



(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)



1-0051194

(51)^{2022.01} C12N 1/00

(13) B

(21) 1-2023-05428

(22) 20/04/2021

(62) 1-2021-02145

(45) 25/09/2025 450

(43) 25/12/2023 429A

(73) Trương Phước Thiên Hoàng (VN)

Trường Đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh khu phố 6, phường Linh Trung,
thành phố Thủ Đức, thành phố Hồ Chí Minh

(72) Trương Phước Thiên Hoàng (VN); Nguyễn Phú Hòa (VN).

(74) Công ty TNHH Dịch thuật sáng chế PROINVEN (PROINVEN CO.,LTD.)

(54) CHỦNG VI KHUẨN STENOTROPHOMONAS PAVANII C2/2 THUẦN KHIẾT
VỀ MẶT SINH HỌC CHUYÊN HOÁ NITRIT TRONG MÔI TRƯỜNG NƯỚC
NUÔI TÔM HÙM

(21) 1-2023-05428

(57) Sáng chế đề xuất các chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas pavanii* thuần khiết về mặt sinh học có trình tự gen vùng 16S rADN như được nêu trong các trình tự SEQ ID NO.1; 2; 3 và 4 được ứng dụng vào sản xuất chế phẩm sinh học ứng dụng xử lý nitrit trong nuôi trồng thủy sản. Các chủng vi khuẩn này có hiệu suất khả năng chuyển hóa nitrit ở vùng bùn đáy lồng bè nuôi tôm hùm cao nhất trong thời gian 72 giờ với trên 95%. Các chủng vi khuẩn này không di động, có phản ứng dương tính với catalaza, âm tính với oxidaza, phát triển ở nhiệt độ tối ưu là 37°C, các chủng vi khuẩn này phát triển yếu ở nhiệt độ cao hơn 40°C, phát triển tốt trên môi trường có nồng độ muối NaCl 3%, phân hủy gelatin, sử dụng các nguồn cacbon như glucoza, manozơ, không sử dụng manitol, phản ứng dương tính với xitrat, esculin.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực vi sinh vật ứng dụng trong bảo vệ môi trường nước nuôi tôm, cụ thể là sáng chế đề cập đến các chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas pavanii* thuần khiết về mặt sinh học có khả năng chuyển hóa nitrit ở vùng nuôi tôm hùm.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong những năm gần đây, ngành nuôi thủy sản lồng bè đang phải đối mặt với những khó khăn có thể dẫn đến nguy cơ thất bại ở nhiều địa phương. Nguyên nhân chính là do ô nhiễm môi trường nước ở vùng nuôi, dịch bệnh và hệ thống sinh thái bị phá hủy. Đặc biệt, ở các đầm/vịnh có hoạt động nuôi trồng thủy sản, nước lưu thông không thông thoáng vào một số thời điểm trong năm. Ngoài ra, các đầm/vịnh không được nạo vét. Do đó, phân (chất thải) của sinh vật nuôi, thức ăn thừa, xác động vật thủy sinh, xác rong, tảo, các loại hóa chất sử dụng trong quá trình nuôi, các loại vi khuẩn gây bệnh tích tụ ở đáy làm cho nước và bùn đáy trong đầm phá/vịnh có khuynh hướng bị ô nhiễm.

Các chất hữu cơ tích tụ lại ở đáy đầm/vịnh bị phân hủy kỵ khí sinh ra các sản phẩm như NH_3 , H_2S , NO^{2-} , NO^{3-} , v.v., làm cho các sinh vật sống trong đầm/vịnh như tôm, cá và các sinh vật khác bị sốc hoặc bị gây hại. Khi đầm/vịnh có hoạt động nuôi thủy sản bị ô nhiễm sẽ dẫn đến các nhóm vi sinh vật gây hại có cơ hội phát triển mạnh mẽ, không kiểm soát được và hậu quả là vật nuôi bị bệnh. Xu hướng hiện nay, một số hộ dân và Viện Nghiên cứu đang triển khai các mô hình nuôi tôm hùm trong bể xi măng [1]. Vì vậy, việc xác định các loài vi sinh vật chuyển hóa nitrit trong bùn đáy vùng nuôi tôm hùm là hết sức cần thiết, ứng dụng trong việc tạo sản phẩm sinh học cho việc xử lý nước trong bể nuôi tôm hùm.

Danh mục tài liệu được trích dẫn được nêu trong phần tài liệu tham khảo dưới đây.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất các chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas pavanii* có trình tự gen vùng 16S rADN được giải trình tự tại Công ty TNHH Dịch vụ và Thương Mại Nam Khoa, có địa chỉ tại 793/58 Trần Xuân Soạn, phường Tân Hưng, Quận 7, thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam, cụ thể là: chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas pavanii* TKT mang trình tự SEQ ID NO.1; chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas pavanii* T₂/2 mang trình tự SEQ ID NO.2; chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas pavanii* C₂/2 mang trình tự SEQ ID NO.3 và chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas pavanii* C₄/2 mang trình tự và SEQ ID NO.4.

Các chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas pavanii* này có khả năng chuyển hóa nitrit được phân lập ở vùng bùn đáy của môi trường nước nuôi tôm hùm ở Vịnh Xuân Đài, tỉnh Phú Yên, Việt Nam, có khả năng xử lý nitrit trong thời gian 72 giờ với hiệu suất cao. Đặc điểm của các chủng vi khuẩn này là gram (-), không di động, có phản ứng dương tính với catalaza, âm tính với oxidaza, phát triển ở nhiệt độ tối ưu là 37°C, các chủng vi khuẩn này phát triển yếu ở nhiệt độ cao hơn 40°C, phát triển tốt trên môi trường có nồng độ muối NaCl 3%, phân hủy gelatin, sử dụng các nguồn cacbon như glucoza, manosa, không sử dụng manitol, phản ứng dương tính với xitrat, esculin. Do đó, chủng vi khuẩn này có thể được ứng dụng vào sản xuất chế phẩm sinh học ứng dụng xử lý nitrit trong nuôi trồng thủy sản.

Bảng phản ứng sinh hóa chủng vi khuẩn theo *Stenotrophomonas pavanii* kit API 20E

Chủng vi khuẩn	<i>Stenotrophomonas pavanii</i>
Phản ứng sinh hóa	
Gram	-
Thời gian ủ	24 - 48 giờ
Di động	-
Catalaza	+
Oxydaza	-
Phát triển ở:	
4°C	-
40°C	-
4,5% NaCl	-
pH=12	+
ONPG (β-galactosidaza)	+
ADH (arginin dihydrolaza)	-

LDC (lysine decarboxylaza)	+
ODC (ornithine decarboxylaza)	-
CIT (xítat)	+
H ₂ S (hydro sunfit)	-
URE (enzym ureaza)	-
TDA (enzym tryptophan deaminaza)	+
IND (thử nghiệm indole)	-
VP (Voges-Proskauer)	-
GEL (enzym gelatin)	+
GLU (lên men glucoza)	-
MAN (D-Manoza)	-
INO (inositol)	-
SOR (sorbitol)	-
RHA(rhamnoza)	-
SAC (sucroza)	-
MEL (melibioza)	-
AMY (amygdalin)	-
ARA (arabinoza)	-
OX (thử nghiệm oxydaza)	-

Hiện nay, các chủng vi khuẩn theo sáng chế đang lưu giữ tại Viện nghiên cứu công nghệ sinh học và môi trường – Trường Đại học Nông lâm, thành phố Hồ Chí Minh, có địa chỉ tại – Khu phố 6, phường Linh Trung, quận Thủ Đức, thành phố Hồ Chí Minh

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là hình ảnh thể hiện kết quả khảo sát khả năng chuyển hóa nitrit, trong đó các ống nghiệm chứa dung dịch huyền phù vi khuẩn trong môi trường nitrit - canxi - carbonat xuất hiện màu vàng cho thấy không còn NO_2^- , điều này chứng tỏ có sự hiện diện của nhóm vi khuẩn chuyển hóa nitrit, còn trong môi trường nitrit - canxi - carbonat xuất hiện màu đỏ thì chứng tỏ cho thấy NO_2^- vẫn còn, tức là không có nhóm vi khuẩn chuyển hóa nitrit hiện diện để chuyển hóa.

Hình 2 là hình ảnh thể hiện đặc điểm khuẩn lạc và gram của các chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas pavanii*, với khuẩn lạc tròn, lồi, nhầy, màu trắng đục, tế bào hình que, gram âm, tồn tại ở dạng đơn.

Hình 3 là sơ đồ cây phát sinh loài của các nhóm vi khuẩn chuyển hóa nitrit thể hiện khi ở vùng đoạn gen được giải trình tự, cho thấy chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas maltophilia* và *Stenotrophomonas pavanii* có độ tương đồng 100% và tiến hành thực hiện nuôi các chủng vi khuẩn trên môi trường có sự hiện diện của muối NaCl 4,5% và ủ ở nhiệt độ 42⁰C, chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas pavanii* không thấy mọc trên môi trường.

Mô tả chi tiết sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất các chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas pavanii* thuần khiết về mặt sinh học có trình tự gen vùng 16S rADN được giải trình tự tại Công ty TNHH Dịch vụ và Thương Mại Nam Khoa, có địa chỉ tại 793/58 Trần Xuân Soạn, phường Tân Hưng, Quận 7, thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam, cụ thể là: chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas pavanii* TKT mang trình tự SEQ ID NO.1; chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas pavanii* T₂/2 mang trình tự SEQ ID NO.2; chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas pavanii* C₂/2 mang trình tự SEQ ID NO.3 và chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas pavanii* C₄/2 mang trình tự và SEQ ID NO.4.

Các chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas pavanii* này có khả năng chuyển hóa nitrit được phân lập ở vùng bùn đáy lồng bè nuôi tôm hùm ở Vịnh Xuân Đài, tỉnh Phú Yên, Việt Nam, có khả năng xử lý nitrit cao nhất trong thời gian 72 giờ với hiệu suất cao. Các chủng vi khuẩn: gram (-), không di động, có phản ứng dương tính với catalaza, âm tính với oxidaza, phát triển ở nhiệt độ tối ưu là 37⁰C, các chủng vi khuẩn này phát triển yếu ở nhiệt độ cao hơn 40⁰C, phát triển tốt trên môi trường có nồng độ muối NaCl 3%, phân hủy gelatin, sử dụng các nguồn cacbon như glucoza, mannoza, không sử dụng manitol, phản ứng dương tính với xitrat, esculin, tiếp tục sử dụng kit API 20E để định danh cho thấy: không lên men glucoza, dương tính với xitrat, β -galactosidaza, thủy phân gelatin, không sử dụng cơ chất D-mannoza, axetoin, inositol, D-sorbitol, rhamnoza, melibioza, amygdalin, arabinoza, âm tính với arginin dihydrolaza, ornithin decarboxylaza, ureaza, H₂S, phản ứng indol, enzym tryptophan deaminaza, lysin decarboxylaza. Do đó, các chủng vi khuẩn này có thể được ứng dụng vào sản xuất chế phẩm sinh học ứng dụng xử lý nitrit trong nuôi trồng thủy sản.

Phương pháp phân lập

Lấy bốn mẫu bùn được ký hiệu là TKT, T₂/2, C₂/2 và C₄/2, mỗi mẫu khoảng 100g bùn từ đáy của khu vực lồng nuôi tôm hùm tại vịnh Xuân Đài, tỉnh Phú Yên. Sau đó, giữ lạnh các mẫu bùn này bằng nước đá lạnh và chuyển về phòng thí nghiệm để bảo quản ở 4°C.

Phân lập và định lượng vi khuẩn:

Sử dụng môi trường nitrit-canxi-carbonat (NaNO₂ 0,3g, K₂HPO₄ 1g, MgSO₄.7H₂O 0,1g, NaCl 0,3g, CaCO₃ 1g, CaCl₂ 0,3g, H₂O 1000mL) để phân lập và định lượng vi khuẩn chuyển hóa nitrit dựa trên phương pháp của Ehrlich (1975)[16]. Môi trường Aleem và Alexander (1960) [9] được sử dụng để nuôi tăng sinh vi khuẩn chuyển hóa nitrit.

Đánh giá số lượng vi sinh vật theo phương pháp MPN:

Phương pháp MPN (phương pháp số có xác suất cao nhất, số tối khả) [2] được dùng để đánh giá số lượng vi sinh vật theo số lượng vi sinh vật có xác suất lớn nhất xuất hiện trong một đơn vị thể tích mẫu. Pha loãng mẫu bùn thu được bằng nước cất ở nồng độ 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, mỗi nồng độ lặp lại 3 lần và chuyển sang các ống nghiệm chứa môi trường nitrit-canxi-carbonat. Ủ các ống nghiệm chứa dung dịch huyền phù vi khuẩn này ở 28°C trong khoảng 21 ngày, sau đó kiểm tra sự có mặt của NO₂⁻ bằng thuốc thử là bộ test kit NO₂ Sera.

Bảng 1(5). Kết quả phản ứng của mẫu với test kit NO₂⁻ Sera sau 21 ngày ủ

Stt	Tên mẫu	Chỉ số MPN/mL của các độ pha loãng								
		10 ⁻³			10 ⁻⁴			10 ⁻⁵		
		L1	L2	L3	L1	L2	L3	L1	L2	L3
1	C ₂	+	+	+	+	+	+	-	+	+
2	C ₄	+	+	+	+	+	+	-	-	-
3	T ₂	+	+	+	+	+	-	-	-	-
4	TKT	+	+	-	+	+	-	+	-	-

L1,L2,L3: các lần lặp lại của thí nghiệm (3 lần lặp)

Bảng 2(6). Chỉ số Most Probable Number (MPN) của mẫu bùn

STT	Tên mẫu	Độ pha loãng			Kết quả (MPN/ml)
		10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	
1	C ₂	3	3	2	1,1 x 10 ⁵

2	C ₄	3	3	0	$2,4 \times 10^4$
3	T ₂	3	2	0	$9,3 \times 10^3$
4	TKT	2	2	1	$2,8 \times 10^3$

Kết quả khảo sát cho thấy nhóm vi khuẩn chuyển hóa nitrit (NOB) ở các mẫu bùn nằm trong khoảng 10^3 đến 10^5 (MPN/mL) và các mẫu bùn có mật số vi khuẩn từ 10^3 MNP/mL. Do đó, từ các ống có chứa bùn và dịch vi khuẩn huyền phù được tiếp tục phân lập trên môi trường thạch để chọn lọc nhóm NOB (Hình 1). Hoạt động của NOB giảm ngay sau khi tiếp xúc với ánh nắng mặt trời và NOB trong bùn thấp là do hoạt động và sự phát triển của chúng dễ bị ức chế bởi các yếu tố môi trường như nồng độ NH₃ và độ pH cao; oxy hòa tan (DO) và NO₂⁻ thấp, nhiệt độ thấp. Ngoài ra, NOB bị giới hạn mạnh bởi cường độ và thời gian chiếu sáng chủ yếu ánh sáng xanh dương và tím. Nhóm NOB là vi khuẩn kỵ ánh sáng, nhiệt độ thích hợp trong khoảng 20 – 30°C, phát triển mạnh tại độ pH = 8. Trong các ao nuôi thủy sản NOB được xác định mẫn cảm với ánh sáng nhiều hơn AOB, điều này góp phần làm mất cân bằng quần thể giữa chúng. Kết quả phân tích chỉ số MPN trong nghiên cứu này cho thấy nhóm NOB tập trung khoảng 10^3 - 10^5 MPN/mL tại vùng đáy Vịnh Xuân Đài, số liệu khá tương đồng với các nghiên cứu khác trong và ngoài nước.

Phương pháp định tính NO₂ bằng test kit NO₂ Sera:

Xác định dương tính đối với nhóm vi khuẩn chuyển hóa nitrit: dùng pipet hút 5 ml dung dịch huyền phù vi khuẩn trong mỗi ống nghiệm ra ống nghiệm khác, sau đó nhỏ dung dịch thuốc thử trong bộ test kit NO₂ Sera vào, lắc đều rồi để yên 5 phút, sau đó quan sát kết quả. Các ống nghiệm chứa dung dịch huyền phù vi khuẩn trong môi trường nitrit - canxi - carbonat xuất hiện màu vàng cho thấy không còn NO₂⁻, điều này chứng tỏ có sự xuất hiện của nhóm NOB (Hình 1).

Phương pháp nhuộm Gram và các phản ứng sinh hóa [2]:

Vi khuẩn được nhuộm theo phương pháp nhuộm Gram của Nguyễn Lâm Dũng (2006). Quan sát mẫu sau khi nhuộm dưới kính hiển vi ở vật kính 40 X, vật kính 100 X có giọt dầu. Kết quả là, vi khuẩn Gram dương có tím, vi khuẩn Gram âm có màu hồng. Đồng thời xác định hình dạng tế bào vi khuẩn, màu sắc và thực hiện các phản ứng sinh hóa như oxidaza, catalaza, tính di động, tính bất động, phản ứng xitrat, phản ứng esculin, phản ứng phân hủy gelatin, nhiệt độ phát triển, nồng độ muối mà vi khuẩn có thể phát triển được (Hình 2).

Đánh giá khả năng chuyển hóa nitrit của các chủng vi khuẩn được tuyển chọn bằng phương pháp quang phổ trắc quang 4500 NO₂

Nuôi cấy tăng sinh các chủng vi khuẩn sau khi được tuyển chọn trong môi trường TSB, đến khi đạt mật độ 10⁷ CFU/ml thì tiến hành các thí nghiệm đánh giá khả năng xử lý nitrit với 3 lần lặp bằng cách hút 1 ml dịch khuẩn (10⁷ CFU/ml) cho vào các ống falcon chứa 50 ml môi trường định lượng nitrit, các chủng vi khuẩn được nuôi cấy theo mẻ qua đêm ở 30°C, 150 vòng/phút trong 24 giờ. Lấy mẫu tại các thời điểm 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 giờ để phân tích hàm lượng nitrit theo phương pháp trắc quang 4500 NO₂ – B. Sau đó, các kết quả định lượng nitrit sẽ được đưa về hiệu suất xử lý theo công thức sau:

$$H = \frac{a-b}{a} \times 100\%$$

trong đó: H là hiệu suất xử lý (%)

a là hàm lượng chất ban đầu (mg/l)

b là hàm lượng chất sau thời gian thứ i (mg/l)

Bảng 3(7). Hiệu suất chuyển hóa nitrit của các chủng vi khuẩn

STT	Chủng vi khuẩn <i>Stenotrophomonas pavanii</i>	Hiệu suất chuyển hóa nitrit (%)					
		12 (giờ)	24 (giờ)	36 (giờ)	48 (giờ)	60 (giờ)	72 (giờ)
1	Ký hiệu mẫu C ₄ /2	12,25	26,54	60,34	85,07	91,65	95,15
2	Ký hiệu mẫu TKT	27,73	35,58	74,86	89,19	93,58	95,73
3	Ký hiệu mẫu T ₂ /2	21,39	64,86	80,73	94,76	97,52	98,21
4	Ký hiệu mẫu C ₂ /2	15,53	24,67	61,90	87,94	96,16	96,16

Bảng 3 cho thấy khả năng chuyển hóa nitrit của nhóm vi khuẩn *Stenotrophomonas pavanii* bắt đầu tăng cao sau 36 giờ và đến 60 giờ hiệu suất tăng. Sau 72 giờ, hiệu suất xử lý của các chủng vi khuẩn tăng lên đến hơn 90%. Điều này cho thấy các chủng vi khuẩn đã thích nghi và đang hoạt động mạnh.

Định danh vi khuẩn bằng phương pháp sinh hóa và sinh học phân tử:

Thực hiện các phản ứng sinh hóa của các chủng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa nitrit như: tính di động, catalaza, oxidaza, lên men các loại đường như glucoza, sucroza, manitol, khảo sát nhiệt độ phát triển và nồng độ muối. Sau đó, các chủng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa nitrit phân lập được gửi mẫu phân tích và giải trình tự,

định danh tại Công ty TNHH Dịch vụ và Thương Mại Nam Khoa, số 793/58 Trần Xuân Soạn, phường Tân Hưng, Quận 7, thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam.

Bảng 4(8). Kết quả một số phản ứng sinh hóa của các chủng vi khuẩn

Chủng vi khuẩn	<i>Stenotrophomonas pavanii</i>
Phản ứng sinh hóa	
Gram	-
Thời gian ủ	24 - 48 giờ
Di động	-
Catalaza	+
Oxydaza	-
Phát triển ở:	
4 ⁰ C	-
40 ⁰ C	-
4,5% NaCl	-
pH=12	+
ONPG (β -galactosidaza)	+
ADH (arginin dihydrolaza)	-
LDC (lysin decarboxylaza)	+
ODC (ornithin decarboxylaza)	-
CIT (xitrat)	+
H ₂ S (hydro sunfit)	-
URE (enzym ureaza)	-
TDA (enzym tryptophan deaminaza)	+
IND (thử nghiệm Indole)	-
VP (Voges-Proskauer)	-
GEL (enzym gelatin)	+
GLU (lên men glucoza)	-
MAN (D-manoza)	-
INO (inositol)	-
SOR (sorbitol)	-
RHA(rhamnoza)	-
SAC (sucroza)	-
MEL (melibioza)	-
AMY (amygdalin)	-
ARA (arabinoza)	-
OX (thử nghiệm oxydaza)	-

Ghi chú: (+): dương tính; (-) : âm tính;

Sau khi thực hiện phản ứng sinh hóa, gửi chủng vi khuẩn có hiệu suất chuyển hóa nitrit cao này để định danh bằng phương pháp giải trình tự gen vùng 16S rADN tại

công ty Nam Khoa, quận 7, kết quả định danh các chủng vi khuẩn được thể hiện trong bảng 9.

Bảng 5(9). Kết quả định danh các chủng vi khuẩn

Chủng vi khuẩn	Tên khoa học	Độ tương đồng
TKT	<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	99%
T ₂ /2	<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	100%
C ₂ /2	<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	100%
C ₄ /2	<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	100%

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Khảo sát khả năng chuyển hóa nitrit của mẫu vi khuẩn

Lấy bốn mẫu bùn được ký hiệu là TKT, T₂/2, C₂/2 và C₄/2, mỗi mẫu khoảng 100g bùn từ đáy của khu vực lồng nuôi tôm hùm tại vịnh Xuân Đài, tỉnh Phú Yên. Sau đó, giữ lạnh các mẫu bùn này bằng nước đá lạnh và bảo quản ở 4°C. Sau đó, chuyển mẫu bùn này sang các ống nghiệm chứa môi trường nitrit-canxi-carbonat. Ủ các ống nghiệm chứa dung dịch huyền phù vi khuẩn ở 28°C trong 21 ngày. Sau đó, kiểm tra sự có mặt của NO₂⁻ bằng test kit NO₂ SERA.

Xác định dương tính đối với nhóm vi khuẩn chuyển hóa nitrit: dùng pipet hút 5 ml dung dịch huyền phù vi khuẩn trong mỗi ống nghiệm ra ống nghiệm khác, sau đó nhỏ dung dịch thuốc thử trong bộ test kit NO₂ Sera vào, lắc đều rồi để yên 5 phút xem kết quả. Các ống nghiệm chứa dung dịch huyền phù vi khuẩn trong môi trường nitrit - canxi - carbonat xuất hiện màu vàng cho thấy không còn NO₂⁻. Điều này chứng tỏ có sự có mặt của nhóm NOB, còn trong môi trường nitrit - canxi - carbonat xuất hiện màu đỏ thì chứng tỏ cho thấy NO₂ vẫn còn, tức là không có nhóm NOB có mặt để chuyển hóa (Hình 1).

Kết quả khảo sát cho thấy nhóm NOB ở các mẫu bùn nằm trong khoảng 10³ đến 1,1 x 10⁵ (MPN/mL) và các mẫu bùn có mật số vi khuẩn từ 10³ MNP/mL. Do đó, từ các ống có chứa bùn và dịch vi khuẩn huyền phù được tiếp tục phân lập trên môi trường thạch để chọn lọc nhóm NOB.

Ví dụ 2: Phân lập, đặc điểm khuẩn lạc và nhuộm Gram của các chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas pavanii*

Các ống nghiệm có sự xuất hiện của nhóm vi khuẩn chuyển hóa nitrit (NOB) được tiếp tục tiến hành phân lập trên môi trường thạch nitrit-canxi-carbonat, quan sát hình thái, nhuộm gram và định tính khả năng chuyển hóa nitrit. Kết quả phân lập được các chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas pavanii* có khả năng chuyển hóa nitrit (Hình 2 và Hình 3) với khuẩn lạc của nó tròn, lồi, nhầy, màu trắng đục, tế bào hình que, gram âm, tồn tại ở dạng đơn.

Ví dụ 3: Khả năng xử lý nitrit của chủng vi khuẩn được tuyển chọn

Sau khi tuyển chọn lọc vi khuẩn có khả năng chuyển hóa nitrit nêu trên, tiến hành khảo sát khả năng xử lý nitrit của chủng vi khuẩn này và định lượng hàm lượng. Hiệu suất chuyển hóa nitrit của chủng vi khuẩn này được nuôi cấy trong môi trường định lượng nitrit với hàm lượng NO_2^- được bổ sung lúc ban đầu là 0,62 mg/l (mật độ ban đầu là 10^7 CFU/ml) sau 24 giờ khảo sát được thể hiện trong bảng dưới đây.

STT	Chủng vi khuẩn <i>Stenotrophomonas pavanii</i>	Hiệu suất chuyển hóa nitrit (%)					
		12 (giờ)	24 (giờ)	36 (giờ)	48 (giờ)	60 (giờ)	72 (giờ)
1	Ký hiệu mẫu C ₄ /2	12,25	26,54	60,34	85,07	91,65	95,15
2	Ký hiệu mẫu TKT	27,73	35,58	74,86	89,19	93,58	95,73
3	Ký hiệu mẫu T ₂ /2	21,39	64,86	80,73	94,76	97,52	98,21
4	Ký hiệu mẫu C ₂ /2	15,53	24,67	61,90	87,94	96,16	96,16

Bảng trên cho thấy khả năng chuyển hóa nitrit của các chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas pavanii* bắt đầu tăng cao sau 36 giờ và đến 60 giờ hiệu suất tăng. Sau 72 giờ, hiệu suất xử lý của các chủng vi khuẩn này đạt đến 95,73%. Điều này cho thấy các chủng vi khuẩn đã thích nghi và đang hoạt động mạnh.

Ví dụ 4: Định danh sinh hóa và sinh học phân tử các chủng vi khuẩn

Chủng vi khuẩn	<i>Stenotrophomonas pavanii</i>
Phản ứng sinh hóa	
Gram	-
Thời gian ủ	24 - 48 giờ
Di động	-
Catalaza	+
Oxydaza	-
Phát triển ở:	
4 ⁰ C	-
40 ⁰ C	-

4,5% NaCl pH=12	- +
ONPG (β -galactosidaza)	+
ADH (arginin dihydrolaza)	-
LDC (lysin decarboxylaza)	+
ODC (ornithin decarboxylaza)	-
CIT (xitrat)	+
H ₂ S (hydro sunfit)	-
URE (enzym ureaza)	-
TDA (enzym tryptophan deaminaza)	+
IND (thử nghiệm Indole)	-
VP (Voges-Proskauer)	-
GEL (enzym gelatin)	+
GLU (lên men glucoza)	-
MAN (D-manoza)	-
INO (inositol)	-
SOR (sorbitol)	-
RHA(rhamnoza)	-
SAC (sucroza)	-
MEL (melibioza)	-
AMY (amygdalin)	-
ARA (arabinoza)	-
OX (thử nghiệm oxydaza)	-

Kết quả định danh các chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas pavanii* với các trình tự gen như được nêu trong các trình tự SEQ ID NO.1; 2; 3 và 4 nêu trên và chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas maltophilia* (có họ hàng gần nhất)

Chủng vi khuẩn	Tên khoa học	Độ tương đồng
TKT	<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	99%
T ₂ /2	<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	100%
C ₂ /2	<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	100%
C ₄ /2	<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	100%
C ₃ /1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	100%
T1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99%

Chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas maltophilia* có các trình tự gen như được nêu trong SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.6 có họ hàng gần với chủng *Stenotrophomonas pavanii*.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas pavanii* C₂/2 thuần khiết về mặt sinh học có trình tự gen vùng 16S rRNA nêu trong SEQ ID NO.3 được ứng dụng vào sản xuất chế phẩm sinh học ứng dụng xử lý nitrit trong nuôi trồng thủy sản, trong đó chủng vi khuẩn này có các đặc tính như sau:

- có khả năng xử lý nitrit trong môi trường nitrit-canxi-carbonat cao nhất trong thời gian 72 giờ với hiệu suất 96,16%;

- chủng vi khuẩn gram âm, không di động, có phản ứng dương tính với catalaza, âm tính với oxidaza, phát triển ở nhiệt độ tối ưu là 37°C và phát triển yếu ở nhiệt độ cao hơn 40°C;

- phát triển tốt trên môi trường có nồng độ muối NaCl 3%;

- phân hủy gelatin, sử dụng các nguồn cacbon như glucoza, mannoza, không sử dụng manitol, phản ứng dương tính với xitrat, esculin;

- không lên men glucoza, dương tính với xitrat, β -galactosidaza, thủy phân gelatin, không sử dụng cơ chất D-mannoza, axetoin, inositol, D-sorbitol, rhamnoza, melibioza, amygdalin, arabinoza, âm tính với arginin dihydrolaza, ornithin decarboxylaza, ureaza, H₂S, phản ứng indol, enzym tryptophan deaminaza, lysin decarboxylaza.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Trương Phước Thiên Hoàng

<120> CHỨNG VI KHUẨN *STENOTROPHOMONAS PAVANII* TKT THUẦN KHIẾT VỀ MẶT SINH HỌC CHUYỂN HOÁ NITRIT TRONG MÔI TRƯỜNG NƯỚC NUÔI TÔM HÙM

<160> 1

<210> SEQ ID NO.1

<211> 491

<212> ADN

<213> *Stenotrophomonas pavanii* TKT

<400>

```

AGTGAACGCT GGC GG TAGGC CTAACACATG CAAGTCGAAC GGCAGCACAG GAGAGCTTGC 60
TCTCTGGGTG GCGAGTGGCG GACGGGTGAG GAATACATCG GAATCTACTC TGTCGTGGGG 120
GATAACGTAG GGAAACTTAC GCTAATACCG CATACGACCT ACGGGTGAAA GCAGGGGACC 180
TTCGGGCCTT GCGCGATTGA ATGAGCCGAT GTCGGATTAG CTAGTTGGCG GGGTAAAGGC 240
CCACCAAGGC GACGATCCGT AGCTGGTCTG AGAGGATGAT CAGCCACACT GGAAGTGA 300
CACGGTCCAG ACTCCTACGG GAGGCAGCAG TGGGGAATAT TGGACAATGG GCGCAAGCCT 360
GATCCAGCCA TACCGCGTGG GTGAAGAAGG CCTTCGGGTT GTAAAGCCCT TTTGTTGGGA 420
AAGAAATCCA GCTGGCTAAT ACCTGGTTGG GATGACGGTA CCCAAAGAAT AAGCACCGGC 480
TAACTTCGTG C

```

<160> 2

<210> SEQ ID NO.2

<211> 480

<212> ADN

<213> *Stenotrophomonas pavanii* T₂/2

<400>

```

AGTGAACGCT GGC GG TAGGC CTAACACATG CAAGTCGAAC GGCAGCACAG GAGAGCTTGC 60
TCTCTGGGTG GCGAGTGGCG GACGGGTGAG GAATACATCG GAATCTACTC TGTCGTGGGG 120
GATAACGTAG GGAAACTTAC GCTAATACCG CATACGACCT ACGGGTGAAA GCAGGGGACC 180
TTCGGGCCTT GCGCGATTGA ATGAGCCGAT GTCGGATTAG CTAGTTGGCG GGGTAAAGGC 240
CCACCAAGGC GACGATCCGT AGCTGGTCTG AGAGGATGAT CAGCCACACT GGAAGTGA 300
CACGGTCCAG ACTCCTACGG GAGGCAGCAG TGGGGAATAT TGGACAATGG GCGCAAGCCT 360
GATCCAGCCA TACCGCGTGG GTGAAGAAGG CCTTCGGGTT GTAAAGCCCT TTTGTTGGGA 420
AAGAAATCCA GCTGGCTAAT ACCCGGTTGG GATGACGGTA CCCAAAGAAT AAGCACCGGC 480

```

<160> 3

<210> SEQ ID NO.3

<211> 420

<212> ADN

<213> *Stenotrophomonas pavanii* C₂/2

<400>

```

AGTGAACGCT GGC GG TAGGC CTAACACATG CAAGTCGAAC GGCAGCACAG GAGAGCTTGC 60
TCTCTGGGTG GCGAGTGGCG GACGGGTGAG GAATACATCG GAATCTACTC TGTCGTGGGG 120
GATAACGTAG GGAAACTTAC GCTAATACCG CATACGACCT ACGGGTGAAA GCAGGGGACC 180
TTCGGGCCTT GCGCGATTGA ATGAGCCGAT GTCGGATTAG CTAGTTGGCG GGGTAAAGGC 240
CCACCAAGGC GACGATCCGT AGCTGGTCTG AGAGGATGAT CAGCCACACT GGAAGTGA 300
CACGGTCCAG ACTCCTACGG GAGGCAGCAG TGGGGAATAT TGGACAATGG GCGCAAGCCT 360
GATCCAGCCA TACCGCGTGG GTGAAGAAGG CCTTCGGGTT GTAAAGCCCT TTTGTTGGGA 420

```

<160> 4

<210> SEQ ID NO.4

<211> 439

<212> ADN

<213> *Stenotrophomonas pavanii* C₄/2

<400>

```

CTGGCTCAGA GTGAACGCTG GCGGTAGGCC TAACACATGC AAGTCGAACG GCAGCACAGG 60
AGAGCTTGCT CTCTGGGTGG CGAGTGGCGG ACGGGTGAGG AATACATCGG AATCTACTCT 120
GTCGTGGGGG ATAACGTAGG GAAACTTACG CTAATACCGC ATACGACCTA CGGGTGAAAG 180
CAGGGGACCT TCGGGCCTTG CGCGATTGAA TGAGCCGATG TCGGATTAGC TAGTTGGCGG 240
GGTAAAGGCC CACCAAGGCG ACGATCCGTA GCTGGTCTGA GAGGATGATC AGCCACACTG 300
GAACTGAGAC ACGGTCCAGA CTCCTACGGG AGGCAGCAGT GGGGAATATT GGACAATGGG 360
CGCAAGCCTG ATCCAGCCAT ACCGCGTGGG TGAAGAAGGC CTTCGGGTTG TAAAGCCCTT 420
TTGTTGGGAA AGAAATCCA                                     439

```

<160> 5

<210> SEQ ID NO.5

<211> 444

<212> ADN

<213> *Stenotrophomonas maltophilia* - C₃/1

<400>

```

TGATCCTGGC TCAGAGTGAA CGCTGGCGGT AGGCCTAACA CATGCAAGTC GAACGGCAGC 60
ACAGGAGAGC TTGCTCTCTG GGTGGCGAGT GGCGGACGGG TGAGGAATAC ATCGGAATCT 120
ACTCTGTCGT GGGGGATAAC GTAGGGAAAC TTACGCTAAT ACCGCATACG ACCTACGGGT 180
GAAAGCAGGG GACCTTCGGG CCTTGCGCGA TTGAATGAGC CGATGTCGGA TTAGCTAGTT 240
GGCGGGGTAA AGGCCACCA AGGCGACGAT CCGTAGCTGG TCTGAGAGGA TGATCAGCCA 300
CACTGGAAC T GAGACACGGT CCAGACTCCT ACGGGAGGCA GCAGTGGGGA ATATTGGACA 360
ATGGGCGCAA GCCTGATCCA GCCATACCGC GTGGGTGAAG AAGGCCTTCG GGTGTAAAG 420
CCCTTTTGT GGGAAAGAAA TCCA                                     444

```

<160> 6

<210> SEQ ID NO.6

<211> 532

<212> ADN

<213> *Stenotrophomonas maltophilia* - T₁

<400>

```

TTGGAGAGTT TTGATCCTGG CTCAGAGTGA ACGCTGGCGG TAGGCCTAAC ACATGCAAGT 60
CGAACGGCAG CACAGGAGAG CTTGCTCTCT GGGTGGCGAG TGGCGGACGG GTGAGGAATA 120
CATCGGAATC TACTCTGTCG TGGGGGATAA CGTAGGGAAA CTTACGCTAA TACCGCATAC 180
GACCTACGGG TGAAAGCAGG GGACCTTCGG GCCTTGCGCG ATTGAATGAG CCGATGTCGG 240
ATTAGCTAGT TGGCGGGGTA AAGGCCACCA AAGGCGACGA TCCGTAGCTG GTCTGAGAGG 300
ATGATCAGCC AACTGGAAC TGAGACACGG TCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTGGGG 360
AATATTGGAC AATGGGCGCA AGCCTGATCC AGCCATACCG CGTGGGTGAA GAAGGCCTTC 420
GGGTTGTAAA GCCCTTTTGT TGGGAAAGAA ATCCAGCCGG CTAATACCTG GTTGGGATGA 480
CGGTACCCAA AGAATAAGCA CCGGCTAACT TCGTGCCAGC AGCCCGCGGT AA 532

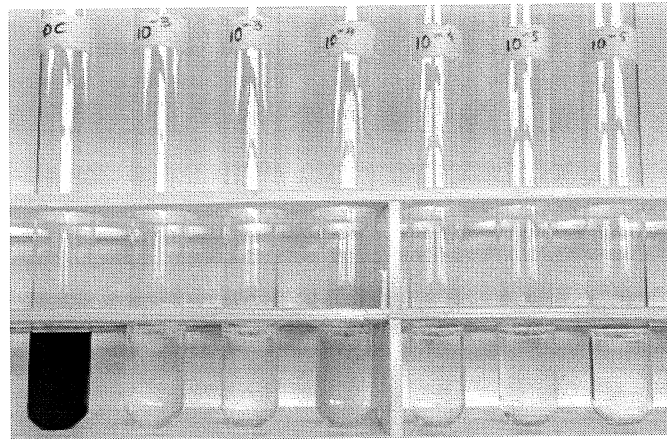
```

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

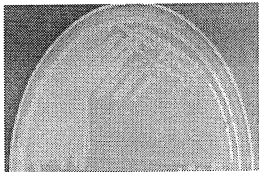
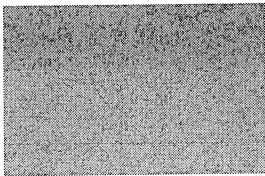
1. Nguyễn Hữu Hào, Trần Văn Vinh, Nguyễn Duy Lâm, Nguyễn Hải Bình, Lê Văn Hùng, Huỳnh Văn Cánh. 2010. *Nghiên cứu đề xuất giải pháp khai thác bền vững nguồn lợi tôm hùm giống tỉnh Bình Định*.
2. Nguyễn Lâm Dũng và Nguyễn Nữ Kim Thảo. 2006. *Vi sinh vật học*. NXB Giáo dục Việt Nam.
3. Nguyễn Thị Phi Oanh, Nguyễn Thị Trúc Mai, 2019, *Phân lập vi khuẩn có khả năng chuyển hóa nitrite trong một số ao nuôi tôm ở Bạc Liêu*. Tạp chí khoa học Đại học Cần Thơ, 2019, Tập 55, Số 6B (2019), trang 75-81.
4. Nguyễn Văn Tuyển. 2012. *Kỹ thuật nuôi tôm hùm*. Nhà xuất bản Thanh Niên.
5. Phạm Thị Tuyết Ngân và Nguyễn Hữu Hiệp. 2010. *Biến động mật độ vi khuẩn hữu ích trong ao nuôi tôm sú (Penaeus monodon) thâm canh*. Tạp chí khoa học Đại học Cần Thơ, 2010, số 14, trang 166-176
6. Phạm Thị Tuyết Ngân, Trần Nhân Dũng và Dương Minh Viễn, 2011. *Khảo sát mật độ và sự đa dạng của vi khuẩn nitrate hóa trong ao nuôi tôm*. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 20b: 69-78
7. Trần Ngọc Hùng, Huỳnh Thị Kim Trang, 2017, *Phân lập và thử nghiệm khả năng xử lý nitrit trong nước rỉ rác của vi khuẩn Nitrobacter sp.* Tạp chí Đại học thủ dầu 1, số Số 3(34)-2017, Tr.55-61.
8. A. C. Anthonisen, R. C. Loehr, T. B. S. Prakasam and E. G. Srinath, 1976. *Inhibition of Nitrification by Ammonia and Nitrous Acid*, Journal (Water Pollution Control Federation) Vol. 48, No. 5 (May, 1976), pp. 835-852 (18 pages).
9. Aleem MI and Alexander M, 1960. *Nutrition and Physiology of Nitrobacter agilis*, *Applied and Environmental Microbiology*, 1960 Mar; 8(2): 80-84.
10. APHA, 2012. *Standard Methods for the Examination of Water and WasteWater*. 22nd edition, American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation.
11. Balmelle, B., 1992. *Study of factors controlling nitrite build-up in biological processes for water nitrification*, Water Sci. Technol. 26: 1018-1025.
12. Bock, E. and H.P. Koops. 1992. *The genus Nitrobacter and related genera in Balows*, Truper, Dsorkin, Harder and Schleifer. Identification, Application, 2nd ed, Springer, Verlag, NewYork, 3: 2302-2309
13. Boyd, C.E., 1998. *Water quality for pond aquaculture*. Alabama Agriculture experiment Station. Auburn University. Alabama Research and Development Series. (Department of Fisheries and Applied Aquacultures Auburn University, Alabama 36849 USA). No. 43, 37 p.
14. Boyd, C.E., 2000. *Water Quality, an Introduction*. Kluwer Academic Publishers, Boston, 330p.
15. Dergange, V; and R. Bardin, 1998. *Detection and Counting of Nitrobacter Population in Soil by PCR*
16. Ehrlich, G. G., 1975. *Water quality: Analytical Methods - "Nitrifying bacteria (most probable number, MPN, method)" in: quality of water branch technical memorandum*. R. J. Pickering No. 75.13 p.
17. Guzik Urszula; Gre Izabela; Wojcieszka Danuta; abu ek Sylwia, 2009. *Isolation and Characterization Of A Novel Strain Of Stenotrophomonas Maltophilia*

- Possessing Various Dioxygenases For Monocyclic Hydrocarbon Degradation*, Brazilian Journal of Microbiology (2009) 40:285-291 ISSN 1517-8382
18. Herbert, R.A., 1999. *Nitrogen Cycling in Coastal Marine Ecosystems*.
 19. J.F. Wickins, D.O. Lee (2002), "*Crustacean Farming - Ranching and Culture*", Blackwell Science, p.446.
 20. M. Vijayakumaran, R. Venkatesan, T. Senthil Murugan, T.S. Kumar, Dilip Kumar Jha, M.C. Remany, J. Mary Leema Thilakam, S. Syed Jahan, G. Dharani, S. Kathioli & K. Selvan, (2009), "*Farming of spiny lobsters in sea cages in India*", New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research, 43, pp.622-634.
 21. Niels O. G. Jørgensen, Kristian K. Brandt, Ole Nybroe and Michael Hansen, 2009. *Delftia lacustris* sp. nov., a peptidoglycan- degrading bacterium from fresh water, and emended description of *Delftia tsuruhatensis* as a peptidoglycan-degrading bacterium. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 59, 2195–2199
 22. Olson, R. J., 1981a. *Differential photoinhibition of marine nitrifying bacteria: a possible mechanism for the formation of the primary nitrite maximum*. J. mar Res. 39: 227-238.
 23. Patr'icia L. Ramos, Stefanie Van Trappen, Fabiano L. Thompson, Rafael C. S. Rocha, Heloiza R. Barbosa, Paul De Vos and Carlos A. Moreira-Filho, 2011. *Screening for endophytic nitrogen-fixing bacteria in Brazilian sugar cane varieties used in organic farming and description of Stenotrophomonas pavanii* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 61, 926–931.
 24. Rennie, R.J; Schmidt, E.L., 1977. *Immunofluorescence Studies of Nitrosomonas and Nitrobacter Populations in Soils*.
 25. Sofia Constantiniu, Angela Romaniuc, Luminița Smaranda Iancu, Raluca Filimon, Iuliana Tarași, 2004, *Cultural And Biochemical Characteristics Of Acinetobacter Spp. Strains Isolated From Hospital Units*, The Journal Of Preventive Medicine 2004; 12 (3-4): 35-42
 26. Vanzella, A., Gurreno, M.A., Jones, R.D., 1985. *Effects of CO₂ light on Ammonium and Nitrite oxidation by Chemolithotrophic Bacteria*. Mar. Ecol.-Pcol. Ser. 57, 69-76.
 27. Vidhi Jain, Nayani Amrin Fatema Afzal Hussain, Tasneem Siddiqui, Chinmoy Sahu,* Malay Ghar and Kashi Nath Prasad ,2017. *Simultaneous isolation of Chryseobacterium gleum from bloodstream and respiratory tract: first case report from India*. JMM Case Reports 2017;4 Microbiology Society
 28. Waston, W. S., E. Book, H. Harms, H. Koops and A. B. Hooper. 1989. Nitrite - Oxidizing Bacteria. In: *Bergey's manual of Systematic bacteriology*, vol 3. pp. 1810 - 1815.
 29. Weyant SR, WC Moss, Weaver ER, Hollis GD, Jordan GJ, Cook CE, Daneshvar IM: Identification of unusual pathogenic Gram-negative aerobic and facultatively anaerobic bacteria. Second edition, Williams & Wilkins, 1996, p. 234-36.
 30. Yoshioka, T., Saijo, Y., 1984. *Photoinhibition and recovery of NH₄ + - oxidizing bacteria and NO₂ - oxidizing bacteria*. J. Gen. Appl. Microbiol., Tokyo 30: 151-166.

Hình 1



Hình 2

Khuẩn lạc	Nhuộm Gram
	

Hình 3

