



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

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

(11)



1-0027441

(51)⁷ C12N 1/20

(13) B

(21) 1-2018-04042

(22) 13/09/2018

(45) 25/02/2021 395

(43) 25/01/2019 370A

(73) Viện Công nghệ sinh học (VN)

Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam; Nhà A10, số 18 Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Đỗ Thị Liên (VN); Đỗ Thị Tố Uyên (VN); Cung Thị Ngọc Mai (VN); Lê Thị Nhi Công (VN).

(54) CHŨNG VI KHUẨN TÍA QUANG HỢP RHODOBACTER SP. DL1 THUẦN KHIẾT VỀ MẶT SINH HỌC CÓ KHẢ NĂNG PHÂN HỦY CÁC HỢP CHẤT HỮU CƠ, LOẠI BỎ SUNPHIT, KHÁNG VI SINH VẬT GÂY BỆNH Ở TÔM VIBRIO SP. VÀ TÍCH LŨY CO-ENZYM Q10

(57) Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn tía quang hợp *Rhodobacter* sp. DL1 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ mẫu bùn trong đáy ao nuôi cá tra chuẩn bị thu hoạch, trong đó chủng vi khuẩn này có trình tự gen 16S rARN với kích thước 1322bp và được đăng ký trên GenBank với mã số LC420054, và có các đặc tính sau:

có khả năng phân hủy các hợp chất hữu cơ trong nước thải sản xuất bún, nước thải sản xuất tinh bột, nước thải lò mổ, nước thải sau biogas, nước thải sinh hoạt sau 5 ngày nuôi cấy với hiệu suất phân hủy lần lượt là 97,1%; 96,3%; 93,5%; 93,7%; 90,0%;

có khả năng sinh trưởng và hoạt tính loại bỏ sunphit ở nồng độ 5 - 30mgS²/lít với hiệu suất đạt 88% ở điều kiện nhiệt độ từ 14-40°C, độ pH từ 6,5-8,5, nồng độ muối NaCl từ 0-2,5%, cường độ chiếu sáng từ 1200 - 6000 lux;

có khả năng kháng lại vi khuẩn gây bệnh tôm *Vibrio* sp. với bán kính vòng ức chế vi khuẩn là 15mm; và

tích lũy Co-enzym Q10 với hàm lượng 63,394 mg/lít.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn tía quang hợp *Rhodobacter* sp. DL1 có khả năng phân hủy các hợp chất hữu cơ và loại bỏ sunphit trong đáy ao nuôi trồng thủy sản, đồng thời chủng này còn có khả năng kháng vi sinh vật gây bệnh *Vibrio* sp. và có khả năng tích lũy Co-enzym Q10.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Khả năng phân hủy các hợp chất hữu cơ và sunphit của vi khuẩn tía quang hợp

Vi khuẩn tía quang hợp thuộc nhóm vi khuẩn thủy sinh có khả năng sinh trưởng trong điều kiện kỵ khí bằng cách quang hợp nhưng không thải oxi như những đối tượng quang dưỡng khác. Nhóm vi khuẩn tía quang hợp thường có màu hồng đến đỏ tía, sắc tố quang hợp chính là *bacteriochlorophin* (Bchl) và nguồn cho điện tử trong quá trình quang hợp không phải là nước (như những đối tượng quang dưỡng khác) mà là các hợp chất khác nhau như: hydro, các axit hữu cơ đơn giản, lưu huỳnh, hydro sunphit, thiosunphit và các hợp chất khử của lưu huỳnh (Brune, 1989; 1995).

Vi khuẩn tía quang hợp phân bố rộng rãi trong tự nhiên, chúng có mặt trong các ao hồ tù đọng, các vùng đầm nước ngọt, nước lợ hoặc mặn như các đáy ao nuôi trồng thủy sản, trong đất, trong các kênh mương chứa nước thải và trong hệ thống xử lý nước thải (Imhoff và Truper, 1992; Kobayashi và Kobayashi, 1995; Okubo và cộng sự, 2006; Hoogewert và cộng sự, 2003; Zhu và cộng sự, 2002)... Ngoài ra, còn có thể gặp đại diện của vi khuẩn tía quang hợp trong một số thủy vực có điều kiện khắc nghiệt như: suối nước nóng, suối lưu huỳnh, thủy vực kiềm hóa, thủy vực có tính axit, ở vùng biển có độ mặn cao và thậm chí ở hồ có băng bao phủ 4-7 m ở Antastica vẫn phát hiện sự có mặt của nhóm vi khuẩn này (Guerero và cộng sự, 1987; Madigan, 2003; Kompantseva và cộng sự, 2012).

Vi khuẩn tía quang hợp là nhóm có khả năng trao đổi chất rất linh hoạt tùy thuộc vào điều kiện sống của môi trường, chúng có khả năng sinh trưởng quang dị dưỡng và quang tự dưỡng trong điều kiện kỵ khí, có ánh sáng và có khả năng sinh trưởng hóa dưỡng ở điều kiện hiếu khí, tối. Do vậy, chúng có khả năng sử dụng đa dạng các hợp chất hữu cơ làm nguồn cacbon và nguồn năng lượng. Nhờ khả năng này mà vi khuẩn tía quang hợp được coi là đối tượng tiềm năng cho xử lý các nguồn thải như: nước thải công nghiệp, nước thải nông nghiệp, nước thải chăn nuôi, nước thải chế biến thực phẩm, nước thải sinh hoạt, nước thải trong quá trình nuôi trồng thủy sản (Kantachote và cộng sự, 2005; Nagadomi và cộng sự, 1999; Madukasi và cộng sự, 2011; Chiemchaisri và cộng sự, 2008; Hulsen và cộng sự, 2014)... Với tiềm năng ứng dụng xử lý các hợp chất hữu cơ trong các nguồn thải của vi khuẩn tía quang

hợp (thông qua loại bỏ COD và BOD), các nhà khoa học đã ứng dụng chúng trong xử lý các loại nước thải được thể hiện trên Bảng 1.

Bảng 1: Tóm tắt các nguồn nước thải được xử lý bằng vi khuẩn tía quang hợp

Tên nguồn nước thải	Hiệu suất loại bỏ COD (%)	Thời gian lưu (ngày)	Cường độ ánh sáng	Vi khuẩn tía quang hợp sử dụng	Tài liệu tham khảo
Nước thải chế biến mỳ	90	6 -10		<i>Rps. palutis</i> và <i>Rba. blasticus</i>	Chiemchaisri và cộng sự, 2008
Nước thải chế biến cá rô phi	43	3 -7	1400±200	<i>R.gelatinosus</i>	de Lima và cộng sự, 2011
Nước thải chế biến cá mè	77	5	2500	<i>R. sulfidophilum</i>	Azad và cộng sự, 2001
Nước thải chế biến cao su	57	1,7	3000	<i>R. gelatinosus</i>	Choorit và cộng sự, 2002
Nước thải chăn nuôi heo	90	6	4000	<i>Rps. palustris</i>	Kim và cộng sự, 2004
Nước thải chế biến thực phẩm			IR	Hỗn hợp VK	Chitapornpan và cộng sự, 2012
Nước thải lò giết mổ gia cầm	91	10	4000±500	<i>R. gelatinosus</i>	Ponsano và cộng sự, 2008
Nước thải dược phẩm	80	5	6000	<i>R. sphaeroides</i>	Madukasi và cộng sự, 2010
Nước thải chế biến cá mè	85	5	2500	<i>R.sulfidophilum</i>	Azad và cộng sự, 2004
Nước thải tổng hợp	89	2		<i>R. sphaeroides</i> <i>Rps. palustris</i>	Nagadomi và cộng sự, 2000
Nước thải sản xuất tấm cao su	80	3	3000	<i>R. palustris</i>	Kantachote và cộng sự, 2010
Nước thải biến thực phẩm chứa sunphat	90	3 - 10	45w/m ²	Hỗn hợp	Chiemchaisri và cộng sự, 2007

Trong lĩnh vực xử lý các nguồn thải, vi khuẩn tía quang hợp tỏ ra có ưu thế khi xử lý nước thải có chứa các hợp chất hữu cơ dễ phân hủy: Tại Nhật Bản, Sasaki và cộng sự đã sử dụng loài *R. gelatinosus* để xử lý nước thải sản xuất đậu tương với COD đầu vào 20000 mg/l, hiệu suất phân hủy đạt 80%. Tại Trung Quốc, tác giả Lu và cộng sự năm 2011 đã sử dụng loài *Rhodobacter sphaeroides* xử lý nguồn nước thải của quá trình sản xuất đậu tương với hiệu suất loại bỏ 95% với đầu vào COD là 9941,4 mg/l. Sử dụng *R. capsulatus* trong giai đoạn đầu của quá trình xử lý bùn cồng đã giảm BOD từ 5800mg/l xuống còn 2000 mg/l trong 4 ngày, còn đối với nước thải lò mổ hiệu suất loại bỏ COD đạt tới 90% ...(Sasikala, 1995a). Ngoài khả năng xử lý các hợp chất hữu cơ trong nước thải thì vi khuẩn tía quang hợp còn có khả năng xử lý photpho (Hiraishi và cộng sự, 1991) khử nitrat (Kim và cộng sự, 1999), loại bỏ NH₄ bằng cách đồng hóa và đặc biệt có khả năng loại bỏ sunphit thông qua đồng hoá và oxi

hóa nhờ sử dụng sunphit làm chất cho điện tử trong quang hợp (Brune, 1989; 1995). Tùy thuộc vào từng loài mà chúng có thể oxi hóa sunphit ở các mức độ khác nhau, sản phẩm cuối cùng có thể là: S_0 , $S_4O_6^{2-}$ hoặc SO_4^{2-} Do đó, chúng tham gia tích cực vào chu trình chuyển hoá lưu huỳnh trong tự nhiên, đặc biệt chúng đóng vai trò chủ yếu trong xử lý các hợp chất khử của lưu huỳnh ở điều kiện kỵ khí.

Tùy thuộc vào từng loài vi khuẩn tía quang hợp có thể oxi hóa sunphit với mức độ khác nhau. Khả năng sử dụng và mức độ oxi hóa các hợp chất khử lưu huỳnh ở các loài vi khuẩn tía quang hợp được tổng kết ở Bảng 2.

Khả năng oxi hóa các hợp chất khử của lưu huỳnh ở vi khuẩn tía quang hợp

Họ vi khuẩn	Hợp chất chứa S và mức độ oxi hóa	Các loài
<i>Chromatiaceae</i>	Oxi hóa H_2S và S^0 đến SO_4^{2-}	<i>Chromatium buderi</i> , <i>C. okenii</i> , <i>C. tepidum</i> , <i>C. waringii</i> , <i>C. weissei</i> , <i>Lamprocystis roseopersicina</i> , <i>Thiocapsa pfennigii</i> , <i>Thiocystis gelatinosa</i> , <i>Thiodictyon bacillosum</i> , <i>Thiodictyon elegans</i> , <i>Thiopodia rosea</i> , <i>Thiospirillum jenese</i> , <i>Thiospirillum winogradskyi</i>
	Oxi hóa H_2S , S^0 và $S_2O_3^{2-}$ đến SO_4^{2-}	<i>Amoebobacter pedioformis</i> , <i>Amoebobacter purpureus</i> , <i>C. gracile</i> , <i>C. minus</i> , <i>C. minutissimum</i> , <i>C. purpuratum</i> , <i>C. violascens</i> , <i>Thyocapsa roseopersicina</i>
	Oxi hóa H_2S , S^0 , $S_2O_3^{2-}$ và SO_3^{2-} đến SO_4^{2-}	<i>Amoebobacter pendens</i> , <i>Amoebobacter roseus</i> , <i>C. salexigens</i> , <i>C. vinosum</i> , <i>Thiocapsa halophila</i>
<i>Rhodospirillaceae</i>	Oxi hóa H_2S đến S^0	<i>Rhodobacter capsulatus</i> , <i>R. sphaeroides</i> , <i>Rhodospirillum mediasalinum</i> , <i>R. rubrum</i> , <i>Rhodopseudomonas marina</i>
	Oxi hóa H_2S đến $S_4O_6^{2-}$	<i>Rhodomicrobium vanellii</i>
	Oxi hóa $S_2O_3^{2-}$ đến $S_4O_6^{2-}$	<i>Rhodopila globiformis</i>
	Oxi hóa H_2S , $S_2O_3^{2-}$ đến SO_4^{2-}	<i>R. sulfidophilus</i> , <i>Rhodopseudomonas palustris</i>
	Oxi hóa H_2S , S^0 , $S_2O_3^{2-}$ và SO_3^{2-} đến SO_4^{2-}	<i>R. adriaticus</i> ; <i>R. veldkampii</i> ; <i>R. sulfoviridis</i>

Nguồn: Brune, 1995.

Nhờ khả năng này mà vi khuẩn tía quang hợp đã và đang được sử dụng trong xử lý các nguồn nước thải có chứa sunphit. Nhiều nước trên thế giới như Nhật Bản, Canada, Hàn Quốc, Trung Quốc, Thái Lan, Ấn Độ... cũng nghiên cứu ứng dụng nhóm vi khuẩn quang hợp để xử lý sunphit trong nước thải. Tại Canada, Syed và Henshaw đã sử dụng loài vi khuẩn *Chlorobium limicola* loại bỏ 100% sunphit trong nước thải với hàm lượng đầu vào từ 91 - 164 mgS /l (Syed và Henshaw, 2003; 2006). Tác giả Ferrera và cộng sự (2004) đã kết hợp chủ yếu hai nhóm vi khuẩn tía quang hợp lưu huỳnh và tía không lưu huỳnh đã xử lý nước thải chứa hàm lượng sunphit đầu vào từ 26 - 112 mgS/l, hiệu suất loại bỏ đạt 95 - 97,9%... Trên thế giới, đã có rất nhiều công trình nghiên cứu ứng dụng nhóm vi khuẩn quang hợp để loại bỏ sunphit trong nước thải. Bảng 3 trình bày tóm tắt một số nghiên cứu ứng dụng và triển khai vi khuẩn tía quang hợp trong xử lý sunphit ở các nước trên thế giới.

Bảng 3: Các nghiên cứu ứng dụng nhóm vi khuẩn quang hợp trong hệ thống xử lý nước thải chứa sunphit

Tình trạng áp dụng	Các tác giả, năm						
	Kobayashi và cộng sự, 1983	Henshaw và cộng sự, 1998	Henshaw and Zhu, 2001	Syed and Henshaw, 2003	Ferrera và cộng sự, 2004	Hurse and Keller, 2004a, b; 2005	Syed and Henshaw, 2005
Sinh khối vi khuẩn	Có định	Lơ lửng	Có định	Có định	Có định	Có định	Có định
Hình dạng bề phản ứng	Là các ống đơn	Chemostat	20 ống trong đặt song song	16 ống trong đặt song song	Dạng ống và bể hồi lưu	Dạng hình trụ phẳng	16 ống đặt song song
Kích thước	Đường kính 3,2mm, dài 12,8m		Đường kính 3,0mm, dài 150mm	Đường kính 1,6 - 6,4mm, dài 150mm	Đường kính 15,6mm, dài 275mm		Đường kính 1,6mm, dài 150mm
Quần xã vi khuẩn trong hệ xử lý	Vi khuẩn xanh và vi khuẩn tía không lưu huỳnh	Không công bố	Không công bố	Không công bố	Vi khuẩn tía quang hợp lưu huỳnh và tía không lưu huỳnh	Vi khuẩn xanh lưu huỳnh	Không công bố
Tỷ lệ dòng nước thải (ml/h)	17,29	70 - 310	9 - 42	34 - 85	Không báo cáo	65 - 73	17 - 24 (1) 10 - 20 (2)
Nồng độ sunphit đầu vào(mg/l)	14 - 24	89 - 627	140 - 452	75 - 311	26 - 112	3 - 32	68 - 70(1),63 - 71(2)
Nguồn sáng cung cấp	Đèn 40w	2,175w đèn hồng ngoại	1,250w đèn hồng ngoại	1,250w đèn hồng ngoại	Bóng đèn sáng chói	Ánh sáng lọc từ projector	LED (1) 250w
Hiệu suất loại bỏ sunphit (%)	100	56 - 100	83 - 100	100	97 - 99,5	7 - 65	100
Nồng độ sinh khối (mg/l)	Không công bố	2,8 - 13,5	12,5 - 51,4	363 - 1639	1660 -4520 mg sắc tố/m ²	Không công bố	1262 - 1306(1) 1214 - 1295(2)

Như vậy, vi khuẩn tía quang hợp đã được ứng dụng rộng rãi trong xử lý nhiều loại nước thải chứa sunphit và áp dụng ở các qui mô khác nhau với các chủng giống khác nhau tùy thuộc vào từng loại nước thải. Khác với các nguồn nước thải thông thường chứa sunphit, đáy các ao nuôi trồng thủy sản thì sunphit thường tích lũy bởi quá trình phân hủy yếm khí của các chất hữu cơ (do thức ăn dư thừa và chất thải của vật nuôi) và quá trình khử sulfat. Dạng hydro sunphit trong nước sẽ gây ức chế quá trình hô hấp hiếu khí do nó kết hợp với nhân hem của cytochrom c thay thế vị trí của oxi phân tử. Hậu quả của quá trình nêu trên dẫn đến kìm hãm quá trình trao đổi chất của tế bào, giống như hiện tượng giảm oxi trong máu (Kiemer và cộng sự, 1995). Năm 2000, một lượng lớn cá bị chết (khoảng 400 tấn) xảy ra trong diện tích nuôi khoảng 40 ha ở Einan (Israel), người ta cho rằng nguyên nhân là do độc tính của sunphit và kéo theo sự thiếu hụt oxi trong ao nuôi (Lahav và cộng sự, 2004). Khi nồng độ sunphit trong máu của tôm đạt ngưỡng 0,013 mg/l thì tôm sẽ bị tê liệt và chết (Avnimelech and Ritvo, 2003). Do vậy, trong các ao nuôi thủy sản sunphit luôn luôn được tạo ra và nó là mối nguy hiểm đe dọa đến các con vật nuôi, làm giảm năng suất hoặc mất mùa. Nhóm vi khuẩn tía quang hợp ngoài việc sử dụng trong xử lý nước thải để phân hủy chất hữu cơ và sunphit, chúng còn được ứng dụng trong sản xuất các chế phẩm làm sạch đáy ao nuôi thủy sản (Sasaki và cộng sự, 1991; Sasikala and Ramana, 1995, Nguyễn Văn Hào và cộng sự, 2004). Tại Trung Quốc đã nghiên cứu sử dụng chế phẩm bổ sung thêm nhóm vi khuẩn tía quang hợp (vi khuẩn tía quang hợp) để cải thiện chất lượng nước ao nuôi tôm, làm giảm hàm lượng các chất hữu cơ, amoni, sunphit và các chất độc hại khác (Li và cộng sự, 1997). Nhóm tác giả Cui và cộng sự từ năm 1997 đã sử dụng vi khuẩn tía quang hợp xử lý ao ương giống tôm, kết quả đã chỉ ra rằng: chất lượng nước của ao nuôi được cải thiện và thời gian biến thái của tôm giống cũng được rút ngắn so với đối chứng. Hiện nay, có nhiều chế phẩm xử lý đáy ao nuôi trồng thủy sản có bổ sung nhóm vi khuẩn tía quang hợp với chức năng đặc trưng là loại bỏ sunphit và hữu cơ như: VEM (Võ Thị Hạnh và cs., 2004), PRO-BEST - (Công ty Cổ phần Thủy sản Bình Minh - thành phố Hồ Chí Minh), CTA - serri (Công ty Biển Cờ), SUPERKING (Trung Quốc), BACTA (Thái Lan), EM (Nhật Bản) v.v... Tại Trung Quốc, Thái Lan, Ấn Độ, Malaysia đã có các chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp thương mại dùng để xử lý ao nuôi trồng thủy sản.

Khả năng kháng vi sinh vật gây bệnh ở tôm

Nghề nuôi tôm là một trong những ngành sản xuất thực phẩm động vật phát triển nhanh nhất trên thế giới (FAO, 2014). Tuy nhiên, nghề nuôi tôm trên thế giới và tại Việt Nam đang phải đối mặt với nhiều vấn đề, đặc biệt là chất lượng nước nuôi kém do mật độ khá cao và quản lý

không phù hợp dẫn đến sự bùng phát bệnh tôm. Hiện nay, các bệnh nghiêm trọng nhất trong nuôi tôm là do nhiễm khuẩn, đặc biệt là do các loài *Vibrio* sp., chẳng hạn như *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* và *V. vulnificus* (Chatterjee & Haldar, 2013). Năm 2010 “bệnh hoại tử gan tụy cấp tính” (AHPND) là bệnh nghiêm trọng nhất đã gây ra những tổn thất kinh tế lớn, tiêu tốn 1 tỷ USD trong ngành tôm công nghiệp tại Châu Á (De Schryver và cộng sự, 2014; Zorriehzahra & Banaederakhshan, 2015). Bệnh này sau đó lan sang Tây bán cầu và nó xuất hiện ở Mexico vào đầu 2013 (Nunan và cộng sự, 2014).

Để giải quyết những vấn đề nghiêm trọng này, người nông dân phải sử dụng hóa chất và thuốc kháng sinh để duy trì chất lượng nước và loại bỏ tác nhân gây bệnh. Tuy nhiên, một số hợp chất đó gây tác hại đến sức khỏe người tiêu dùng, đặc biệt từ việc sử dụng thuốc kháng sinh lâu dài sẽ tích lũy trong tôm, trong trầm tích ao và vi khuẩn có thể phát triển kháng kháng sinh (Zhang và cộng sự, 2011). Ví dụ, chloramphenicon đã bị cấm sử dụng trong nuôi trồng thủy sản vì còn tồn dư trong các sản phẩm tôm, và người sử dụng sản phẩm này sẽ có nguy cơ mắc bệnh thiếu máu (Serrano, 2005). Do đó, để nuôi tôm bền vững người nuôi tôm nên tránh sử dụng kháng sinh. Hiện nay, trên thị trường có nhiều chế phẩm sinh học chứa các vi sinh vật có tác dụng chống lại các loài *Vibrio* gây bệnh mang lại hiệu quả kinh tế cho người nuôi tôm. Trong số các nhóm vi sinh vật được sử dụng trong nuôi tôm, vi khuẩn tía quang hợp là một trong những các nhóm có tiềm năng tốt vì chúng có thể làm sạch môi trường nước, giảm hàm lượng sunphit và hoạt động như probiotic để thúc đẩy tăng trưởng của tôm bằng cách tiết ra các hợp chất hoạt tính sinh học kiểm soát các tác nhân gây bệnh cho tôm (Qi và cộng sự, 2009; Luo và cộng sự, 2012). Nhóm tác giả Chandrasekaran và Ashok Kumar đã chứng minh vi khuẩn tía không lưu huỳnh có thể tiết ra vitamin B12 và sản xuất các hợp chất kháng vi sinh vật, ức chế vi khuẩn *Vibrio* sp. (Chandrasekaran và Ashok Kumar, 2011). Tác giả Chumpol và cộng sự đã lựa chọn được chủng vi khuẩn tía quang hợp không lưu huỳnh có khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính và các chủng thuộc nhóm tác nhân gây bệnh *Vibrio* sp. khác.

Co-enzym Q10

Vi khuẩn tía quang hợp ngoài khả năng ứng dụng để xử lý môi trường chúng còn được ứng dụng trong lĩnh vực y tế vì chúng có khả năng sản xuất các hoạt chất sinh học có giá trị như: vitamin B12, ubiquinon (Co-enzym Q10), axit 5-aminolevulinic, pocphirin và ARN. Đáng chú ý là axit 5-aminolevulinic và Co-enzym Q10 đang được tách chiết cho thương mại hóa trên thị trường (Co-enzym Q10 thuộc nhóm chất izoprenoit quinon có mặt ở mọi tế bào vi sinh vật). Chúng có cấu tạo hóa học là một nhân thơm benzoquinon và chuỗi bên polyizoprenoit gồm 10

đơn vị izopren (Lu và cộng sự, 2013). Hợp chất Co-enzym Q10 có 4 chức năng sinh lý chủ yếu: là thành phần của chuỗi truyền điện tử đóng vai trò quan trọng trong quá trình sinh tổng hợp ATP; giữ hoạt lực oxi hóa khử của màng tế bào; chất chống oxi hóa nội sinh, ức chế quá trình peroxit hóa lipid-khử các gốc tự do và tham gia duy trì tính bền vững và linh động của màng tế bào (Lê Thị Thanh Thảo và cộng sự, 2014). Đối với cơ thể người, hàm lượng Co-enzym Q10 có chức năng thúc đẩy năng lượng, tăng cường hệ thống miễn dịch và hoạt động như chất chống oxi hóa (Ernster và Dallner, 1995). Hàm lượng Co-enzym Q10 trong cơ thể người được nhận thấy giảm dần theo độ tuổi và giảm mạnh khi mắc một số bệnh lý như: tim mạch, ung thư, nhiễm khuẩn, thoái hóa thần kinh... Do vậy, hợp chất Co-enzym Q10 đang được nghiên cứu như là một nguồn nguyên liệu mới trong lĩnh vực dược phẩm, thực phẩm và mỹ phẩm (Takahashi và cộng sự, 2003; Sasaki và cộng sự, 2005; Zhang và cộng sự, 2007).

Co-enzym Q10 có thể được sản xuất bằng phương pháp hóa học (Negishi và cộng sự, 2002), phương pháp bán hóa học (Lipshutz và cộng sự, 2002) và tổng hợp sinh học. Tổng hợp sinh học của Co-enzym Q10 được sử dụng rộng rãi hơn so với tổng hợp hóa học vì nó an toàn hơn đối với con người (Hà và cộng sự, 2007). Vì thế, sản xuất thương mại của Co-enzym Q10 bằng phương pháp sinh học trong đó tổng hợp từ vi sinh vật đã được quan tâm nghiên cứu (Choi và cộng sự, 2005) và vi sinh vật biến đổi gen được thiết kế để tổng hợp Co-enzym Q10 (Lee và cộng sự, 2004; Park và cộng sự, 2005; Sakai và cộng sự, 2005). Các chủng vi sinh vật thuộc chi *Rhodobacter*, *Agrobacterium*, và *Paracoccus* đã được công bố là nhà sản xuất Co-enzym Q10 cao (Choi và cộng sự, 2005). Đặc biệt *Rhodobacter sphaeroides* được công bố tạo ra hàm lượng Co-enzym Q10 cao hơn *Agrobacterium tumefaciens* và *Paracoccus denitrificans* (Yoshida và cộng sự, 1998). Hơn nữa, *R. sphaeroides* là nhóm vi khuẩn có thể được nuôi cấy trong điều kiện kỵ khí sáng hoặc lên men. Nhóm tác giả Bae và cộng sự đã nghiên cứu bổ sung vi khuẩn *Rhodobacter sphaeroides* trong khẩu phần ăn của bò sữa đã tạo ra sữa có chất lượng cao, trong đó có chứa hàm lượng Co-enzym Q10 cao hơn khi không bổ sung vi khuẩn *Rhodobacter sphaeroides* vào khẩu phần ăn (Bae và cộng sự, 2018).

Chi Rhodobacter và đặc tính của nó

Theo khóa phân loại của Bergey (1989) nhóm vi khuẩn tía quang hợp không lưu huỳnh bao gồm 6 chi đó là: *Rhodospirillum*, *Rhodopila*, *Rhodobacter*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodomicrobium* và *Rhodocyclus*. Theo khóa phân loại Bergey (2001; 2005) dựa vào sự sai khác về trình tự gen mã hóa 16S rARN sự sắp xếp này đã bị thay đổi. Ví dụ: trước đây người ta cho rằng tất cả các loài có tế bào dạng xoắn thì thuộc chi *Rhodospirillum* nhưng theo khóa phân loại

Bergey 2001 khi phân tích trình tự gen mã hóa 16S rARN kết hợp với sự khác biệt về kiểu hình một số loài đã được tách ra thành chi mới như *Rhodospirillum fulvum* và *Rhodospirillum molischianum* chuyển sang chi mới có tên là *Phaeospirillum fulvum* và *Phaeospirillum molischianum*... Chi *Rhodobacter* cũng có nhiều sự thay đổi: theo Bergey 1989 chi này gồm có 5 loài: *Rb.adriaticus*, *Rb. capsulatus*, *Rb. sphaeroides*, *Rb. sulfidophilus* và *Rb. veldkampii*. Theo Bergey 2001 dựa vào môi trường sống và kết quả phân tích trình tự gen 16S rARN, người ta đã chuyển một số loài thuộc chi này đòi hỏi về muối cho sinh trưởng tốt sang chi *Rhodovulum* (*R. adriaticum* và *R. sulfidophilum*) (Hiraishi và Ueda, 1994). Như vậy, theo Hệ thống phân loại mới (Bergey, 2005) chi *Rhodobacter* chỉ còn 3 loài: *Rb. capsulatus*, *Rb. sphaeroides* và *Rb. veldkampii* và có thêm 3 loài mới là: *Rb. azotoformans* (Hiraishi và cộng sự, 1996), *Rb. blasticus* (được chuyển từ *Rhodopseudomonas blastica* sang), *Rb. vinaykumarii* (Srinivas và cộng sự, 2007). Đến nay, chi này đã được công nhận thêm 5 loài mới đó là: *Rb.changlensis* (Anil Kumar và cộng sự, 2007); *Rb. ovatus* (Srinivas và cộng sự, 2008); *Rb. maris* (Venkata Ramana và cộng sự, 2008); *Rb.megalophilus* (Arunasri và cộng sự, 2008); *Rb. aestuarii* (Anil Kumar và cộng sự, 2009) và *Rb. johrii* (Girija và cộng sự, 2010). Như vậy, chi *Rhodobacter* hiện nay gồm 11 loài đã được công nhận.

Tế bào của các loài trong chi này có dạng hình trứng hoặc hình que ngắn, đường kính từ 0,5 – 1,2 μm , một số loài có quan sát thấy chuyển động, một số loài không chuyển động, tế bào sinh sản bằng cách phân đôi, một số loài tạo chất nhầy và có thể tạo thành chuỗi tế bào. Chúng đều là vi khuẩn Gram (-). Sắc tố quang hợp là *bactechlorophin a* và carotenoid thuộc họ *spharoiden*. Các loài trong chi này có thể sinh trưởng quang dị dưỡng trong điều kiện kỵ khí có chiếu sáng và chúng có thể sử dụng đa dạng các hợp chất hữu cơ làm nguồn cacbon và nguồn điện tử, một số loài có thể sinh trưởng quang tự dưỡng khi có mặt sunphit làm chất cho điện tử trong quang hợp, một số loài sử dụng thiosunphat và hydro phân tử. Sunphit được sử dụng như là chất cho điện tử trong quang hợp ở một số loài, và mức độ chống chịu hàm lượng sunphits cao được tìm thấy ở một số loài như *Rb. sphaeroides*, *Rb. veldkampii*; *Rb. azotoformans*; và *Rb. capsulatus*

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn tía quang hợp *Rhodobacter* sp. DL1 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ mẫu bùn trong đáy ao nuôi cá tra chuẩn bị thu hoạch, trong đó chủng vi khuẩn này có trình tự gen 16S rARN với kích thước 1322 bp và được đăng ký trên GenBank với mã số LC420054, và có các đặc tính sau:

có khả năng phân hủy các hợp chất hữu cơ trong nước thải sản xuất bún, nước thải sản xuất tinh bột, nước thải lò mổ, nước thải sau biogas, nước thải sinh hoạt sau 5 ngày nuôi cấy với hiệu suất phân hủy lần lượt là 97,1%; 96,3%; 93,5%; 93,7%; 90,0%;

có khả năng sinh trưởng và hoạt tính loại bỏ sunphit ở nồng độ $5 - 30\text{mgS}^{2-}/\text{lít}$ đạt hiệu suất 88% ở điều kiện nhiệt độ từ $14-40^{\circ}\text{C}$, độ pH từ 6,5-8,5, nồng độ muối NaCl từ 0-2,5%, cường độ chiếu sáng từ 1200 - 6000 lux;

có khả năng kháng lại vi khuẩn gây bệnh tôm *Vibrio* sp. với bán kính vòng ức chế vi khuẩn là 15mm; và

tích lũy Co-enzym Q10 với hàm lượng 63,394 mg/lít.

Chủng vi khuẩn theo sáng chế được phân lập từ mẫu bùn trong đáy ao nuôi cá tra chuẩn bị thu hoạch tại Cái Bè, Tiền Giang, Việt Nam.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện hình thái khuẩn lạc của chủng vi khuẩn tía quang hợp DL1.

Fig. 2 thể hiện hình thái tế bào của chủng DL1 được nuôi cấy trên môi trường DSMZ-27 thạch dưới kính hiển vi điện tử với độ phóng đại 20 000 lần.

Fig. 3 thể hiện phổ hấp thụ dịch huyền phù tế bào nguyên chủng DL1.

Fig. 4 thể hiện sản phẩm PCR nhân lên từ ADN tổng số của chủng DL1 bởi cặp mồi 27F/1527R thông qua điện di trên gel agarosa 1% (M-marker, 1-DL1, (-) đối chứng âm không có vi sinh vật.

Fig. 5 thể hiện cây phát sinh chủng loài của chủng vi khuẩn DL1.

Fig. 6 thể hiện khả năng kháng lại vi khuẩn gây bệnh tôm *Vibrio* sp. của chủng DL1.

Fig. 7 thể hiện kết quả sắc ký bản mỏng (TLC) của Co-enzym Q10 do chủng DL1 tích lũy.

Fig. 8 thể hiện hình ảnh phổ UV của Co-enzym Q10 do chủng DL1 tích lũy.

Fig. 9 thể hiện hình ảnh HPLC xác định hàm lượng Co-enzym Q10 do chủng DL1 tích lũy.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn tía quang hợp *Rhodobacter* sp. DL1 thuần khiết về mặt sinh học phân lập từ mẫu bùn trong đáy ao nuôi cá tra chuẩn bị thu hoạch tại Cái Bè, Tiền Giang, Việt Nam.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn tía quang hợp *Rhodobacter* sp. DL1 được nuôi cấy để đánh giá khả năng phân hủy các hợp chất hữu cơ, khả năng loại bỏ sunphit và tính kháng vi khuẩn gây bệnh *Vibrio* sp.. Đồng thời, sáng chế cũng đề cập tới khả năng sinh tổng hợp Co-enzym Q10 của chủng DL1.

A. Phân lập và định danh chủng vi khuẩn tía quang hợp *Rhodobacter* sp. DL1

Mẫu bùn trong đáy ao nuôi cá tra giai đoạn chuẩn bị thu hoạch bị ô nhiễm chất hữu cơ và sunphit được bảo quản trong dụng cụ tiệt trùng để đảm bảo không bị nhiễm tạp các vi sinh vật từ môi trường. Sau khi thu, mẫu được làm giàu bằng cách nuôi tích lũy trong các bình nhựa trong hình trụ có kích thước $\Phi = 5$ cm, $h = 35$ cm. Các bình nhựa này được thiết kế theo kiểu cột Winogradsky có cải tiến. Mẫu bùn được đưa vào bình với tỷ lệ 9:1, sau đó chúng được làm đầy bằng môi trường DSMZ-27 bổ sung sunphit hàm lượng $10 \text{ mgS}^{2-}/\text{l}$. Các bình này được đậy kín và ủ dưới ánh sáng đèn sợi đốt cường độ sáng ~ 5000 lux. Sau khoảng một tuần, các vạch màu từ nâu vàng đến đỏ tía xuất hiện trên thành bình (là biểu hiện sự có mặt sắc tố đặc trưng của vi khuẩn tía quang hợp). Lấy mẫu từ vạch màu rồi tiến hành phân lập trên đĩa petri chứa môi trường thạch DSMZ-27, ủ ở điều kiện kỵ khí (không khí được thay thế bằng khí nitơ) với cường độ sáng ~ 5000 lux từ đèn sợi đốt, sau khoảng 3 - 5 ngày xuất hiện các khuẩn lạc tròn có màu nâu, hồng đến đỏ tía. Các khuẩn lạc này được làm sạch theo phương pháp cấy rìa và tiến hành ủ mẫu dưới điều kiện kỵ khí sáng, từ đó thu được các chủng vi khuẩn thuần khiết. Các chủng vi khuẩn thu được từ các khuẩn lạc này được nuôi cấy riêng rẽ trên môi trường DSMZ-27 dịch thể để đánh giá khả năng phân hủy các hợp chất hữu cơ và khả năng loại bỏ sunphit. Chuyên gia trong lĩnh vực vi sinh vật có thể dễ dàng thực hiện việc chọn môi trường và các thao tác nuôi cấy các chủng vi khuẩn trong quá trình phân lập này. Các môi trường được dùng trong quá trình làm giàu và phân lập được đề cập ở đây là môi trường DSMZ-27 có thành phần như sau: cao nấm men (0,3 g/l); succinat - Na (1 g/l); axetat (0,5 g/l); K_2HPO_4 (1g/l); KH_2PO_4 (0,5 g/l); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,4 g/l); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,05 g/l); NH_4Cl (0,4 g/l); vi lượng $\text{SL}_6^{(*)}$ (1 ml/l); dung dịch vitamin $\text{B}_{12}^{(**)}$ (0,4 ml/l); nước cất (1000 ml); NaCl (20 g/l); Na_2S (10mgS); pH 6,8.

Dung dịch vi lượng SL_6 : HCl (25%) (6,5 ml/l); $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1,5 g/l); H_3BO_3 (0,3 g/l); $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,03 g/l); $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,2 g/l); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1 g/l); $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (17 mg/l); $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (24 mg/l); $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (36 mg/l), H_2O 993 ml.

Dung dịch vitamin B12: 10 mg trong 100 ml nước được khử trùng bằng màng lọc và bổ sung vào môi trường trước khi sử dụng.

Môi trường DSMZ-27 khử trùng ở 121°C trong 30 phút.

Kết quả đã phân lập được chủng vi khuẩn tía quang hợp DL1. Phân loại sơ bộ chủng vi khuẩn DL1 dựa vào hình thái khuẩn lạc của chủng vi khuẩn này trên môi trường nuôi cấy dạng thạch (Fig. 1). Mô tả chi tiết hình thái khuẩn lạc của chủng DL1 như sau: khuẩn lạc có hình tròn, bề mặt lồi, trơn, bóng, màu xanh nâu, rìa trong, $d = 0,7-1,5$ mm. Dịch huyền phù tế bào có màu nâu đỏ. Tế bào của chúng có dạng hình trứng tồn tại ở dạng đơn bào, chiều rộng $0,8 \mu\text{m}$ và chiều

dài 1,2 μm , sinh sản bằng cách nhân đôi, không quan sát thấy giọt lưu huỳnh tích lũy trong tế bào. Hình thái tế bào thể hiện trên Fig 2. Dựa vào các đặc điểm về khuẩn lạc, dịch huyền phù, hình thái tế bào có thể xếp chủng này vào chi *Rhodobacter*.

Đặc trưng cơ bản nhất để phân biệt vi khuẩn tía quang hợp với các vi sinh vật quang dưỡng khác là khả năng tổng hợp các loại *bacterioclorophin* (Bchl) khi được chiếu sáng. Chủng DL1 được nuôi cấy trên môi trường DSMZ-27 dịch thể trong điều kiện kỵ khí, chiếu sáng bằng đèn sợi đốt. Sau 4 ngày nuôi cấy, chủng DL1 đạt tới giữa pha sinh trưởng (pha log), dịch huyền phù tế bào được tiến hành đo phổ hấp thụ trên máy quang phổ thể hiện trên Fig. 3. Kết quả cho thấy, phổ hấp thụ của dịch huyền phù tế bào của chủng DL1 có cực đại hấp thụ bước sóng 803 và 855 nm. Cực đại hấp thụ dịch huyền phù tế bào của chủng DL1 nằm trong vùng 800 - 900nm là đặc trưng phổ hấp thụ của *bacterioclorophin a* trong tế bào nguyên (Plennig & Trueper, 1992).

Để sơ bộ phân loại chủng DL1 chúng tôi còn đánh giá khả năng sinh trưởng trên một số nguồn cacbon được sử dụng mang tính chất đặc trưng cho loài có vai trò để phân loại vi khuẩn. Để xác định khả năng sử dụng một số nguồn cacbon cho sinh trưởng, chủng DL1 được nuôi cấy trong môi trường DSMZ-27 dịch thể và trên đĩa thạch, trong đó axetat được lần lượt thay thế bằng một số nguồn cacbon khác với cùng nồng độ 1 g/l, thí nghiệm được tiến hành ở điều kiện kỵ khí - sáng. Khả năng sinh trưởng của chúng được ghi nhận sau 5 ngày nuôi cấy và so sánh với một số loài thuộc chi *Rhodobacter* (Girija và cộng sự., 2010). Trên Bảng 4 trình bày kết quả so sánh khả năng sử dụng các nguồn cacbon khác nhau của chủng DL1 với một số loài thuộc chi *Rhodobacter*.

Kết quả trên Bảng 4 cho thấy, DL1 có tế bào hình trứng với chiều rộng 0,8 μm , chiều dài 1,2 μm ; sinh trưởng bằng cách phân đôi; màu sắc dịch nuôi cấy có màu nâu đỏ. Có khả năng sinh trưởng ở dải pH từ 5- 9,0 và tối ưu ở 6- 7,5. Chủng DL1 thuộc nhóm ưa nhiệt, sinh trưởng tối ưu ở 26-28°C và giải nhiệt độ sinh trưởng là từ 14-45°C. Chủng DL1 không có nhu cầu muối cho sinh trưởng nhưng có thể sinh trưởng trong môi trường với nồng độ NaCl từ 0-4%. Chủng này có khả năng sinh trưởng trên môi trường có chứa axetat, succinat, tactat, xitrat, glycerol, glucoza, etanol, manitol, socbitol, propionat, sunphit. Chúng không sinh trưởng được trên môi trường chứa fomat, metanol. Khả năng sử dụng nguồn cacbon của chủng DL1 cũng tương tự như các loài thuộc chi *Rhodobacter*. Trong số các loài thuộc chi này, có ba loài là *Rba. sphaeroides*, *Rba. azotoformans* và *Rba. capsulatus* có khả năng sinh trưởng trong môi trường có chứa sunphit. Tuy nhiên, loài *Rba. azotoformans* không sinh trưởng trên môi trường chứa tactat, citrat và etanol và *Rba. capsulatus* không có khả năng sử dụng tactat, glyxerol và etanol làm nguồn cacbon (Girija và cộng sự., 2010). So sánh khả năng sử dụng nguồn cacbon và sunphit của chủng

DL1 với các loài thuộc chi *Rhodobacter* theo tác giả Girija và cộng sự năm 2010 thì chủng này có nhiều điểm gần gũi nhất với loài *Rba. sphaeroides* vì chúng có khả năng sử dụng tetrat, citrat, glycerol và sunphit. Đồng thời, chủng DL1 có nhiều điểm tương đồng về các đặc tính sinh lí sinh hóa khác với loài *Rba. sphaeroides*.

Từ các điểm về hình thái tế bào, sắc tố quang hợp và các đặc điểm sử dụng nguồn cacbon cho sinh trưởng, dựa vào khóa phân loại của Bergey năm 2001 và Girija và cộng sự năm 2010; chủng DL1 có thể được xếp vào chi *Rhodobacter* (Bergey, 2001; Girija và cộng sự., 2010).

Bảng 4. So sánh khả năng sử dụng một số nguồn C của chủng DL1 so với một số loài thuộc chi *Rhodobacter* (Girija và cộng sự, 2010; Kumar và cộng sự, 2009)

Đặc điểm	DL1	<i>Rba. sphaeroides</i>	<i>Rba. megalophilus</i>	<i>Rba. maris</i>	<i>Rba. veldkampii</i>	<i>Rba. vinayakumarii</i>	<i>Rba. ovatus</i>	<i>Rba. blasticus</i>	<i>Rba. azotoformans</i>	<i>Rba. aestuarii</i>	<i>Rba. capsulatus</i>	<i>Rba. changlensis</i>	<i>Rba. johrii</i>
Hình dạng tế bào	Hình trứng	Hình trứng, tròn	Hình trứng	Hình trứng, que ngắn, tạo chuỗi	Hình trứng, que ngắn	Hình que ngắn	Hình trứng	Hình trứng, que ngắn	Hình trứng, que ngắn	Hình trứng, que ngắn, tạo chuỗi	Hình trứng, que ngắn, tạo chuỗi	Hình trứng, que ngắn, tạo chuỗi	Hình trứng, que ngắn
Chiều rộng tế bào (µm)	0,8	2.0 – 2.5	1,2 -1,5	0,6-1,0	0,6-0,8	0,8- 1,2	0,9-1,2	0,6- 0,8	0,6 -1.0	0,7- 1,0	0,5 – 1,2	0,8 – 1,0	0,8-0,9
Chiều dài tế bào (µm)	1,2	2.5-3.5	1,5-2,0	1,0-1,5	1,0-1.3	1,5- 3,0	1,0-2,0	1,0 -2,5	0,9 -1,5	1,5 – 2,0	2,0 – 2,5	2,0 – 4,0	1,5-1,9
Khả năng chuyển động	Chuyển động	Chuyển động	Không chuyển động	Chuyển động	Không chuyển động	Không chuyển động	Không chuyển động	Không chuyển động	Chuyển động	Chuyển động	Chuyển động	Không chuyển động	Chuyển động
Màu sắc dịch nuôi cấy	Xanh vàng	Xanh vàng	Nâu vàng	Vàng nâu	Vàng nâu	Vàng nâu	Vàng nâu	Cam nâu	Vàng nâu	Vàng nâu	Vàng nâu	Vàng nâu	Vàng nâu
pH cho sinh trưởng:													
- Tối ưu	7	7,0	7,0	6,5-7,0	7,5	6,0-7,5	6,5-7,0	6,5-7,5	7,0-7,5	7,0	7,0	6,5-7,5	7,0
- Dải pH	5,5-8,5	6,0-8,5	6,0-8,0	5,0-8,0		6,0-8,0	6,0-8,0		6,0-8,0	6,0-8,5	6,5-7,5	6,5-8,0	6,0-8,0
Nhiệt độ tối ưu	28-30	30-34	5-40	25-30	30-35	20-30	25-30	30-35	30-35	25-30	30-35	20-30	30
Nhu cầu muối													

Đồng hóa sunphat	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Phân nitrat	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nguồn cacbon cho sinh trưởng																			
Axetat	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Succinat	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Focmat	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tactat	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Xitrat	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Glucoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Metanol	-	±	-	-	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
Etanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Socbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Propionat	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sunphit	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(KXD: Không xác định; +, sinh trưởng tốt; (+), sinh trưởng yếu; (+/-), sinh trưởng ở một số chủng khác nhau; (-), không sinh trưởng)

Thực hiện phân loại chủng vi khuẩn bằng cách xác định trình tự đoạn gen 16S rARN với cặp mồi xuôi 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3' và mồi ngược 5'-ACGGCTACCTTGTACGACT -3'. Các điều kiện thực hiện nhân đoạn gen 16S rARN là kiến thức thông thường trong lĩnh vực xác định trình tự và các chuyên gia trong lĩnh vực này có thể thực hiện được một cách dễ dàng.

Sản phẩm PCR nhân đoạn gen 16S rARN từ ADN tổng số của chủng DL1 (Fig. 4) đã được xác định trình tự có kích thước 1322 nucleotit (SEQ ID NO:1) và có mức độ tương đồng 99 % với trình tự tương ứng của chủng *Rhodobacter sphaeroides* ATCC17025 (CP000661). Trình tự đoạn gen của chủng DL1 được xác định như nêu trong SEQ ID NO:1 và đã được đăng ký trên GenBank với mã số LC420054. Mối quan hệ phát sinh chủng loài của chủng DL1 với một số chủng vi khuẩn đã được xây dựng và thể hiện trên Fig. 5.

Như vậy, dựa trên các đặc điểm hình thái như khuẩn lạc hình thái tế bào và so sánh trình tự đoạn gen 16S rARN thì chủng DL1 thuộc chi *Rhodobacter* và được đặt tên là *Rhodobacter* sp. DL1.

Tên chủng “DL1”, trong phạm vi bản mô tả này, vẫn được sử dụng để chỉ chủng *Rhodobacter* sp. DL1 vừa được định tên trên đây.

Chủng *Rhodobacter* sp. DL1 phân lập được được lưu giữ tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam dưới dạng thuần khiết về mặt sinh học.

B. Phân tích khả năng phân hủy các hợp chất hữu cơ của chủng DL1.

Chủng DL1 sau khi phân lập được được tiến hành xác định khả năng phân hủy các hợp chất hữu cơ có trong các nguồn nước thải.

Chủng DL1 được nuôi cấy trên môi trường DSMZ-27 trong điều kiện kỵ khí sáng đạt mật độ 10^9 CFU/ml và tiến hành thí nghiệm đánh giá khả năng phân hủy các hợp chất hữu cơ bởi chủng DL1. Môi trường DSMZ -27 có thành phần như đã nêu ở trên.

Thí nghiệm được tiến hành với các nguồn nước thải sau: nước thải lò mổ (Trung Văn), nước thải sản xuất bún (lấy tại thôn Phú Đô), nước thải sinh hoạt (sông Tô Lịch), nước thải sau biogas (hộ gia đình nuôi heo ở Nam Định), nước thải sản xuất tinh bột (nước thải miễn dong Dương Liễu). Hàm lượng BOD₃ ban đầu trong các nguồn nước thải được phân tích và trình bày ở Bảng 5.

Bảng 5. Mức độ ô nhiễm hữu cơ và amoni trong các nguồn nước thải

Nguồn nước thải	BOD ₃ (mg/l)	Nguồn nước thải	BOD ₃ (mg/l)
Nước thải sản xuất bún	1050±11,5	Nước thải sau biogas	720±8,8
Nước thải sản xuất tinh bột	1100±12,7	Nước thải sinh hoạt	300±5,8

Nước thải lò mổ	1400±15,0		
-----------------	-----------	--	--

Các nguồn nước thải được khử trùng và đưa vào bình thủy tinh thể tích 100 ml bổ sung 10% giống vi khuẩn tía quang hợp mật độ 10^9 CFU/ml để đạt giá trị $OD_{800} \sim 0,1 - 0,2$. Đối chứng là các nguồn nước thải đã khử trùng không bổ sung vi khuẩn tía quang hợp. Thí nghiệm được tiến hành trong điều kiện kỵ khí sáng. Khả năng sinh trưởng của chủng vi khuẩn tía quang hợp DL1 được đánh giá bằng khả năng tích lũy sinh khối đo ở bước sóng 800 nm. Khả năng loại bỏ hợp chất hữu cơ được xác định bằng cách ly tâm mẫu nước thải có bổ sung vi khuẩn tía quang hợp chủng DL1 sau 5 ngày nuôi cấy 8000 vòng/phút trong 10 phút, thu dịch trên để xác định hàm lượng BOD. Kết quả theo dõi khả năng sinh trưởng và khả năng xử lý các hợp chất hữu cơ của chủng vi khuẩn tía quang hợp DL1 trong các nguồn nước thải sau 5 ngày được trình bày ở Bảng 6.

Bảng 6. Mức độ tích lũy sinh khối (ΔOD_{800}) và hiệu suất loại bỏ các hợp chất hữu cơ trong các nguồn thải sau 5 ngày

Nguồn nước thải	ΔOD_{800}	BOD ₃ ban đầu (mg/l)	BOD ₃ còn lại (mg/l)	Hiệu suất loại bỏ (%)
Nước thải sản xuất bún	2,00±0,1	1050±11,5	30±5	97,1
Nước thải sản xuất tinh bột	1,90±0,1	1100±12,7	40±3	96,3
Nước thải lò mổ	1,95±0,2	1400±15,0	90±5	93,5
Nước thải sau biogas	1,87±0,3	720±8,8	45±4	93,7
Nước thải sinh hoạt	1,00±0,2	500±5,8	50±5	90,0

Kết quả từ Bảng 6 cho thấy: chủng vi khuẩn tía quang hợp DL1 có khả năng sinh trưởng khá tốt trong các nguồn thải khi được chiếu sáng. Hàm lượng hợp chất hữu cơ (theo BOD₃) được giảm mạnh. Hiệu suất loại bỏ các hợp chất hữu cơ tương đối cao như nước thải sản xuất bún 97,1%, nước thải sản xuất tinh bột 96,3% và thấp nhất là đối với nước thải sinh hoạt 90%. Ngoài ra, còn quan sát thấy nước thải ở ban đầu có màu đen, mùi hôi thối, sau thí nghiệm có bổ sung vi khuẩn tía quang hợp chủng DL1 thì các nguồn nước thải đều có màu đỏ (màu đặc trưng của vi khuẩn tía quang hợp) và mùi hôi thối bị khử hoàn toàn. Như vậy, sử dụng chủng vi khuẩn tía quang hợp DL1 để xử lý các hợp chất hữu cơ trong các nguồn thải đạt hiệu suất tương đối cao.

C. Phân tích khả năng xử lý sunphit của chủng vi khuẩn tía quang hợp DL1

Chủng vi khuẩn tía quang hợp DL1 sau khi phân lập được nhân giống trong các lọ hình trụ thể tích 10 - 100 ml. Môi trường sử dụng trong quá trình nhân giống là DSMZ-27. Các môi trường được dùng trong quá trình đánh giá khả năng loại bỏ sunphit là môi trường DSMZ-27 cải tiến có bổ sung sunphit ở các nồng độ khác nhau 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 mgS²⁻/l, môi trường có thành phần như sau:

Các môi trường được dùng trong quá trình làm giàu và phân lập được đề cập ở đây là môi trường DSMZ-27 có thành phần như sau: cao nấm men (0,3 g/l); succinat - Na (1 g/l); axetat (0,5 g/l); K_2HPO_4 (1 g/l); KH_2PO_4 (0,5 g/l); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,4 g/l); $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,05 g/l); NH_4Cl (0,4 g/l); vi lượng $SL_6^{(*)}$ (1 ml/l); dung dịch vitamin $B_{12}^{(**)}$ (0,4 ml/l); nước cất (1000 ml); NaCl (20 g/l); Na_2S (10mgS); pH (6,8).

Dung dịch vi lượng SL_6 : HCl (25%) (6,5 ml/l); $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ (1,5 g/l); H_3BO_3 (0,3 g/l); $MnCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,03 g/l); $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (0,2 g/l); $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,1 g/l); $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ (17 mg/l); $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ (24 mg/l); $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (36 mg/l), H_2O 993 ml.

Dung dịch vitamin B12: 10 mg trong 100 ml nước được khử trùng bằng màng lọc và bổ sung vào môi trường trước khi sử dụng.

Môi trường DSMZ-27 khử trùng ở 121°C trong 30 phút.

Thí nghiệm được tiến hành trong các bình thủy tinh thể tích 100 ml, lượng giống ban đầu được cấy vào môi trường là 10% (mật độ tế bào trong các bình nuôi giống đạt mật độ khoảng 10^9 CFU/ml) tiến hành nuôi ở điều kiện kỵ khí, chiếu sáng bằng đèn sợi đốt, nhiệt độ nằm trong khoảng $30 \pm 5^\circ C$, trong thời gian 5 ngày. Khả năng tích lũy sinh khối tiến hành đánh giá bằng cách đo dịch nuôi cấy vi khuẩn tia quang hợp chủng DL1 trên máy quang phổ ở bước sóng 800nm (OD_{800}). Hàm lượng sunphit được đánh giá bằng phương pháp so màu của phức xanh metylen tạo thành khi phản ứng với p-aminodimetyl anilin có mặt của $FeCl_3$ (Standard method 428C, 1975). Kết quả được trình bày trên Bảng 7.

Bảng 7. Khả năng tích lũy sinh khối (ΔOD_{800}) và hoạt tính loại bỏ sunphit của chủng DL1

DL1		
Hàm lượng sunphit ban đầu (mgS^{2-}/l)	ΔOD_{800}	Hàm lượng sunphit còn lại (mgS^{2-}/l)
0	$1,82 \pm 0,03$	$0,0 \pm 0,00$
5	$1,79 \pm 0,01$	$0,0 \pm 0,00$
10	$1,78 \pm 0,03$	$0,0 \pm 0,00$
15	$1,67 \pm 0,02$	$0,0 \pm 0,00$
20	$1,63 \pm 0,05$	$0,64 \pm 0,03$
25	$1,55 \pm 0,08$	$2,5 \pm 0,2$
30	$1,2 \pm 0,01$	$3,6 \pm 0,05$

Chủng vi khuẩn tia quang hợp DL1 có khả năng sinh trưởng và hoạt tính loại bỏ sunphit trong khoảng nồng độ sunphit từ 0-30 mgS^{2-}/l . Nồng độ 30 mgS^{2-}/l gây ức chế đối với nhiều nhóm vi sinh vật thậm chí cả một số loài vi khuẩn tia quang hợp. Trong khi đó, sinh trưởng của chủng DL1 chỉ bị ức chế một phần không đáng kể và hoạt tính loại bỏ sunphit đạt 88%.

Do vậy, chủng vi khuẩn tía quang hợp DL1 có tiềm năng xử lý sunphit ở các nguồn thải hoặc các ao hồ nuôi trồng thủy sản có chứa nồng độ sunphit 5 - 30 mgS²⁻/l.

Tiến hành đánh giá ảnh hưởng của một số nhân tố như pH, nhiệt độ, nồng độ muối để từ đó xác định được các điều kiện thích hợp cho sinh trưởng và khả năng loại bỏ sunphit theo sáng chế.

Để đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ lên khả năng sinh trưởng cũng như loại bỏ sunphit của chủng DL1, thí nghiệm được tiến hành nghiên cứu ở các khoảng nhiệt độ 14-16°C; 28 - 30°C; 38 - 40°C (là các khoảng nhiệt độ trung bình đặc trưng cho mùa đông và mùa hè ở miền Bắc nước ta). Chủng DL1 được nuôi trong các bình thủy tinh thể tích 100 ml, chứa 10ml dịch vi khuẩn tía quang hợp chủng DL1 (mật độ tế bào trong các bình nuôi giống đạt mật độ khoảng 10⁹ CFU/ml) và 90ml môi trường DSMZ-27, sunphit bổ sung vào bình với hàm lượng 15 mgS²⁻/l. Tiến hành nuôi ở điều kiện kỵ khí, chiếu sáng bằng đèn sợi đốt tại các khoảng nhiệt độ khác nhau. Kết quả thu được trình bày trên Bảng 8.

Bảng 8. Khả năng sinh trưởng và loại bỏ sunphit của chủng DL1 ở các nhiệt độ khác nhau

Khoảng nhiệt độ	DL1	
	ΔOD_{800}	Hàm lượng sunphit còn lại (mgS ²⁻ /l)
14-16	1,5±0,05	2,8±0,10
28-30	1,8±0,03	0,0±0,00
38-40	1,6±0,02	1,2±0,30
ĐC	0,2±0,01	14,5±0,01

Như vậy, chủng vi khuẩn tía quang hợp DL1 có thể sinh trưởng được ở nhiệt độ khá rộng từ 14 - 40°C, trong khoảng này sự sai khác về sinh trưởng là không có ý nghĩa ($P>0,05$) và sinh trưởng thích hợp ở khoảng nhiệt độ 28 - 30°C. Trong khoảng nhiệt độ thích hợp cho sinh trưởng thì hoạt tính loại bỏ sunphit của chúng cũng cao nhất. Mặc dù mức độ tích lũy sinh khối của các chủng DL1 ở khoảng nhiệt độ từ 14 - 16°C và 38 - 40°C kém hơn so với nhiệt độ tối ưu nhưng chúng vẫn sinh trưởng khá tốt và hàm lượng sunphit còn lại trong môi trường không đáng kể. Điều này chứng tỏ chủng vi khuẩn tía quang hợp DL1 có khả năng sinh trưởng khá tốt ở nhiệt độ thấp 14 - 16°C (nhiệt độ trung bình mùa đông ở miền Bắc) và nhiệt độ cao 38 - 40°C (nhiệt độ trung bình của mùa hè). Như vậy, có thể ứng dụng chúng trong xử lý sunphit ngoài tự nhiên trong mùa hè và cả mùa đông ở tất cả các tỉnh thành trong cả nước ta.

Để đánh giá ảnh hưởng của pH lên khả năng sinh trưởng cũng như loại bỏ sunphit của chủng DL1, thí nghiệm được tiến hành nghiên cứu ở các khoảng pH khác nhau từ 4-9. Chủng DL1 được nuôi trong các bình thủy tinh thể tích 100 ml, chứa 10 ml dịch vi khuẩn tía quang hợp

chủng DL1 (mật độ tế bào trong các bình nuôi giống đạt mật độ khoảng 10^9 CFU/ml) và 90 ml môi trường DSMZ-27, sunphit bổ sung vào bình với hàm lượng $15 \text{ mgS}^{2-}/\text{l}$ và điều chỉnh pH ban đầu từ 4 - 9. Tiến hành nuôi ở điều kiện kỵ khí, chiếu sáng bằng đèn sợi đốt ở nhiệt độ $28-30^\circ\text{C}$. Kết quả thu được trình bày trên Bảng 9.

Bảng 9. Khả năng sinh trưởng và loại bỏ sunphit của chủng DL1 ở các pH khác nhau

pH	DL1	
	ΔOD_{800}	Hàm lượng sunphit còn lại (mgS^{2-}/l)
4,0	$0,01\pm 0,01$	$14,5\pm 0,1$
4,5	$0,10\pm 0,03$	$14,2\pm 0,2$
5,0	$0,30\pm 0,02$	$13,7\pm 0,3$
5,5	$1,00\pm 0,10$	$7,5\pm 0,1$
6,0	$1,30\pm 0,05$	$2,7\pm 0,2$
6,5	$1,70\pm 0,03$	$0,0\pm 0,0$
7,0	$1,86\pm 0,06$	$0,0\pm 0,0$
7,5	$1,77\pm 0,05$	$0,0\pm 0,0$
8,0	$1,73\pm 0,04$	$0,0\pm 0,0$
8,5	$1,60\pm 0,03$	$0,3\pm 0,3$
9,0	$0,50\pm 0,02$	$12,8\pm 0,5$

Kết quả từ Bảng 9 cho thấy: chủng DL1 có thể sinh trưởng khá tốt trong khoảng pH từ 6,5 - 8,5, trong khoảng pH này, hoạt tính loại bỏ sunphit của chúng cũng khá tốt, hàm lượng sunphit hầu như không còn lại trong môi trường nuôi. Trong đó, khả năng sinh trưởng cũng như hoạt tính loại bỏ sunphit tối ưu tại pH 7. Như vậy, chủng DL1 có khả năng sinh trưởng và có hoạt tính loại bỏ sunphit tốt trong khoảng pH khá rộng, thuận lợi cho sản xuất sinh khối của chúng ngoài tự nhiên cũng như ứng dụng chúng để xử lý các nguồn ô nhiễm.

Chủng DL1 được tiến hành đánh giá ảnh hưởng của nồng độ muối (NaCl) lên khả năng sinh trưởng và hoạt tính loại bỏ sunphit. Thí nghiệm được tiến hành nghiên cứu ở các nồng độ NaCl khác nhau. Chủng DL1 được nuôi trong các bình thủy tinh thể tích 100 ml, bổ sung 10ml dịch vi khuẩn tủa quang hợp chủng DL1 (mật độ tế bào trong các bình nuôi giống đạt mật độ khoảng 10^9 CFU/ml) và 90 ml môi trường DSMZ-27, sunphit bổ sung vào bình với hàm lượng $15 \text{ mgS}^{2-}/\text{l}$. Tiến hành nuôi ở điều kiện kỵ khí, chiếu sáng bằng đèn sợi đốt ở nhiệt độ $28-30^\circ\text{C}$. Kết quả thu được trình bày trên Bảng 10.

Bảng 10. Ảnh hưởng của NaCl đến khả năng sinh trưởng và hoạt tính khử sunphit của chủng DL1

Nồng độ NaCl (%)	DL1	
	ΔOD_{800}	Hàm lượng sunphit còn lại (mgS^{2-}/l)
0,0	$1,82\pm 0,04$	$0\pm 0,00$

0,5	1,78±0,08	0±0,00
1,0	1,74±0,07	0±0,00
1,5	1,68±0,07	0±0,00
2,0	1,69±0,08	0±0,00
2,5	1,66±0,05	0±0,00
3,0	1,58±0,05	1,25±0,27
3,5	1,57±0,04	1,32±0,20
4,0	1,22±0,03	4,90±0,17
5,0	0,87±0,02	7,80±0,45
6,0	0,50±0,03	12,10±0,33
7,0	0,38±0,02	12,50±0,01
8,0	0,25±0,01	13,09±0,03
ĐC	0,12±0,02	14,80±0,01

Kết quả ở Bảng 10 cho thấy, nồng độ muối trong môi trường nuôi có ảnh hưởng đến khả năng tích lũy sinh khối và hoạt tính loại bỏ sunphit của chủng DL1. Chủng này có khả năng sinh trưởng tốt nhất trong môi trường không chứa muối, khoảng nồng độ NaCl từ 1 – 3,5%, sinh trưởng của chủng này khá tốt. Hoạt tính loại bỏ sunphit của chủng DL1 tốt nhất khi bổ sung từ 0 - 2,5% nồng độ NaCl. Khi nồng độ muối NaCl cao hơn 3,5% khả năng sinh trưởng của chủng DL1 bắt đầu bị ức chế và sự ức chế này tăng dần theo sự gia tăng của độ muối kéo theo hoạt tính loại bỏ sunphit cũng giảm dần, do vậy lượng sunphit còn lại trong môi trường khá cao. Như vậy, chủng DL1 có thể ứng dụng để xử lý sunphit trong các thủy vực từ nước ngọt đến nước mặn.

Ánh sáng là một trong những yếu tố quan trọng đối với nhóm sinh vật quang hợp trong đó có nhóm vi khuẩn tía quang hợp. Để xác định nhu cầu về ánh sáng đối với chủng vi khuẩn tía quang hợp DL1, thí nghiệm được tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của cường độ sáng khác nhau đến khả năng tích lũy sinh khối và hoạt tính loại bỏ sunphit. Chủng DL1 được nuôi trong các bình thủy tinh thể tích 100 ml, chứa 10 ml dịch vi khuẩn tía quang hợp chủng DL1 (mật độ tế bào trong các bình nuôi giống đạt mật độ khoảng 10^9 CFU/ml) và 90 ml môi trường DSMZ-27, sunphit bổ sung vào bình với hàm lượng 15 mgS/l. Tiến hành nuôi ở điều kiện kỵ khí, chiếu sáng bằng đèn sợi đốt có cường độ chiếu sáng từ 0 – 6000 lux, ở nhiệt độ 28-30 °C. Kết quả thu được trình bày trên Bảng 11.

Bảng 11. Ảnh hưởng của cường độ sáng đến khả năng sinh trưởng và hoạt tính khử sunphit của chủng DL1

Cường độ sáng	DL1	
	ΔOD_{800}	Hàm lượng sunphit còn lại (mgS^2-/l)
0	0,20±0,04	14,5±0,3
600	0,67±0,03	11,8±0,4
1200	1,02±0,05	6,6±0,2

2400	1,71±0,02	0±0,0
3600	1,82±0,04	0±0,0
4800	1,79±0,03	0±0,0
6000	1,77±0,02	0,0±0,0

Kết quả cho thấy, chủng DL1 có thể sinh trưởng tốt và có hoạt tính loại bỏ sunphit khá cao khi được chiếu sáng ở khoảng cường độ từ 1200 đến 6000 lux. Mức độ tích lũy sinh khối và hoạt tính loại bỏ sunphit của chủng này khá cao khi được chiếu sáng với cường độ khoảng 2400 - 6000 lux và tối ưu ở cường độ chiếu sáng 3600 lux. Như vậy, vi khuẩn tía quang hợp có nhu cầu được chiếu sáng để sinh trưởng quang hợp nhưng ở mức độ không cao (1200 - 6000 lux), khả năng sinh trưởng và hoạt tính của chúng vẫn thể hiện ngay cả khi được chiếu sáng với cường độ thấp. Khả năng này có thể do vi khuẩn tía quang hợp có khả năng thu nhận năng lượng ánh sáng cả trong vùng phổ không nhìn thấy (Syed and Henshaw, 2003). Do vậy, có thể ứng dụng chúng để xử lý sunphit ở những nơi có cường độ chiếu sáng thấp như ở đáy các ao nuôi trồng thủy sản, các hồ tù đọng, các hồ chứa nước thải.

D. Phân tích khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh ở tôm *Vibrio*. sp

Chủng DL1 sau khi được phân lập và định danh được sử dụng để khảo sát khả năng đối kháng với chủng vi khuẩn gây bệnh tôm *Vibrio* sp. bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch có điều chỉnh cho phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (Hadacek và cộng sự., 2000; Trịnh Thị Trang và cộng sự., 2016; Chumpol và cộng sự., 2016).

Chủng vi khuẩn tía quang hợp được nuôi trong môi trường DSMZ- 27 dịch, môi trường DSMZ- 27 có thành phần như đã mô tả phía trên.

Khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh tôm của chủng DL1 được xác định như sau: Chủng DL1 được nuôi trong môi trường DSMZ- 27 dịch thể ở điều kiện kỵ khí có chiếu sáng bằng đèn sợi đốt, nhiệt độ 28 – 30°C trong 48h, đo OD₈₀₀ khoảng 0,5 – 0,6 để xác định mật độ đạt 10⁸ CFU/ml. Vi khuẩn gây bệnh tôm *Vibrio* sp. được nuôi trong môi trường MPA dịch, lắc 150 vòng/phút, ở 35°C trong 18 h, tiến hành đo độ đục huyền phù ở bước sóng 600 nm và kiểm tra lại bằng phương pháp đếm khuẩn lạc trên bề mặt thạch. Đĩa thử hoạt tính được chuẩn bị bằng cách cấy trải 100 µl vi khuẩn gây bệnh *Vibrio* sp. mật độ 10⁶ CFU/ml lên bề mặt đĩa petri có chứa môi trường DSMZ-27 đặc để khô và đục 4 giếng, đường kính khoảng 6 mm sao cho mỗi giếng cách nhau 2 -3 mm. Bổ sung 100 µl dịch nuôi vi khuẩn tía quang hợp chủng DL1 mật độ 10⁸ CFU/ml vào các giếng thạch trên đĩa petri và giữ các đĩa thí nghiệm ở điều kiện phòng có chiếu sáng trong 3h. Sau đó đặt các đĩa vào tủ ấm 37°C trong 24h. Đối chứng là môi trường DSMZ- 27 dịch không chứa vi khuẩn tía quang hợp chủng DL1. Hoạt tính ức chế vi khuẩn *Vibrio* sp. được đánh giá bằng cách đo bán kính vòng ức chế vi khuẩn, tính theo công thức: Bán kính (mm) = D-d; trong

đó D là đường kính vòng vô khuẩn và d là đường kính lỗ khoan thạch. Thí nghiệm được lặp lại ba lần trên đĩa thạch và lấy giá trị trung bình. Kết quả cho thấy: chủng vi khuẩn tía quang hợp DL1 tạo thành vòng vô khuẩn đối với vi khuẩn gây bệnh *Vibrio* sp. và thể hiện trên Fig 6. Giá trị trung bình tính kháng vi khuẩn gây bệnh tôm *Vibrio* sp. của chủng DL1 là 15mm. Như vậy, có thể kết luận chủng vi khuẩn DL1 có khả năng kháng lại vi khuẩn gây bệnh *Vibrio* sp..

E. Phân tích khả năng tích lũy Co-enzyme Q10

Chủng DL1 sau khi phân lập được tiến hành xác định khả năng tích lũy Co-enzyme Q10 của nó theo phương pháp của Paterson và Buddie (1991).

Chủng DL1 được nuôi cấy trên môi trường DSMZ-27. Môi trường DSMZ -27 có thành phần như đã mô tả phía trên.

Khả năng tích lũy Co-enzyme Q10 của chủng DL1 được xác định như sau: nuôi cấy chủng DL1 trên môi trường DSMZ- 27, sau 5 ngày nuôi cấy trong điều kiện kỵ khí sáng, đem ly tâm loại dịch thu sinh khối tươi (ly tâm ở 8000 vòng/phút, 4°C trong 10 phút). Co-enzyme Q10 được tiến hành chiết xuất theo phương pháp của Paterson và Buddie (1991), hỗn hợp dung môi chiết là metanol: *n*-hexan với tỉ lệ là 3:2 (v/v). Sinh khối tươi của chủng DL1 thu được sau khi ly tâm bổ sung dung môi chiết là metanol: *n*-hexan với tỉ lệ là 3:2 (v/v), lắc nhẹ trong 20 – 30 phút để phá vỡ màng tế bào và hòa tan tối đa Co-enzyme Q10. Tiến hành ly tâm ở 8000 vòng/phút, 4°C trong 10 phút thu dịch pha trên và loại bỏ xác tế bào. Dịch trên thu được quay cô chân không ở 60°C đến khi tạo cặn (gọi là cặn thô). Cặn thô được hòa tan vào dung môi *n*-hexan được gọi là dịch thô chứa Co-enzyme Q10. Dịch thô thu được từ sinh khối chủng DL1 được xác định Co-enzyme Q10 bằng phương pháp sắc kí bản mỏng tráng silicagel 60 F₂₅₄ (TCL) pha thường với hệ dung môi *n*-hexan: etyl ete với tỉ lệ là 4:1 (v/v). Kết quả được thể hiện Fig 7.

Trên sắc kí đồ của tấm sắc kí bản mỏng, dựa vào vị trí vạch và màu sắc của chất chuẩn Co-enzyme Q10 có thể thấy hợp chất Co-enzyme Q10 chứa trong dịch chiết vi khuẩn chủng DL1 đã được cô lập.

Để xác định hàm lượng Co-enzyme Q10 có trong dịch chiết của chủng DL1, dịch chiết thô của chủng đã tiến hành định lượng Co-enzyme Q10 bằng phương pháp sắc kí lỏng cao áp (HPLC). Thiết bị HPLC có các thông số kỹ thuật như sau: Model Agilent 1100, sử dụng detector chuỗi (DAD) dải đo 190 -1100 nm do hãng Agilent (Mỹ) sản xuất; Cột Zobrax Hypersil C₁₈ (200 x 4 mm); Tỷ lệ pha động Hexan:Axeton = 90:10 (v/v); Tốc độ dòng: 0,5 ml/phút; Áp suất: 250 bar. Cách tiến hành: Sau khi đặt xong các thông số cần thiết, tiến hành rửa bơm, rửa cột, chạy đường nền và áp suất ổn định 30 ÷ 45 phút. Lọc mẫu trước khi đo bằng micro filter 2-3 lần, lượng mẫu tối thiểu đạt 0,5ml. Dùng micropipet lấy 5 ml dung dịch phân tích đưa vào buồng mẫu. Máy sẽ tự động ghi các thông số: Thời gian lưu (RT), chiều cao phổ và tính diện tích cũng như thành phần phần trăm (%) của từng cấu tử trong hỗn hợp. Sau khi đo xong mẫu để thiết bị chạy đường nền 10 phút trước khi bơm mẫu tiếp theo.

Kết quả phân tích định lượng hợp chất Co-enzyme Q10 thô từ dịch chiết của chủng DL1

được thể hiện trên sắc kí đồ Fig 8 và Fig 9. Dựa vào sự tương quan tuyến tính của diện tích phổ và nồng độ chất chuẩn Co-enzym Q10, hàm lượng Co-enzym Q10 có trong dịch chiết vi khuẩn tia quang hợp chủng DL1 là 63,394 mg/lít.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Phân lập và định tên chủng vi khuẩn DL1

Mẫu thu từ bùn ao nuôi cá tra giai đoạn chuẩn bị thu hoạch bị ô nhiễm chất hữu cơ và sunphit được bảo quản trong dụng cụ tiệt trùng để đảm bảo không bị nhiễm tạp các vi sinh vật từ môi trường. Sau khi thu 24h, mẫu được làm giàu bằng cách nuôi tích lũy trong các bình nhựa trong hình trụ có kích thước $\Phi = 5$ cm, $h = 35$ cm. Mẫu bùn được đưa vào bình với tỷ lệ 9: 1, sau đó chúng được làm đầy bằng môi trường DSMZ -27 bổ sung sunphit hàm lượng 10 mgS²⁻/l. Các bình này được đậy kín và ủ dưới ánh sáng đèn sợi đốt cường độ sáng ~5000 lux. Sau khoảng một tuần, tiến hành phân lập trên đĩa petri chứa môi trường thạch DSMZ 27, ủ ở điều kiện kỵ khí (không khí được thay thế bằng khí nitơ) với cường độ sáng ~5000 lux từ đèn sợi đốt. Các khuẩn lạc được tách và làm sạch, thu được chủng vi khuẩn DL1 có hình thái khuẩn lạc cũng như hình thái tế bào như được thể hiện trong Fig. 1 và Fig. 2.

Dựa vào hình thái khuẩn lạc và hình thái tế bào của chủng vi khuẩn thu được trên môi trường nuôi cấy dạng thạch, chủng vi khuẩn DL1 có thể được xếp vào chi *Rhodobacter* (Bergey, 1989, 2001).

Thực hiện phân loại chủng vi khuẩn DL1 bằng cách xác định trình tự đoạn gen 16S rARN với cặp mồi 27F/1527R, ADN tổng số của chủng vi khuẩn DL1 được thu như sau:

- Nuôi cấy thu sinh khối vi khuẩn trong môi trường DSMZ -27 ở điều kiện kỵ khí và đặt dưới ánh sáng đèn sợi đốt khoảng 3 - 4 ngày đến khi OD₈₀₀ đạt 0,8 - 1 thì ADN của chúng được tách chiết theo qui trình sau: i). Hút dịch nuôi cấy vào các ống eppendorf 1,5 ml, tế bào được thu lại bằng cách ly tâm 10 000 v/ph trong 5 phút. ii). Bổ sung 576 µl dung dịch TE, để trên đá và lắc đều cho tan hết tế bào; iii) Bổ sung 30 µl SDS 10%, lắc nhẹ và để ở nhiệt độ phòng; iv). Bổ sung 3 µl enzym proteinaza K (10 mg/ml), ủ mẫu ở 37°C trong 1 giờ; v). Bổ sung 180 µl NaCl 5M lắc nhẹ, ủ mẫu ở 65°C trong 10 phút. Chú ý: đảo nhẹ nhàng để tránh đứt gãy ADN; vi). Protein được loại bỏ bằng một thể tích chloroform/izoamyn alcohol 24:1 (v/v), ly tâm 12 000 v/ph trong 10 phút, thu dịch nổi và chuyển sang ống eppendorf mới; vii) Protein được loại bỏ tiếp bằng phenon/chloroform/ izoamyn alcohol theo tỷ lệ 25:24:1 (v/v), ly tâm 12000 v/ph trong 10 phút, thu dịch nổi và chuyển sang ống eppendorf mới; viii) ADN được rửa bằng hai lần thể tích etanol 100 % ở 4°C trong 20 phút, ly tâm 12000 v/ph ở 4°C, phần tủa là ADN hệ gen được thu lại, tủa được rửa lại bằng etanol 70% ly tâm 12000 v/ph ở 4°C trong 15 phút và được làm khô bằng máy hút chân không Mi-vac 110 V, hòa tan ADN trong 25µl TE và bảo quản ở 4 °C.

Cặp mồi được sử dụng để định danh chủng vi khuẩn là cặp mồi 27F/1527R được thiết kế dựa vào trình tự có tính bảo thủ cao của gen 16S rARN ở sinh vật nhân sơ (White và cộng sự, 1990).

Mồi xuôi 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3' và mồi ngược 5'-ACGGCTACCTTGTACGACT -3'.

ADN thu được từ chủng vi khuẩn được thực hiện nhân gen 16S rARN bằng phương pháp PCR với thành phần phản ứng và chu trình nhiệt như sau:

Thành phần phản ứng (μ l):

Đệm Taq 10X:	2,5 μ l	Taq-polymeraza (5 U/ μ l):	0,25 μ l
MgSO ₄ (25 mM):	2,5 μ l	ADN khuôn:	2,0 μ l
dNTP (2,5 mM):	2,0 μ l	H ₂ O khử ion:	13,75 μ l
Mồi xuôi 10 μ M:	1,0 μ l	Tổng thể tích:	25 μ l
Mồi ngược 10 μ M:	1,0 μ l		

Chu trình nhiệt:

Bước 1: 95°C (5 phút)

Bước 2: 95°C (50 s)

Bước 3: 58°C (45 s)

Bước 4: 72°C (1 phút 30 giây)

Bước 5: Lặp lại 30 lần từ bước 2 đến bước 4

Bước 6: 72°C (7 phút)

Bước 7: Bảo quản ở 4°C

Sản phẩm PCR nhân đoạn gen 16S rARN từ ADN tổng số của chủng DL1 đã được kiểm tra trên gel agarosa 1%, nhuộm ethidium bromit và sau đó soi bản gel dưới tia tử ngoại. Độ dài của sản phẩm PCR có kích thước đúng như lý thuyết và được thể hiện trên Fig. 4.

Sản phẩm nhân đoạn gen 16S rARN được tinh sạch bằng kit Gel Purification Kit, hãng Bioneer, Hàn Quốc có bán trên thị trường và sau đó được xác định trình tự theo phương pháp của Sanger, sử dụng máy đọc trình tự tự động ABI, Mỹ. Sử dụng các phần mềm Bioedit, Clustal X và Mega4 để xây dựng cây phát sinh chủng loại của chủng vi khuẩn DL1.

Trình tự gen của chủng DL1 có kích thước 1322 nucleotit được xác định như nêu trong SEQ ID NO: 1 và được đăng ký trên GenBank với mã số truy cập LC420054.

Trình tự gen của chủng DL1 có có mức độ tương đồng 99% với trình tự tương ứng của các chủng *Rhodobacter sphaeroides* ATCC17025 (mã số CP000661), và tương đồng xa hơn (94 %) so với chủng *Rhodobacter aestuarii* JA296T (AM748926). Mối quan hệ phát sinh chủng loài của chủng DL1 với một số chủng vi khuẩn đã được xây dựng và kết quả được thể hiện ở Fig. 5.

Như vậy, dựa trên các đặc điểm hình thái khuẩn lạc cũng như hình thái tế bào và so sánh trình tự gen 16S rARN thì chủng DL1 thuộc chi *Rhodobacter* và được đặt tên là *Rhodobacter* sp. DL1.

Chủng vi khuẩn DL1 phân lập được được lưu giữ tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam dưới dạng thuần khiết về mặt sinh học.

Ví dụ 2. Đánh giá khả năng phân hủy các hợp chất hữu cơ của chủng DL1

Thí nghiệm được tiến hành khi nuôi cấy chủng DL1 mật độ 10^9 CFU/ml, tỷ lệ 10% đối với các nguồn nước thải sau: Nước thải lò mổ (Trung Văn), nước thải sản xuất bún (lấy tại thôn Phú Đô), nước thải sinh hoạt (sông Tô Lịch), nước thải sau biogas (hộ gia đình nuôi heo ở Nam Định), nước thải sản xuất tinh bột (nước thải miến dong Dương Liễu). Kết quả thể hiện trên Bảng 6: chủng vi khuẩn tía quang hợp DL1 có khả năng sinh trưởng khá tốt trong các nguồn thải khi được chiếu sáng. Hàm lượng hợp chất hữu cơ (theo BOD_3) được giảm mạnh. Hiệu suất loại bỏ các hợp chất hữu cơ tương đối cao như nước thải sản xuất bún 97,1%, nước thải sản xuất tinh bột 96,3% và thấp nhất là đối với nước thải sinh hoạt 90%. Ngoài ra, còn quan sát thấy nước thải ở ban đầu có màu đen, mùi hôi thối, sau thí nghiệm có bổ sung vi khuẩn tía quang hợp chủng DL1 thì các nguồn nước thải đều có màu đỏ (màu đặc trưng của vi khuẩn tía quang hợp) và mùi hôi thối bị khử hoàn toàn. Như vậy, sử dụng chủng DL1 để xử lý các hợp chất hữu cơ trong các nguồn thải đạt hiệu suất tương đối cao.

Ví dụ 3: Đánh giá khả năng xử lý sunphit của chủng DL1

Chủng vi khuẩn tía quang hợp DL1 được tiến hành đánh giá khả năng xử lý sunphit bằng cách bổ sung 10% giống DL1 mật độ 10^9 CFU/ml. Môi trường được dùng trong quá trình đánh giá khả năng loại bỏ sunphit là môi trường DSMZ – 27 cải tiến có bổ sung sunphit ở các nồng độ khác nhau 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 mgS^{2-}/l . Kết quả theo dõi khả năng sinh trưởng và loại bỏ sunphit thể hiện ở Bảng 7.

Kết quả cho thấy chủng DL1 có khả năng sinh trưởng và hoạt tính loại bỏ sunphit trong khoảng nồng độ sunphit từ 0-30 mgS^{2-}/l . Nồng độ 30 mgS^{2-}/l gây ức chế đối với nhiều nhóm vi sinh vật trong đó có cả một số loài vi khuẩn tía quang hợp. Trong khi đó, sinh trưởng của chủng DL1 chỉ bị ức chế một phần không đáng kể và hoạt tính loại bỏ sunphit đạt 88%. Do vậy, chủng vi khuẩn tía quang hợp DL1 có tiềm năng xử lý sunphit ở các nguồn thải hoặc các ao hồ nuôi trồng thủy sản có chứa nồng độ sunphit 5 - 30 mgS^{2-}/l .

Ví dụ 4: Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng sinh trưởng và xử lý sunphit của chủng DL1

Chủng DL1 được tiến hành đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ lên khả năng sinh trưởng cũng như loại bỏ sunphit, thí nghiệm được tiến hành nghiên cứu ở các khoảng nhiệt độ 14-16°C;

28 -30°C; 38-40°C (là các khoảng nhiệt độ trung bình đặc trưng cho mùa đông và mùa hè ở miền Bắc nước ta). Kết quả thu được thể hiện trên Bảng 8.

Kết quả cho thấy chủng vi khuẩn tía quang hợp DL1 có thể sinh trưởng được ở nhiệt độ khá rộng từ 14-40°C và sinh trưởng thích hợp ở khoảng nhiệt độ 28 - 30°C. Trong khoảng nhiệt độ thích hợp cho sinh trưởng thì hoạt tính loại bỏ sunphit của chúng cũng cao nhất. Mặc dù mức độ tích lũy sinh khối của các chủng DL1 ở khoảng nhiệt độ từ 14 - 16°C và 38 - 40°C kém hơn so với nhiệt độ tối ưu nhưng chúng vẫn sinh trưởng khá tốt và hàm lượng sunphit còn lại trong môi trường không đáng kể. Điều này chứng tỏ chủng vi khuẩn tía quang hợp DL1 có khả năng sinh trưởng khá tốt ở nhiệt độ thấp 14 - 16°C (nhiệt độ trung bình mùa đông) và nhiệt độ cao 38 - 40°C (nhiệt độ trung bình của mùa hè). Như vậy, có thể ứng dụng chúng trong xử lý sunphit ngoài tự nhiên trong mùa hè và cả mùa đông ở tất cả các tỉnh thành trong cả nước ta.

Ví dụ 5: Ảnh hưởng của pH đến khả năng sinh trưởng và xử lý sunphit của chủng DL1

Chủng DL1 được nuôi cấy và đánh giá khả năng sinh trưởng cũng như khả năng loại bỏ sunphit ở các pH khác nhau từ 4 -9. Kết quả được thể hiện trên Bảng 9.

Kết quả cho thấy: chủng DL1 có thể sinh trưởng khá tốt trong khoảng pH từ 6,5 - 8,5, trong khoảng pH này, hoạt tính loại bỏ sunphit của chúng cũng khá tốt, hàm lượng sunphit hầu như không còn lại trong môi trường nuôi. Trong đó, khả năng sinh trưởng cũng như hoạt tính loại bỏ sunphit tối ưu tại pH 7. Như vậy, chủng DL1 có khả năng sinh trưởng và có hoạt tính loại bỏ sunphit tốt trong khoảng pH khá rộng, thuận lợi cho sản xuất sinh khối của chúng ngoài tự nhiên cũng như ứng dụng chúng để xử lý các nguồn ô nhiễm.

Ví dụ 6: Ảnh hưởng của nồng độ muối đến khả năng sinh trưởng và xử lý sunphit của chủng DL1

Chủng DL1 được tiến hành đánh giá ảnh hưởng của nồng độ muối (NaCl) lên khả năng sinh trưởng và hoạt tính xử lý sunphit. Thí nghiệm được tiến hành nghiên cứu ở các nồng độ NaCl khác nhau từ 0-8%. Kết quả thu được trình bày trên Bảng 10.

Kết quả cho thấy, nồng độ muối trong môi trường nuôi có ảnh hưởng đến khả năng tích lũy sinh khối và hoạt tính loại bỏ sunphit của chủng DL1. Chủng này có khả năng sinh trưởng tốt nhất trong môi trường không chứa muối, khoảng nồng độ NaCl từ 1-3,5%, sinh trưởng của chủng này khá tốt. Hoạt tính loại bỏ sunphit của chủng DL1 tốt nhất khi bổ sung từ 0 - 2,5% nồng độ NaCl. Khi nồng độ muối NaCl cao hơn 3,5% khả năng sinh trưởng của chủng DL1 bắt đầu bị ức chế và sự ức chế này tăng dần theo sự gia tăng của độ muối kéo theo hoạt tính loại bỏ sunphit cũng giảm dần, do vậy lượng sunphit còn lại trong môi trường khá cao. Như vậy, chủng DL1 có thể ứng dụng để xử lý sunphit trong các thủy vực từ nước ngọt đến nước mặn.

Ví dụ 7: Ảnh hưởng của cường độ chiếu sáng đến khả năng sinh trưởng và xử lý sunphit của chủng DL1

Chủng DL1 được tiến hành đánh giá ảnh hưởng của cường độ chiếu sáng lên khả năng sinh trưởng và hoạt tính xử lý sunphit.

Thí nghiệm được tiến hành nghiên cứu ở các nồng độ NaCl khác nhau từ 0-8%. Kết quả thu được trình bày trên Bảng 11.

Kết quả cho thấy chủng DL1 có thể sinh trưởng tốt và có hoạt tính loại bỏ sunphit khá cao khi được chiếu sáng ở khoảng cường độ từ 1200 đến 6000 lux. Mức độ tích lũy sinh khối và hoạt tính loại bỏ sunphit của chủng này khá cao khi được chiếu sáng với cường độ khoảng 2400 - 6000 lux và tối ưu ở cường độ chiếu sáng 3600 lux. Như vậy, vi khuẩn tía quang hợp có nhu cầu được chiếu sáng để sinh trưởng quang hợp nhưng ở mức độ không cao (1200 - 6000 lux), khả năng sinh trưởng và hoạt tính của chúng vẫn thể hiện ngay cả khi được chiếu sáng với cường độ thấp. Khả năng này có thể do vi khuẩn tía quang hợp có khả năng thu nhận năng lượng ánh sáng cả trong vùng phổ không nhìn thấy (Syed and Henshaw, 2003). Do vậy, có thể ứng dụng chúng để xử lý sunphit ở những nơi có cường độ chiếu sáng thấp như ở đáy các ao nuôi trồng thủy sản, các hồ tù đọng, các hồ chứa nước thải.

*Ví dụ 8: Đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh cho tôm *Vibrio* sp.*

Chủng DL1 được sử dụng để khảo sát khả năng đối kháng với chủng vi khuẩn gây bệnh tôm *Vibrio* sp. bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch. Đĩa thử hoạt tính được chuẩn bị bằng cách cấy trải 100 μ l vi khuẩn gây bệnh *Vibrio* sp. mật độ 10^6 CFU/ml lên bề mặt đĩa petri có chứa môi trường DSMZ-27 đặc để khô và đục 4 giếng, đường kính khoảng 6 mm sao cho mỗi giếng cách nhau 2 -3 mm. Bổ sung 100 μ l dịch nuôi vi khuẩn tía quang hợp chủng DL1 mật độ 10^8 CFU/ml vào các giếng thạch trên đĩa petri và giữ các đĩa thí nghiệm ở điều kiện phòng có chiếu sáng trong 3h. Sau đó đặt các đĩa vào tủ ấm 37 °C trong 24 h. Đối chứng âm là môi trường DSMZ- 27 dịch không chứa vi khuẩn tía quang hợp chủng DL1. Kết quả thể hiện trên Fig 6. Kết quả cho thấy chủng DL1 có khả năng kháng lại vi khuẩn gây bệnh tôm *Vibrio* sp. có vòng kháng khuẩn bán kính là 15mm.

Ví dụ 9. Khả năng tích lũy Co-enzym Q10 của chủng DL1

Khả năng tích lũy Co-enzym Q10 của chủng DL1 được xác định như sau: nuôi cấy chủng DL1 trên môi trường DSMZ-27, sau 5 ngày nuôi cấy trong điều kiện kỵ khí, sáng, đem ly tâm loại dịch thu sinh khối tươi (ly tâm ở 8000 vòng/phút, 4°C trong 10 phút). Co-enzym Q10 được tiến hành chiết xuất theo phương pháp của Paterson và Buddie (1991). Trên sắc kí đồ của tấm sắc kí bản mỏng, dựa vào vị trí vạch và màu sắc của chất chuẩn Co-enzym Q10 có thể thấy hợp chất Co-enzym Q10 chứa trong dịch chiết vi khuẩn chủng DL1 đã được cô lập.

Để xác định hàm lượng Co-enzym Q10 có trong dịch chiết của chủng DL1, dịch chiết thô của chủng đã tiến hành định lượng Co-enzym Q10 bằng phương pháp sắc kí lỏng cao áp (HPLC). Kết quả phân tích định lượng hợp chất Co-enzym Q10 thô từ dịch chiết của chủng DL1 được thể

hiện trên sắc kí đồ Fig 8 và Fig.9. Dựa vào sự tương quan tuyến tính của diện tích phổ và nồng độ chất chuẩn Co-enzym Q10, hàm lượng Co-enzym Q10 có trong dịch chiết vi khuẩn tía quang hợp chủng DL1 là 63,394 mg/lít.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chúng vi khuẩn tía quang hợp *Rhodobacter* sp. DL1 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ mẫu bùn trong đáy ao nuôi cá tra chuẩn bị thu hoạch, trong đó chủng vi khuẩn này có trình tự gen 16S rARN với kích thước 1322bp và được đăng ký trên GenBank với mã số LC420054, và có các đặc tính sau:

có khả năng phân hủy các hợp chất hữu cơ trong nước thải sản xuất bún, nước thải sản xuất tinh bột, nước thải lò mổ, nước thải sau biogas, nước thải sinh hoạt sau 5 ngày nuôi cấy với hiệu suất phân hủy lần lượt là 97,1%; 96,3%; 93,5%; 93,7%; 90,0%;

có khả năng sinh trưởng và hoạt tính loại bỏ sunphit ở nồng độ 3 - 30mgS²⁻/lít với hiệu suất đạt 88% ở điều kiện nhiệt độ từ 14-40°C, độ pH từ 6,5-8,5, nồng độ muối NaCl từ 0-2,5%, cường độ chiếu sáng từ 1200 – 6000 lux;

có khả năng kháng lại vi khuẩn gây bệnh tôm *Vibrio* sp. với bán kính vòng ức chế vi khuẩn là 15mm; và

tích lũy Co-enzym Q10 với hàm lượng 63,394 mg/lít.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Viện Công nghệ sinh học

<120> Chủng vi khuẩn tía quang hợp *Rhodobacter* sp. DL1 thuần khiết về mặt sinh học có khả năng phân hủy các hợp chất hữu cơ, loại bỏ sunphit, kháng vi sinh vật gây bệnh ở tôm *Vibrio* sp. và tích lũy Co-enzym Q10

<160> 1

<210> 1

<211> 1322

<212> ADN

<213> *Rhodobacter* sp.

<400> 1

gagcgaagtc ttcggactta gcggcggacg ggtgagtaac gcgtgggaac atgccc aaag 60
gtacggaata gcccgggaa actgggagta ataccgtatg tgcccttcgg gggaaagatt 120
tatcgccctt ggattggccc gcgttgatt aggtagttgg tggggtaatg gcctaccaag 180
ccgacgatcc atagctggtt tgagaggatg atcagccaca ctgggactga gacacggccc 240
agactcatac gggaggcagc agtggggaat cttagacaat gggcgcaagc ctgatctagc 300
catgccgcgt gatcgatgaa ggccttaggg ttgtaaagat ctttcaggtg ggaagataat 360
gacggtacca ccagaagaag ccccggttaa ctccgtgccg gcagccgcgg taatacggag 420
ggggctagcg ttattcggaa ttactgggcg taaagcgcac gtaggcggac tggaaagtca 480
ggggtgaaat cccggggctc aaccccgga aatcccttga aactcccagt cttgaggtcg 540
agagaggtga gtggaattcc gagtgtagag gtgaaattcg tagatattcg gaggaacacc 600
agtggcgaag gcggctcact ggctcgatac tgacgctgag gtgcgaaagc gtggggagca 660
aacaggatta gataccctgg tagtccacgc cgtaaacgat gaatgccagt cgtcgggcag 720
catgctgttc ggtgacacac ctaacggatt aagcattccg cctggggagt acggccgcaa 780
ggttaaaact caaaggaatt gacggggggc cgcacaagcg gtggagcatg tggtttaatt 840

cgaagcaacg cgcagaacct taccaaccct tgacatggcg atcgcggttc cagagatggt 900
tccttcagtt cggctggatc gcacacaggt gctgcatggc tgtcgtcagc tcgtgtcgtg 960
agatgttcgg ttaagtccgg caacgagcgc aaccacgtc ctcaattgcc agcattcagt 1020
tgggcactct ggggaaactg ccggtgataa gccggaggaa ggtgtggatg acgtcaagtc 1080
ctcatggccc ttacgggttg ggctacacac gtgctacaat ggcagtgaca atgggttaat 1140
cccaaaaagc tgtctcagtt cggattgggg tctgcaactc gaccccatga agtcggaatc 1200
gctagtaatc gcgtaacagc atgacgcggt gaatacgttc ccgggccttg tacacaccgc 1260
ccgtcacacc atgggaattg gttctaccgc aaggcggcgc gccaacctcg caagaggagg 1320
ca 1322

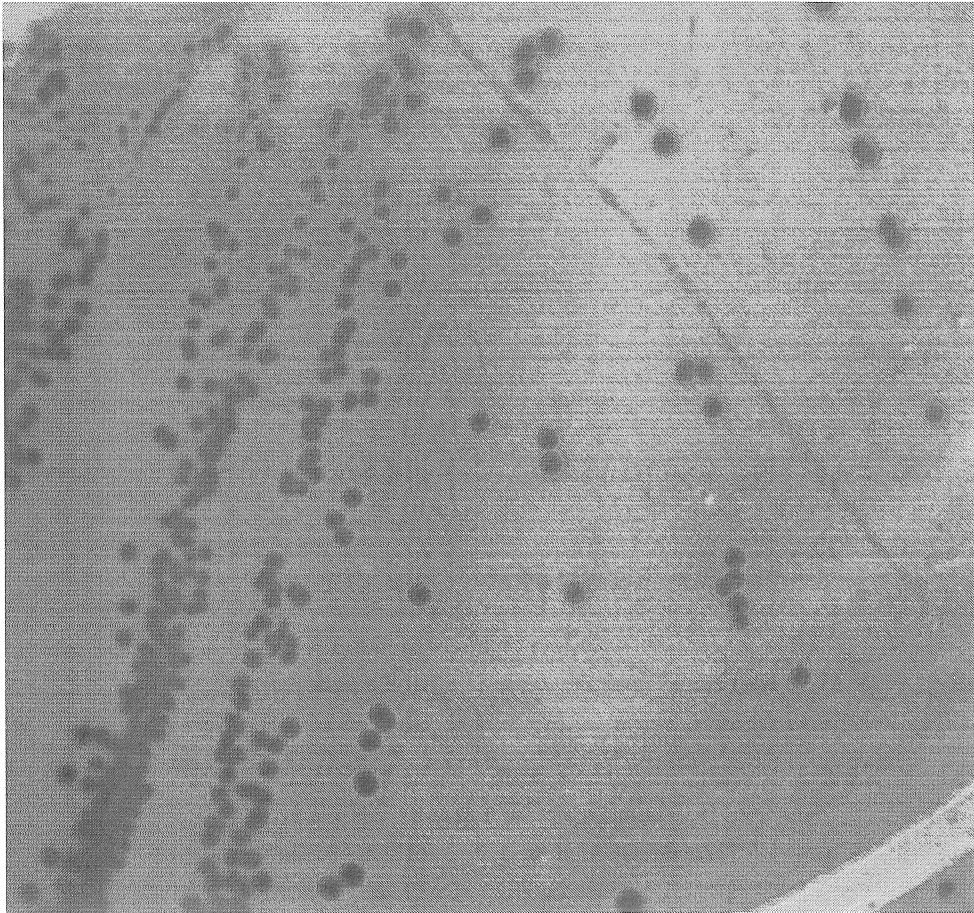


Fig. 1

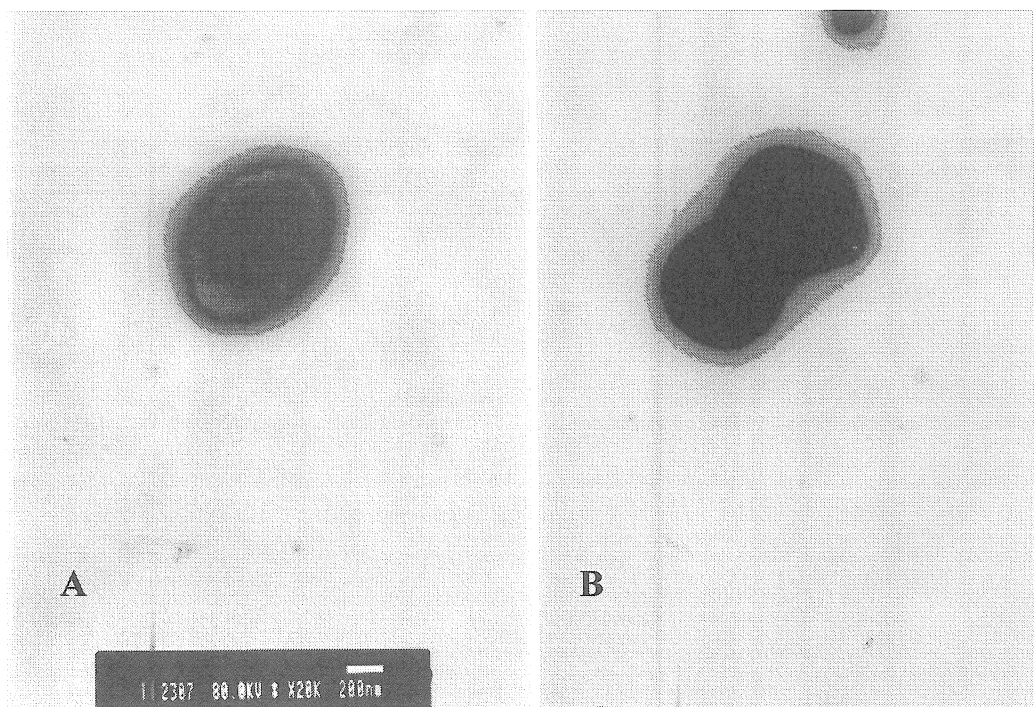


Fig. 2

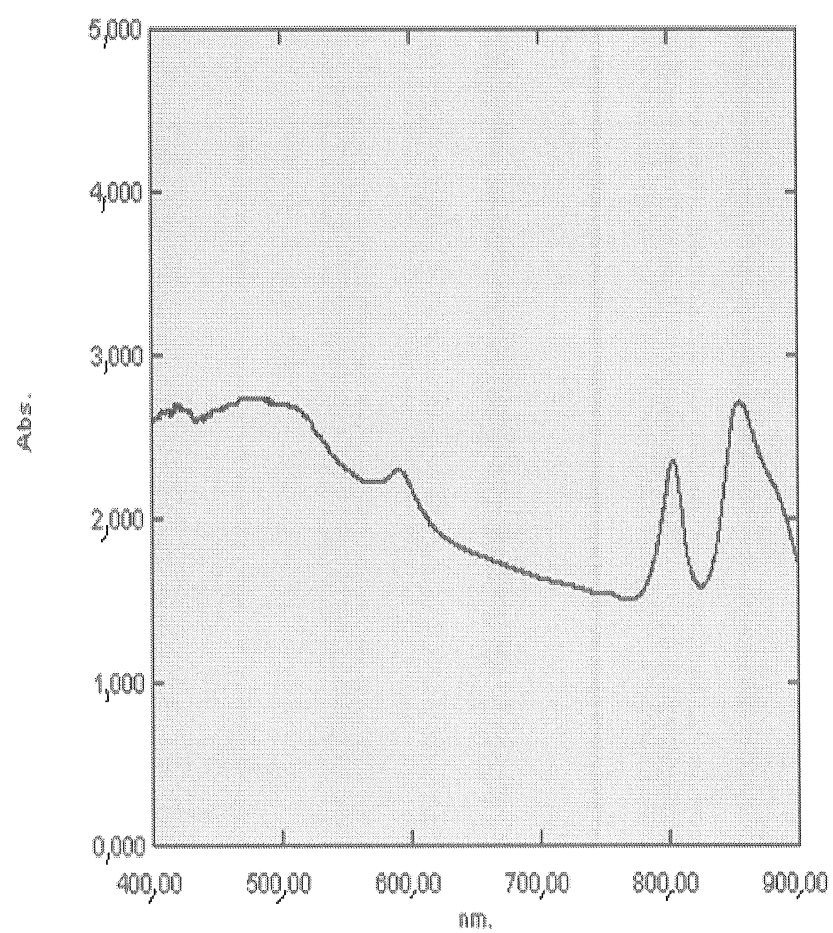


Fig 3

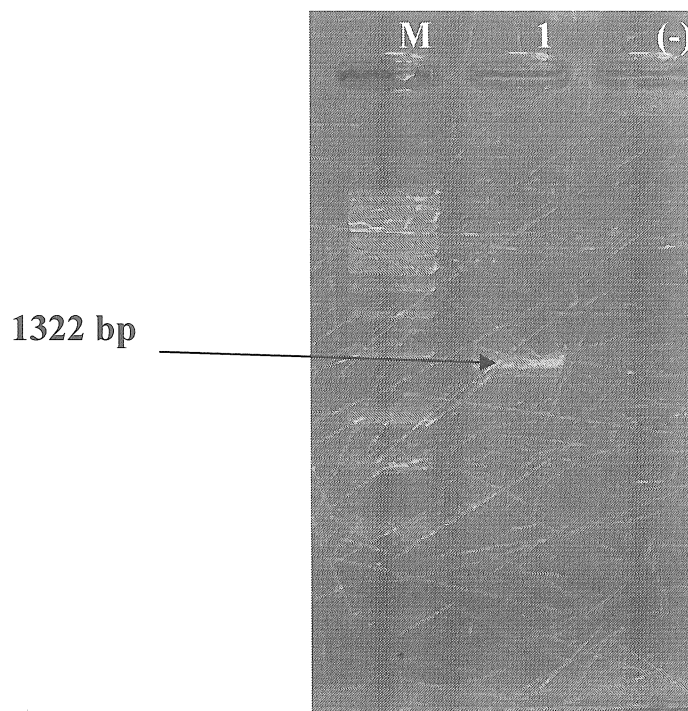


Fig. 4

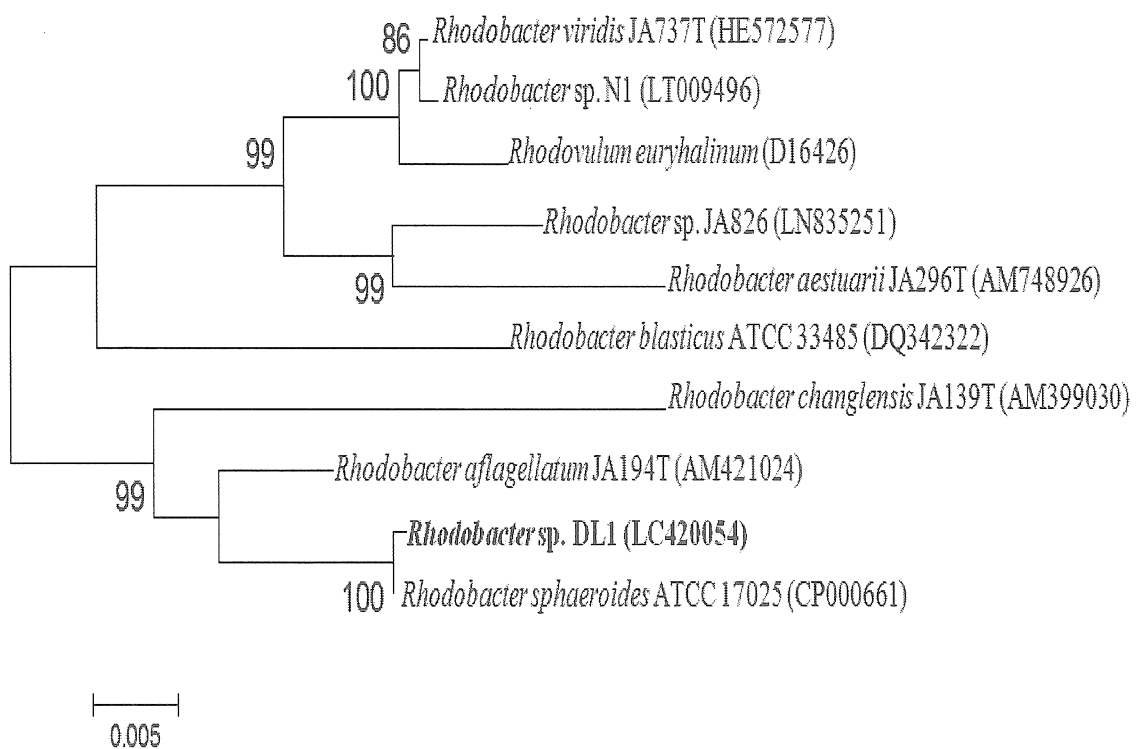


Fig. 5

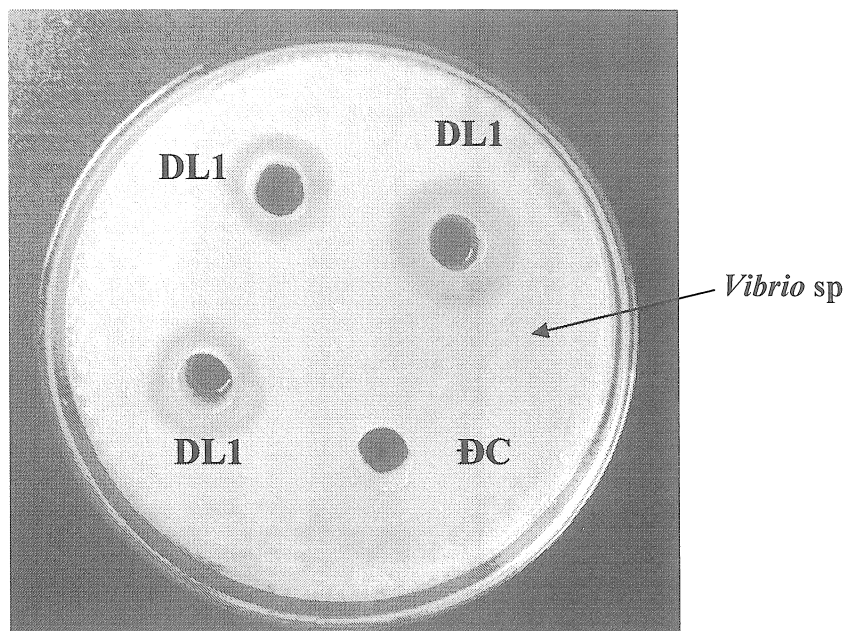


Fig 6

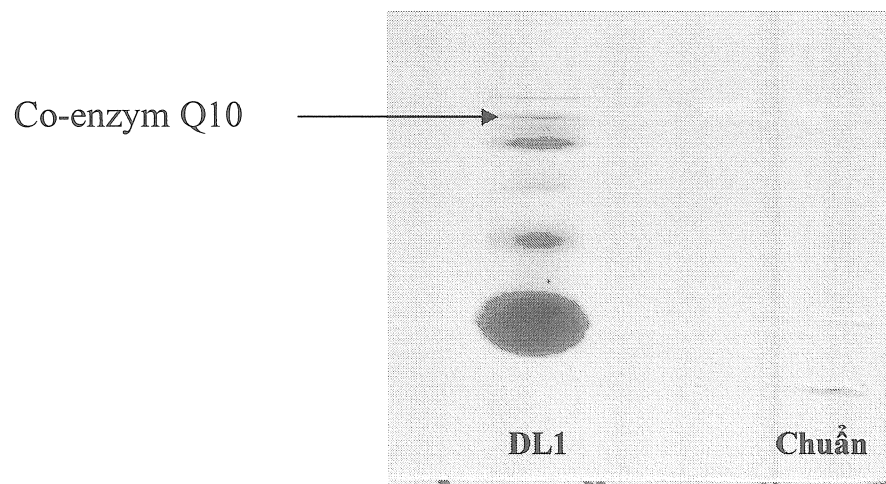


Fig. 7

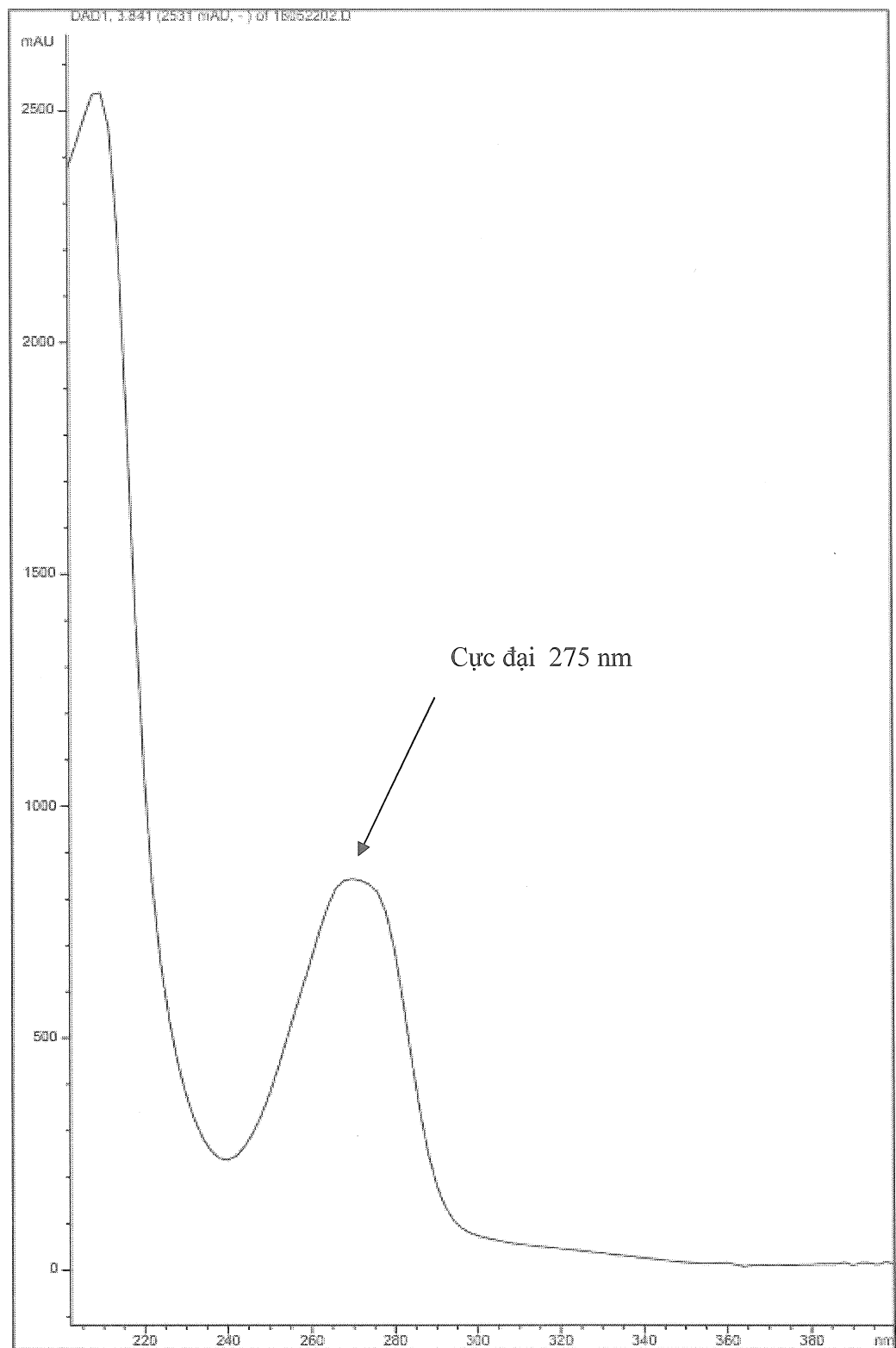


Fig. 8

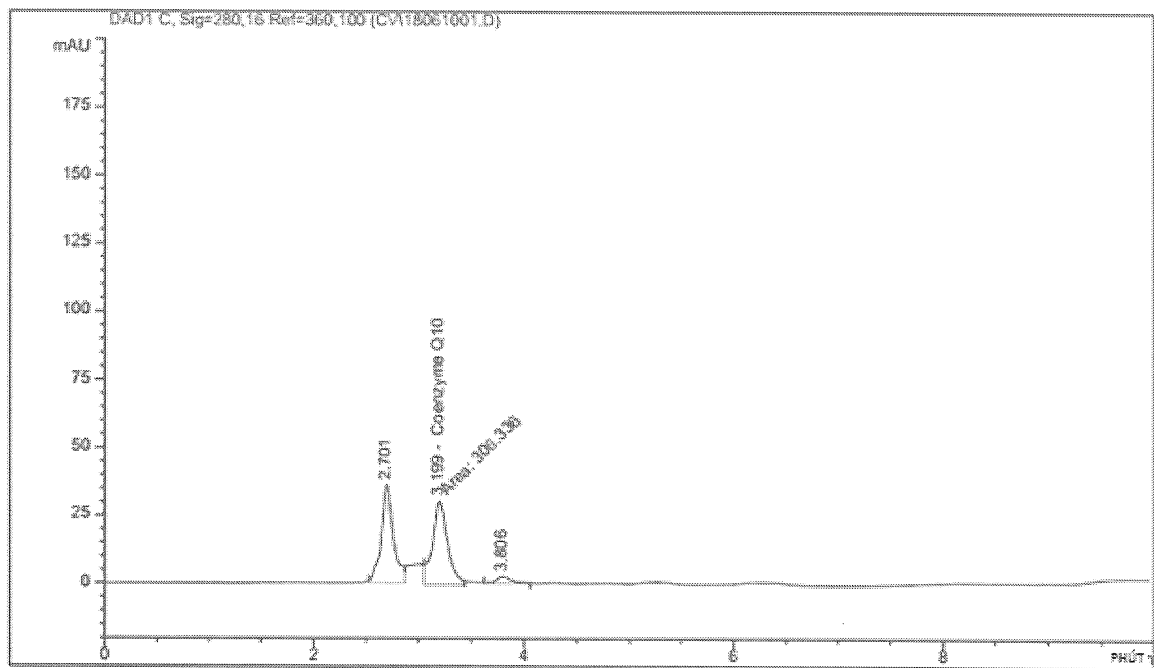


Fig. 9