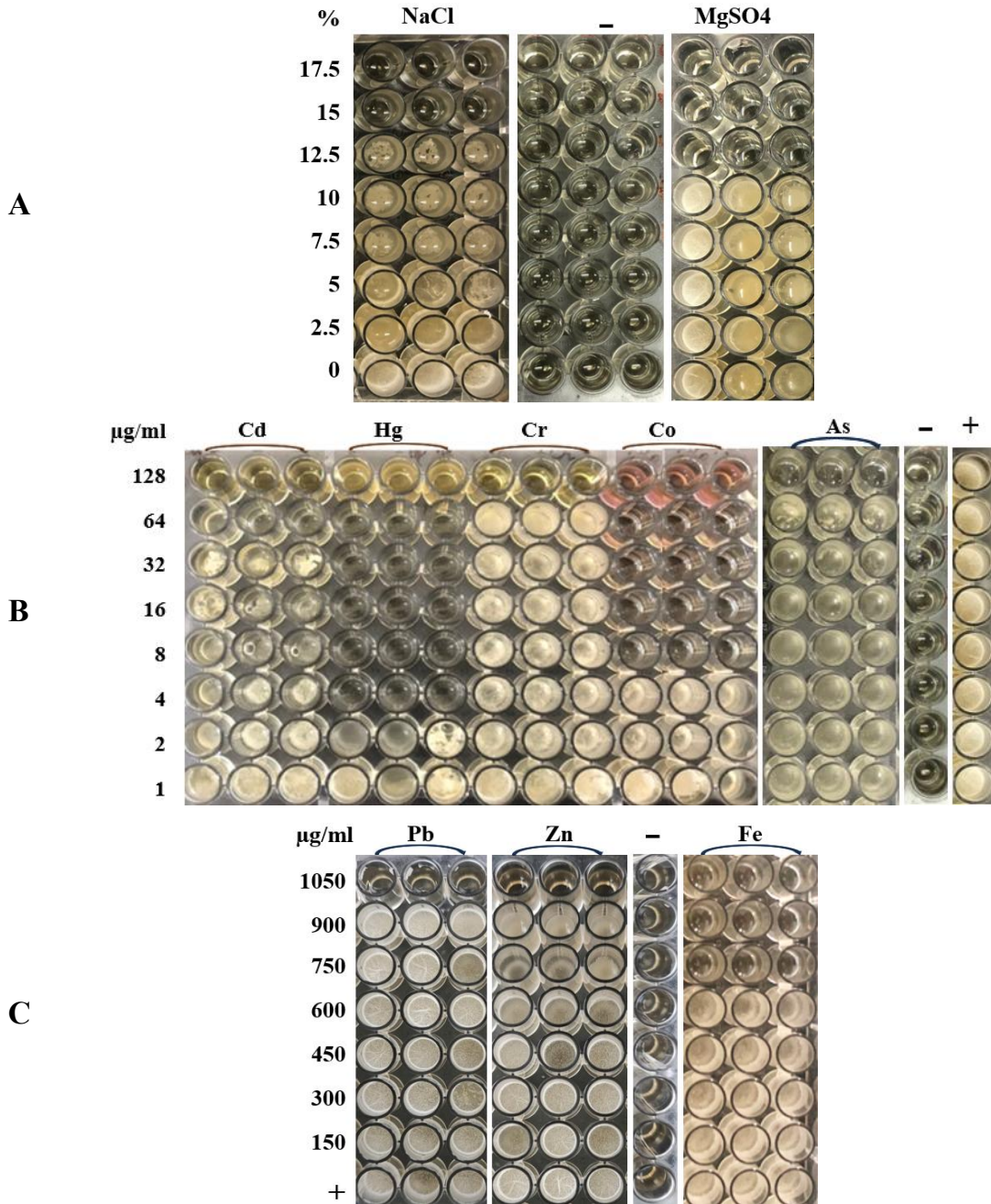
Means that do not share a letter are significantly different.

Phụ lục 4. Kết quả kiểm tra khả năng sử dụng các nguồn carbon của *B. velezensis* DTA1 sử dụng kit API® 50CHB ở các thời điểm bắt đầu (A) và sau 48 giờ ủ (B).



(+): chuyển từ đỏ sang vàng (riêng esculin là từ tím sang đen); (-): không đổi màu;
(±): chưa rõ có đổi màu không.

Phụ lục 5. Khả năng sinh trưởng của chủng *B. velezensis* DTA1 ở nồng độ muối NaCl/MgSO₄ từ 0 -17,5% (w/v) (A), nồng độ kim loại nặng Cd, Hg, Cr, Co, As 1-128 µg/mL (B) và Pb, Zn, Fe từ 150–1050 µg/mL (C). “–”: đối chứng âm (môi trường LB không có vi khuẩn), “+”: đối chứng dương (môi trường LB có vi khuẩn).



Phụ lục 6. Ý nghĩa thống kê của các sai khác về giá trị OD600 và hàm lượng EPS giữa các môi trường nuôi cấy khảo sát.

➤ **OD600**

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Môi trường	N	Mean	Grouping		
TB	3	15.913	A		
LB	3	9.310	B		
ISP2	3	8.5800	C		
YPM	3	7.2567	D		
NB	3	4.2833	E		
YM	3	1.9633	F		

Means that do not share a letter are significantly different.

➤ **mEPS**

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Môi trường	N	Mean	Grouping		
TB	3	9.220	A		
YPM	3	2.5500	B		
ISP2	3	1.8600	C		
NB	3	1.3133	D		
LB	3	1.03333	E		
YM	3	0.7700	E		

Means that do not share a letter are significantly different.

Phụ lục 7. Ý nghĩa thống kê của các sai khác về giá trị OD600 và hàm lượng EPS giữa các nguồn carbon khảo sát.

➤ **OD600**

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Nguồn			
Carbon 1%	N	Mean	Grouping
L-rhamnose	3	24.783	A
Mannose	3	24.413	A
Cellobiose	3	23.720	A
Sucrose	3	23.513	A
Trehalose	3	20.610	B
D-fructose	3	20.247	B C
D-xylose	3	19.8600	B C D

D-maltose	3	19.8433	B	C	D		
D-glucose	3	19.290	B	C	D	E	
L-arabinose	3	18.9933		C	D	E	F
Lactose	3	18.460			D	E	F
Manitol	3	18.1333				E	F
D-galactose	3	17.637					F
Đối chứng	3	15.877					G

Means that do not share a letter are significantly different.

➤ **mEPS**

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Nguồn Carbon 1%	N	Mean	Grouping				
Sucrose	3	12.703	A				
D-galactose	3	11.877	B				
Cellobiose	3	11.700	B				
D-fructose	3	11.697	B				
Mannose	3	11.667	B				
D-glucose	3	11.453	B				
D-maltose	3	10.217	C				
L-arabinose	3	10.057	C				
Lactose	3	9.543	C D				
L-rhamnose	3	9.4433	C D				
Đối chứng	3	9.2133	D				
D-xylose	3	9.1400	D				
Manitol	3	8.9700	D				
Trehalose	3	6.887	E				

Means that do not share a letter are significantly different.

Phụ lục 8. Ý nghĩa thống kê của các sai khác về giá trị OD600 và hàm lượng EPS giữa các nồng độ sucrose khảo sát.

➤ **OD600**

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Hàm lượng Succrose (%)	N	Mean	Grouping
2.5	3	24.357	A
1.0	3	22.667	B
5.0	3	22.620	B

7.5	3	19.273	C
0.5	3	18.560	C
10.0	3	13.187	D

Means that do not share a letter are significantly different.

➤ mEPS

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Hàm lượng Succrose (%)	N	Mean	Grouping
5.0	3	16.250	A
7.5	3	15.9700	A
2.5	3	14.127	B
10.0	3	13.323	C
1.0	3	12.547	D
0.5	3	10.747	E

Means that do not share a letter are significantly different.

Phụ lục 9. Ý nghĩa thống kê của các sai khác về giá trị OD600 và hàm lượng EPS giữa các nguồn Nito khảo sát.

➤ OD600

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Nguồn N (1%)	N	Mean	Grouping
Casein	3	26.213	A
NH ₄ NO ₃	3	23.130	B
Đối chứng	3	22.563	B
NH ₄ Cl	3	18.070	C
(NH ₄) ₂ SO ₄	3	16.947	C
Urea	3	16.913	C

Means that do not share a letter are significantly different.

➤ mEPS

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Nguồn N (1%)	N	Mean	Grouping
Đối chứng	3	16.220	A
NH ₄ NO ₃	3	15.667	A
Casein	3	11.9733	B
(NH ₄) ₂ SO ₄	3	11.707	B
NH ₄ Cl	3	11.410	B

Urea 3 10.630 C

Means that do not share a letter are significantly different.

Phụ lục 10. Ý nghĩa thông kê của các sai khác về giá trị OD600 và hàm lượng EPS giữa các nguồn muối khoáng khảo sát

➤ **OD600**

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Nguồn muối khoáng 0,5%	N	Mean	Grouping	
FeSO ₄	3	28.157	A	
NaCl	3	25.880	B	
Đối chứng	3	22.693		C
MgSO ₄	3	21.337		C
ZnSO ₄	3	17.513		D

Means that do not share a letter are significantly different.

➤ **mEPS**

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Nguồn muối khoáng 0,5%	N	Mean	Grouping	
NaCl	3	18.9667	A	
ZnSO ₄	3	17.653	B	
MgSO ₄	3	17.167	B	C
Đối chứng	3	16.167		C
FeSO ₄	3	9.033		D

Means that do not share a letter are significantly different.

Phụ lục 11. Ý nghĩa thông kê của các sai khác về giá trị OD600 và hàm lượng EPS giữa các nồng độ NaCl khảo sát

➤ **OD600**

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Nồng độ NaCl (%)	N	Mean	Grouping	
1.00	3	28.027	A	
0.50	3	25.863	B	
0.25	3	25.503	B	C
3.00	3	24.430		C
5.00	3	19.207		D
8.00	3	9.407		E
12.50	3	2.600		F
15.00	3	0.03667		G

Means that do not share a letter are significantly different.

➤ **mEPS**

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Nồng độ NaCl (%)	N	Mean	Grouping
3.00	3	22.9567	A
1.00	3	20.550	B
5.00	3	20.427	B
0.50	3	18.950	C
0.25	3	17.380	D
8.00	3	11.9767	E
12.50	3	4.547	F
15.00	3	0.1133	G

Means that do not share a letter are significantly different.

Phụ lục 12. Ý nghĩa thông kê của các sai khác về giá trị OD600 và hàm lượng EPS giữa các giá trị pH khảo sát.

➤ **OD600**

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Độ pH	N	Mean	Grouping
pH9	3	28.307	A
pH8	3	26.247	B
Đối chứng pH7	3	24.403	C
pH6	3	16.157	D
pH5	3	8.230	E
pH10	3	7.177	E
pH4	3	2.8633	F
pH11	3	0.6433	G

Means that do not share a letter are significantly different.

➤ **mEPS**

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Độ pH	N	Mean	Grouping
pH8	3	25.380	A
Đối chứng pH7	3	22.783	B
pH9	3	19.167	C
pH6	3	14.000	D
pH5	3	9.0733	E
pH4	3	5.877	F

pH10	3	5.1300	F
pH11	3	1.643	G

Means that do not share a letter are significantly different.

Phụ lục 13. Ý nghĩa thông kê của các sai khác về giá trị OD600 và hàm lượng EPS giữa các tốc độ lắc khảo sát

➤ **OD600**

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Tốc độ lắc	N	Mean	Grouping
200	3	28.643	A
150	3	26.190	B
250	3	21.503	C
100	3	18.053	D

Means that do not share a letter are significantly different.

➤ **mEPS**

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Tốc độ lắc	N	Mean	Grouping
150	3	25.287	A
200	3	19.000	B
100	3	12.947	C
250	3	11.993	C

Means that do not share a letter are significantly different.

Phụ lục 14. Ý nghĩa thông kê của các sai khác về giá trị OD600 và hàm lượng EPS giữa các nhiệt độ khảo sát

➤ **OD600**

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Nhiệt độ (°C)	N	Mean	Grouping
37	3	28.887	A
30	3	26.1133	B
22	3	17.690	C
42	3	9.0867	D
15	3	9.083	D
50	3	4.487	E
10	3	3.1600	E
5	3	1.6533	F
57	3	0.0733	G

Means that do not share a letter are significantly different.

➤ mEPS

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Nhiệt độ (°C)	N	Mean	Grouping			
30	3	25.373	A			
37	3	18.073		B		
22	3	15.613			C	
42	3	9.187				D
15	3	5.430				E
50	3	4.890				E
10	3	2.6967				F
5	3	1.8600				F
57	3	0.0733				G

Means that do not share a letter are significantly different.

Phụ lục 15. Ý nghĩa thống kê của các sai khác về giá trị OD600 và hàm lượng EPS giữa các thời điểm thu mẫu khảo sát.

➤ OD600

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Thời gian (giờ)	N	Mean	Grouping			
48	3	26.803	A			
60	3	26.293	A			
72	3	25.883	A			
84	3	24.963	A			
36	3	22.650		B		
24	3	15.873			C	
12	3	6.477				D

Means that do not share a letter are significantly different.

➤ mEPS

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Thời gian (giờ)	N	Mean	Grouping			
72	3	27.350	A			
60	3	26.057	A	B		
84	3	25.727	A	B		
48	3	24.943		B		
36	3	21.810			C	
24	3	13.790				D
12	3	6.050				E

Means that do not share a letter are significantly different.

Phụ lục 16. Ý nghĩa thống kê của các sai khác về giá trị OD600 và hàm lượng EPS giữa các tỉ lệ tiếp giống khảo sát

➤ **OD600**

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Tỉ lệ tiếp giống	N	Mean	Grouping
5.0	3	18.873	A
7.5	3	16.713	B
2.5	3	16.560	B
1.0	3	15.583	B

Means that do not share a letter are significantly different.

➤ **mEPS**

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Tỉ lệ tiếp giống	N	Mean	Grouping
5.0	3	27.303	A
2.5	3	24.097	B
7.5	3	23.807	B
1.0	3	22.857	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Phụ lục 17. Ý nghĩa thống kê của các sai khác về hàm lượng EPS khi khảo sát ảnh hưởng của nguồn glucose và sucrose đến thành phần monosaccharide trong EPS ở chủng *B. velezensis* DTA1.

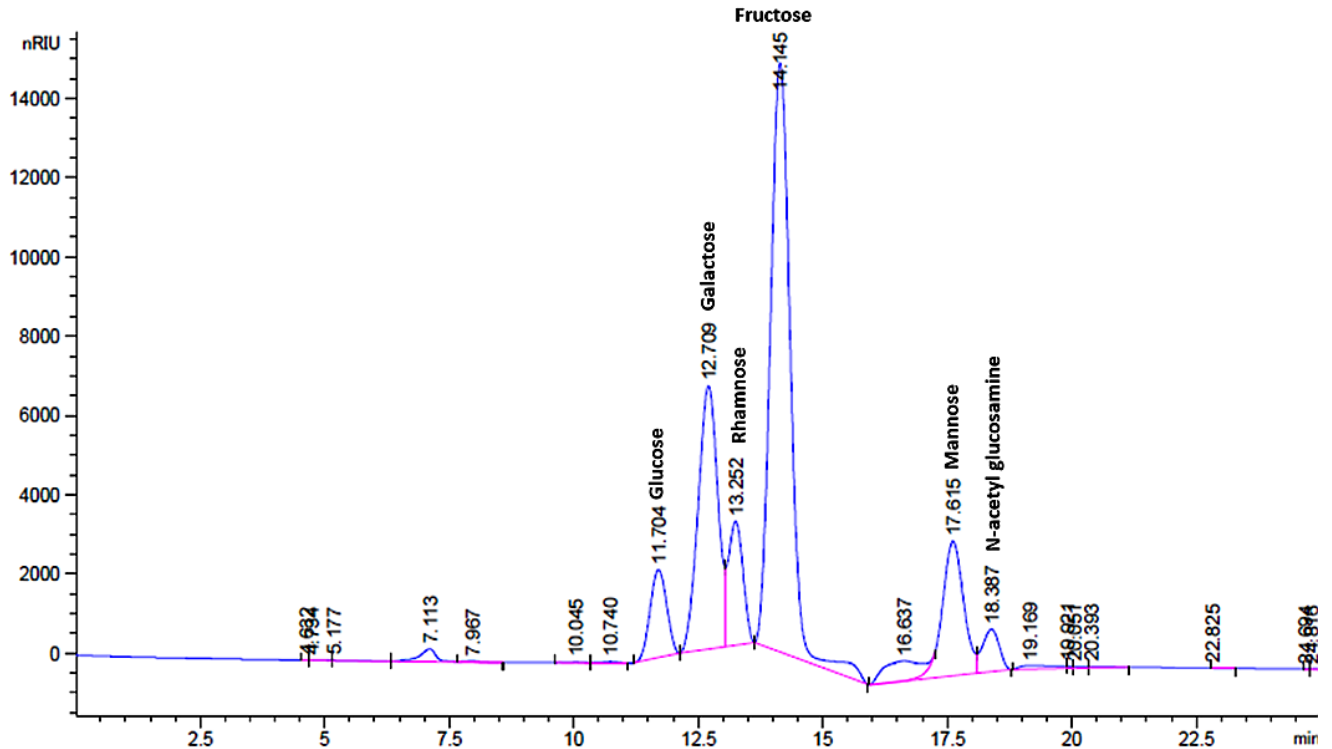
Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Sugar source (g/L)	N	Mean	Grouping
Sucrose 50	3	30.390	A
Sucrose 10	3	23.927	B
Glucose 50	3	23.293	B
Glucose 10	3	21.420	C
Control	3	16.350	D

Means that do not share a letter are significantly different.

Phụ lục 18. Kết quả phân tích HPLC của các mẫu monnosaccharide chuẩn và các mẫu thủy phân EPSDTA1 khi đánh giá ảnh hưởng của nguồn đường glucose và sucrose.

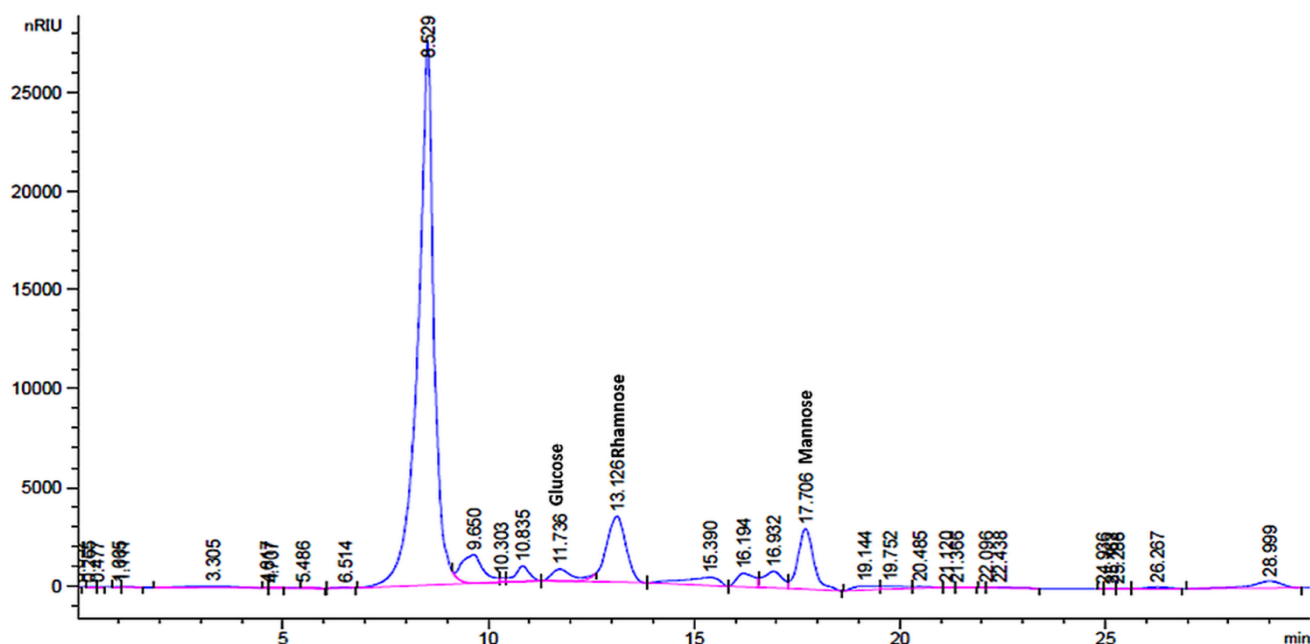
1. Mẫu monnosaccharide chuẩn



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [nRIU*s]	Height [nRIU]	Area %
1	4.632	BV	0.1010	24.95462	3.87541	2.829e-3
2	4.734	VV	0.3172	159.24370	6.19382	0.0181
3	5.177	VB	0.6729	373.59772	6.66982	0.0424
4	7.113	BV R	0.3390	7827.80127	330.45126	0.8874
5	7.967	VB E	0.2724	594.05029	32.37362	0.0673
6	10.045	VV R	0.2721	369.11554	18.81188	0.0418
7	10.740	VB	0.3230	766.27197	36.13702	0.0869
8	11.704	BB	0.3690	5.13656e4	2222.49341	5.8232
9	12.709	BV	0.4234	1.82089e5	6645.42285	20.6431
10	13.252	VB	0.3169	6.41138e4	3127.75098	7.2685
11	14.145	BB	0.4329	4.13948e5	1.48663e4	46.9284
12	16.637	BV E	0.6881	2.56290e4	500.56467	2.9055
13	17.615	VV R	0.4614	1.02247e5	3395.75830	11.5915
14	18.387	VB	0.3706	2.56225e4	1076.50940	2.9048
15	19.169	BV	0.6774	4809.18066	97.43356	0.5452
16	19.921	VV	0.1052	344.23343	54.53154	0.0390
17	20.051	VV	0.2248	835.67090	49.01711	0.0947
18	20.393	VB	0.3165	900.58362	35.11914	0.1021
19	22.825	VB	0.1522	29.79176	2.57572	3.377e-3
20	24.694	VV	0.0878	11.91670	1.85865	1.351e-3
21	24.816	VBA	0.1117	21.41081	2.70626	2.427e-3

Totals : 8.82082e5 3.25125e4

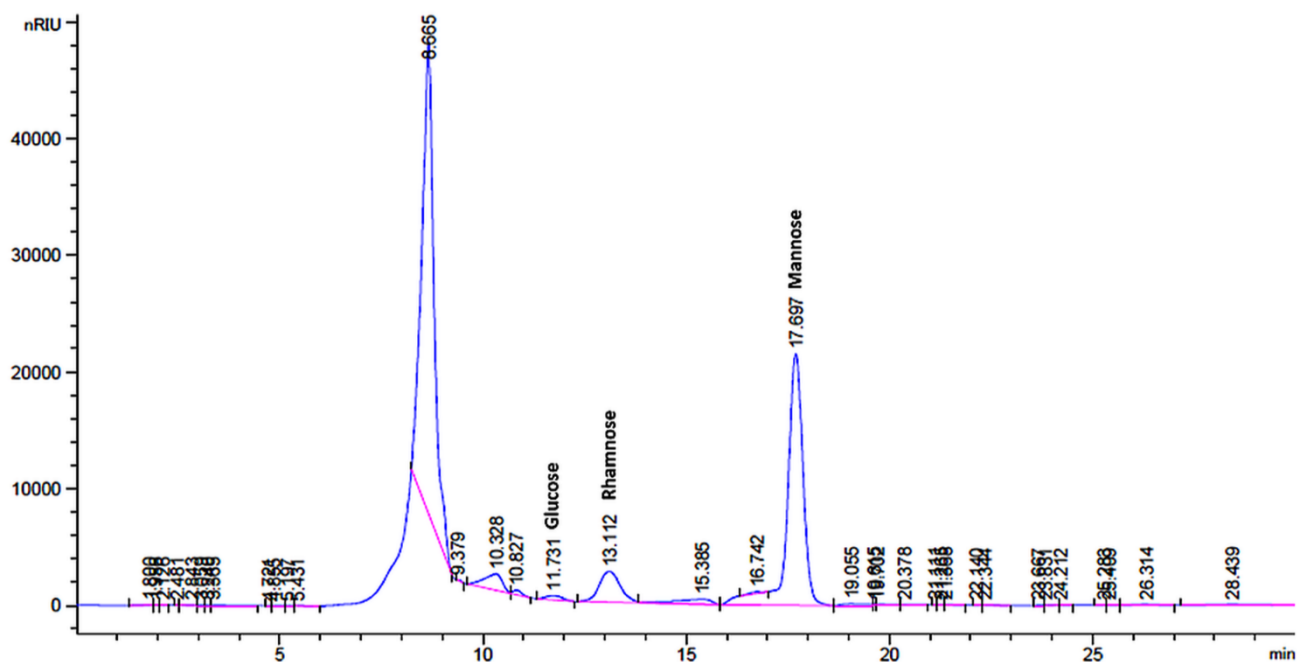
2. Mẫu thủy phân EPS từ môi trường TB, pH 8.46, NaCl 3,27%, không bổ sung đường.



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [nRIU*s]	Height [nRIU]	Area %
1	0.032	BB	0.0483	5.20563	1.79620	4.492e-4
2	0.265	VV	0.1967	36.53379	2.34771	3.152e-3
3	0.477	VB	0.0782	11.31565	2.24541	9.763e-4
4	1.005	BV	0.1199	60.87008	7.07188	5.252e-3
5	1.111	VB	0.2606	211.24918	10.31078	0.0182
6	3.305	VV R	1.1143	7170.60449	76.10921	0.6187
7	4.617	VV E	0.0851	11.31703	1.88779	9.765e-4
8	4.707	VV E	0.1924	39.67300	2.51885	3.423e-3
9	5.486	VB X	0.7727	118.36674	1.82284	0.0102
10	6.514	BB	0.3246	519.15228	21.36086	0.0448
11	8.529	BV R	0.3688	7.55109e5	2.74236e4	65.1523
12	9.650	VV E	0.4712	5.06797e4	1432.21497	4.3728
13	10.303	VV E	0.1204	2008.34912	222.50230	0.1733
14	10.835	VB E	0.3466	1.88284e4	791.60327	1.6245
15	11.736	BV E	0.5250	2.07382e4	602.03131	1.7893
16	13.126	VB R	0.5269	1.13754e5	3339.98682	9.8149
17	15.390	BB	0.8673	2.51211e4	399.60233	2.1675
18	16.194	BV	0.4244	2.02109e4	688.79327	1.7438
19	16.932	VV	0.4588	2.68255e4	845.35205	2.3146
20	17.706	VB	0.4025	8.13001e4	3062.98706	7.0147
21	19.144	BV	0.5920	7864.28320	193.01596	0.6785
22	19.752	VV	0.4922	5882.22168	144.51459	0.5075
23	20.485	VB	0.3385	1908.63208	75.97397	0.1647
24	21.120	BV	0.2944	54.83324	2.34523	4.731e-3
25	21.366	VB	0.2778	122.99638	5.46329	0.0106
26	22.096	BV	0.0854	40.73798	6.97382	3.515e-3
27	22.438	VB	0.4368	795.39294	22.12137	0.0686
28	24.936	BV	0.0696	10.57393	2.35770	9.123e-4
29	25.162	VV	0.1804	103.51986	8.16281	8.932e-3
30	25.288	VB	0.1810	108.24724	7.81482	9.340e-3
31	26.267	BB	0.4089	2226.45093	68.98359	0.1921
32	28.999	VB R	0.7117	1.71135e4	353.51160	1.4766

Totals : 1.15899e6 3.98274e4

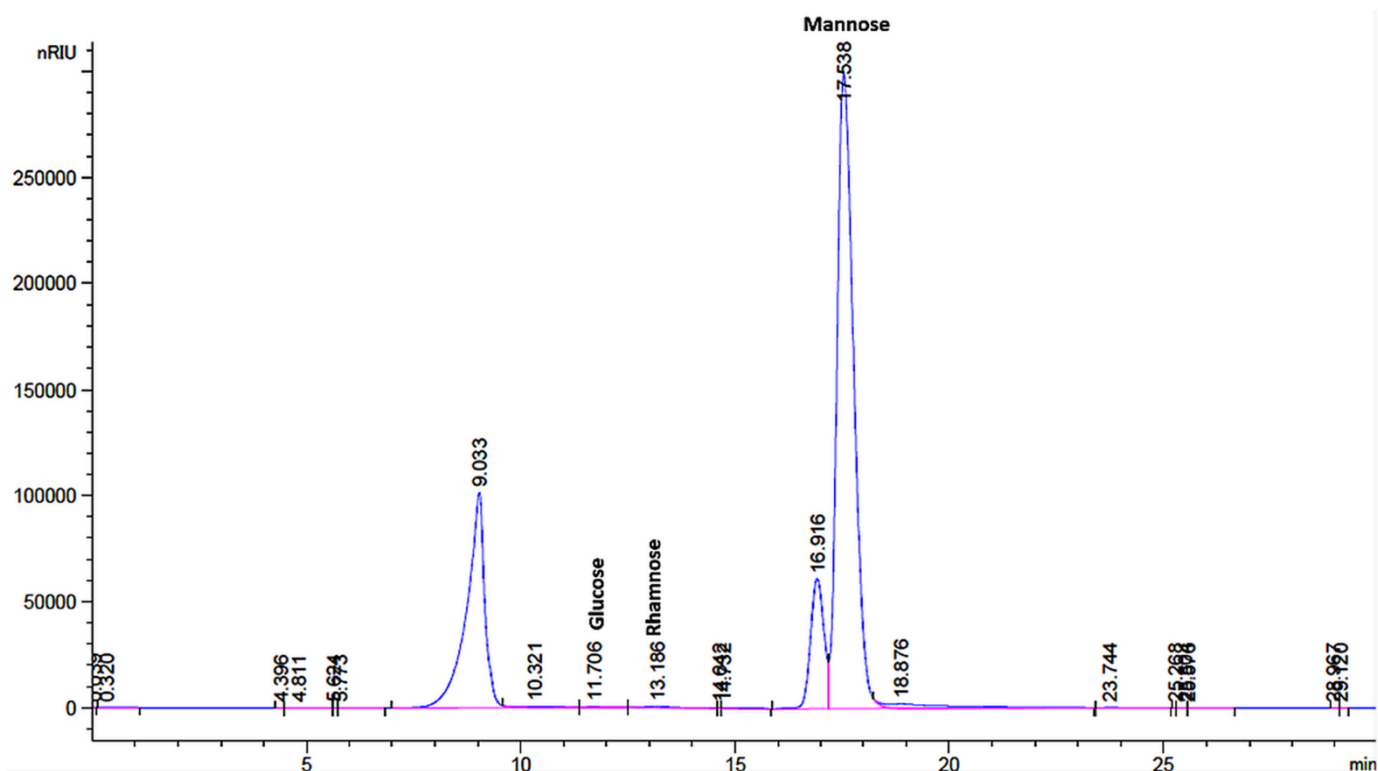
3. Mẫu thủy phân EPS từ môi trường TB, pH 8.46, NaCl 3,27%, bổ sung glucose 1%.



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [nRIU*s]	Height [nRIU]	Area %
3	2.126	VB	0.1134	20.90981	2.48201	1.266e-3
4	2.481	BV	0.0729	12.54598	2.63220	7.595e-4
5	2.843	VV	0.2508	230.86150	11.75341	0.0140
6	3.059	VV	0.1568	176.15862	14.50349	0.0107
7	3.240	VV	0.1237	146.38782	16.73047	8.862e-3
8	3.365	VB	0.5216	806.21863	18.57110	0.0488
9	4.721	BV	0.0933	12.63047	1.93860	7.646e-4
10	4.855	VV	0.2174	49.92332	2.94153	3.022e-3
11	5.197	VV	0.1822	40.36985	3.23639	2.444e-3
12	5.431	VB	0.3848	112.51183	3.59234	6.811e-3
13	8.665	BB	0.2900	8.52904e5	4.03197e4	51.6327
14	9.379	BB	0.1733	456.79401	37.24171	0.0277
15	10.328	BV	0.4442	4.31150e4	1405.68152	2.6101
16	10.827	VB	0.2308	5685.67920	384.68762	0.3442
17	11.731	BB	0.4166	9880.09180	378.86459	0.5981
18	13.112	BV R	0.5643	9.44988e4	2627.36255	5.7207
19	15.385	VB E	0.8700	2.66447e4	423.53647	1.6130
20	16.742	BV E	0.3466	3090.57080	133.07083	0.1871
21	17.697	VB R	0.4130	5.92197e5	2.15814e4	35.8501
22	19.055	BV	0.6057	6654.68701	164.57349	0.4029
23	19.615	VV	0.0735	526.76135	98.02338	0.0319
24	19.702	VV	0.3345	2649.61011	94.24268	0.1604
25	20.378	VB	0.2898	1231.44910	52.72657	0.0745
26	21.111	BV	0.0756	19.54129	3.77243	1.183e-3
27	21.265	VV	0.1230	102.52147	11.79377	6.206e-3
28	21.368	VB	0.2665	326.02023	15.25884	0.0197
29	22.140	BV	0.1844	62.35698	4.24235	3.775e-3
30	22.344	VB	0.3529	316.72653	10.94055	0.0192
31	23.667	BV	0.1440	590.28699	56.27368	0.0357
32	23.831	VV	0.2091	668.94385	40.69015	0.0405
33	24.212	VB	0.1480	205.74887	18.35907	0.0125
34	25.283	BV	0.1100	22.52598	2.76964	1.364e-3
35	25.409	VB	0.1568	45.33302	3.73372	2.744e-3
36	26.314	BV R	0.4459	2447.51172	72.46651	0.1482
37	28.439	VV R	0.9395	5739.42725	73.11856	0.3475

Totals : 1.65187e6 6.81023e4

4. Mẫu thủy phân EPS từ môi trường TB, pH 8,46, NaCl 3,27%, bổ sung glucose 5%.

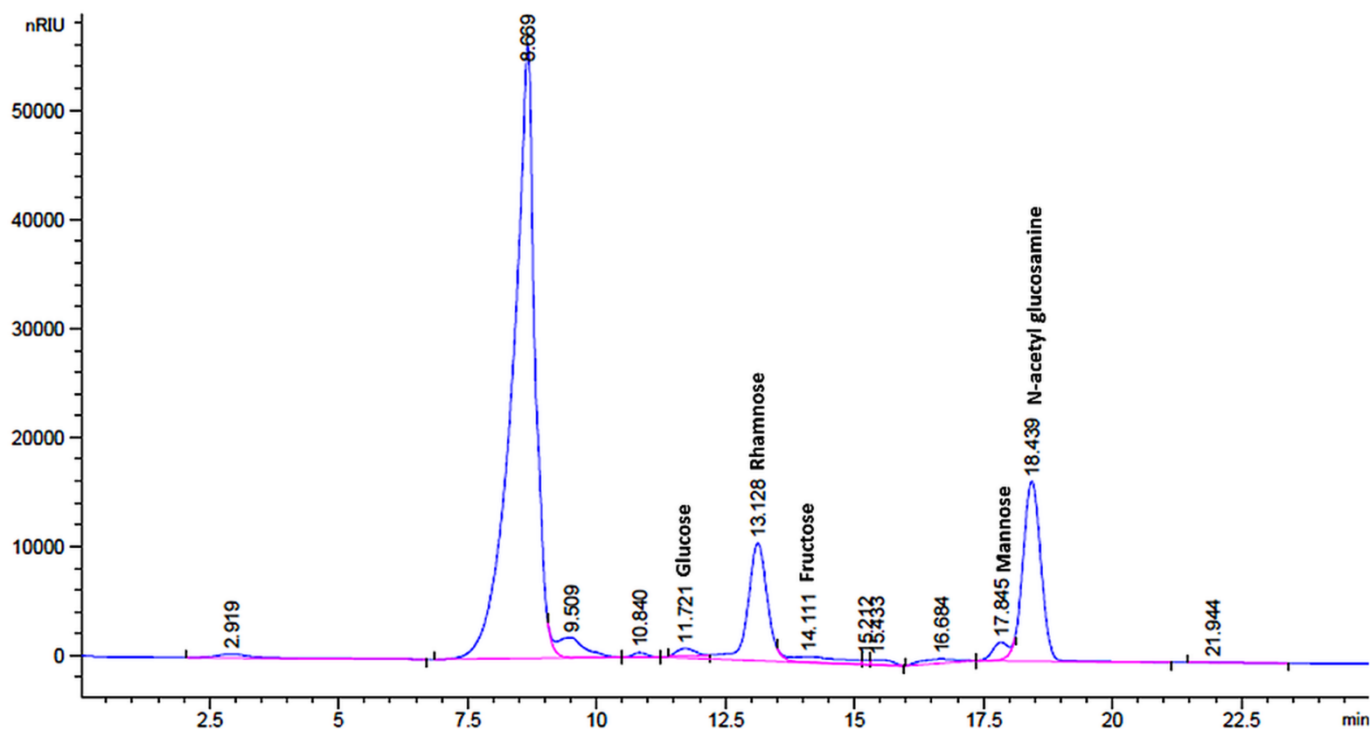


Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [nRIU*s]	Height [nRIU]	Area %
1	0.039	BV	0.0747	15.98914	3.56885	1.248e-4
2	0.320	VB	0.4480	414.92065	11.23955	3.239e-3
3	4.396	BV	0.1291	54.31516	5.55970	4.240e-4
4	4.811	VV	0.7659	1722.34314	27.07503	0.0134
5	5.624	VV	0.1153	287.61612	35.81577	2.245e-3
6	5.773	VB	0.6928	2268.61060	38.92958	0.0177
7	9.033	BV R	0.3921	3.01951e6	1.01586e5	23.5723
8	10.321	VV E	0.9173	3.98086e4	548.96838	0.3108
9	11.706	VB E	0.5297	1.08477e4	303.19513	0.0847
10	13.186	BV	0.7309	4.01585e4	773.63239	0.3135
11	14.642	VV	0.0726	1707.35437	333.95615	0.0133
12	14.732	VB	0.8820	2.61375e4	352.65652	0.2040
13	16.916	BV	0.3401	1.33573e6	6.14316e4	10.4276
14	17.538	VV R	0.4186	8.08473e6	2.99520e5	63.1147
15	18.876	VB E	1.5030	2.43636e5	2053.46021	1.9020
16	23.744	BB	0.6444	1088.86292	20.39677	8.500e-3
17	25.268	BV	0.0686	21.18027	4.62200	1.653e-4
18	25.504	VV	0.1443	226.12900	20.42713	1.765e-3
19	25.576	VB	0.6080	1163.99670	23.59171	9.087e-3
20	28.967	VV	0.1309	22.78110	2.21303	1.778e-4
21	29.120	VB	0.1347	24.01660	2.30201	1.875e-4

Totals :

1.28096e7 4.67099e5

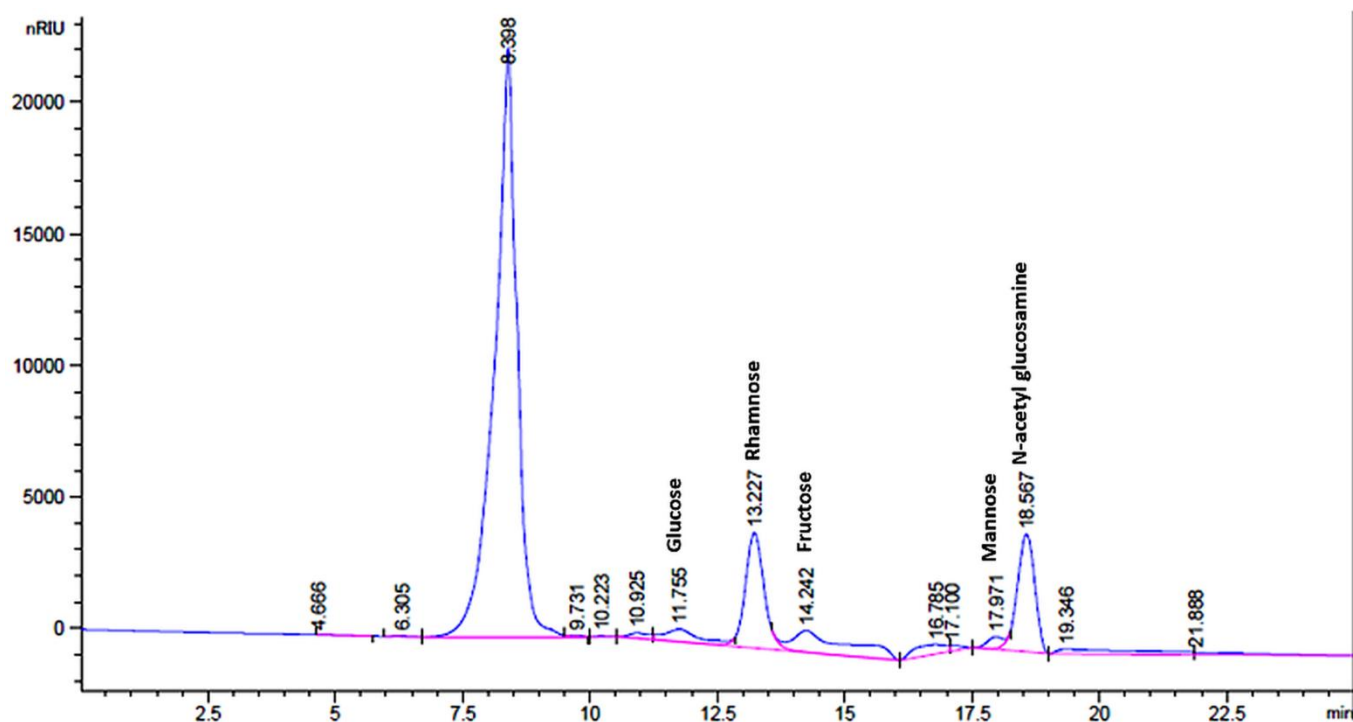
5. Mẫu thủy phân EPS từ môi trường TB, pH 8,46, NaCl 3,27%, bổ sung sucrose 1%.



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [nRIU*s]	Height [nRIU]	Area %
1	2.919	VB R	0.8412	2.16377e4	374.06183	0.8162
2	8.669	BV R	0.4020	1.73061e6	5.62700e4	65.2783
3	9.509	VB E	0.4651	6.56317e4	1814.68542	2.4756
4	10.840	BB	0.3003	7808.02441	413.27310	0.2945
5	11.721	BV E	0.3854	1.66706e4	690.49176	0.6288
6	13.128	VV R	0.4140	2.96839e5	1.07842e4	11.1967
7	14.111	VV E	0.8844	3.71129e4	553.04700	1.3999
8	15.212	VV E	0.1360	3965.75122	396.76947	0.1496
9	15.433	VB E	0.3579	1.26325e4	432.63937	0.4765
10	16.684	BB	0.6849	1.82832e4	361.59189	0.6896
11	17.845	BV E	0.3055	3.10809e4	1577.22656	1.1724
12	18.439	VB R	0.3856	4.07529e5	1.64850e4	15.3719
13	21.944	BBA	0.6130	1327.90527	26.09863	0.0501

Totals : 2.65113e6 9.01791e4

6. Mẫu thủy phân EPS từ môi trường TB, pH 8,46, NaCl 3,27%, bổ sung sucrose 5%.

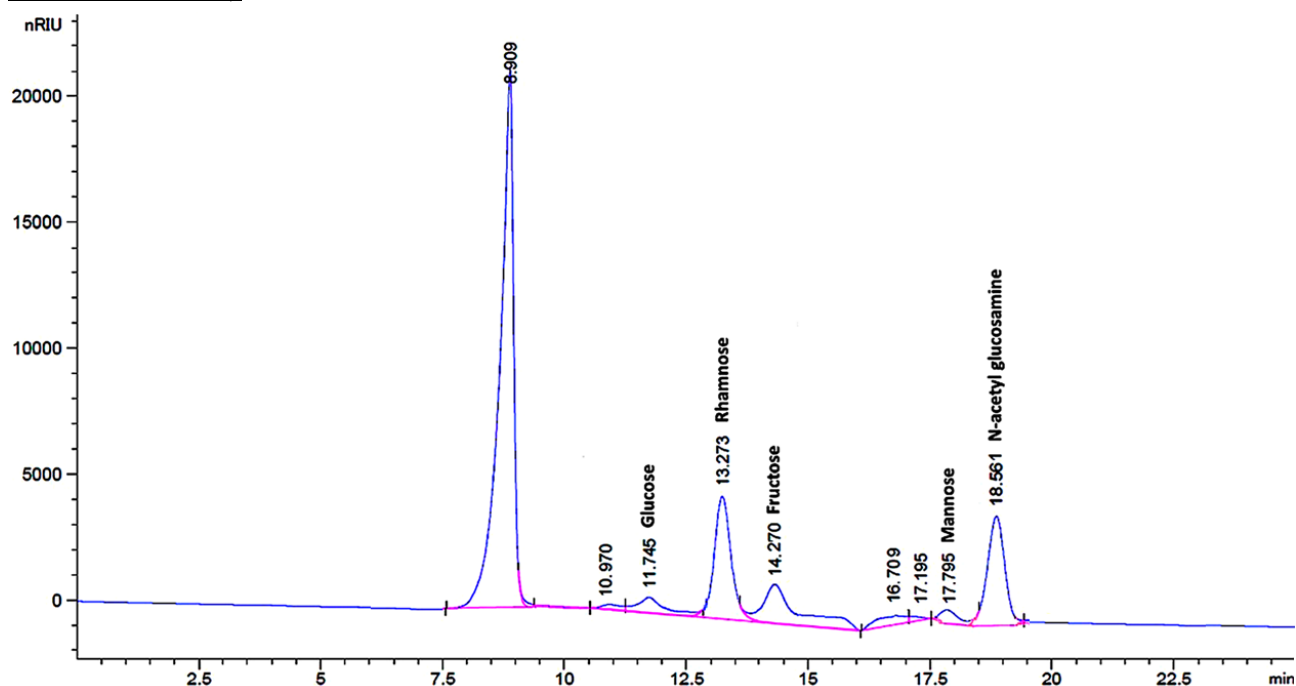


Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [nRIU*s]	Height [nRIU]	Area %
1	4.666	BB	0.8452	164.91742	2.33002	0.0155
2	6.305	BB	0.3254	485.81937	19.63233	0.0455
3	8.398	BV R	0.4000	6.93095e5	2.23907e4	64.9617
4	9.731	VB E	0.2243	814.23743	57.99852	0.0763
5	10.223	BB	0.2550	432.67020	27.80386	0.0406
6	10.925	BV E	0.4001	5737.45313	204.89479	0.5378
7	11.755	VV E	0.6686	2.29869e4	474.71091	2.1545
8	13.227	VV R	0.3972	1.13342e5	4376.00244	10.6232
9	14.242	VB E	0.9888	6.25399e4	822.29633	5.8617
10	16.785	BV	0.6435	1.67271e4	350.27228	1.5678
11	17.100	VB	0.2360	3214.85620	216.38127	0.3013
12	17.971	BV E	0.3169	8815.61133	430.08914	0.8263
13	18.567	VB R	0.3818	1.08398e5	4477.54443	10.1598
14	19.346	BV	1.4884	2.20105e4	183.15750	2.0630
15	21.888	VBA	1.0314	8164.98145	93.93630	0.7653

Totals :

1.06693e6 3.41277e4

7. Mẫu thủy phân EPS từ điều kiện nuôi cấy tối ưu (TB, pH 8,46, NaCl 3,27%, sucrose 7,26 %)



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [nRIU*s]	Height [nRIU]	Area %
1	8.909	BV R	0.3422	5.23256e5	2.12302e4	59.6798
2	10.970	BV E	0.4011	5741.45342	205.11091	0.6548
3	11.745	VV E	0.6685	2.29959e4	486.71829	2.6228
4	13.273	VV R	0.3973	1.13202e5	4221.21452	12.9112
5	14.270	VB E	0.9889	7.53982e4	1000.14314	8.5995
6	16.709	BV	0.6429	1.59126e4	349.19856	1.8149
7	17.195	VB	0.2332	3198.12081	215.38127	0.3648
8	17.795	BV E	0.3329	8878.87662	431.12958	1.0127
9	18.561	VB R	0.3817	1.08189e5	4465.91265	12.3395

Totals : 8.76772e5 3.26050e4

Phụ lục 19. Ý nghĩa thống kê của các sai khác về giá trị OD600 và EPSDTA1 nuôi trong môi trường TB, pH 8,46, sucrose 72,6 g/L ở các điều kiện stress muối và/hoặc kim loại nặng.

➤ **OD600**

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Điều kiện stress	N	Mean	Grouping
Đối chứng	3	22.933	A
3% NaCl	3	20.607	B
Thêm 1% NaCl, 1 µg/mL Co(NO ₃) ₂ , 1 µg/mL Cd(NO ₃) ₂	3	18.270	C
Thêm 1% NaCl và các muối FeSO ₄ , CuSO ₄ , Ag ₂ SO ₄ , ZnCl ₂ , MgCl ₂ , MnSO ₄ đều ở mức 1 µg/mL	3	16.887	D

Means that do not share a letter are significantly different.

➤ **mEPS**

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Điều kiện stress	N	Mean	Grouping
3% NaCl	3	30.783	A
Thêm 1% NaCl, 1 µg/mL Co(NO ₃) ₂ , 1 µg/mL Cd(NO ₃) ₂	3	29.330	B
Thêm 1% NaCl và các muối FeSO ₄ , CuSO ₄ , Ag ₂ SO ₄ , ZnCl ₂ , MgCl ₂ , MnSO ₄ đều ở mức 1 µg/mL	3	28.727	B
Đối chứng	3	19.273	C

Means that do not share a letter are significantly different.

➤ **Hàm lượng carbohydrate**

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Điều kiện stress	N	Mean	Grouping
Thêm 1% NaCl và các muối FeSO ₄ , CuSO ₄ , Ag ₂ SO ₄ , ZnCl ₂ , MgCl ₂ , MnSO ₄ đều ở mức 1 µg/mL	3	41.293	A
3% NaCl	3	40.810	A
Thêm 1% NaCl, 1 µg/mL Co(NO ₃) ₂ , 1 µg/mL Cd(NO ₃) ₂	3	37.833	B
ĐC	3	19.340	C

Means that do not share a letter are significantly different.

➤ **Hàm lượng protein**

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Điều kiện stress	N	Mean	Grouping
Thêm 1% NaCl và các muối FeSO ₄ , CuSO ₄ , Ag ₂ SO ₄ , ZnCl ₂ , MgCl ₂ , MnSO ₄ đều ở mức 1 µg/mL	3	28.260	A
Thêm 1% NaCl, 1 µg/mL Co(NO ₃) ₂ , 1 µg/mL Cd(NO ₃) ₂	3	26.580	B
3% NaCl	3	25.903	B
ĐC	3	12.063	C

Means that do not share a letter are significantly different.

Phụ lục 20. Ý nghĩa sai khác thống kê giữa các giá trị độ mặn của các mẫu nước từ 4 thí nghiệm giảm độ mặn của đất

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Thí nghiệm	N	Mean	Grouping
TN2	3	563.67	A
TN4	3	535.27	B
TN3	3	493.85	C
TN1	3	62.36	D

Means that do not share a letter are significantly different.

Phụ lục 21. Ý nghĩa sai khác thống kê giữa các giá trị WHC của EPS DTA1.

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Thời gian (giờ)	N	Mean	Grouping
4	3	1764.04	A
2	3	1762.20	A
1	3	1001.80	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Phụ lục 22. Ý nghĩa thông kê của các sai khác về tốc độ thấm nước của 5 thí nghiệm đánh giá khả năng giữ nước của đất được xử lý bằng EPS và dịch nuôi cấy chủng *B. velezensis* DTA1.

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Thí nghiệm	N	Mean	Grouping	
1	3	0.9433	A	
5	3	0.18352	B	
4	3	0.13816	B	C
3	3	0.12431		C
2	3	0.04876		D

Means that do not share a letter are significantly different.

Phụ lục 23. Ý nghĩa thông kê của các sai khác về WHC của 5 thí nghiệm đánh giá khả năng giữ nước của đất được xử lý bằng EPS và dịch nuôi cấy chủng *B. velezensis* DTA1.

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Thí nghiệm	N	Mean	Grouping	
5	3	66.311	A	
4	3	60.40	B	
3	3	53.721		C
2	3	49.059		D
1	3	33.165		E

Means that do not share a letter are significantly different.

Phụ lục 24. Ý nghĩa thống kê của các sai khác về hàm lượng carbohydrate trong các mẫu đất thí nghiệm quy mô chậu vại.

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Thí nghiệm	N	Mean	Grouping	
TN7	3	1120.8	A	
TN5	3	1045.34	B	
TN3	3	960.79	C	
TN6	3	725.544	D	
TN4	3	642.24		E
TN2	3	633.75		E
TN1	3	212.77		F

Means that do not share a letter are significantly different.

Phụ lục 25. Ý nghĩa thống kê các sai khác về WHC của các mẫu đất thí nghiệm ở các thời điểm sau tưới nước

Sau 0 giờ tưới nước

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Kí hiệu mẫu	N	Mean	Grouping
TN7	3	38.33	A
TN5	3	31.833	B
TN6	3	30.500	B
TN3	3	29.167	B C
TN4	3	28.667	B C
TN2	3	26.167	C
TN1	3	18.50	D

Means that do not share a letter are significantly different.

Sau 24 giờ tưới nước

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Kí hiệu mẫu	N	Mean	Grouping
TN7	3	34.30	A
TN6	3	28.167	B
TN5	3	26.500	B
TN3	3	25.167	B
TN4	3	21.433	C
TN2	3	19.50	C
TN1	3	12.167	D

Means that do not share a letter are significantly different.

Sau 72 giờ tưới nước

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Kí hiệu mẫu	N	Mean	Grouping
TN7	3	31.00	A
TN6	3	25.500	B
TN5	3	23.467	B C
TN3	3	21.667	C D
TN4	3	19.667	D

TN2	3	18.167	D
TN1	3	12.333	E

Means that do not share a letter are significantly different.

Phụ lục 26. Ý nghĩa của các sai khác giữa nồng độ NaCl trong đất ở các lô thí nghiệm 1, 6 và 7 trong thí nghiệm trồng cây trong chậu vại

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Thí nghiệm	N	Mean	Grouping
TN6	3	0.1600	A
TN7	3	0.1533	A
TN1	3	0.04333	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Phụ lục 27. Kết quả so sánh ý nghĩa khác biệt ở một số chỉ tiêu rau mồng tơi ở 7 thí nghiệm đánh giá khả năng giữ nước và giảm mặn của vi khuẩn sinh EPS trên quy mô chậu vại.

Chỉ tiêu chiều dài rễ

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Kí hiệu mẫu	N	Mean	Grouping
TN3	3	23.43	A
TN5	3	16.50	A B
TN4	3	15.93	A B
TN2	3	15.000	A B
TN1	3	13.60	B
TN7	3	10.33	B
TN6	3	8.63	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Chỉ tiêu bề rộng bầu rễ

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Kí hiệu mẫu	N	Mean	Grouping
TN5	3	12.83	A
TN3	3	10.667	A B
TN4	3	9.667	A B C
TN1	3	7.833	A B C

TN2	3	6.833	B	C
TN6	3	5.333		C
TN7	3	4.667		C

Means that do not share a letter are significantly different.

Chỉ tiêu khối lượng bầu rễ

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Kí hiệu mẫu	N	Mean	Grouping	
TN5	3	302.1	A	
TN3	3	184.7	A	B
TN4	3	173.4		B C
TN7	3	96.03		B C
TN2	3	64.9		B C
TN1	3	61.6		C
TN6	3	60.17		C

Means that do not share a letter are significantly different.

Chỉ tiêu chiều cao thân lá

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Kí hiệu mẫu	N	Mean	Grouping	
TN5	3	26.43	A	
TN3	3	20.33	A	B
TN4	3	18.83	A	B
TN2	3	16.33	A	B
TN7	3	14.77	A	B
TN1	3	14.67	A	B
TN6	3	12.233		B

Means that do not share a letter are significantly different.

Chỉ tiêu khối lượng thân lá

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Kí hiệu mẫu	N	Mean	Grouping	
TN5	3	25.233	A	
TN3	3	22.833	A	B

TN4	3	20.667	B	
TN2	3	14.733	C	
TN7	3	11.633		D
TN1	3	10.667		D
TN6	3	10.200		D

Means that do not share a letter are significantly different.

Chỉ tiêu số lượng lá

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Kí hiệu mẫu	N	Mean	Grouping	
TN5	3	10.333	A	
TN4	3	10.333	A	
TN3	3	10.000	A	
TN1	3	8.000	A	B
TN2	3	7.00	B	C
TN7	3	6.333	B	C
TN6	3	5.333	C	

Means that do not share a letter are significantly different.

Phụ lục 28. Ý nghĩa của các sai khác giữa các chỉ số SPAD ở 7 lô Thí nghiệm trồng cây trong chậu

Ngày thứ 0:

Thí nghiệm	N	Mean	Grouping
TN2	3	33.567	A
TN3	3	32.867	A
TN1	3	32.800	A
TN4	3	32.200	A
TN5	3	32.067	A
TN6	3	31.933	A
TN7	3	31.400	A

Ngày thứ 15:

Thí nghiệm	N	Mean	Grouping
TN5	3	41.133	A
TN3	3	39.867	A
TN2	3	38.767	A
TN7	3	36.033	A B
TN4	3	36.033	A B
TN6	3	32.933	B
TN1	3	32.600	B

Ngày thứ 30:

Thí nghiệm	N	Mean	Grouping
TN5	3	45.667	A
TN3	3	44.400	A B
TN4	3	42.767	A B
TN2	3	40.100	B
TN7	3	34.000	C
TN1	3	28.567	D
TN6	3	26.733	D

Phụ lục 29. Hình ảnh thử nghiệm trồng rau quy mô chậu tại Nhà lưới, Khu thực nghiệm và đào tạo nghề, Học viện Nông nghiệp Việt Nam



Phụ lục 30. Hình ảnh trồng rau trên đất cát san hô cải tạo quy mô đồng ruộng tại Nhà lưới, Trạm nghiên cứu thử nghiệm biển Đầm Báy

