

Đặc điểm hình thái, sinh lý, sự chuyển hóa, phân loại và tiềm năng ứng dụng của vi khuẩn *Bacillus subtilis* và vi khuẩn *Bacillus pumilus* trong nông nghiệp xanh tại Thành phố Hà Nội

TS. Lưu Ngọc Sinh, ThS. Ngô Thanh Sơn
Trường Đại học Thủ đô Hà Nội

Tóm tắt

Chi *Bacillus* bao gồm các vi khuẩn Gram dương, hình que, có khả năng hình thành nội bào tử (endospore) chịu nhiệt và phân bố rộng rãi trong các hệ sinh thái từ đất, nước biển đến đường tiêu hóa động vật và sinh vật biển. Bài báo tổng quan này hệ thống hóa toàn diện các đặc điểm hình thái, sinh lý chuyển hóa kỵ khí tùy tiện, di truyền học tạo bào tử và tiềm năng ứng dụng công nghiệp/probiotic của hai loài tiêu biểu: *Bacillus subtilis* và *Bacillus pumilus*. *B. subtilis* đóng vai trò là sinh vật mô hình trong nghiên cứu nhân đôi nhiễm sắc thể, biệt hóa tế bào và là nhà máy tế bào thương mại tiết ngoại bào enzyme với năng suất đạt 20–25 g/L (van Dijk & Hecker, 2013). Trong khi đó, *B. pumilus* thể hiện năng lực thích ứng sinh thái cực đoan, chống chịu bức xạ UV, hóa chất diệt khuẩn và tiết các peptide kháng khuẩn có giá trị. Phân tích phân loại học đa pha kết hợp profile ester methyl axit béo toàn bộ tế bào (FAME) và giải trình tự gen 16S rDNA (kích thước amplicon ~454–500 bp) xếp cả hai loài vào Nhóm 1 (*B. subtilis* group) với độ tương đồng chuỗi đạt 99–100% (Ash et al., 1991; Parvathi et al., 2009). Đặc biệt, đánh giá an toàn vi sinh ghi nhận dữ liệu thực nghiệm mang tính bước ngoặt về sự xuất hiện của gen độc tố nôn mửa *cesB* (kích thước amplicon 635 bp, độ tương đồng nucleotide 96%) ở chủng *B. pumilus* NIOB 133 phân lập từ cá cửa sông tại Cochín, Ấn Độ (Parvathi et al., 2009). Mặc dù *Bacillus* spp. được trao trạng thái an toàn GRAS (US FDA) và QPS (EFSA), và thử nghiệm lâm sàng trên người của chủng *B. subtilis* CU1 (liều 2 tỷ bào tử/ngày với phác đồ 10 ngày uống, 18 ngày nghỉ mỗi tháng kéo dài 4 tháng) chứng minh tính an toàn tuyệt đối (Lefevre et al., 2017), các nguy cơ rủi ro sinh học như hiện tượng nhầy ruột bánh mì và nhiễm trùng cơ hội đặt ra yêu cầu bắt buộc phải đánh giá an toàn sinh học ở cấp độ chủng (strain-specific assessment) dựa trên công nghệ giải trình tự toàn bộ hệ gen (WGS).

Từ khóa: *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, 16S rDNA, FAME, Sporulation, *cesB*, Probiotic.

1. Đặt vấn đề

Chi *Bacillus* đại diện cho một trong những nhóm vi sinh vật đa dạng và phân bố rộng rãi nhất trong sinh quyển. Các thành viên thuộc chi này là vi khuẩn Gram dương, hình que, hiếu khí hoặc kỵ khí tùy tiện, có đặc tính sinh học nổi bật là khả năng hình thành nội bào tử (endospore) đề kháng mạnh mẽ với nhiệt độ cao, hóa chất diệt khuẩn, bức xạ và sự cạn kiệt dinh dưỡng. Khả năng tạo bào tử này cho phép vi khuẩn *Bacillus* duy trì sức sống và thích ứng bền vững trong vô số môi trường sinh thái đa dạng, từ hệ sinh thái đất giàu chất hữu cơ, nước biển ven bờ và đại dương sâu, cơ thể sinh vật biển (như bọt biển, cá, giáp xác) cho đến đường tiêu hóa của động vật nhai lại và con người (Errington & Aart, 2020; Parvathi et al., 2009; Paul et al., 2021).

Trong chi *Bacillus*, *Bacillus subtilis* được coi là sinh vật mô hình (model organism) vi khuẩn Gram dương chuẩn mực nhất cho các nghiên cứu sinh học phân tử về cơ chế nhân đôi nhiễm sắc thể, quá trình biệt hóa tế bào và mạng lưới điều hòa tạo bào tử (Errington & Aart, 2020; Losick, 2020). Bên cạnh giá trị học thuật, *B. subtilis* còn là "ngựa kéo" (workhorse) thương mại hàng đầu trong công nghệ sinh học nhờ năng lực tiết ngoại bào lượng lớn enzyme công nghiệp và protein tái tổ hợp. Mặt khác, *Bacillus pumilus* nổi lên như một đối tượng nghiên cứu then chốt trong hệ sinh thái biển/ven biển và các môi trường cực đoan. Loài này sở hữu khả năng chống chịu vượt trội đối với bức xạ cực tím (UV), các chất oxy hóa mạnh như H_2O_2 , tình trạng mất nước (desiccation) và có khả năng sinh tổng hợp các hợp chất kháng khuẩn, bacteriocin có hoạt tính sinh học cao (Nieminen et al., 2007; Parvathi et al., 2009).

Mục tiêu của bài báo tổng quan này nhằm hệ thống hóa và phân tích toàn diện các đặc điểm phân loại học phân tử, hình thái, sinh lý chuyển hóa, di truyền học quá trình tạo bào tử, độc tố học và các tiềm năng ứng dụng công nghiệp cũng như probiotic của *B. subtilis* và *B. pumilus* dựa trên dữ liệu thực nghiệm thực tế từ các công trình nghiên cứu hiện đại.

2. Đặc điểm hình thái, phân loại phân tử và tiêu chuẩn kiểm nghiệm vi sinh

2.1. Đặc điểm hình thái tế bào và sinh hóa đặc trưng

Tế bào *B. subtilis* và *B. pumilus* đều có dạng hình que (rod-shaped), đường kính trung bình từ 0,25–1,0 μm và chiều dài khoảng 4–10 μm . Cả hai loài đều chuyển động nhờ hệ thống roi (flagella) phân bố quanh tế bào và cho phản ứng Gram dương.

Về mặt sinh thái - chuyển hóa, hoạt tính enzyme ngoại bào của hai loài phản ánh sự tối ưu hóa với sinh cảnh tự nhiên: các chủng *B. pumilus* phân lập từ môi trường biển và cửa sông thể hiện tỷ lệ tiết protease và lipase cao nhằm phân hủy các nguồn hữu cơ giàu protein và lipid từ động vật biển (cá, giáp xác); trong khi *B. subtilis* tối ưu hóa khả năng phân giải các polysaccharide phức tạp (tinh bột, cellulose) phổ biến trong sinh cảnh đất và vùng rễ thực vật (rhizosphere).

Bảng 2.1: So sánh đặc tính sinh hóa và khả năng sử dụng cơ chất giữa *Bacillus subtilis* và *Bacillus pumilus*

Chỉ tiêu Sinh hóa / Cơ chất	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus pumilus</i>
Nhuộm Gram	Positive (+)	Positive (+)
Thử nghiệm Catalase	Positive (+)	Positive (+)
Thử nghiệm Oxidase	Biến đổi (Variable / -)	Positive (+)
Phản ứng Voges-Proskauer (VP)	Positive (+)	Positive (+)
Sử dụng Citrate	Positive (+)	Negative (-)
Thử nghiệm Indole	Negative (-)	Negative (-)
Thử nghiệm Urease	Negative (-)	Negative (-)
Khử Nitrate (Nitrate reduction)	Positive (+)	Negative (-)
Khả năng di động (Motility)	Positive (+)	Positive (+)
Thủy phân Gelatin (Gelatinase)	Positive (+)	Negative (-)

Thủy phân Casein (Protease)	Positive (+)	Positive (+)
Thủy phân Tinh bột (Amylase)	Positive (+)	Positive (+)*
Thủy phân Lipid (Lipase)	Positive (+)	Positive (+)
Thủy phân Chitin (Chitinase)	Negative (-)	Negative (-)
Thủy phân DNA (DNase)	Negative (-)	Negative (-)
Lên men D-Glucose	Positive (+)	Positive (+)
Lên men D-Xylose	Positive (+)	Positive (+)
Lên men D-Mannitol	Positive (+)	Positive (+)
Lên men L-Arabinose	Positive (+)	Positive (+)
Lên men Galactose	Positive (+) / Biến đổi	Positive (+)
Lên men Fructose	Positive (+)	Positive (+)
Lên men Lactose	Biến đổi (Variable)	Negative (-)
Lên men Maltose	Positive (+)	Positive (+)
Lên men Sucrose	Positive (+)	Positive (+)

(Nguồn tổng hợp: Aryal, 2022; Parvathi et al., 2009; Paul et al., 2021)

2.2. Phương pháp phân loại phân tử, sơ đồ FAME và giải trình tự 16S rDNA

Để định danh chính xác các chủng thuộc chi *Bacillus*, việc kết hợp giữa phân loại học hình thái truyền thống và các công cụ phân tử hiện đại là tiêu chuẩn bắt buộc:

- **Phân tích profile ester methyl axit béo toàn bộ tế bào (FAME):** Trích xuất và phân tích sắc khí các ester methyl axit béo bằng hệ thống Sherlock TSBA Library (phiên bản 3.9). Chỉ số tương đồng (Similarity Index) >60% cho phép phân nhóm chính xác các chủng ở cấp độ loài (Parvathi et al., 2009).
- **Giải trình tự gen 16S rDNA:** Sử dụng cặp mồi vạn năng EUB-F (5'-gcacaagcgggtggagcatgtgg-3') và EUB-R (5'-gcccggaacgtattccaccg-3') để khuếch đại đoạn gen 16S rDNA với kích thước amplicon khoảng 454–500 bp (chính xác 454 bp). Phân tích so sánh BLAST trên NCBI xếp *B. subtilis* và *B. pumilus* vào Nhóm 1 (Group 1 - *B. subtilis* group) với độ tương đồng chuỗi đạt 99–100% (Ash et al., 1991; Parvathi et al., 2009).
- **AP-PCR (Arbitrarily Primed PCR):** Kỹ thuật nhân bản ngẫu nhiên đoạn DNA sử dụng mồi đơn CRA22 (5'-ccgcagccaa-3') tạo ra 4–10 dải băng DNA đặc trưng, giúp phân tích sự đa dạng di truyền sâu trong nội bộ loài *B. pumilus* (Parvathi et al., 2009).

2.3. Ghi nhận thực nghiệm mang tính bước ngoặt về dịch chuyển di truyền gen độc tố *cesB* ở *B. pumilus* biển Cochin

Một phát hiện sinh học phân tử có ý nghĩa bước ngoặt đã được ghi nhận tại vùng biển ven bờ Cochin, Ấn Độ khi tiến hành phân lập 82 chủng *Bacillus* spp. (bao gồm 16 chủng *B. pumilus*, 15 chủng *B. cereus*, 10 chủng *B. subtilis*...) (Parvathi et al., 2009):

Khi sàng lọc các gen mã hóa độc tố, chủng *B. pumilus* NIOB 133 phân lập từ cá cửa sông đã cho sản phẩm khuếch đại PCR kích thước 635 bp khi phản ứng với cặp mồi đặc hiệu EM1-F (5'-gacaagagaaatttctacgagcaagtacaat-3') và EM1-r (5'-gcagccttccaattactccttctgccacagt-3') hướng đến gen *cesB* (Parvathi et al., 2009).

Gen *cesB* định vị trong cụm operon *ces* mã hóa cho enzyme cereulide synthetase - một phức hợp Non-Ribosomal Peptide Synthetase (NRPS) chịu trách nhiệm tổng hợp cereulide (độc tố nôn mửa chịu nhiệt độ hại thường chỉ xuất hiện ở các chủng *B. cereus* mang plasmid độc lực pCER270 kích thước 270-kb) (Ehling-Schulz et al., 2004; Horwood et al., 2004; Parvathi et al., 2009).

Phân tích trình tự đoạn gen *cesB* của chủng NIOB 133 cho thấy độ tương đồng 96% về chuỗi nucleotide và 92% về chuỗi axit amin so với gen *cesB* trên plasmid pCER270 của *B. cereus* (mã truy cập GenBank DQ889676) (Parvathi et al., 2009; Rasko et al., 2007).

Mặc dù mang gen *cesB*, chủng *B. pumilus* NIOB 133 lại âm tính với gen *cesA* (khi sử dụng cặp mồi CER1/EMT1) và hoàn toàn không thể phân biệt được với các chủng *B. pumilus* lành tính khác thông qua các phản ứng sinh hóa, profile FAME hay kiểu hình phân tử AP-PCR. Sự hiện diện của gen *cesB* (dù thiếu *cesA*) ở chủng vi khuẩn biển này phản ánh dấu vết của hiện tượng chuyển gen ngang (Horizontal Gene Transfer - HGT) hoặc sự tiến hóa phân đoạn của operon độc tố giữa các loài trong chi *Bacillus* ở môi trường tự nhiên (Parvathi et al., 2009).

3. Sinh lý chuyển hóa, thích ứng môi trường và di truyền học tạo bào tử (Sporulation)

3.1. Sinh lý chuyển hóa hiếu khí và lên men kỵ khí

Về lịch sử phân loại, *B. subtilis* từng được xem là vi khuẩn "hiếu khí bắt buộc" (strict aerobe). Tuy nhiên, các nghiên cứu sinh hóa hiện đại đã điều chỉnh định danh sinh lý của loài này thành vi khuẩn "kỵ khí tùy tiện" (facultative anaerobe) (Nakano & Zuber, 1998; Paul et al., 2021).

Trong điều kiện thiếu hụt oxygen, *B. subtilis* duy trì sinh trưởng bằng hô hấp kỵ khí (sử dụng nitrate làm chất nhận electron cuối cùng nhờ hệ thống enzyme nitrate reductase) hoặc chuyển sang con đường lên men acid hỗn hợp. Về động học chuyển hóa phân tử, hệ gen của *B. subtilis* chứa gen *pta* mã hóa cho enzyme phosphotransacetylase. Enzyme này xúc tác quá trình chuyển đổi Acetyl-CoA thành Acetyl-phosphate, từ đó tổng hợp ATP thông qua con đường phosphoryl hóa cấp mức cơ chất (substrate-level phosphorylation) và giải phóng acetate ra môi trường ngoại bào, đảm bảo duy trì cân bằng năng lượng khi thiếu hụt oxy (Dauner et al., 2001; Rahman et al., 2020).

3.2. Khả năng thích ứng với môi trường cực đoan

Cả *B. subtilis* và *B. pumilus* đều thể hiện ngưỡng chống chịu sinh lý rất cao, cho phép chúng tồn tại trong các điều kiện môi trường khắc nghiệt:

Nhiệt độ: Khả năng sinh trưởng trong dải nhiệt độ rộng từ 5°C đến 50°C (Parvathi et al., 2009).

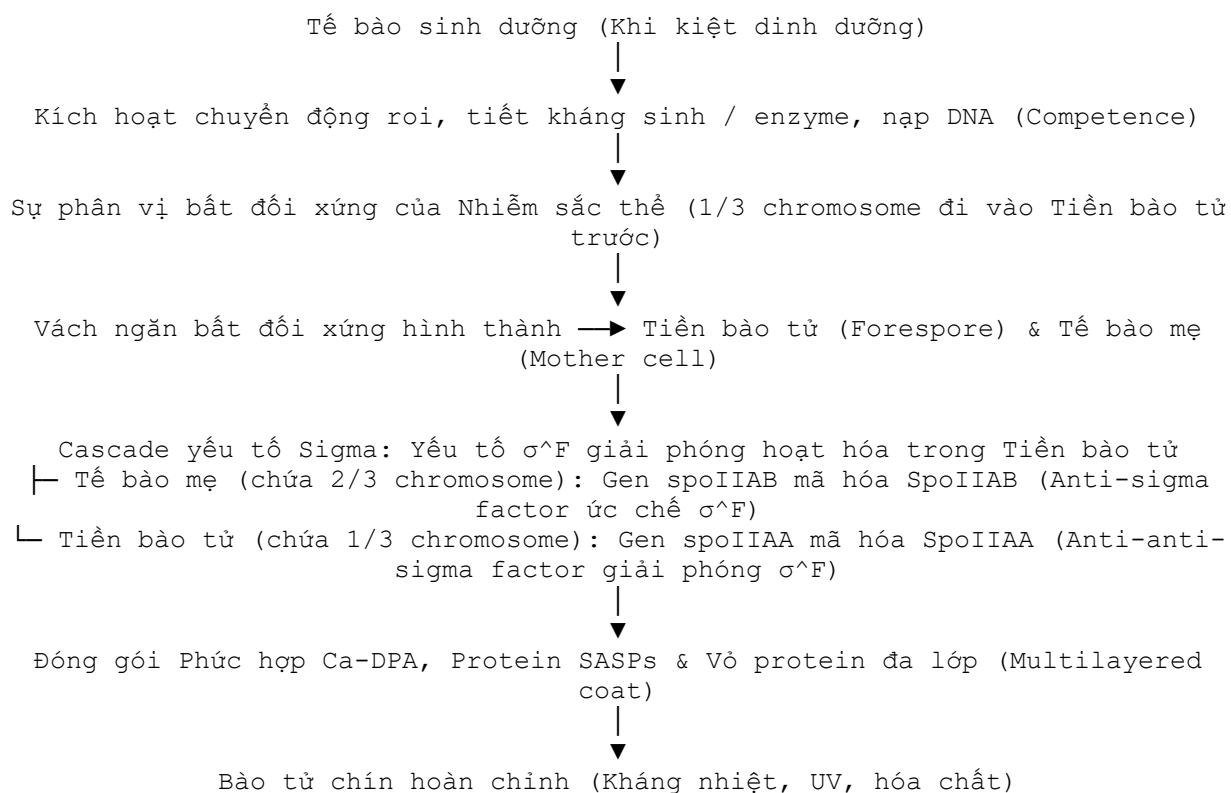
Độ pH: Duy trì sự sống trong dải pH môi trường linh hoạt từ 5.0 đến 11.0 (Parvathi et al., 2009).

Độ mặn (NaCl): Sinh trưởng tốt trong điều kiện áp suất thẩm thấu cao với nồng độ NaCl dao động từ 6,5% đến 10% (Aryal, 2022; Parvathi et al., 2009; Paul et al., 2021).

Chống chịu bức xạ và hạn hán: Bào tử của *B. pumilus* thể hiện năng lực sống sót trước tình trạng mất nước kéo dài (desiccation), tiếp xúc với các hóa chất diệt khuẩn (H_2O_2), bức xạ cực tím (UV) và môi trường ngoài không gian (Horneck et al., 2010; Nicholson et al., 2000; Parvathi et al., 2009).

3.3. Di truyền học và cơ chế điều hòa quá trình tạo bào tử (Sporulation)

Quá trình hình thành nội bào tử ở *B. subtilis* là hệ thống mô hình tiêu chuẩn cho sự biệt hóa tế bào ở vi khuẩn.



Động lực kích hoạt: Khi nguồn dinh dưỡng bị cạn kiệt, tế bào không lập tức tạo bào tử mà kích hoạt các phản ứng đáp ứng thay thế: tăng cường chuyển động roi (chemotaxis), tiết enzyme thủy phân (protease, amylase) để tìm kiếm thức ăn, tiết kháng sinh tiêu diệt đối thủ, và kích hoạt trạng thái nạp DNA ngoại bào (competence) để sửa chữa DNA tổn thương (Stephens, 1998; Tan & Ramamurthi, 2014).

Cơ chế phân vị bất đối xứng nhiễm sắc thể và Cascade yếu tố Sigma: Khi quyết định tạo bào tử được đưa ra, vách ngăn bào tử bất đối xứng hình thành. Về mặt vật lý di truyền, chỉ khoảng

1/3 nhiễm sắc thể được đưa vào tiền bào tử (forespore) trước, mang locus mã hóa cho yếu tố σ^F (*sigF*) và *spoIIAA*. Trong khi đó, locus *spoIIAB* nằm trên 2/3 nhiễm sắc thể còn lại ở tế bào mẹ (mother cell). Sự bất đối xứng không gian - thời gian của nhiễm sắc thể này là nền tảng quyết định sự giải phóng σ^F :

- Trong tiền bào tử, protein SpoIIAA (mã hóa bởi *spoIIAA*) đóng vai trò là anti-anti-sigma factor, liên kết và vô hiệu hóa anti-sigma factor SpoIIAB, giải phóng yếu tố σ^F hoạt tính để kích hoạt chương trình phiên mã tạo bào tử (Higgins & Dworkin, 2012; Slonczewski et al., 2020).
- Ở tế bào mẹ, do locus *spoIIAB* liên tục được phiên mã từ 2/3 nhiễm sắc thể còn lại, nồng độ protein SpoIIAB luôn áp đảo, duy trì sự ức chế σ^F và ngăn chặn quá trình tạo bào tử xảy ra tại tế bào mẹ (Higgins & Dworkin, 2012).

Cấu trúc bào tử: Bào tử chín có vỏ đa lớp (multilayered coat) chống chịu lực cơ học, chứa hàm lượng lớn phức hợp Canxi - Axit Dipicolinic (Ca-DPA) giúp làm khô lõi bào tử và các protein dòng SASPs (Small Acid-Soluble Spore Proteins) gắn chặt bảo vệ cấu trúc DNA khỏi tác động phá hủy của nhiệt độ, hóa chất và bức xạ vũ trụ (Horneck et al., 2010; McKenney et al., 2013).

4. Hệ chất chuyển hóa thứ cấp và cơ chế kiểm soát sinh học (Biocontrol)

4.1. Các hợp chất kháng khuẩn và peptide phi ribosome (NRPs)

Chủng *B. subtilis* và *B. pumilus* sở hữu tiềm năng hóa sinh to lớn trong việc tổng hợp các peptide kháng khuẩn thông qua con đường phi ribosome (Non-Ribosomal Peptides - NRPs):

- **Lipopeptide kháng nấm:** *B. subtilis* sản sinh ba họ lipopeptide vòng chính bao gồm Surfactin, Iturin và Fengycin. Các hợp chất này phá hủy màng tế bào nấm, thể hiện hoạt tính kháng mạnh đối với các nấm gây bệnh thực vật như *Monilinia fructicola* và *Monilinia vaccinii-corymbosi* (Ngugi et al., 2005; Yáñez-Mendizábal et al., 2011).
- **Bacteriocin của *B. pumilus*:** Chủng *B. pumilus* WAPB4 tiết ra Pumilicin 4 - một bacteriocin có khả năng tiêu diệt hiệu quả các vi khuẩn kháng thuốc nguy hiểm như *Staphylococcus aureus* kháng Methicillin (MRSA) và *Enterococcus* kháng Vancomycin (VRE) (Aunpad & Na-Bangchang, 2007). Ngoài ra, hợp chất Pumilacidin do *B. pumilus* tiết ra cũng thể hiện đặc tính kháng khuẩn mạnh (From et al., 2007).
- **Ghi chú lịch sử phân loại về Bacitracin:** Kháng sinh chuỗi peptide Bacitracin thương mại ban đầu được phân lập từ chủng "Tracy I" thuộc nhóm *Bacillus subtilis* (Johnson et al., 1945). Tuy nhiên, các phân tích phân loại học hiện đại đã định danh chính thức chủng "Tracy I" thuộc loài *Bacillus licheniformis* (Podstawka, 1945).

4.2. Ứng dụng kiểm soát sinh học trong nông nghiệp và bảo quản thực phẩm

- **Kích thích sinh trưởng và kháng bệnh cây trồng:** Khi xâm nhiễm vùng rễ (rhizosphere), *B. subtilis* tạo màng sinh học (biofilm) bao bọc rễ, giúp cây hấp thụ chất dinh dưỡng đồng thời kích hoạt hệ thống kháng bệnh tự nhiên của thực vật (Induced Systemic Resistance - ISR) (Tan & Ramamurthi, 2014). Chủng *B. subtilis* FZB24 giúp gia tăng đáng kể năng

lượng sinh trưởng và sản lượng nhụy hoa nghệ tây (*Crocus sativus*) (Sharaf-Eldin et al., 2008).

- **Bảo quản nông sản sau thu hoạch:** Kết hợp ứng dụng bào tử *B. subtilis* với Chitosan tạo ra lớp màng bao sinh học giúp ngăn ngừa hiện tượng thối mốc xanh do nấm *Penicillium digitatum* gây ra trên trái cây họ cam quýt (Waewthongrak et al., 2015).

5. Tiềm năng ứng dụng của *Bacillus subtilis* và *Bacillus pumilus* trong phát triển nông nghiệp xanh, bền vững tại thành phố Hà Nội

5.1. Cơ sở khoa học và khả năng ứng dụng đối với sản xuất nông nghiệp đô thị

Trong định hướng phát triển nông nghiệp xanh tại Hà Nội, việc khai thác các chủng *Bacillus* có ích là một hướng nghiên cứu phù hợp nhằm giảm phụ thuộc vào đầu vào hóa học, cải thiện sức khỏe đất và nâng cao tính ổn định của hệ thống canh tác. *Bacillus subtilis* và *Bacillus pumilus* có khả năng hình thành nội bào tử, thuận lợi cho nghiên cứu tạo chế phẩm vi sinh có khả năng bảo quản và sử dụng trong điều kiện sản xuất. Tuy nhiên, hiệu quả của chế phẩm phụ thuộc vào từng chủng, cây trồng, loại đất, phương pháp phối trộn và điều kiện đồng ruộng; không thể suy rộng từ đặc điểm của loài sang hiệu quả của mọi chủng (Errington & Aart, 2020; Parvathi et al., 2009).

5.2. Hỗ trợ sinh trưởng cây trồng và cải thiện hệ sinh thái đất

Các chủng *B. subtilis* có tiềm năng định cư vùng rễ, hình thành màng sinh học và tham gia tương tác có lợi với cây trồng. Đây là cơ sở để nghiên cứu tuyển chọn các chủng hỗ trợ sinh trưởng, nâng cao khả năng khai thác dinh dưỡng và tăng sức chống chịu của cây trong hệ thống sản xuất rau, hoa và cây trồng giá trị cao ở Hà Nội. Đối với *B. pumilus*, cần sàng lọc riêng từng chủng về khả năng thích nghi vùng rễ và hoạt tính có lợi trước khi đề xuất ứng dụng. Những cơ chế này là tiềm năng khoa học, chưa phải bằng chứng về mức tăng năng suất trên đồng ruộng Hà Nội (Errington & Aart, 2020; Tan & Ramamurthi, 2014; Parvathi et al., 2009).

Để đánh giá tính khả thi, cần so sánh nghiệm thức sử dụng chủng vi sinh với đối chứng không xử lý trong cùng điều kiện canh tác; theo dõi tỷ lệ sống của vi sinh vật, chỉ tiêu sinh trưởng, năng suất, chất lượng nông sản, đặc tính đất và chi phí sản xuất. Kết quả cần được kiểm chứng qua nhiều vụ và địa điểm đại diện trước khi khuyến nghị nhân rộng.

5.3. Phòng trừ bệnh hại cây trồng bằng biện pháp sinh học

B. subtilis có khả năng sinh tổng hợp các lipopeptide như surfactin, iturin và fengycin, là cơ sở nghiên cứu hoạt tính đối kháng với một số tác nhân gây bệnh thực vật. Các cơ chế cạnh tranh sinh thái, tạo màng sinh học và kích hoạt đáp ứng phòng vệ của cây cũng có thể góp phần vào hiệu quả kiểm soát sinh học. Vì vậy, có thể ưu tiên sàng lọc chủng bản địa hoặc chủng có nguồn gốc rõ ràng để nghiên cứu phòng trừ bệnh trên rau, hoa và cây trồng phù hợp tại Hà Nội; hiệu lực phải được kiểm nghiệm đối với từng tác nhân gây bệnh và cây chủ cụ thể (Ngugi et al., 2005; Yáñez-Mendizábal et al., 2011; Tan & Ramamurthi, 2014). Việc sử dụng chế phẩm *Bacillus* nên được

xem là một thành phần của quản lý dịch hại tổng hợp, kết hợp giống khỏe, vệ sinh đồng ruộng, quản lý nước tưới và theo dõi dịch hại. Không nên coi chế phẩm vi sinh là giải pháp thay thế hoàn toàn mọi biện pháp bảo vệ thực vật.

5.4. Tận dụng phụ phẩm nông nghiệp và định hướng kinh tế tuần hoàn

Năng lực tiết enzyme ngoại bào của *B. subtilis*, bao gồm các enzyme phân giải thành phần hữu cơ, tạo cơ sở để nghiên cứu bổ sung chủng phù hợp vào quy trình xử lý phụ phẩm thực vật và sản xuất phân hữu cơ vi sinh. Với *B. pumilus*, khả năng tiết enzyme biến thiên theo chủng nên cần xác định hoạt tính và điều kiện công nghệ trước khi sử dụng. Tại Hà Nội, hướng nghiên cứu này có thể gắn với việc tận dụng phụ phẩm từ sản xuất rau, hoa và cây trồng khác, qua đó hỗ trợ tuần hoàn vật chất trong nông nghiệp; các lợi ích về thời gian ủ, chất lượng phân và giảm phát thải cần được đo đạc thực nghiệm (van Dijk & Hecker, 2013; Parvathi et al., 2009).

5.5. Định hướng tuyển chọn, thử nghiệm và kiểm soát an toàn tại Hà Nội

Quy trình nghiên cứu đề xuất gồm: (i) thu thập mẫu đất và vùng rễ tại các vùng sản xuất nông nghiệp đại diện của Hà Nội; (ii) phân lập, định danh và lưu giữ chủng; (iii) sàng lọc hoạt tính có lợi, khả năng tạo bào tử và tính ổn định; (iv) đánh giá an toàn ở cấp độ chủng, chú ý các dấu hiệu độc lực và nguy cơ kháng kháng sinh; (v) thử nghiệm trong nhà lưới trước khi bố trí khảo nghiệm đồng ruộng có đối chứng; và (vi) đánh giá hiệu quả kinh tế, tác động môi trường và điều kiện chuyển giao. Đặc biệt, các báo cáo về đặc tính độc tố ở một số chủng *B. pumilus* cho thấy không thể mặc nhiên coi mọi chủng *Bacillus* đều an toàn (Parvathi et al., 2009; Nieminen et al., 2007).

Các ứng dụng nêu trên là định hướng nghiên cứu và phát triển công nghệ cho Hà Nội, không phải báo cáo về các mô hình đã triển khai hoặc kết quả khảo nghiệm tại địa phương. Việc sản xuất, lưu hành và sử dụng chế phẩm cần tuân thủ các quy định hiện hành tương ứng với loại sản phẩm.

6. Kết luận và triển vọng nghiên cứu

Bacillus subtilis và *Bacillus pumilus* có những đặc điểm sinh học thuận lợi cho nghiên cứu ứng dụng trong nông nghiệp xanh, nổi bật là khả năng hình thành nội bào tử, thích nghi với nhiều điều kiện môi trường và sinh tổng hợp các chất chuyển hóa có hoạt tính sinh học. Trong đó, *B. subtilis* có cơ sở nghiên cứu tương đối rõ về tương tác vùng rễ và kiểm soát sinh học; *B. pumilus* là nguồn chủng tiềm năng nhưng cần sàng lọc, đánh giá hiệu quả và an toàn riêng cho từng chủng (Errington & Aart, 2020; Tan & Ramamurthi, 2014; Parvathi et al., 2009).

Đối với Thành phố Hà Nội, các hướng ưu tiên gồm tuyển chọn chủng hỗ trợ sinh trưởng cây trồng, phát triển chế phẩm phòng trừ bệnh hại sinh học, cải thiện chất lượng đất và nghiên cứu xử lý phụ phẩm nông nghiệp theo hướng tuần hoàn. Để chuyển từ tiềm năng sang ứng dụng, cần

có khảo nghiệm trong điều kiện canh tác địa phương với đối chứng thích hợp, đánh giá hiệu lực qua nhiều vụ, tính ổn định của chế phẩm, an toàn sinh học và hiệu quả kinh tế – môi trường.

Triển vọng nghiên cứu là xây dựng bộ sưu tập chủng *Bacillus* có nguồn gốc và đặc tính được xác nhận, kết hợp định danh phân tử với đánh giá an toàn cấp chủng, từ đó lựa chọn các ứng viên phù hợp cho thử nghiệm quy mô sản xuất. Cách tiếp cận này có thể đóng góp cơ sở khoa học cho phát triển nông nghiệp xanh, bền vững tại Hà Nội mà không suy diễn hiệu quả từ các kết quả nghiên cứu ở địa bàn khác.

Tài liệu Tham khảo (References - Standard APA)

1. Agata, N., Ohta, M., Mori, M., & Isobe, M. (1995). A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiology Letters*, 129(1), 17-20.
2. Aunpad, R., & Na-Bangchang, K. (2007). Pumilicin 4, a novel bacteriocin with anti-MRSA and anti-VRE activity produced by newly isolated bacteria *Bacillus pumilus* strain WAPB4. *Current Microbiology*, 55(4), 308-313.
3. Ciprandi, G., Scordamaglia, A., Venuti, D., Caria, M., & Canonica, G. W. (1986). In vitro effects of *Bacillus subtilis* on the immune response. *Chemioterapia*, 5(6), 404-407.
4. Dauner, M., Storni, T., & Sauer, U. (2001). *Bacillus subtilis* metabolism and energetics in carbon-limited and excess-carbon chemostat culture. *Journal of Bacteriology*, 183(24), 7308-7317.
5. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). (2010). Scientific opinion on the maintenance of the list of QPS microorganisms intentionally added to food or feed (2010 update). *EFSA Journal*, 8(12), 1944.
6. Ehling-Schulz, M., Fricker, M., & Scherer, S. (2004). Identification of emetic toxin-producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay. *FEMS Microbiology Letters*, 232(2), 189-195.
7. Errington, J., & Aart, L. T. (2020). Microbe Profile: *Bacillus subtilis*: model organism for cellular development, and industrial workhorse. *Microbiology*, 166(5), 425-427.
8. From, C., Hormazabal, V., & Granum, P. E. (2007). Food poisoning associated with pumilacidin-producing *Bacillus pumilus* in rice. *International Journal of Food Microbiology*, 115(3), 319-324.
9. Higgins, D., & Dworkin, J. (2012). Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(1), 131-148.
10. Horneck, G., Klaus, D. M., & Mancinelli, R. L. (2010). Space microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(1), 121-156.
11. Johnson, B. A., Anker, H., & Meleney, F. L. (1945). Bacitracin: A new antibiotic produced by a member of the *B. subtilis* group. *Science*, 102(2650), 376-377.
12. Lefevre, M., Racedo, S. M., Denayrolles, M., Ripert, G., Desfougères, T., Lobach, A. R., ... & Urdaci, M. C. (2017). Safety assessment of *Bacillus subtilis* CU1 for use as a probiotic in humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 83, 54-65.
13. Losick, R. M. (2020). *Bacillus subtilis*: A bacterium for all seasons. *Current Biology*, 30(19), R1146-R1150.
14. McKenney, P. T., Driks, A., & Eichenberger, P. (2013). The *Bacillus subtilis* endospore: Assembly and functions of the multilayered coat. *Nature Reviews Microbiology*, 11(1), 33-44.

15. Nakano, M. M., & Zuber, P. (1998). Anaerobic growth of a "strict aerobe" (*Bacillus subtilis*). *Annual Review of Microbiology*, 52(1), 165-190.
16. Nieminen, T., Rintaluoma, N., Andersson, M., Taimisto, A. M., Ali-Vehmas, T., Seppälä, A., Priha, O., & Salkinoja-Salonen, M. (2007). Toxinogenic *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* from mastitic milk. *Veterinary Microbiology*, 124(3-4), 329-339.
17. Parvathi, A., Krishna, K., Jose, J., Joseph, N., & Nair, S. (2009). Biochemical and molecular characterization of *Bacillus pumilus* isolated from coastal environment in Cochin, India. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(2), 269-275.
18. Paul, S. I., & Rahman, M. M. (2022). Draft genome sequence of *Bacillus subtilis* YBS29, a potential fish probiotic that prevents motile *Aeromonas* septicemia in *Labeo rohita*. *Microbiology Resource Announcements*, 11(10), e00915-22.
19. Paul, S. I., Rahman, M. M., Salam, M. A., Khan, M. A., & Islam, M. T. (2021). Identification of marine sponge-associated bacteria of the Saint Martin's island of the Bay of Bengal emphasizing on the prevention of motile *Aeromonas* septicemia in *Labeo rohita*. *Aquaculture*, 545, 737156.
20. Pepe, O., Blaiotta, G., Moschetti, G., Greco, T., & Villani, F. (2003). Rope-producing strains of *Bacillus* spp. from wheat bread and strategy for their control by lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4), 2321-2329.
21. Podstawka, A. (1945). *Bacillus licheniformis* Tracy I | DSM 603, ATCC 10716, NCIB 8874 | BacDiveID:686. *BacDive - the Bacterial Diversity Metadatabase*.
22. Rahman, M. M., Paul, S. I., Akter, T., Tay, A. C., Foyosal, M. J., & Islam, M. T. (2020). Whole-genome sequence of *Bacillus subtilis* WS1A, a promising fish probiotic strain isolated from marine sponge of the Bay of Bengal. *Microbiology Resource Announcements*, 9(39), e00641-20.
23. Rasko, D. A., Rosovitz, M. J., Okstad, O. A., Fouts, D. E., Jiang, L., Cer, R. Z., Kolstø, A. B., Gill, S. R., & Ravel, J. (2007). Complete sequence analysis of novel plasmids from emetic and periodontal *Bacillus cereus* isolates reveals a common evolutionary history among the *B. cereus*-group plasmids, including *Bacillus anthracis* pXO1. *Journal of Bacteriology*, 189(1), 52-64.
24. Slonczewski, J., Foster, J., & Zinser, E. (2020). *Microbiology: An evolving science* (5th ed.). W. W. Norton & Company.
25. Stephens, C. (1998). Bacterial sporulation: A question of commitment? *Current Biology*, 8(2), R45-R48.
26. Tan, I. S., & Ramamurthi, K. S. (2014). Spore formation in *Bacillus subtilis*. *Environmental Microbiology Reports*, 6(3), 212-225.
27. van Dijl, J. M., & Hecker, M. (2013). *Bacillus subtilis*: From soil bacterium to super-secreting cell factory. *Microbial Cell Factories*, 12(1), 3.