



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

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

(11)



2-0003887

(51) **C12N 1/00**
2022.01

(13) **Y**

(21) 2-2023-00712

(22) 18/10/2021

(67) 1-2021-06524

(45) 27/01/2025 442

(43) 27/12/2021 405

(73) Sở Khoa học và Công nghệ thành phố Hồ Chí Minh (VN)

244 Điện Biên Phủ, phường Võ Thị Sáu, quận 3, thành phố Hồ Chí Minh

(72) Ngô Đức Duy (VN).

(54) **CHỦNG VI KHUẨN QUANG DƯỠNG RHODOBACTER SPHAEROIDES CG3.1
THUẦN KHIẾT VỀ MẶT SINH HỌC CÓ KHẢ NĂNG LÀM GIẢM MẶN**

(21) 2-2023-00712

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng vi khuẩn quang dưỡng *Rhodobacter sphaeroides* CG3.1 thuần khiết về mặt sinh học có khả năng làm giảm mặn vào ngày nuôi cấy thứ 3-4 trong môi trường GM ở nhiệt độ 29°C, độ pH 7, cường độ ánh sáng 2900lux, trong đó chủng này mang trình tự vùng gen 16S rADN được nêu trong SEQ ID NO: 1.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng vi khuẩn *Rhodobacter sphaeroides* CG3.1 thuần khiết về mặt sinh học, có khả năng giảm mặn (hấp thu Natri clorua).

Tình trạng kỹ thuật Giải pháp hữu ích

Trong những năm gần đây hiện tượng xâm nhiễm mặn trong đất nông nghiệp do biến đổi khí hậu ngày càng tăng. Những công bố khoa học liên quan tới giảm mặn trong 10 năm gần đây bao gồm: công bố của Minas. K. và cộng sự (2015) chỉ ra tảo lam *Cyanobacteria* (vi khuẩn lam) là nhóm quang hợp có thể phát triển với yêu cầu dinh dưỡng tối thiểu trong điều kiện dưới ánh sáng mặt trời tự nhiên; và một nghiên cứu rộng được kết hợp của các trường Đại học Anh được thành lập để kiểm tra nguyên lý sử dụng *Cyanobacteria* làm chất trao đổi ion, để loại bỏ đặc hiệu Na^+ và Cl^- khỏi nước biển bao gồm chủng nước ngọt (*Synechocystis* sp. Strain PCC 6803) và chủng nguồn gốc biển (*Synechococcus* sp. Strain PCC 7002) do các trường Đại học Robert Gordon, Aberdeen, Đại học Sheffield, Đại học Newcastle. Tuy nhiên, nhược điểm lớn của nhóm tảo lam *Cyanobacteria* là nguyên nhân chính của hiện tượng nở hoa rộng lớn cả trong nước ngọt và nước mặn. Vì vậy, việc ứng dụng khả năng giảm nhiễm mặn của nhóm tảo này vào thực tiễn cũng đang là vấn đề cần cân nhắc.

Cơ chế liên quan tới quá trình hấp thu độ mặn hay còn gọi là hấp thu Na^+ ở vi sinh vật đơn bào như vi khuẩn, áp lực thẩm thấu cần được kiểm soát khi sống trong điều kiện nước mặn. Do đó, các cơ chế tự nhiên có liên quan nhất trong vi khuẩn ưa muối (halophilic) là quá trình điều hòa giữa các kênh Na^+ và K^+ điều tiết thích nghi chuyên biệt với những thay đổi về độ mặn môi trường đã được nghiên cứu nhiều nhất là chủng *Halobacillus halophilus*, với các kết quả nghiên cứu của Bamberg. E và cộng sự (1984), Duschl. A và cộng sự (1986), Dohrmann. A. B (1999) và Kolbe. M và cộng sự (2000) đưa ra những thông tin về kênh ion Cl^- trên hệ thống màng sinh học và khả năng tích tụ Cl^- nhờ ánh sáng mặt trời kích hoạt làm bơm ion âm Cl^- trên

màng tế bào mở ra và ion Cl^- đi vào trong tế bào chất, từ đó dẫn đến sự chênh lệch điện thế bên trong và ngoài màng tế bào, trong màng mang nhiều điện tích âm hơn và ngoài màng mang nhiều điện tích dương hơn. Khi điện thế màng chênh lệch trong âm hơn thì lúc này kênh ion Na^+ sẽ mở ra làm cho quá trình vận chuyển Na^+ cũng từ ngoài vào trong màng để cân bằng điện thế màng, sự di chuyển và tích tụ Na^+ trong tế bào chất sẽ làm giảm Na^+ ngoài màng dẫn đến muối sẽ giảm trong dung dịch, việc giữ Na^+ trong màng không cho ra khỏi tế bào để quay lại môi trường sẽ được ngăn chặn thông qua sự ức chế sản sinh ATP từ quang hợp. Tương tự như giải thích hệ thống bơm Cl^- của tác giả Jaime M. Amezaga và cs (2014) về tảo lam *Cyanobacteria*.

Gần đây nhất, nghiên cứu tập trung về nhóm vi khuẩn quang dưỡng có khả năng loại bỏ muối là công bố của Kei Sasaki và cộng sự (2017) về việc ứng dụng vi khuẩn quang dưỡng hấp thu độ mặn, kết quả đạt được từ nghiên cứu này là việc loại bỏ natri (Na) từ nước biển bằng cách sử dụng hai chủng vi khuẩn quang hợp *Rhodobacter sphaeroides* SSI và *Rhodovulum* sp. đều phát triển tốt trong môi trường GM (Glutamate-Malate) bổ sung 3% NaCl. Trong đó chủng *Rhodobacter sphaeroides* SSI được chứng minh là tăng trưởng tốt, khả năng loại bỏ Na tối đa là 39,3% trong điều kiện có ánh sáng và 36,7% trong điều kiện tối. Còn chủng *Rhodovulum* sp. được chứng minh là phát triển tốt có tỷ lệ loại bỏ Na tối đa là 64,9% bởi *Rhodovulum* sp. cả hai điều kiện sáng và tối sau hai ngày nuôi cấy. Tuy nhiên, vấn đề lớn xảy ra là sau khoảng 2 đến 3 ngày nuôi cấy tiếp theo thì hiện tượng Na quay trở lại môi trường do quá trình chuyển điện tử và trao đổi chất. Còn trong môi trường bổ sung dinh dưỡng khác là môi trường NSSW (Nutrient Supplemented SeaWater) có 5,0g/l glucoza và 2,0g/l pepton thí nghiệm trong 8 ngày cho thấy rằng: giai đoạn 4 ngày đầu thì cho thấy chủng *Rhodobacter sphaeroides* SSI loại bỏ tới 30,3% Na sau 4 ngày nuôi cấy trong điều kiện có ánh sáng và *Rhodovulum* sp. lên tới 48,9%, trong cả hai trường hợp này hầu như Na được hấp thụ hoàn toàn mà không có trường hợp trả lại môi trường và kết quả tương tự đã được quan sát dưới các điều kiện tối. Trong trường hợp hai giai đoạn nuôi cấy được tiến hành đầu tiên là chủng *Rhodovulum* sp. và sau đó thay thế chủng làm cho kết quả nồng độ Na còn lại giảm thêm xuống 0,79g/L sau 8 ngày nuôi cấy dưới điều kiện không ánh sáng.

Cho đến nay chưa có nghiên cứu trong nước được tiến hành về việc phân lập và tuyển chọn các vi sinh vật bản địa có hoạt tính hấp thu NaCl nhằm giảm mặn thích hợp với các điều kiện xâm nhiễm mặn trong nước đất nông nghiệp trong nước và đồng thời có khả năng ứng dụng. Do vậy, việc cần thiết là phân lập, chọn lọc chủng vi khuẩn quang dưỡng có khả năng làm giảm mặn và thử nghiệm ứng dụng trong nông nghiệp nhằm góp phần vào định hướng phát triển sản xuất nông nghiệp bền vững hơn và chủ động ứng phó giải quyết được một phần nào bài toán xâm nhiễm mặn do biến đổi khí hậu ngày càng khốc liệt ở đồng bằng sông Cửu Long nói riêng và Việt Nam nói chung.

Bảng chất kỹ thuật Giải pháp hữu ích

Mục đích của Giải pháp hữu ích là đề xuất giải pháp để giải quyết vấn đề nêu trên. Để đạt được mục đích đó, Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng vi khuẩn quang dưỡng *Rhodobacter sphaeroides* CG3.1 thuần khiết về mặt sinh học, có khả năng giảm mặn. Chủng *Rhodobacter sphaeroides* CG3.1 khả năng hấp thu NaCl đạt 35,5% trong 3-4 ngày nuôi cấy ở nhiệt độ 29⁰C, cường độ ánh sáng 2900lux, độ pH 7 ở nồng độ NaCl 25‰. Có khả năng chịu mặn và hấp thu mặn, góp phần vào định hướng phát triển sản xuất nông nghiệp bền vững hơn và chủ động ứng phó giải quyết được một phần nào bài toán xâm nhiễm mặn do biến đổi khí hậu ngày càng khốc liệt ở đồng bằng sông Cửu Long nói riêng và Việt Nam nói chung. Trong đó, chủng này mang trình tự vùng gen 16S rADN được nêu trong SEQ ID NO: 1.

Chủng *Rhodobacter sphaeroides* CG3.1 được lưu giữ tại Phòng Vi sinh, Viện Sinh học Nhiệt đới với số hiệu lưu giữ là CG3.1.

Các dấu hiệu và các đặc điểm nổi bật của Giải pháp hữu ích sẽ được hiểu đầy đủ và được đánh giá đúng từ phần mô tả chi tiết sau đây dựa trên các hình vẽ kèm theo.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 là hình ảnh thể hiện chủng *Rhodobacter sphaeroides* CG3.1 được nuôi cấy sau 5 ngày.

Fig. 2 là hình ảnh thể hiện khuẩn lạc của chủng *Rhodobacter sphaeroides* CG3.1.

Fig. 3 là hình ảnh thể hiện ảnh nhuộm gram và nhuộm bào tử của chủng *Rhodobacter sphaeroides* CG3.1.

Fig. 4 là hình ảnh thể hiện kết quả bảo quản chủng *Rhodobacter sphaeroides* CG3.1.

Fig. 5 là hình ảnh thể hiện kết quả điện di kiểm tra đoạn gen 16S rADN của chủng *Rhodobacter sphaeroides* CG3.1.

Fig. 6 là sơ đồ thể hiện đường cong tăng trưởng *Rhodobacter sphaeroides* CG3.1

Fig. 7 là sơ đồ thể hiện thời gian hấp thu của chủng *Rhodobacter sphaeroides* CG3.1

Fig. 8 là sơ đồ thể hiện kết quả khảo sát đơn yếu chủng *Rhodobacter sphaeroides* CG3.1

Fig. 9 là sơ đồ thể hiện kết quả tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng tới khả năng hấp thu mặn của chủng *Rhodobacter sphaeroides* CG3.1

Mô tả chi tiết Giải pháp hữu ích

Theo Giải pháp hữu ích, các môi trường dinh dưỡng được sử dụng bao gồm:

1. Môi trường BIM (môi trường phân lập và giữ chủng): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1g/L), NaCl (2g/L), K_2HPO_4 (0,5g/L); NaHCO_3 (5g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2g/L); nấm men (1,5g/L), glyxerol (1,5ml/L), nước cất vừa đủ 1000 ml, độ pH 6,5; hấp tiệt trùng ở nhiệt độ 121°C trong thời gian 30 phút.

2. Môi trường GM (môi trường kích thích khả năng hấp thu mặn tối ưu): natri-L glutamat 3,8g, axit DL-Malic 2,7g, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,8g, nấm men 1,0g, KH_2PO_4 0,5g, K_2HPO_4 0,5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,2g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,05g, Thiamin-HCl 1×10^{-3} , axit Nicotinic 1×10^{-3} , Biotin 0.01×10^{-3} , độ pH 7,0, nước cất vừa đủ 1000 ml hấp tiệt trùng ở nhiệt độ 121°C trong thời gian 15 phút.

Theo một phương án, Giải pháp hữu ích đề xuất chủng thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ các mẫu bùn, nước nhiễm mặn từ huyện Cần Giờ. Quy trình phân lập được tiến hành như sau:

a) Phân lập và định danh chủng *Rhodobacter sphaeroides* CG3.1.

Tiến hành phân lập chủng vi khuẩn từ mẫu bùn, nước bằng cách nuôi cấy trên đĩa chứa môi trường dinh dưỡng để tạo khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn có trong mẫu, từ đó thu được các chủng vi khuẩn thuần khiết. Môi trường dùng trong quá trình phân lập được đề cập ở đây là môi trường BIM. Sau thời gian nuôi cấy 5-7 ngày, quan sát thấy có sự xuất hiện của các khuẩn lạc riêng rẽ có đặc điểm hình thái nhô cao, có dạng hình tròn, mép nhẵn hoặc gồ ghề, bề mặt khô màu đỏ từ tâm ra ngoài, thể hiện trên Fig.2 và được đặt tên là CG3.1. Trong số các khuẩn lạc đó, lựa chọn một khuẩn lạc đặc trưng nhất, cấy vào ống thạch nghiêng BIM để lưu chủng cho phân định danh và các thử nghiệm tiếp theo.

b) Quan sát hình thái và tế bào

Cấy chuyển chủng CG3.1 vào các đĩa petri chứa môi trường BIM, sau khi phát triển ổn định, tiến hành nhuộm gram và nhuộm bào tử, mẫu được chụp soi dưới kính hiển vi, cho thấy hình ảnh hình thái học tế bào như được thể hiện ở Fig.3, đây là vi khuẩn gram dương, có sinh bào tử.

c) Định danh bằng phương pháp sinh học phân tử

Thực hiện phân tích 16S rADN, trình tự gen 16S rADN của chủng CG3.1 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO: 1 được đối chiếu kết quả phân tích 16S rADN trên Ngân hàng dữ liệu gen của Trung tâm thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia Hoa Kỳ (National Center for Biotechnology Information – NCBI) cho thấy trình tự gen 16S rADN của chủng CG3.1 tương đồng 99,18% với trình tự gen 16S rADN của chủng *Rhodobacter sphaeroides*. Kết quả trên thể hiện rằng chủng CG3.1 phân lập được từ mẫu bùn, nước ở huyện Cần Giờ thuộc loài *R. sphaeroides*.

Chủng *R. sphaeroides* CG3.1 được lưu giữ tại Phòng Vi sinh, Viện Sinh học Nhiệt đới với số hiệu lưu giữ là CG3.1. Chủng CG3.1 được lưu trữ dưới hai dạng, chủng đông khô (-20°C) và lưu trữ trong dung dịch glyxerol (-80°C).

c) Thử nghiệm khảo sát khả năng chịu mặn

Chủng CG3.1 sẽ được khảo sát khả năng chịu mặn. Sử dụng môi trường BIM cho thí nghiệm khảo sát khả năng chịu mặn. Kết quả dương tính xuất hiện khi mật độ vi khuẩn trong môi trường BIM ngày càng tăng thông qua kỹ thuật đo mật độ tế bào bằng phương pháp đo độ đục. Kết quả, mật độ tế bào của chủng CG3.1 tăng theo thời gian và đạt mức cực đại ở ngày nuôi cấy thứ 5. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực vi sinh vật sẽ có thể dễ dàng thực hiện các thao tác trên.

c) Khả năng hấp thu mặn của chủng CG3.1

Khả năng hấp thu mặn của chủng CG3.1 được đánh giá bằng cách đo lượng muối còn sót lại trong môi trường nuôi cấy. Kết quả thể hiện sự khác biệt rõ rệt giữa mẫu với mẫu đối chứng. Kết quả lượng tủa thu được sau 15 ngày nuôi cấy chủng CG3.1 trong môi trường lỏng GM, ở 29°C , độ pH 7,0, cường độ ánh sáng 2900lux là 35,5% ở nồng độ NaCl 25‰ trong khoảng ngày thứ 3-4.

Ví dụ thực hiện Giải pháp hữu ích

Sau đây, Giải pháp hữu ích sẽ được minh họa chi tiết hơn qua các ví dụ thực hiện cụ thể dưới đây. Tuy nhiên, Giải pháp hữu ích không bị giới hạn ở các ví dụ này, mà phạm vi bảo hộ của Giải pháp hữu ích sẽ được xác định dựa trên các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Ví dụ 1: Phân lập và định danh chủng CG3.1

1. Phân lập

Mẫu được thu thập tại địa bàn huyện Cần Giờ, Việt Nam. Các mẫu bùn, nước sẽ được kiểm tra các thông số cơ bản như độ mặn, nhiệt độ, độ pH, λ , ρ .

Sau đó, lấy 10g mỗi mẫu cho vào 100ml dung dịch môi trường BIM lỏng đã được hấp khử trùng. Nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C trong 5-7 ngày (Fig.1). Mẫu sau khi

tăng sinh được pha loãng đến các nồng độ 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} . Vi khuẩn được phân lập bằng phương pháp cấy trải trên các đĩa petri chứa môi trường BIM agar. Các đĩa petri sau đó được ủ ở 30°C trong 5-7 ngày. Khuẩn lạc đơn có hình thái đặc trưng hình thái nhô cao, có dạng hình tròn, mép nhẵn hoặc gồ ghề, bề mặt khô màu đỏ bắt nguồn từ tâm ở các đĩa phân lập được chọn để làm thuần bằng cách cấy ria tiếp trên môi trường thạch BIM (Fig.2). Tiếp tục cấy chuyển nhiều lần để thu được dòng thuần có một dạng khuẩn lạc đồng nhất. Chọn khuẩn lạc riêng lẻ của chủng CG3.1 cấy vào các ống thạch nghiêng chứa môi trường thạch BIM và ủ ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 36 giờ để vi sinh vật phát triển, sau đó chuyển vào tủ lạnh để bảo quản và lưu chủng cho phân định danh và sử dụng.

2. Định danh

Từ chủng CG3.1 phân lập được ở trên, thực hiện tách chiết ADN và thực hiện nhân gen sử dụng phương pháp PCR (Polymerase Chain Reaction) theo hướng dẫn của nhà sản xuất cặp mồi 27F/1492R được thiết kế dựa vào trình tự có tính bảo tồn cao của gen 16S ở vi sinh vật nhân điển hình.

Cặp mồi: 27F: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'

1492R: 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'

Sản phẩm thu được sau phản ứng này là các đoạn ADN đơn được duỗi ra. Sản phẩm PCR được phân tích trên gel agarosa 1% trong dung dịch đệm Tris-Axetic-EDTA (TAE) ở 90V trong 40 phút, đọc kết quả dưới đèn UV. Kết quả xác định được trình tự có kích thước 1500bp, thể hiện rõ ở (Fig.5). Tiến hành tinh sạch mẫu thu được bằng bộ kit QIAGEN kit (www.qiagen.com) theo chỉ dẫn của nhà sản xuất và kiểm tra độ tinh sạch của mẫu trên máy quang phổ khả biến ở các bước sóng 260nm và 280nm cho tỷ lệ tinh sạch là $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} > 1,7$. Từ đó, xác nhận sản phẩm PCR đã đạt độ tinh sạch như yêu cầu. Trình tự của gen 16S rADN của chủng CG3.1 được gửi đi giải trình tự. Sau khi giải trình tự, trình tự gen được xử lý cắt bỏ vùng bị nhiễu tín hiệu ở 2 đầu đoạn gen bằng phần mềm Bioedit, thu được trình tự (có kích thước 1094bp) như nêu trong SEQ ID NO: 1. Các trình tự nucleotit hoàn chỉnh được so sánh với ngân hàng dữ liệu gen của NCBI bằng công cụ BLAST. So sánh kết quả trình tự cho thấy,

trình tự gen 16S rADN của chủng CG3.1 tương đồng 99,18% với trình tự gen 16S rARN của các chủng *Rhodobacter sphaeroides*.

Ví dụ 2: Quan sát hình thái và tế bào

Cấy chuyển chủng CG3.1 vào các đĩa petri chứa môi trường BIM agar, sau khi phát triển ổn định, tiến hành nhuộm gram và nhuộm bào tử, mẫu được chụp soi dưới kính hiển vi. Vi khuẩn được kiểm tra bằng phương pháp nhuộm Gram với tím kết tinh (Crystal violet) và Safranin. Đầu tiên, dùng que cấy vô trùng lấy mẫu vi sinh vật đã được nuôi cấy trên môi trường thạch hòa tan vào một giọt nước cất được nhỏ sẵn trên phiến kính. Cố định mẫu trên phiến kính: hơi mẫu đã khô trên ngọn lửa đèn cồn 3 lần để cố định mẫu và làm mẫu dễ bắt màu hơn. Nhuộm bằng tím kết tinh trong 30 giây đến 1 phút, rửa lại bằng nước cất, thấm khô. Nhuộm lại bằng dung dịch Iot trong 1 phút, rửa nước cất, thấm khô. Nhỏ dịch tẩy màu (alcohol 90%), giữ cho đến mất màu (khoảng 30 giây), rửa lại bằng nước cất, thấm khô. Nhuộm lại bằng Safranin trong 30 giây đến 1 phút, rửa nước, để khô. Nhỏ dầu soi kính và quan sát ở vật kính 100X. Tiếp đến, chủng CG3.1 sẽ được kiểm tra bào tử. Làm vết bôi và cố định tế bào tương tự như đối với nhuộm Gram. Nhuộm bằng dung dịch Lục Malachite trong 10 phút, rửa lại với nước. Nhuộm lại bằng dung dịch Safranin trong 30 giây, rửa nước và thấm khô. Quan sát: bằng kính hiển vi quang học, dùng vật kính dầu 100X.

Ví dụ 3: Thử nghiệm khả năng chịu mặn

Xác định khả năng chịu mặn của các chủng vi khuẩn qua sàng lọc sơ trong môi trường lỏng GM có nồng độ NaCl từ 10; 15; 20; 25; 30 và 35‰ trong điều kiện ánh sáng trong vòng 7 ngày.

Nuôi cấy các chủng vi khuẩn đã sàng lọc sơ bộ trong môi trường GM ở nồng độ NaCl 5; 10; 15; 20; 25; 30; 35‰, đặt nơi có ánh sáng.

Khả năng tích lũy sinh khối của các chủng vi khuẩn được xác định bằng phương pháp đo độ hấp thụ trong 7 ngày nuôi cấy liên tiếp. Từ các ống nghiệm nuôi cấy, hút ra 200µl dịch bơm vào các giếng nuôi cấy trên đĩa 96 giếng, tiến hành đo OD_{630nm} và xác định quá trình tăng trưởng của các chủng.

Khả năng chịu mặn được xác định thông qua mật độ tế bào. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực vi sinh vật sẽ có thể dễ dàng thực hiện các thao tác trên.

Ví dụ 4: sản xuất giống gốc CG3.1

Trong sản xuất vi sinh, giống thường được dự trữ với số lượng lớn giống gốc đủ để đảm bảo đủ dùng trong vài năm, không cần phải cấy chuyển và biến đổi di truyền. Do đó, việc chuẩn bị giống tốt là điều kiện tiên quyết cho quá trình sản xuất. Cấy chuyển mẫu giống CG3.1 được lưu giữ từ ví dụ 1 trong đĩa thạch BIM và ủ ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 36 giờ, quan sát thấy sự xuất hiện của các khuẩn lạc như được mô tả ở trên. Lấy một khuẩn lạc riêng rẽ, đặc trưng của chủng CG3.1 mới mọc để cấy lên thạch nghiêng BIM và ủ ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 36 giờ để tế bào phát triển tốt, ổn định. Tiến hành làm tiêu bản và nhuộm Gram để kiểm tra độ tinh khiết của ống giống thạch nghiêng. Dùng pipet chuyển 4ml nước muối sinh lý đã tiệt trùng vào ống thạch nghiêng đã kiểm tra là tinh khiết, cho vi khuẩn hòa lên để tạo dịch huyền phù tế bào. Cấy 2ml dịch tế bào vào bình nuôi cấy (bình Roux) chứa môi trường tạo bào tử BIM, ủ ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 3 ngày để chủng CG3.1 phát triển tốt và tạo bào tử. Dùng pipet thêm 10ml nước muối sinh lý đã tiệt trùng vào bình và cho vi khuẩn hòa lên để tạo dịch bào tử. Thu dịch bào tử thu được, kiểm tra độ tinh khiết của dịch bào tử bằng cách làm tiêu bản và nhuộm Gram. Sau khi xác nhận được dịch bào tử là tinh khiết, bổ sung môi trường đông khô skim milk 5% với thể tích tương đương, trộn đều để thu được dịch huyền phù đồng nhất. Dùng pipet vô trùng nhỏ dịch huyền phù vào từng lọ đông khô (lọ ampul) trong điều kiện vô trùng, lắp vào hệ thống đông khô để tiến hành đông khô mẫu trong thời gian từ 24 - 30 giờ, hàn đóng ống đông khô trong chân không của các ống bằng đèn cực tím, loại bỏ các ống không đạt và bảo quản ống đông khô đạt tiêu chuẩn ở nhiệt độ -80°C trong tủ âm (Fig.4).

Ví dụ 5: Khả năng hấp thu mặn của chủng CG3.1

Chủng *CG3.1* được hoạt hóa tăng sinh trong môi trường BIM đã được hấp khử trùng ở 121°C trong 30 phút. Tiếp tục nuôi cấy các chủng vi khuẩn trong môi trường BIM lỏng, đặt nơi có ánh sáng trong 48 giờ. Hút 10 ml dịch nuôi cấy, ly tâm 8.000 vòng/phút trong 15 phút và loại bỏ dịch nổi.

Tiến hành rửa tế bào vi khuẩn 2 lần bằng dung dịch pepton 0,1%, cho lượng tế bào khô này vào trong 50ml môi trường nước có nồng độ NaCl 25%. Ủ tế bào ở 30°C và lắc với tốc độ 100 vòng/phút trong 30 phút với cường độ ánh sáng thích hợp. Ly tâm 8.000 vòng/phút trong 15 phút, thu dịch nổi để kiểm tra nồng độ muối còn sót lại bằng dụng cụ và đối chứng với nồng độ muối ban đầu.

Hiệu quả đạt được của Giải pháp hữu ích

Chủng *Rhodobacter sphaeroides* CG3.1 có khả năng làm giảm mặn vào ngày nuôi cấy thứ 3-4 trong môi trường GM ở nhiệt độ 29 °C, độ pH 7, cường độ ánh sáng 2900lux. Chủng này cho thấy có tiềm năng ứng dụng trong sản xuất nông nghiệp, góp phần vào định hướng phát triển sản xuất nông nghiệp bền vững hơn và chủ động ứng phó giải quyết được một phần nào bài toán xâm nhiễm mặn do biến đổi khí hậu ngày càng khốc liệt ở đồng bằng sông Cửu Long nói riêng và Việt Nam nói chung.

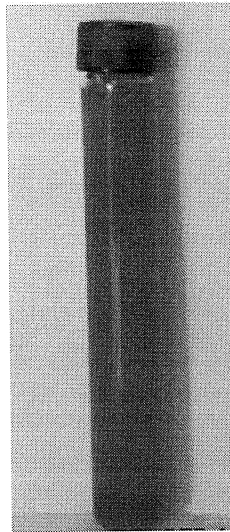
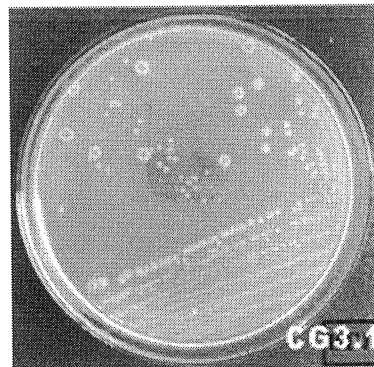
TÀI LIỆU THAM KHẢO

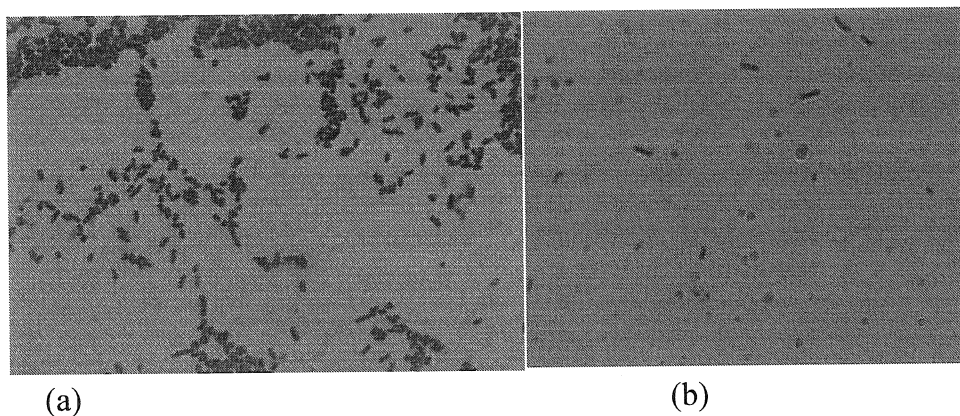
- [1] Dionisio-Sese M.L and S. Tobita (2000). *Effects of salinity on sodium content and photosynthetic responses of rice seedlings differing in salt tolerance*. Journal of Plant Physiology, 157(1), 54-58.
- [2] El-Dessouky H.T and H.M. Ettouney (2002). *Fundamentals of salt water desalination*, Elsevier.
- [3] Ellis R.A; C.C.GOERTEMILLER and D.L.STETSON (1977). *Significance of extensive 'leaky' cell junctions in the avian salt gland*, Nature, 268(5620), 555.
- [4] Federman Josef (2014). *Israel Solves Water Woes with Desalination*, Yahoo! News.
- [5] Flowers T.J and T.D.Colmer (2015). *Plant salt tolerance: adaptations in halophytes*, Annals of botany, 115(3), 327-331.
- [6] Frank J.A (2008). *Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes*, Appl Environ, Microbiol, 74(8), 2461-2470.
- [7] Hall J.E (2015). *Guyton and Hall textbook of medical physiology e-Book*, Elsevier Health Sciences.
- [8] Hildebrandt J.P (2001). *Coping with excess salt: adaptive functions of extrarenal osmoregulatory organs in vertebrates*, Zoology, 104 (3-4), 209-220.
- [9] Hunter C.N (2008). *The purple phototrophic bacteria*, Springer Science, Business Media.
- [10] Jay Z.J and W.P. Inskeep (2015). *The distribution, diversity, and importance of 16S rRNA gene introns in the order Thermoproteales*, Biology direct, 10(1), 35.
- [11] Kantha Thanawan; D.Kantachote and N.Klongdee (2015). *Potential of biofertilizers from selected Rhodopseudomonas palustris strains to assist rice*

- (*Oryza sativa* L. subsp. indica) growth under salt stress and to reduce greenhouse gas emissions, *Annals of microbiology*, 65, 2109-2118.
- [12] Khoo T.C (2009). *Singapore water: yesterday, today and tomorrow*. in *Book*, Springer, 237-250.
- [13] Kim Kiwong (2016). *Novel water filtration of saline water in the outermost layer of mangrove roots*. *Scientific reports*, 6, 20426.
- [14] Krishnamurthy Pannaga (2014). *Role of root hydrophobic barriers in salt exclusion of a mangrove plant *Avicennia officinalis**, *Plant cell & environment*, 37(7), 1656-1671.
- [15] Mack E.E (1993). *Rhodospirillum sodomense* sp. nov; a Dead Sea *Rhodospirillum* species, *Archives of microbiology*, 160(5), 363-371.
- [16] Panwichian Saijai (2010). *Isolation of purple nonsulfur bacteria for the removal of heavy metals and sodium from contaminated shrimp ponds*, *Electronic Journal of Biotechnology*, 13(4), 3-4.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chúng vi khuẩn quang dưỡng *Rhodobacter sphaeroides* CG3.1 thuần khiết về mặt sinh học có khả năng làm giảm mặn vào ngày nuôi cấy thứ 3-4 trong môi trường GM ở nhiệt độ 29°C, độ pH 7, cường độ ánh sáng 2900lux, trong đó chủng này mang trình tự vùng gen 16S rADN được nêu trong SEQ ID NO: 1.

**Fig.1****Fig.2**



(a) Hình ảnh nhuộm gram; (b) Hình ảnh nhuộm bào tử.

Fig.3



Fig.4

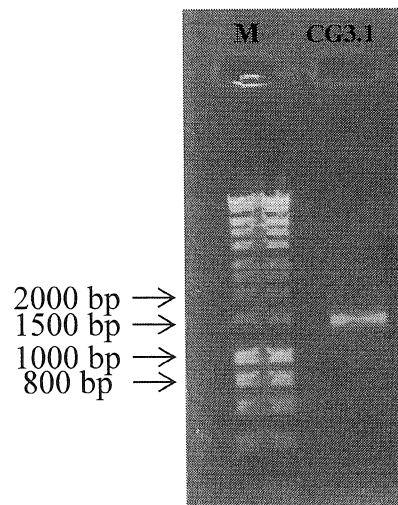
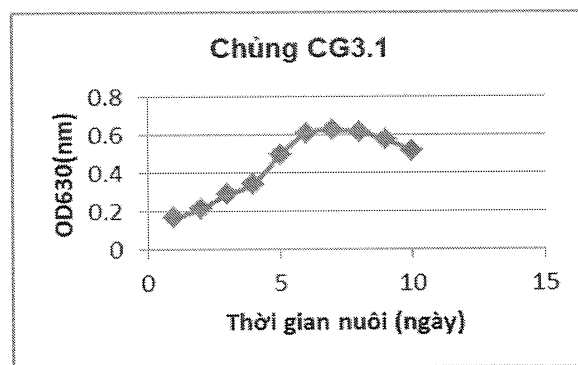
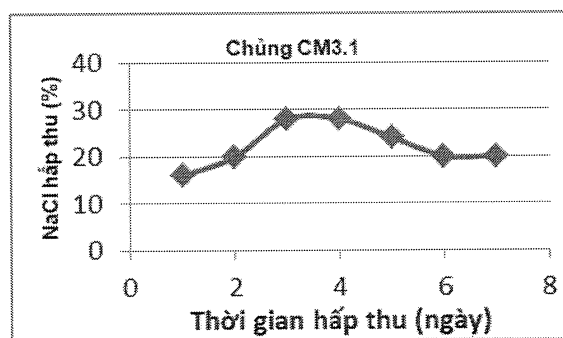


Fig.5



Đường cong tăng trưởng

Fig.6



Thời gian hấp thu

Fig.7

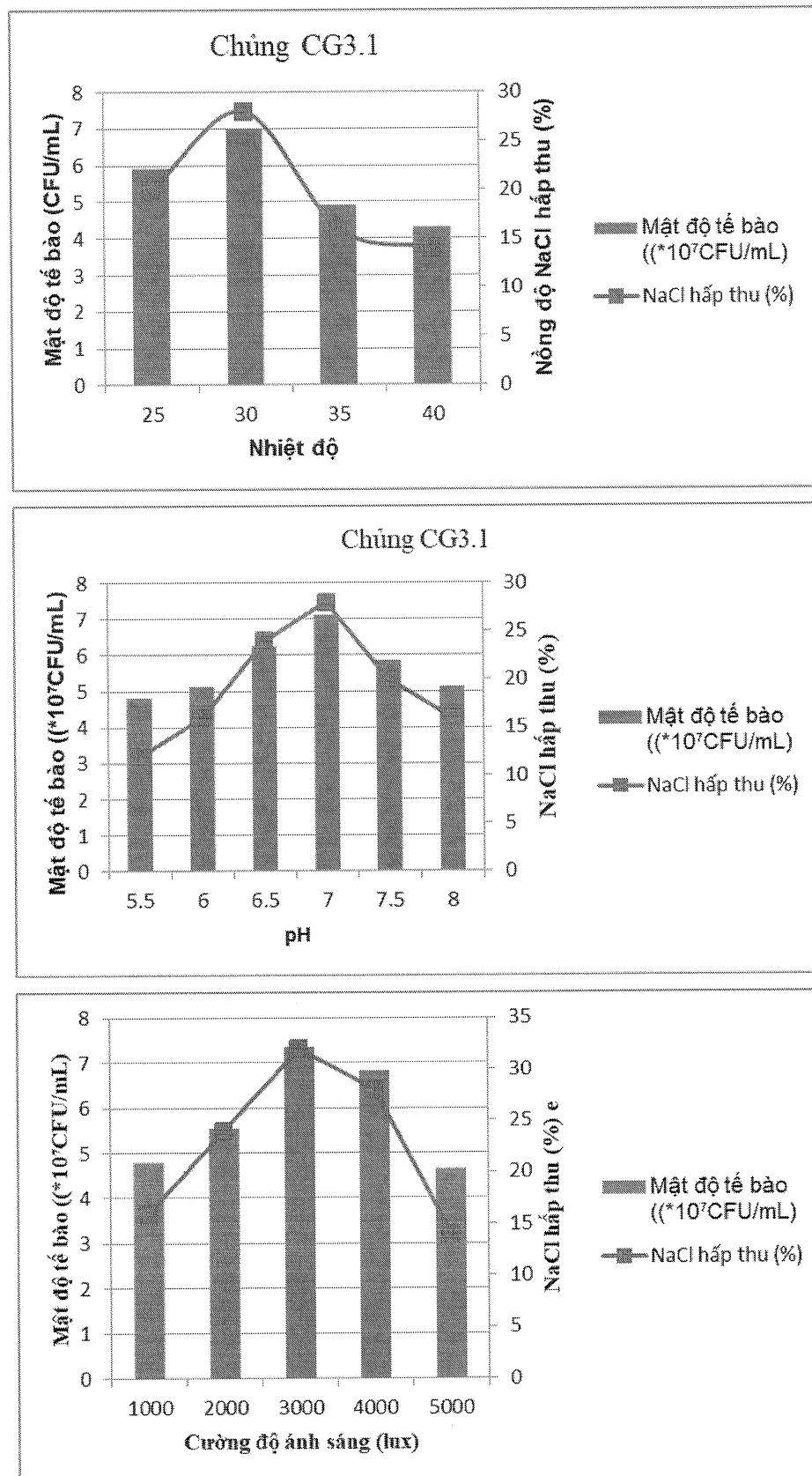


Fig.8

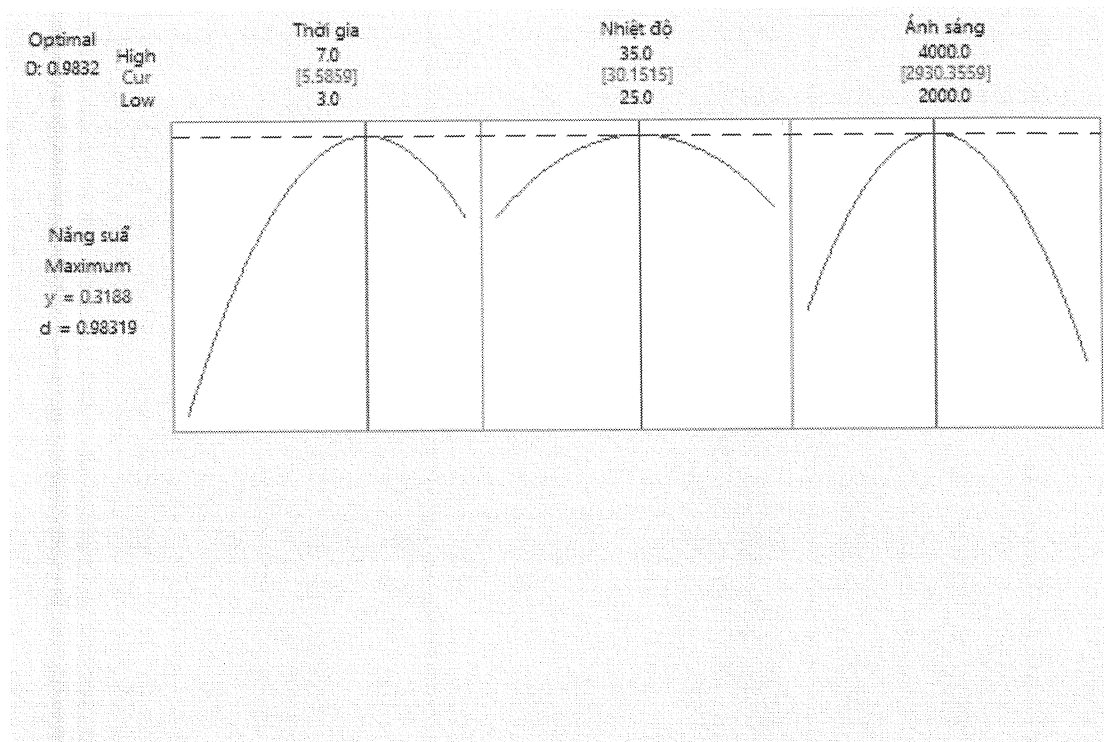


Fig.9

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Sở Khoa học và Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh (Việt Nam)

<120> Chủng vi khuẩn quang dưỡng *Rhodobacter sphaeroides* CG3.1 thuần khiết về mặt sinh học có khả năng làm giảm mặn

<160> 1

<210> SEQ ID NO: 1

<211> 1334

<212> ADN

<213> *Rhodobacter sphaeroides* CG3.1

<400>

```

GGACTTAAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGAACGTGCCCTTTGCTTCGGAATAGC   63
CCCGGGAAACTGGGAGTAATACCGAATGTGCCCTACGGGGGAAAGATTTATCGGCAAAGG   123
ATCGGCCCCGCGTTGGATTAGGTAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGCCGACGATCCAT   183
AGCTGGTTTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGG   243
GAGGCAGCAGTGGGGAATCTTAGACAATGGGCGCAAGCCTGATCTAGCCATGCCGCGTGA   303
TCGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGATCTTTCAGGTGGGAAGATAATGACGGTACCACC   363
AGAAGAAGCCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGGGCTAGCGTT   423
ATTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATCGGAAAGTCAGAGGTGAAATCC   483
CAGGGCTCAACCCTGGAAGTGCCTTTGAAACTCCCGATCTTGAGGTCGAGAGAGGTGAGT   543
GGAATTCGAGTG TAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGC   603
GGCTCACTGGCTCGATACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGA   663
TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCCAGTCGTCGGGCAGCATGCTGTTCCG   723
TGACACACCTAACGGATTAATCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCA   783
AAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCG   843
CAGAACCTTACCAACCCTTGACATGGCGATCGCGGTTCCAGAGATGGTTCCTTCAGTTCG   903
GCTGGATCGCACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTTCGGTT   963
AAGTCCGGCAACGAGCGCAACCCACGTCCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAG   1023
GGAAACTGCCGGTGATAAGCCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTT   1083
ACGGGTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCAGTGACAATGGGTTAATCCCCAAAAGCTG   1143
TCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGC   1203
GTAACAGCATGACGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCAT   1263
GGGAATTGGTTCTACCCGAAGGCGGTGCGCCAACCTCGCAAGAGGAGGCAGCCGACCTCG   1323

```

GTTAGATCAGT 1334

1335