



(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)



1-0053651

(51)^{2023.01} C12N 1/00

(13) B

(21) 1-2024-00495

(22) 22/01/2024

(45) 25/11/2025 452

(43) 25/06/2024 435

(73) Viện Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)
Nhà A10, số 18 Hoàng Quốc Việt, Nghĩa Đô, Cầu Giấy, Hà Nội

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

(54) CHỦNG VI KHUẨN TÍA QUANG HỢP RHODOBACTER CAPSULATUS GT10
THUẦN KHIẾT VỀ MẶT SINH HỌC CÓ KHẢ NĂNG CỐ ĐỊNH NITƠ PHÂN
TỬ, PHÂN GIẢI PHOSPHAT KHÓ TAN, SẢN SINH CHẤT KÍCH THÍCH SINH
TRƯỞNG IAA, CHỐNG CHỊU ĐƯỢC ĐIỀU KIỆN MẶN HÓA, PHÈN HÓA

(21) 1-2024-00495

(57) Chủng vi khuẩn tía quang hợp *Rhodobacter capsulatus* GT10 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ mẫu đất lấy từ ruộng lúa nhiễm mặn (sau sạ 1,5 tháng) ven đê biển tại Giao Thủy, Nam Định có trình tự gen 16S rARN với kích thước 1321 bp và được đăng ký trên ngân hàng gen với mã số LC791252 và có các đặc tính sau: có khả năng cố định nitơ phân tử, phân giải phosphat khó tan, sản sinh chất kích thích sinh trưởng IAA ở nồng độ muối từ 0 – 3 % và pH từ 4-9 trong đó tối ưu ở pH 6 – 7; có tiềm năng ứng dụng làm phân bón cho lúa ở những vùng đang bị mặn hóa và phèn hóa, nơi mà các nhóm vi sinh vật hữu ích khó tồn tại và phát triển. Đây là một trong các đặc điểm nổi bật của vi khuẩn tía quang hợp có khả năng chống chịu các điều kiện bất lợi từ môi trường. Ngoài ra Sáng chế còn đề cập đến việc tiềm năng ứng dụng của chủng này làm phân bón cho các vùng trồng lúa, đặc biệt là những vùng đất nhiễm mặn, nhiễm phèn mà hiện chưa có các chế phẩm phù hợp.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn tía quang hợp *Rhodobacter capsulatus* GT10 có khả năng cố định nitơ phân tử, phân giải phosphat khó tiêu và sản sinh chất kích thích sinh trưởng IAA đồng thời chủng này còn có khả năng chống chịu được các điều kiện mặn hóa và phèn hóa.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

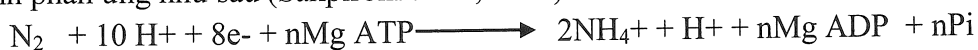
Các vi sinh vật trong đất, đặc biệt là vi sinh vật (VSV) vùng rễ có vai trò đặc biệt quan trọng với cây trồng, chúng tạo thành mối quan hệ hữu cơ, gắn bó trong một thể thống nhất. Hầu như mọi quá trình xảy ra trong đất đều có sự tham gia trực tiếp hoặc gián tiếp của VSV (quá trình mùn hóa, khoáng hóa hợp chất hữu cơ, quá trình phân giải hoặc cố định hợp chất vô cơ v.v...). Vi sinh vật là một yếu tố sinh học có ý nghĩa của hệ thống dinh dưỡng cây trồng. Tại nhiều quốc gia trên thế giới, phân bón VSV được hiểu là các sản phẩm chứa các VSV tồn tại dưới dạng tế bào sinh dưỡng hoặc tiềm sinh thuộc các nhóm VSV có khả năng cố định nitơ; phân giải hợp chất phosphat khó tan, sản sinh hoạt chất kích thích sinh trưởng thực vật v.v... sử dụng để bổ sung vào đất và cây trồng. Theo nhóm tác giả Phạm Văn Toàn và cộng sự thì các nhóm VSV chính sử dụng làm phân bón sinh học bao gồm: VSV cố định nitơ, VSV phân giải hợp chất photpho khó tan, VSV tổng hợp kích thích sinh trưởng thực vật, VSV đối kháng VSV gây bệnh vùng rễ cây trồng và VSV chuyển hoá chất hữu cơ. Các nhóm vi sinh vật này được nghiên cứu và ứng dụng rộng rãi tại các Trường Đại học cũng như các Viện nghiên cứu ở nước ta. Nhiều sản phẩm phân VSV đã được Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn công nhận và cho đăng ký trong danh mục các loại phân bón được phép sử dụng tại Việt Nam (Phân VSV cố định nitơ cho cây họ đậu, Phân VSV cố định nitơ cho lúa, Phân lân hữu cơ vi sinh KOMIX, Phân bón sinh tổng hợp BIOMIX, Phân vi sinh HUMIX, phân vi sinh Phytohoocmon, HUDAVIL, phân VSV chức năng...). Bên cạnh đó, trên thị trường còn có các loại phân thương phẩm như: Nitragin, Rhidafo, Azotobacterin, Azogin, Dasvila, và đã thử nghiệm trên phạm vi cả nước. Đối với lúa cũng có nhiều sản phẩm VSV có hiệu quả như: nhóm nghiên cứu Phạm Thị Phấn (2010) đã thử nghiệm phân BioGro cho sản xuất lúa ở đồng bằng sông Cửu Long trên 3 vụ cho thấy: lúa thu hoạch có hạt chắc mẩy, cây ít nhiễm bệnh, ít đổ ngã tăng năng suất so với đối chứng.

Tuy nhiên, quá trình mặn hóa, phèn hóa hiện đang làm giảm rõ rệt số lượng VSV trong đất, đặc biệt là các nhóm VSV có ích như cố định nitơ, phân giải hữu cơ, phân giải lân, sinh các chất kích thích sinh trưởng thực vật, ... do đó gián tiếp làm giảm năng suất cây trồng, nhất là cây lúa. Như vậy cần phải bổ sung lại những nhóm VSV có ích này thông qua các loại phân bón VSV chức năng... Những loại phân bón chứa VSV hữu ích đã được nghiên cứu và chứng minh là có hiệu quả trên một số loại đất, với một số cây trồng tại các vùng sinh thái khác nhau. Tuy nhiên, mức độ ứng dụng của các loại phân vi sinh còn rất hạn chế, nhất là phân bón vi sinh sử dụng chuyên dùng cho cây lúa đặc biệt tại các vùng đất phèn hoặc đất mặn. Để tạo ra sự đồng bộ (giống, phân bón, kỹ thuật, thủy lợi) thì việc nghiên cứu, phát triển những loại phân bón mới, cụ thể là phân bón vi sinh chuyên dùng cho cây lúa có thể sử dụng được ở các vùng đất phèn, đất mặn là nhu cầu thiết yếu hiện nay. Việt Nam có khoảng 3 triệu hecta (ha) đất ở các vùng đồng bằng bị nhiễm mặn và nhiễm phèn, trong đó đất phèn có

khoảng gần hai triệu ha và đất mặn có khoảng hơn một triệu ha. Cả 2 nhóm đất này đang có xu thế ngày càng bị phèn hóa hoặc mặn hóa hơn dẫn đến suy giảm năng suất cây trồng, đặc biệt là cây lúa. Chính vì vậy việc khai thác sử dụng chúng một cách có hiệu quả phục vụ sản xuất lúa ngày càng trở nên cấp bách và có ý nghĩa quan trọng đối với nền kinh tế quốc dân, trong đó hai yếu tố giống và phân bón được ưu tiên. Do vậy, việc tìm kiếm các nhóm VSV hữu ích như nhóm vi khuẩn tía quang hợp (VKTQH) có khả năng cố định đạm, phân giải phosphat khó tan, sản sinh các chất kích thích sinh học chống chịu được trong điều kiện phèn và mặn là cần thiết.

Vi khuẩn tía quang hợp (VKTQH) thuộc nhóm vi khuẩn thủy sinh có khả năng sinh trưởng trong điều kiện kỵ khí bằng cách quang hợp nhưng không thải oxy như những đối tượng quang dưỡng khác (Imhoff và Trueper, 1989). VKTQH có các kiểu trao đổi chất rất linh hoạt tùy thuộc vào điều kiện sống nên chúng phân bố rộng rãi trong tự nhiên như các thủy vực nước ngọt, nước lợ, nước mặn, các kênh mương nước thải, cánh đồng lúa và còn tìm thấy chúng trong các điều kiện cực trị về nhiệt độ và pH (Imhoff and Truper, 1989). Đặc tính của tất cả các loài thuộc nhóm này là đều có chứa sắc tố quang hợp *bacteriochlorophyll* và *carotenoid* (Imhoff, 1995). Quá trình quang đồng hóa CO₂ của chúng phụ thuộc vào chất cho điện tử từ bên ngoài với thể oxy hóa khử thấp hơn nước như một số hợp chất lưu huỳnh dạng khử, nguyên tố lưu huỳnh, hydro phân tử hoặc các hợp chất hydrocarbon. Với các đặc tính trên, VKTQH được ứng dụng rộng rãi trong xử lý các nguồn nước thải từ dễ phân hủy như nước thải chế biến thực phẩm đến những nguồn nước thải khó phân hủy như nước thải công nghiệp xăng dầu, thuốc trừ sâu, diệt cỏ nước thải nhựa cao su (Madukasi *et al.*, 2011; Kantachote *et al.*, 2010, Le Thi Nhi Cong *et al.*, 2019). Sinh khối của các chủng VKTQH còn được ứng dụng trong sản xuất các chất có hoạt tính sinh học cao như ubiquinone, coenzyme Q10... (Sasikala *et al.*, 1995a). Bên cạnh đó, VKTQH được ứng dụng làm phân bón sinh học, người ta đã thử nghiệm thành công trên rất nhiều đối tượng cây hoa màu và các loại cây ăn quả nhờ khả năng cố định nitơ phân tử và sản sinh các chất kích thích sinh trưởng (Sasikala *et al.*, 1995a).

Gest và Kamen là những người đầu tiên phát hiện ra khả năng cố định nitơ phân tử ở VKTQH khi họ nghiên cứu quá trình quang hợp thải H₂ của vi khuẩn tía không lưu huỳnh *R. rubrum* (Gest và Kamen, 1949). Kết quả của những nghiên cứu sau đó đã khẳng định rằng đa số các vi khuẩn tía không lưu huỳnh và lưu huỳnh đều có thể sinh trưởng với nitơ phân tử làm nguồn nitơ duy nhất đặc biệt là khi chúng sinh trưởng ở điều kiện quang dị dưỡng (Kantha *et al.*, 2015). Cũng giống như các nhóm vi khuẩn cố định nitơ khác, enzym nitrogenase xúc tác quá trình cố định nitơ ở vi khuẩn quang hợp bao gồm hai tiểu phần: Protein-Mo (dinitrogenaza) và protein-Fe (dinitrogenaza reductaza - Rc2) (Sakpirom *et al.*, 2017). Phức hợp enzym nitrogenaza xúc tác phản ứng khử một phân tử nitơ tạo thành amoni theo phương trình phản ứng như sau (Sakpirom *et al.*, 2017)



Trong số các VKTQH, các loài thuộc họ không lưu huỳnh có khả năng cố định nitơ phân tử với tốc độ cao, trong số đó đáng kể nhất là các loài như: *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodopseudomonas viridis* và *Rubrivivax gelatinosus*. Các loài thuộc chi *Rhodospirillum* có hoạt tính cố định nitơ phân tử ở mức thấp hơn (Sakarika *et al.*, 2019). Đối với nhóm VKTQH oxy là tác nhân ức chế cả hoạt tính cố định nitơ và sự tổng hợp nitrogenaza, Tuy nhiên, một số loài thuộc chi *Rhodopseudomonas* và *Rhodobacter* có khả năng chống chịu oxy và cố định nitơ ngay cả trong điều kiện vi hiếu khí và hiếu khí (Hoffmann *et al.*, 2014). Điều này cho thấy tính linh hoạt và khả năng ứng dụng của VKTQH

trong sản xuất phân bón cho thực vật, như ứng dụng chúng làm phân bón cho các ruộng lúa nước nơi không duy trì được điều kiện kỵ khí nghiêm ngặt.

Đa số các đại diện của VKTQH có thể sinh trưởng dị dưỡng với N phân tử làm nguồn nitơ duy nhất, khả năng cố định N_2 của VKTQH khi ở ngoài sáng cao hơn so với điều kiện trong tối (Nunkaew *et al.*, 2014a; Wong *et al.*, 2014).

Vi khuẩn tía quang hợp phân bố ở những nơi có ánh sáng và dưới điều kiện nitơ khí quyển như cánh đồng lúa, chúng có thể cố định nitơ phân tử tạo ra lượng đạm dễ tiêu cho cây trồng. Với đặc tính này, VKTQH là một trong những loài chiếm ưu thế trong các ruộng lúa (Elbadry *et al.*, 1999a, b) góp phần làm tăng độ phì nhiêu nitơ do đó làm tăng năng suất lúa (Kundu và Ladha, 1997). VKTQH ngoài khả năng cố định nitơ để cung cấp chất dinh dưỡng thiết yếu cho cây trồng thì nó còn thúc đẩy tăng cường hiệu quả hấp thụ nitơ (Wong *et al.*, 2014). Điều này đã được chứng minh trong quá trình trồng lúa bằng dung dịch thủy canh có bổ sung *Rhodobacter capsulatus* DSM 155 vào các môi trường như sau: trong môi trường thiếu nitơ, hàm lượng nitơ trong rễ được phát hiện tăng 50 – 65 %, trong môi trường có bổ sung nitơ thì ảnh hưởng lên rễ không nhiều hàm lượng nitơ trong rễ chỉ tăng 1,3 -14 % (Elbadry và Elbanna, 1999). Khả năng cố định N_2 của *R. capsulatus* DSM 155 cũng được quan sát thấy khi chủng này được cấy vào trên rễ của cây lúa, làm tăng hàm lượng nitơ hạt gạo lên 7,1 % (Elbadry *et al.*, 1999a, b). Như vậy, sử dụng VKTQH làm phân bón cho lúa có thể tiết kiệm được chi phí do giảm lượng bón phân hóa học và tùy thuộc vào liều lượng VKTQH bổ sung và chi phí liên quan đến sản xuất sinh khối VKTQH.

Vi khuẩn tía quang hợp còn được biết đến với khả năng sản sinh ra các chất kích thích sinh trưởng như axit indole-3-axetic (IAA) và 5 - aminolevulinic (ALA). Axit indole-3-axetic (IAA) thuộc nhóm auxin. Auxin cần thiết và có vai trò quan trọng cho sự phát triển và tăng trưởng của thực vật. Cụ thể nó đóng vai trò trong quá trình phân chia, tăng sinh và biệt hóa tế bào (Tsavkelova *et al.*, 2006). IAA còn đóng một vai trò quan trọng trong việc kích hoạt tế bào rễ hấp thụ khoáng chất cho cây trồng (Sakpirom *et al.*, 2017). Nghiên cứu đã chỉ ra rằng IAA hỗ trợ thực vật thích ứng với điều kiện bất lợi làm tăng cường bộ rễ và chồi phát triển trong điều kiện nhiễm mặn và kim loại nặng (Sheng và Xia, 2006; Egamberdieva, 2009; Iqbal và Ashraf, 2010; Fahad *et al.*, 2015). Nhiều nhóm vi khuẩn đã được báo cáo có khả năng sản sinh IAA thông qua các con đường tổng hợp khác nhau. Các con đường indole-3-pyruvate và tryptamine được tìm thấy trong *Rhodospseudomonas* được tạo ra với nồng độ khác nhau (Spaepen *et al.*, 2007). Trong nghiên cứu của nhóm tác giả Sakpirom năm 2017 đã phân lập được chủng VKTQH có khả năng sản xuất IAA ngoại bào dưới điều kiện vi hiếu khí có chiếu sáng thu được nồng độ 0,65 – 3,6 mgIAA/l. Nhóm VKTQH có khả năng tổng hợp IAA cao được tìm thấy ở các loài phân lập từ cánh đồng lúa hoặc trầm tích sông hồ là những loài chịu được thuốc trừ sâu. Các loài phân lập từ ruộng lúa có thể tổng hợp được IAA từ 0,65 – 3,6 mg/l khi môi trường nuôi được bổ sung tiền chất tryptophan 1mM (Sakpirom *et al.*, 2017). Su và cộng sự đã nuôi cấy *Rhodospseudomonas palustris* GJ-22 trong môi trường có bổ sung tryptophan 3mM đạt nồng độ IAA 30 mg/l cao hơn đáng kể so với môi trường không bổ sung tryptophan (Su *et al.*, 2017).

Vi khuẩn tía quang hợp còn có khả năng phân giải lân khó tiêu cho cây trồng. Nhóm tác giả Rana và cộng sự 2016 đã thử nghiệm khả năng phân giải $Ca_3(PO_4)_2$, $Mg_3(PO_4)_2$ và $Zn_3(PO_4)_2$ của chủng *Rhodospirillum rubrum*, kết quả cho thấy hiệu suất phân giải $Ca_3(PO_4)_2$, $Mg_3(PO_4)_2$ đều là 100% và hiệu suất phân hủy $Zn_3(PO_4)_2$ đạt 51%. Khi sử dụng chủng *Rhodospirillum rubrum* làm phân hỗn hợp phân giải tro (cặn khoáng do đốt than giàu photpho) nhóm nghiên cứu phát hiện được nồng độ Ca^{2+} là 20mg/l, nồng độ Mg^{2+} là 10 mg/l và

nồng độ Zn^{2+} là 4 mg/l và điều này cho thấy rằng VKTQH phân giải phosphat không tạo ra những ion kim loại độc hại.

Nhóm tác giả Kantha và cộng sự đã thử nghiệm cố định chủng *Rhodopseudomonas palustris* PP803 trên chất mang bao gồm rơm rạ và tro trấu với tỷ lệ 4:1 thử nghiệm giống lúa nhạy cảm với điều kiện mặn để thử khả năng này mầm kết quả cho thấy: làm tăng sự nảy mầm của hạt ở điều kiện 0,25% muối so với đối chứng bằng cách sản sinh ra ALA và giảm lượng khí phát thải CH_4 và CO_2 . Đặc biệt không tìm thấy chất độc đối với thực vật khi sử dụng VKTQH sản sinh chất kích thích nảy mầm. Cũng trong nghiên cứu này, nhóm tác giả đã thử nghiệm trên ruộng lúa trong 10 ngày cho thấy mật độ VKTQH đạt 6,7 – 6,8 log CFU/ml và giảm phát thải 100% CH_4 và 47% CO_2 . Với các đặc điểm trên thì VKTQH có tiềm năng ứng dụng để sản xuất phân vi sinh bón cho lúa. Bón phân vi sinh chứa nhóm vi khuẩn này có tác dụng tăng năng suất và chất lượng sản phẩm cũng như giảm các tác động bất lợi của hạn mặn hay kim loại nặng gây ra, tăng sức đề kháng của cây chống lại sâu bệnh. Sử dụng phân bón dạng này còn hạn chế được bệnh thối rễ ở lúa do đất nhiễm sulfur vì các VKTQH có khả năng oxy hóa các hợp chất này tới sulfat. Nhóm tác giả Kantachote và cộng sự (2016) thử nghiệm các chủng *Rhodopseudomonas palustris* TN114, PP803 và TK103 làm phân bón sinh học để nâng cao năng suất lúa và giảm phát thải CH_4 ở cả hai loại ruộng lúa, nhóm kết luận rằng trên ruộng mặn bón phân chứa các chủng trên cho năng suất hạt cao hơn ở mức có ý nghĩa thống kê và phát hiện ra mối tương quan nghịch giữa mật độ VKTQH và mức phát thải khí CH_4 .

Điều quan trọng là ruộng lúa cung cấp các điều kiện thuận lợi cho VKTQH phát triển, đó là môi trường ngập nước thiếu khí và có chứa axetate phân hủy từ rơm rạ (Conrad, 2007) dưới ánh sáng mặt trời. Cũng trong nghiên cứu của Kantachote và cộng sự (2016), tất cả các chủng VKTQH sinh trưởng ở cả ruộng hữu cơ và ruộng mặn và đều tăng 1 logCFU/g so với đối chứng. Điều này mang lại cho VKTQH lợi thế về khả năng cạnh tranh đối với các nhóm vi sinh vật khác. VKTQH phân bố trong ruộng lúa phụ thuộc vào từng thời điểm gieo trồng (Elbadry *et al.*, 1999a, b). Cụ thể, nhóm tác giả Elbadry và cộng sự, 1999 khảo sát cho thấy quần thể VKTQH tăng lên sau khi cấy lúa, đạt đến số lượng tối đa ở giai đoạn đẻ nhánh và giảm dần cho đến thời điểm thu hoạch. Do đó, VKTQH được khuyến cáo nên bổ sung sớm vào chu kỳ sản xuất lúa để cho năng suất cao hơn (Elbadry *et al.*, 1999a, b).

Do vậy, sử dụng phân vi sinh từ nhóm VKTQH này có lợi ích là bón cho lúa trồng ở mọi loại đất bao gồm nhiễm mặn cũng như nhiễm phèn. Điểm khác biệt của nhóm VKTQH sử dụng làm phân bón khác các nhóm vi khuẩn khác là có thể sinh trưởng được trong điều kiện ruộng nhiễm mặn cũng như nhiễm phèn. Với tất cả các đặc điểm trên VKTQH có tiềm năng ứng dụng trong sản xuất phân bón cho cây trồng đặc biệt cho lúa góp phần tăng năng suất, giảm sử dụng phân bón hóa học, tăng chất lượng sản phẩm và xu hướng phát triển thành nông nghiệp hữu cơ.

Chi *Rhodobacter* và các đặc tính của chúng:

Chi *Rhodobacter* thuộc họ *Rhodobacteraceae* thuộc lớp *Alphaproteobacteria* trong ngành *Proteobacteria*. Tại thời điểm này, chi *Rhodobacter* gồm 25 loài đã được công nhận.

Tế bào của các loài trong chi này có dạng hình cầu, 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 carotenoit 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.

Rhodobacter capsulatus đã được nghiên cứu là loài linh hoạt nhất, dễ dàng chuyển đổi giữa các con đường trao đổi chất tùy theo môi trường sống của chúng. Loài này sinh trưởng quang dưỡng bằng cách sử dụng các hợp chất hữu cơ khi có ánh sáng. Trong điều kiện tối chúng có thể sinh trưởng bằng cách hóa dưỡng hoặc lên men (Jung & Jung, 2009). Dịch nuôi cấy của loài này trong điều kiện kỵ khí có chiếu sáng thường có màu nâu vàng đến màu nâu đậm, thậm chí có một số loài có màu hơi xanh. Khi nuôi cấy chúng trong môi trường có oxy thì chúng có màu đỏ đến đỏ tía.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn tía quang hợp *Rhodobacter capsulatus* GT10 thuần khiết về mặt sinh học có khả năng cố định nitơ phân tử, phân giải phosphat khó tan, sản sinh chất kích thích sinh trưởng IAA ở nồng độ muối từ 0 – 3% và pH từ 4-9. Chủng này có tiềm năng ứng dụng làm phân bón cho lúa ở những vùng đất đang bị mặn hóa và phèn hóa, nơi mà các nhóm vi sinh vật có khả năng làm phân bón khó tồn tại và phát triển.

Chủng vi khuẩn theo sáng chế được phân lập từ mẫu đất lấy từ ruộng lúa nhiễm mặn (sau sạ 1,5 tháng) ven đê biển tại Giao Thủy, Nam Định. Trong đó, chủng vi khuẩn tía quang hợp có trình tự gen 16S rARN với kích thước 1321 bp có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 và được đăng ký trên ngân hàng gen với mã số LC791252.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ kèm theo

Fig. 1 thể hiện hình thái khuẩn lạc của chủng vi khuẩn tía quang hợp GT10

Fig. 2 thể hiện hình thái tế bào của chủng GT10 được nuôi cấy trên môi trường DSMZ-27 thạch dưới kính hiển vi điện tử quét với độ phóng đại 20.000 lần và 15.000 lần

Fig. 3 thể hiện phổ hấp thụ dịch huyền phù tế bào nguyên chủng GT10

Fig. 4 thể hiện sản phẩm PCR nhân lên từ ADN tổng số của chủng GT10 bởi cặp mồi 27F/1527R thông qua điện di trên gel agarosa 1%

Fig. 5 thể hiện cây phát sinh chủng loài của chủng vi khuẩn tía quang hợp GT10

Fig. 6 thể hiện khả năng cố định nitơ phân tử trong điều kiện có độ mặn và pH khác nhau (màu vàng thể hiện sự bắt màu của NH_4^+ với thuốc thử Nessler); A, B khả năng tạo ra NH_4^+ của chủng GT10 ở các nồng độ muối khác nhau, A là điều kiện vi hiếu khí, sáng, B là điều kiện hiếu khí, tối; C, D khả năng tạo ra NH_4^+ của chủng GT10 ở các pH khác nhau, C là điều kiện vi hiếu khí, sáng, D là điều kiện hiếu khí.

Fig. 7 thể hiện khả năng phân giải phosphat khó tan trong điều kiện độ mặn và pH khác nhau: A, B khả năng phân giải phosphat khó tan thành dạng dễ tiêu (bắt màu xanh với thuốc thử Molybdate) ở các pH khác trong điều kiện vi hiếu khí, sáng (A) và hiếu khí tối (B); C, D khả năng phân giải phosphat khó tan thành dạng dễ tiêu ở độ muối khác nhau trong điều kiện vi hiếu khí, sáng (C) và hiếu khí tối (D).

Fig. 8 thể hiện khả năng sinh IAA trong điều kiện độ mặn và pH khác nhau. thể hiện khả năng sinh IAA trong điều kiện độ mặn và pH khác nhau (màu đỏ tía thể hiện sự bắt màu của IAA với thuốc thử Salkowski): A, B-khả năng sinh IAA ở các nồng độ muối khác nhau trong điều kiện vi hiếu khí, sáng (A) và hiếu khí tối (B); C, D khả năng sinh IAA ở các pH khác nhau trong điều kiện vi hiếu khí, sáng (C) và hiếu khí tối (D)

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn tía quang hợp *Rhodobacter capsulatus* GT10 thuần khiết về mặt sinh học phân lập từ mẫu đất lấy từ ruộng lúa nhiễm mặn (sau sạ 1,5 tháng) ven đê biển tại Giao Thủy, Nam Định.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chủng *Rhodobacter capsulatus* GT10 được nuôi cấy để đánh giá khả năng cố định nitơ phân tử, phân giải phosphat khó tiêu và sản sinh chất kích thích sinh trưởng IAA. Đồng thời sáng chế cũng đề cập đến khả năng chống chịu được các điều kiện mặn hóa và phèn hóa.

A. Phân lập và định danh chủng vi khuẩn tía quang hợp *Rhodobacter capsulatus* GT10

Mẫu đất lấy từ ruộng lúa giai đoạn sau sạ 1,5 tháng tại ruộng lúa nhiễm mặn ven đê biển Giao Thủy, Nam Định 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. Các bình này được đậy kín và ủ dưới ánh sáng đèn sợi đốt cường độ sáng ~ 3000 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 VKTQH). 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 ~ 3000 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 cố định nitơ phân tử, phân giải phosphat khó tan và sản sinh chất kích thích sinh trưởng IAA. 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); succinate - Na (1 g/l); acetate (0,5 g/l); K_2HPO_4 (1g/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); NaCl (20 g/l); Na_2S (10mgS); nước cất (đến 1000 ml); 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), nước cất 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 $121^\circ C$ trong 30 phút.

Kết quả đã phân lập được chủng vi khuẩn tía quang hợp GT10. Phân loại sơ bộ chủng vi khuẩn GT10 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 GT10 như sau: khuẩn lạc có dạng thạch (Fig. 1). Mô tả chi tiết hình thái khuẩn lạc của chủng GT10 như sau: khuẩn lạc có hình tròn, bề mặt lồi, trơn, bóng, rìa trong, màu đỏ nâu, $d = 0,9-1,2$ mm. Dịch huyền phù tế bào có màu đỏ nâu. Tế bào của chúng có dạng hình trứng tồn tại ở dạng đơn bào, kích thước tế bào từ chiều rộng 0,6- 0,7 μm , chiều dài 0,9 – 1,250 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 VKTQH với các vi sinh vật quang dưỡng khác là khả năng tổng hợp các loại *bacterioclorophin* (Bchl) khi được chiếu sáng. Chủng GT10 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 GT10 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 GT10 có cực đại hấp thụ bước sóng 807 và 872 nm. Cực đại hấp thụ dịch huyền phù tế bào của chủng GT10 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 GT10 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 GT10 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 chủng 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 1 trình bày kết quả so sánh khả năng sử dụng các nguồn cacbon khác nhau của chủng GT10 với một số loài thuộc chi *Rhodobacter*.

Kết quả trên Bảng 1 cho thấy, GT10 có tế bào hình trứng với kích thước chiều rộng 0,6- 0,7 μ m, chiều dài 0,9 – 1,250 μ m, sinh trưởng bằng cách phân đôi; màu sắc dịch nuôi cấy có màu nâu vàng (điều kiện kỵ khí) và đến đỏ nâu (điều kiện vi hiếu khí). Có khả năng sinh trưởng ở dải pH từ 4-9,0 và tối ưu ở 6,8 - 7,0. Chủng GT10 thuộc nhóm ưa nhiệt, sinh trưởng tối ưu ở 30-35°C và giải nhiệt độ sinh trưởng là từ 14-45°C. Chủng GT10 không có nhu cầu muối cho sinh trưởng nhưng có thể sinh trưởng trong môi trường với nồng độ NaCl từ 0-3%. Chủng này có khả năng sinh trưởng trên môi trường có chứa axetat, succinat, xitrat, fomat, glucoza, manitol, socbitol, propionat, sunphit. Chúng không sinh trưởng được trên môi trường chứa tactat, glycerol, methanol, ethanol. Khả năng sử dụng nguồn cacbon của chủng GT10 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 ethanol và *Rba. capsulatus* không có khả năng sử dụng tactate, glyxerol và ethanol làm nguồn cacbon (Girija và cộng sự., 2010). So sánh khả năng sử dụng nguồn cacbon và các đặc điểm sinh học chủng GT10 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. capsulatus* vì chúng không có khả năng sử dụng tactat, glycerol, methanol và ethanol. Đồng thời, chủng GT10 có nhiều điểm tương đồng về các đặc tính sinh lí sinh hóa khác với loài *Rba. capsulatus*.

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 GT10 có thể được xếp vào chi *Rhodobacter* (Bergey, 2001; Girija và cộng sự., 2010).

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'-ACGGCTACCTTGTTACGACT -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 GT10 (Fig. 4) đã được xác định trình tự có kích thước 1321 nucleotit và có mức độ tương đồng 99,12 % với trình tự tương ứng của chủng *Rhodobacter capsulatus* ATCC11166 (D16428.1). Trình tự đoạn gen của chủng GT10 đã được đăng ký trên Genbank với mã số LC791252. Mối quan hệ phát sinh chủng loài của chủng GT10 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 GT10 thuộc chi *Rhodobacter* và thuộc loài *Rhodobacter capsulatus* được đặt tên là *Rhodobacter capsulatus* GT10.

Tên chủng “GT10”, trong phạm vi bản mô tả này, vẫn được sử dụng để chỉ chủng *Rhodobacter capsulatus* GT10 vừa được định tên trên đây.

Chủng *Rhodobacter capsulatus* GT10 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 với mã số CNSHMT 100.

Bảng 1. So sánh khả năng sử dụng một số nguồn cacbon của chủng GT10 với một số loài thuộc chi *Rhodobacter*
(Girija và cộng sự, 2010; Kumar và cộng sự, 2009)

Đặc điểm	GT10	<i>Rba. capsulatus</i>	<i>Rba. veldkampii</i>	<i>Rba. vinaykumarii</i>	<i>Rba. blasticus</i>	<i>Rba. azotoformans</i>	<i>Rba. sphaeroides</i>
Hình dạng tế bào	Hình trứng	Hình trứng, que ngắn, tạo chuỗi	Hình trứng, que ngắn	Hình que ngắn	Hình trứng, que ngắn	Hình trứng, que ngắn	Hình trứng, tròn
Chiều rộng tế bào (µm)	0,6 – 0,7	0,5 – 1,2	0,6-0,8	0,8- 1,2	0,6- 0,8	0,6 -1,0	2,0 – 2,5
Chiều dài tế bào (µm)	0,9 – 1,2	2,0 – 2,5	1,0-1,3	1,5- 3,0	1,0 -2,5	0,9 -1,5	2,5-3,5
Khả năng CĐ		Chuyển động	Không chuyển động		Chuyển động		
Màu sắc dịch nuôi		Vàng nâu đến đỏ tía	Vàng nâu	Vàng nâu	Cam nâu	Vàng nâu	Xanh vàng
pH Tối ưu	Đỏ nâu	7,0	7,5	6,0-7,5	6,5-7,5	7,0-7,5	7,0
- Dải pH	6,8- 7 4-9	6,0-8,5		6,0-8,0		6,0-8,0	6,5-7,5
Nhiệt độ tối ưu	30-35	30-3	30-35	20-30	30-35	30-35	30-34
Đồng hóa sunphat	+	+	-	+	+	+	+
Phân nitrat	-	-	-	-	-	+	±
Nguồn cacbon cho sinh trưởng							
Axetat	+	+	+	+	+	+	+
Succinat	+	+	+	+	+	+	+
Focmat	+	+	-	-	-	+	-
Tactat	-	-	-	-	-	-	+
Xitrat	+	±	-	-	+	-	+
Glycerol	-	-	-	-	+	+	+
D-Glucoza	+	+	+	+	+	+	+
Methanol	-	-	±	-	-	-	±
Ethanol	-	-	-	-	-	-	+
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)

B. Đánh giá khả năng cố định nitơ phân tử của chủng GT10

Chủng GT10 sau khi phân lập được tiến hành đánh giá khả năng cố định N_2 và một số yếu tố ảnh hưởng đến quá trình cố định N_2

Chủng GT10 được nuôi cấy trên môi trường khoáng không chứa nguồn nitơ với nồng độ giống bổ sung 10% (v/v) (mật độ tế bào trong các bình nuôi giống đạt mật độ khoảng 10^9 CFU/ml), các bình thí nghiệm được đậy nắp cao su, đôi chứng chỉ chứa môi trường không bổ sung chủng GT10, khí nitơ được sục để hòa tan vào môi trường khoảng 17-20 mg/L trong điều kiện 25 – 35 °C. Các bình nuôi cấy được ủ ở 2 điều kiện: vi hiếu khí sáng và hiếu khí tối. Trong điều kiện vi hiếu khí, cường độ chiếu sáng 3000 lux và nhiệt độ phòng 25 – 30 °C, cả hai điều kiện được thử nghiệm trong 48 giờ. Sau đó, dịch nuôi cấy được ly tâm ở tốc độ 8000 vòng/phút trong 15 phút để thu được dịch nổi phía trên để đánh giá hàm lượng NH_4^+ tạo ra trong môi trường bằng thuốc thử Nessler (Sakpirom *et al.*, 2016). Môi trường nuôi cấy VKTQH cố định nitơ phân tử không chứa nguồn nitơ bao gồm các thành phần sau: CH_3COONa (1 g/l), K_2HPO_4 (0,9g/l), KH_2PO_4 (0,6 g/l), $MgSO_4.7H_2O$ (0,2 g/l), $CaCl_2.2 H_2O$ (0,01g/l), $Na_2MoO_4.2H_2O$ (0,01g), $FeSO_4$ (0,02g), $MnCl_2.2H_2O$ (2,8 mg) $ZnSO_4. 7H_2O$ (0,75 mg); $CuCl_2.2H_2O$ (0,024 mg) H_3BO_3 (0,016 mg), EDTA (0,018g) và 0,001 g biotin, nước cất (1000 ml) pH (6,8 - 7).

Thuốc thử Nessler: Pha 10g KI trong 10ml nước cất, thêm từ từ dung dịch $HgCl_2$ bão hòa đến khi xuất hiện tủa đỏ bền. Bổ sung 30 g KOH, thêm 10ml dung dịch $HgCl_2$ bão hòa, thêm nước cất đến thể tích cuối cùng là 200ml. Để dung dịch trong chai tối màu qua đêm, sau đó lọc lấy phần dung dịch trong, bảo quản trong chai tối màu có nút nhám.

Để phân tích hàm lượng NH_4^+ tạo ra trong môi trường, tiến hành dựng đồ thị chuẩn biểu diễn sự tương quan giữa độ hấp thụ ánh sáng và nồng độ amoni từ dung dịch chuẩn với các nồng độ.

Phân tích mẫu: tiến hành hút 2ml dịch nổi của các mẫu thu được sau ly tâm vào các lọ penicillin, sau đó bổ sung 0,16 ml dung dịch Nessler (nếu dịch có nồng độ cao có thể pha loãng mẫu để có nồng độ thích hợp) và lắc đều, để yên 15 phút dung dịch sẽ chuyển sang màu vàng nhạt hay đậm tùy thuộc nồng độ NH_4^+ có trong dung dịch. Sau đó định lượng amoni bằng cách đo độ hấp thụ ở A_{420} trên máy quang phổ kế. Dựa trên đồ thị chuẩn để xác định hàm lượng amoni trong mẫu.

Khả năng cố định nitơ phân tử của chủng GT10 được thể hiện trên Bảng 2

Bảng 2: Khả năng cố định nitơ phân tử của chủng GT10 ở hai điều kiện nuôi cấy

Tên chủng	Hàm lượng NH_4^+ tạo thành sau 48 h (mg/L)	
	Vi hiếu khí, có chiếu sáng	Hiếu khí, tối
GT10	4,34±0,85	4,05±0,56

Từ Bảng 2 cho thấy chủng GT10 có khả năng cố định N_2 rất linh hoạt và khá cao cũng tương đương với các chủng VKTQH mà nhóm tác giả Nookongbut và cộng sự phân lập được từ vùng rừng đầm lầy than bùn tại Thái Lan năm 2019. So với các chủng VKTQH, nhóm Sakpirom và cộng sự phân lập từ cánh đồng lúa thì các chủng GT10 có khả năng cố định N_2 cao hơn sau 48 h ở điều kiện vi hiếu khí sáng. So với nghiên cứu của Nguyễn Thị Thu Hằng và cộng sự (2015), trong môi trường Ashby lỏng có bổ sung 2% glucose, pH 7, nuôi cấy ở 30° C trong 72 giờ, đã tuyển chọn được 2 chủng thuộc chi *Azotobacter* kí hiệu AZT1 và AZT7 có khả năng cố định nitơ tương ứng là 3,36 và 3,32 mg NH_4^+ /L, thì chủng VKTQH GT10 có khả năng cố định nitơ cao

hơn với khả năng sinh NH_4^+ đều đạt hàm lượng trên 4 mg/ml. Theo nghiên cứu của Thái Thành Được và cộng sự năm 2022 đã sàng lọc 25 chủng trên môi trường Nfb lỏng không chứa nguồn nitơ sau 48h các chủng vi khuẩn cố định đạm phân lập từ rễ cây bắp đều có khả năng tổng hợp NH_4^+ dao động cao nhất đạt 4,33 mg NH_4^+ /L. Khả năng tổng hợp này tương đương với khả năng tổng hợp chủng vi khuẩn tía quang hợp GT10.

Như vậy, từ các kết quả trên Bảng 2 cho thấy chủng GT10 có khả năng cố định N_2 rất linh hoạt ở cả hai điều kiện vi hiếu khí, sáng và hiếu khí tối điều kiện này nhiều nhóm vi khuẩn cố định nitơ trong đất không thực hiện được, chủng GT10 phù hợp với điều kiện thực tiễn khi làm phân bón cho lúa. Do trên cánh đồng lúa, điều kiện kỵ khí trong đất và nước không được duy trì hoàn toàn ngay cả khi đất ngập nước.

Hiện nay, Việt Nam có khoảng hơn 1 triệu ha đất nhiễm mặn và ngày càng có xu hướng gia tăng, điều này làm suy giảm năng suất cây trồng và giảm sự đa dạng vi sinh vật trong đất, và đặc biệt khi bón phân vi sinh có nhiều chủng không tồn tại và sinh trưởng trên đất nhiễm mặn. nhằm ứng dụng cho những vùng nhiễm mặn, chủng GT10 được tiến hành đánh giá ảnh hưởng của nồng độ muối lên khả năng cố định N_2 . Chủng GT10 được nuôi cấy trong môi trường khoáng không chứa nguồn nitơ và bổ sung muối ở các nồng độ khác nhau. Kết quả về khả năng cố định N_2 thành NH_4^+ (mg/L) sau 48 h thể hiện trên Bảng 3.

Bảng 3: Khả năng cố định nitơ phân tử của chủng GT10 ở các nồng độ muối khác nhau

Nồng độ muối NaCl	0%	0,5%	1%	1,5%	2%	2,5%	3%
Vi hiếu khí, sáng	4,08±0,65	4,15±0,80	4,22±0,82	4,37±0,76	4,45±0,77	4,55±0,88	4,63±0,67
Hiếu khí, tối	3,58±0,77	3,65±0,68	3,75±0,75	3,76±0,85	3,95±0,83	4,13±0,95	4,35±0,81

Kết quả từ Bảng 3 cho thấy chủng vi khuẩn tía quang hợp GT10 có thể sinh trưởng và cố định N_2 khá tốt với nồng độ muối từ 0 – 3% ở cả hai điều kiện vi hiếu khí có chiếu sáng và hiếu khí, tối. Chủng này khi bổ sung muối đến 3% đều có khả năng cố định nitơ cao hơn khi không bổ sung muối.

Theo Mack và cộng sự (1993) vi khuẩn tía quang hợp có thể sống được trong môi trường nước biển có độ mặn cao, có loài có độ mặn lớn hơn 80‰. Khả năng chịu mặn tốt là một trong những đặc điểm nổi bật của các chủng VKTQH so với các chủng VSV khác, vừa có khả năng sinh trưởng tốt trong điều kiện môi trường nhiễm mặn xong lại có khả năng cố định nitơ phân tử, sinh NH_4^+ với hàm lượng cao. Như vậy chủng VKTQH GT10 có thể ứng dụng để sản xuất phân bón vi sinh cho lúa nước và đặc biệt có thể ứng dụng làm phân bón cho các địa phương có đất canh tác ven biển bị nhiễm mặn.

pH là một trong những yếu tố môi trường quan trọng ảnh hưởng đến sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn tía quang hợp. Chủng GT10 cũng được tiến hành đánh giá khả năng cố định N_2 ở các pH khác nhau. Kết quả hàm lượng NH_4^+ (mg/L) tạo ra trong môi trường ở các pH khác nhau thể hiện trên Bảng 4.

Bảng 4: Khả năng cố định nitơ phân tử của chủng GT10 ở các độ pH khác nhau

pH	4	5	6	6,5	7	8	9
Vi hiếu	5,17±0,55	5,35±0,60	4,12±0,73	4,17±0,66	4,15±0,71	3,70±0,76	2,55±0,45

khí, sáng							
Hiếu khí, tối	4,68±0,57	4,15±0,65	3,90±0,45	3,96±0,70	3,90±0,53	2,87±0,44	2,08±0,31

Kết quả từ Bảng 4 cho thấy chủng GT10 có khả năng cố định N_2 ở phổ khá rộng từ pH 4 – 9 ở cả hai điều kiện vi hiếu khí, có chiếu sáng và điều kiện hiếu khí, tối. Ở mỗi giá trị pH khác nhau chủng GT10 có khả năng cố định N_2 khác nhau và chủng này có khả năng cố định N_2 mạnh nhất trong môi trường axit. Trong khi đó, rất nhiều nhóm vi khuẩn khác khó sinh trưởng và cố định N_2 trong môi trường có pH 4 và 5. Nghiên cứu của Nguyễn Thị Thu Hằng và cộng sự (2015) chỉ ra rằng trong điều kiện môi trường có pH 4 và pH 5 thì các chủng thuộc chi *Azotobacter* (AZT1 và AZT7) không có khả năng cố định nito, khả năng cố định nito của các chủng này tốt nhất là pH 6-8. Điều này cho thấy đặc điểm nổi bật của chủng GT10 so với các nhóm VSV có khả năng cố định nito khác là khả năng chống chịu tốt trong các điều kiện pH môi trường khác nhau, đặc biệt là trong môi trường đất bị chua, phèn (môi trường axit). Đây được coi là một trong những ưu điểm nổi bật trong ứng dụng sản xuất phân bón vi sinh không chỉ sử dụng trên đồng ruộng có pH trung tính mà còn trên đồng ruộng tại các địa phương bị nhiễm phèn, nhiễm axit.

C. Đánh giá khả năng phân giải phosphat khó tan của chủng GT10

Chủng GT10 được tiến hành đánh giá khả năng phân giải phosphat khó tan bằng cách nuôi chủng trong môi trường Pikovskaya cải tiến dạng dịch chứa các nguồn lân khó tan như $Ca_3(PO_4)_2$, $FePO_4$ và $AlPO_4$ nồng độ 5g/L, giống VKTQH chủng GT10 bổ sung 10% (v/v) (mật độ tế bào trong bình nuôi giống chủng GT10 đạt mật độ khoảng 10^9 CFU/ml), các bình thí nghiệm được đậy nắp cao su, đối chứng chỉ chứa môi trường không bổ sung chủng GT10. Thí nghiệm được tiến ở 2 điều kiện: vi hiếu khí sáng và hiếu khí tối. Trong điều kiện vi hiếu khí, cường độ chiếu sáng 3000 lux và nhiệt độ phòng 25 – 30 °C. Hàm lượng phosphat dễ tiêu trong môi trường trong môi trường nuôi được xác định bằng phương pháp hiện màu Molybdate. Kết quả đánh giá khả năng hòa tan các dạng lân khó tan trong 7 ngày được thể hiện trên Bảng 5.

Bảng 5: Khả năng phân giải photphat khó tan của chủng GT10 ở hai điều kiện nuôi cấy trong môi trường chứa các nguồn phosphat hòa tan khác nhau

Tên chủng	Hàm lượng lân hòa tan (P_2O_5) trong điều kiện vi hiếu khí, sáng (mg/L)			Hàm lượng lân hòa tan trong điều kiện Hiếu khí, tối P_2O_5 (mg/L)		
	$Ca_3(PO_4)_2$	$AlPO_4$	$FePO_4$	$Ca_3(PO_4)_2$	$AlPO_4$	$FePO_4$
GT10	51,4±3,85	35,67±3,37	75,05±4,56	27,5±3,67	18,4±3,67	40,14±2,3

Kết quả từ Bảng 5 cho thấy chủng GT10 có khả năng hòa tan phosphat khó tan ở cả hai điều kiện vi hiếu khí, sáng và hiếu khí tối. Tại thời điểm thu mẫu, chủng GT10 hòa tan phosphat dạng $Ca_3(PO_4)_2$ trong môi trường Pikovskaya cải tiến dạng lỏng là cao nhất, kế đến là nghiệm thức chứa nguồn phosphat dạng $FePO_4$ và sau cùng là nghiệm thức chứa nguồn phosphat dạng $AlPO_4$. Ở hầu hết các thời điểm khảo sát có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) được tìm thấy khi so sánh về lượng phosphat hòa tan trong môi trường nuôi cấy lỏng chứa các nguồn phosphat khó tan khác nhau. Hai nguồn $FePO_4$ và $AlPO_4$ là hai nguồn phosphat khó tan trong đất đặc biệt là những vùng đất nhiễm phèn. Kết quả này cho thấy chủng GT10 có thể hòa tan hai nguồn $FePO_4$ và $AlPO_4$ trong đất phèn có ý nghĩa hết sức quan trọng giúp cây lúa vượt qua bất lợi về sự thiếu hụt phosphat trong điều kiện đất nhiễm phèn.

Chủng GT10 còn được tiến hành đánh giá khả năng sinh trưởng và phân giải phosphat khó tan ở các nồng độ muối khác nhau từ 0-3%. Thí nghiệm được tiến hành trên môi trường Pikovskaya cải tiến dạng lỏng. Kết quả sau 7 ngày nuôi cấy chủng GT10 được thể hiện trên Bảng 6.

Bảng 6: Khả năng sinh trưởng và phân giải phosphat khó tan của chủng GT10 ở các nồng độ muối khác nhau

Nồng độ muối (%)	Vi hiệu khí, sáng		Hiệu khí, tối	
	ΔOD_{800}	P_2O_5 (mg/L)	ΔOD_{800}	P_2O_5 (mg/L)
0	2,15 $\pm$ 0,23	58,8 $\pm$ 3,6	1,03 $\pm$ 0,12	39,8 $\pm$ 2,6
0,5	2,10 $\pm$ 0,21	59,1 $\pm$ 3,2	1,05 $\pm$ 0,14	45,1 $\pm$ 1,8
1	2,11 $\pm$ 0,18	60,2 $\pm$ 2,9	1,11 $\pm$ 0,11	45,9 $\pm$ 1,9
1,5	2,27 $\pm$ 0,24	62,7 $\pm$ 3,7	1,15 $\pm$ 0,15	61,7 $\pm$ 2,7
2	2,08 $\pm$ 0,17	59,0 $\pm$ 2,1	0,93 $\pm$ 0,20	40,5 $\pm$ 2,1
2,5	1,95 $\pm$ 0,19	43,5 $\pm$ 2,8	0,87 $\pm$ 0,17	33,5 $\pm$ 1,8
3	1,67 $\pm$ 0,25	37,6 $\pm$ 2,6	0,75 $\pm$ 0,18	31,6 $\pm$ 1,3

Kết quả cho thấy, với nồng độ muối từ 0 – 3% chủng VKTQH GT10 có khả năng sinh trưởng và phân giải phosphat khó tan khá tốt, tuy nhiên, ở mỗi nồng độ muối khác nhau khả năng hòa tan phosphat khác nhau. Chủng GT10 cho thấy khả năng sinh trưởng cũng như hòa tan phosphat cao nhất ở nồng độ muối 1,5%. Như vậy, chủng này có khả năng sinh trưởng và hòa tan phosphat đến 3%. Tuy nhiên, nồng độ muối bổ sung cao hơn 2,5 % sẽ dẫn đến việc giảm khả năng hòa tan của chủng GT10. Kết quả cho thấy nồng độ muối 0 – 2% là nồng độ muối mà chủng GT10 có thể sinh trưởng và hòa tan phosphat tốt nhất. Do vậy, chủng GT10 có tiềm năng ứng dụng ở những vùng trồng lúa bị nhiễm mặn nhằm giúp cung cấp lượng lân hữu dụng vốn đã bị bất động trong đất cho cây lúa sinh trưởng và phát triển tốt.

Chủng vi khuẩn tia quang hợp GT10 được tiến hành đánh giá khả năng phân giải phosphat khó tan trong môi trường Pikovskaya cải tiến, ở các pH khác nhau từ 4 – 9, thí nghiệm được lặp lại 3 lần, sau 7 ngày nuôi cấy kết quả được thể hiện trên Bảng 7.

Bảng 7: Khả năng phân giải phosphat khó tan của chủng GT10 ở các pH khác nhau

pH	Vi hiệu khí, sáng		Hiệu khí, tối	
	ΔOD_{800}	P_2O_5 (mg/L)	ΔOD_{800}	P_2O_5 (mg/L)
4	0,55 $\pm$ 0,11	18,3 $\pm$ 1,6	0,39 $\pm$ 0,10	14,8 $\pm$ 1,9
5	1,36 $\pm$ 0,20	39,1 $\pm$ 1,8	0,88 $\pm$ 0,20	24,1 $\pm$ 1,8
6	1,87 $\pm$ 0,15	59,6 $\pm$ 2,0	0,90 $\pm$ 0,17	28,2 $\pm$ 2,0
7	2,21 $\pm$ 0,12	57,0 $\pm$ 2,3	1,01 $\pm$ 0,15	35,5 $\pm$ 1,7
8	2,05 $\pm$ 0,20	44,5 $\pm$ 2,5	1,05 $\pm$ 0,12	37,5 $\pm$ 1,8
9	1,47 $\pm$ 0,18	39,6 $\pm$ 1,6	0,89 $\pm$ 0,14	22,6 $\pm$ 1,3

Kết quả cho thấy chủng GT10 có khả năng sinh trưởng và phân giải phosphat khó tan từ pH 4 – 9, tuy nhiên, ở mỗi mức pH khác nhau thì sinh trưởng và khả năng hòa tan khác nhau. Chủng GT10 có khả năng hòa tan lân cao nhất ở pH 6 – 7. Ở pH 4 chủng GT10 sinh trưởng yếu hơn nhưng vẫn hòa tan phosphat khó tan, ở pH 5 chủng GT10 có khả năng sinh trưởng và phân giải phosphat khó tan khá tốt. Như vậy, chủng GT10 có khả năng ứng dụng hòa tan nguồn lân khó tiêu cho những vùng đất trồng lúa nhiễm phèn ở Việt Nam thường dao động từ pH 5 - 6, thậm chí một số vùng có pH 4.

D. Đánh giá khả năng sản sinh chất kích thích sinh trưởng IAA của chủng GT10

Chủng GT10 còn được tiến hành đánh giá khả năng sản sinh chất kích thích sinh trưởng IAA bằng cách bằng cách nuôi chủng trong môi trường GA cải tiến với nồng độ giống bổ sung 10% (v/v) (mật độ tế bào trong bình nuôi giống GT10 đạt mật độ khoảng 10^9 CFU/ml), các bình thí nghiệm được đậy nắp cao su, đối chứng chỉ chứa môi trường không bổ sung chủng GT10. Thí nghiệm được tiến ở 2 điều kiện: vi hiếu khí sáng và hiếu khí tối. Trong điều kiện vi hiếu khí, cường độ chiếu sáng 3000 lux và nhiệt độ phòng 25 – 30 °C. Hàm lượng IAA sản sinh trong môi trường nuôi được xác định bằng phương pháp Salkowski cải tiến. Dịch nuôi VKTQH được ly tâm ở 8000 vòng/phút trong 10 phút. Hút 1 ml dung dịch sau ly tâm vào các lọ penicilin sau đó thêm 2 ml thuốc thử Salkowski và ủ trong bóng tối (30°C, 10 phút). Tiến hành đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 530 nm. Từ các kết quả OD₅₃₀ và đồ thị chuẩn IAA, hàm lượng IAA sinh ra được xác định. Sau 5 ngày nuôi cấy, kết quả thu được trình bày trên Bảng 8.

Môi trường nuôi VKTQH sinh chất kích thích sinh trưởng IAA là môi trường GA cải tiến có các thành phần như sau: 5,44 g sodium acetate monohydrate, 1 M tryptophan, 1,0 g cao nấm men; 0,5 g KH₂PO₄; 0,5 g K₂HPO₄; 0,8 g (NH₄)₂HPO₄; 0,2 g MgSO₄ 7H₂O; 53 mg CaCl₂ 2H₂O; 1,2 mg CoCl₂ 6H₂O; 1,2 mg MnSO₄ 5H₂O; 0,01 mg biotin; 2,5 mg C₆H₅FeO₇ và 1 mg nicotinic axit trong 1000 mL nước cất (pH 7.0).

Thuốc thử Salkowski gồm các thành phần sau: 15 ml (FeCl₃) 0,5 M; 300 ml H₂SO₄ 98%, 500 ml nước cất.

Bảng 8: Khả năng sản sinh IAA của chủng GT10 ở hai điều kiện nuôi cấy

Tên chủng	Hàm lượng IAA tạo thành (µg/ml)		ΔOD800	
	Vi hiếu khí, sáng	Hiếu khí, tối	Vi hiếu khí, sáng	Hiếu khí, tối
GT10	205,4±5,85	140,05±4,56	2,5±0,5	1,14±0,3

Kết quả từ Bảng 5 cho thấy: chủng GT10 có khả năng sinh trưởng tốt và sản sinh IAA khá cao ở cả hai điều kiện nuôi. Tuy nhiên, ở điều kiện tối ưu là vi hiếu khí sáng thì chủng sinh trưởng tốt cũng như tích lũy IAA cao, ở điều kiện hiếu khí, tối thì sinh trưởng và sản sinh IAA thấp hơn. So với các loài thuộc chi *Enterobacteria*, *Azotobacteria* và *Pseudomonas* phân lập từ vùng đất rẫy lúa tại Colombia của nhóm nghiên cứu Torres và cộng sự (2000) sản sinh IAA cao nhất là 32,2 µg/ml, thì khả năng sản sinh IAA của chủng GT10 cao hơn gấp khoảng 6 lần. Theo nghiên cứu của Nguyễn Thị Phương Oanh và cộng sự (2013), đã phân lập được các chủng có hàm lượng IAA cao nhất đạt 42,14 µg/ml. Nhóm tác giả Nguyễn Thị Thu Hằng và cộng sự (2015) đã tuyển chọn được 2 chủng *Azotobacter* kí hiệu AZT1 và AZT7 có khả năng sinh IAA tương ứng là 10,72 µg/ml và 11,52 µg/ml. Như vậy, chủng GT10 có khả năng sản sinh IAA cao hơn từ 4,5 – 16 lần và chủng GT10 có tiềm năng trong sử dụng làm phân bón kích thích sinh trưởng cho lúa.

Chủng GT10 được tiến hành đánh giá khả năng sinh trưởng và sản sinh IAA ở các nồng độ muối từ 0 – 3%. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, sau 5 ngày nuôi cấy kết quả được thể hiện trên Bảng 9.

Bảng 9: Khả năng sinh trưởng và sản sinh IAA của chủng GT10 ở các nồng độ muối khác nhau

Nồng độ muối (%)	Vi hiếu khí, sáng		Hiếu khí, tối	
	ΔOD800	IAA (µg/ml)	ΔOD800	IAA (µg/ml)

0	2,5±0,4	207,8±5,6	1,0±0,2	139,8±4,6
0,5	2,7±0,5	253,1±6,8	1,1±0,2	142,1±4,8
1	2,6±0,3	260,2±5,9	1,0±0,3	145,2±3,9
1,5	2,7±0,6	280,7±7,7	0,9±0,1	151,7±4,7
2	2,4±0,3	275,0±7,1	0,8±0,2	136,5±4,1
2,5	2,2±0,4	271,5±5,8	0,7±0,1	133,5±4,8
3	2,1±0,5	270,6±6,6	0,5±0,2	131,6±4,3

Chủng GT10 có ưu việt là sinh trưởng và sản sinh IAA rất tốt ở nồng độ muối từ 0 – 3 %. Hàm lượng IAA sinh ra của chủng GT10 khá cao, cao hơn so với các chủng vi khuẩn vùng rễ kích thích sinh trưởng ở cây nghệ vàng được phân lập tại Việt Nam do nhóm tác giả Hoàng Kim Chi và cộng sự công bố 2019 (63,11- 73,87 ppm) (Hoàng Kim Chi *et al.*, 2019). So sánh với khả năng sinh IAA của nhóm VKTQH được phân lập từ cánh đồng ô nhiễm Cd và Zn tại Thái Lan do nhóm tác giả Sakpirom và cộng sự công bố năm 2017 thì hàm lượng IAA sản sinh của chủng GT10 phân lập được cao hơn 40 – 60 lần. Tuy nhiên, so sánh hàm lượng IAA sản sinh ra của một số chủng VKTQH cao nhất (KKSSG29- IAA 276,3 ml/L; KTSWR2- IAA 302,6 mg/L), phân lập tại Thái Lan do nhóm tác giả Nookongbut và cộng sự công bố năm 2019 thì chủng GT10 sản sinh IAA thấp hơn. Theo nghiên cứu của Nguyễn Anh Huy và cộng sự (2018), tuyển chọn 02 chủng có kí hiệu PL2 và PL9 vừa có khả năng cố định nitơ, vừa có khả năng sản sinh IAA và có khả năng chịu mặn ở độ muối 10 ‰ (1 %). So với chủng GT10, hai chủng PL2 và PL9 có khả năng chịu mặn thấp hơn.

Chủng GT10 được đánh giá khả năng sinh IAA ở các pH từ 4 – 9, thí nghiệm được lặp lại 3 lần, sau 5 ngày nuôi cấy kết quả được thể hiện trên Bảng 10.

Bảng 10: Khả năng sản sinh IAA của chủng GT10 ở các pH khác nhau

pH	Vi hiếu khí, sáng		Hiếu khí, tối	
	ΔOD_{800}	IAA ($\mu\text{g/ml}$)	ΔOD_{800}	IAA ($\mu\text{g/ml}$)
4	0,5±0,1	68,2±3,6	0,2±0,1	34,8±2,6
5	1,7±0,2	139,1±4,8	0,8±0,2	84,1±1,8
6	2,3±0,3	219,6±3,9	0,9±0,3	138,2±2,9
7	2,4±0,2	208,0±2,9	1,1±0,3	135,5±2,1
8	2,2±0,2	194,5±3,5	1,0±0,2	127,5±1,8
9	2,1±0,3	189,6±3,6	0,9±0,2	122,6±2,3

Kết quả thu được cho thấy chủng GT10 có khả năng sinh trưởng và sản sinh IAA ở phổ pH rộng từ 4 – 9 trong điều kiện vi hiếu khí, có chiếu sáng và hiếu khí, tối. Chủng GT 10 có khả năng sinh trưởng và sản sinh IAA cao nhất ở pH 6, ở pH 5 chủng này sinh trưởng khá tốt và sản sinh IAA tương đối cao. Như vậy, chủng GT10 có khả năng ứng dụng làm phân bón kích thích sinh trưởng cho những vùng đất trồng lúa nhiễm phèn ở Việt Nam thường dao động từ pH 5 - 6, thậm chí một số vùng có pH 4.

Các nghiên cứu trước đây chỉ ra rằng, các vi khuẩn sinh IAA có khả năng hoạt động mạnh tại mức pH khá rộng và giá trị pH thích hợp cho việc sinh IAA của các vi khuẩn là khác nhau. Khamna và cộng sự (2010) đã chỉ ra pH 7 thích hợp cho sản xuất IAA cao nhất đối với loài *Streptomyces sp.* IAA được sản xuất bởi *Bacillus spp.* MOH-19 có khả năng sinh IAA cao nhất tại giá trị pH=6 và giảm 62% lượng IAA sinh ra ở pH=5 và tổng hợp IAA bởi vi sinh vật diễn ra

mạnh nhất tại pH trung tính hay acid nhẹ. Nguyễn Khởi Nghĩa và cộng sự (2017) trong nghiên cứu các vi khuẩn chịu mặn sinh IAA từ vùng đất ngập mặn ở hệ thống trồng lúa- nuôi tôm tại khu vực đồng bằng sông Mekong Việt Nam cũng đã chỉ ra rằng các vi khuẩn này sinh IAA mạnh nhất ở mức pH=7. Kết quả khảo sát tác động pH môi trường nuôi đến khả năng sinh IAA của chủng GT10 phù hợp với các nghiên cứu trước đây đã được công bố. Trong đó, chủng GT10 nghiên cứu có những điểm nổi bật hơn so với các nhóm VSV có khả năng sinh IAA là khả năng chống chịu tốt trong các điều kiện pH môi trường khác nhau, đặc biệt là trong môi trường đất bị chua, phèn (môi trường axit). Đây được coi là một trong những ưu điểm nổi bật trong ứng dụng sản xuất phân bón vi sinh chứa chủng GT10 không chỉ sử dụng trên đồng ruộng có pH trung tính mà còn trên đồng ruộng tại các địa phương bị nhiễm phèn, nhiễm axit.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Phân lập và định tên chủng vi khuẩn GT10

Mẫu đất lấy từ ruộng lúa giai đoạn sau gieo sạ 1,5 tháng tại ruộng lúa nhiễm mặn ven đê biển Giao Thủy, Nam Định 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 đất được đưa vào bình với tỷ lệ 9: 1, sau đó chúng được làm đầy bằng môi trường DSMZ -27. Các bình này được đậy kín và ủ dưới ánh sáng đèn sợi đốt cường độ sáng ~3000 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 ~3000 lux từ đèn sợi đốt. Các khuẩn lạc được tách và làm sạch, thu được chủng vi khuẩn GT10 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, hình thái tế bào và đặc điểm khả năng sử dụng nguồn cacbon của chủng GT10 thu được trên môi trường nuôi cấy dạng thạch, chủng vi khuẩn GT10 có thể được xếp vào chi *Rhodobacter* (Bergey, 1989, 2001).

Thực hiện phân loại chủng vi khuẩn GT10 bằng cách xác định trình tự đoạn gen 16S rARN với cặp mồi 27F/1527R, ADN tổng số của chủng vi khuẩn GT10 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 OD_{800} 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 μ l dung dịch TE, để trên đá và lắc đều cho tan hết tế bào; iii) Bổ sung 30 μ l SDS 10%, lắc nhẹ và để ở nhiệt độ phòng; iv). Bổ sung 3 μ l enzym prôtêinaza K (10 mg/ml), ủ mẫu ở 37°C trong 1 giờ; v). Bổ sung 180 μ l NaCl 5M lắc nhẹ, ủ mẫu ở 65°C trong 10 phút. Chú ý: đảo nhẹ nhàng để tránh đứt gãy ADN; vi). Prôtêin được loại bỏ bằng một thể tích chloroform/isoamyl alcohol 24:1 (v/v), ly tâm 12.000 v/ph trong 10 phút, thu dịch nổi và chuyển sang ống eppendorf mới; vii) Prôtêin được loại bỏ tiếp bằng phenol/chloroform/isoamyl alcohol theo tỷ lệ 25:24:1 (v/v), ly tâm 12.000 v/ph trong 10 phút, thu dịch nổi và chuyển sang ống eppendorf mới; viii) ADN được rửa bằng hai lần thể tích ethanon 100 % ở 4°C trong 20 phút, ly tâm 12.000 v/ph ở 4°C, phần rửa là ADN genom được thu lại, rửa được rửa lại bằng ethanon 70% ly tâm 12.000 vòng/phút ở 4°C trong 15 phút và được làm khô bằng máy hút chân không Mi- vac 110 V, hòa tan ADN trong 25 μ l 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 GT10 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 (μl):

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

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 GT10 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 Mega để xây dựng cây phát sinh chủng loại của chủng vi khuẩn GT10.

Trình tự gen của chủng GT10 có kích thước 1321 nucleotit và được đăng ký trên GenBank với mã số truy cập LC791252.

Trình tự gen của chủng GT10 có mức độ tương đồng 99,12% với trình tự tương ứng của các chủng *Rhodobacter capsulatus* ATCC 11166 (mã số D16428) và tương đồng xa hơn (85,28 %) so với chủng *Rhodopseudomonas pseudopalustris* (AB498818). Mối quan hệ phát sinh chủng loài của chủng GT10 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, đặc điểm sử dụng nguồn cacbon và so sánh trình tự gen 16S rARN thì chủng GT10 thuộc chi *Rhodobacter* và được đặt tên là *Rhodobacter capsulatus* GT10.

Chủng vi khuẩn GT10 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 cố định nitơ phân tử của chủng GT10

Thí nghiệm được tiến hành trong các bình thể tích 25 ml chứa 20 ml môi trường khoáng không bổ sung nguồn nitơ (như mục B), thêm 2ml dịch VKTQH chủng GT10 (mật độ tế bào trong các bình nuôi giống GT10 đạt mật độ khoảng 10⁹ CFU/ml), bình đối chứng chỉ chứa môi trường và không bổ sung VKTQH chủng GT10. Các bình thí nghiệm được đậy nắp cao su, khí nitơ được sục để hòa tan vào môi trường khoảng 17-20 mg/L trong điều kiện 25 – 35 °C. Các bình nuôi cấy được ủ ở 2 điều kiện: vi hiếu khí sáng và hiếu khí tối. Ở điều kiện vi hiếu khí, cường độ chiếu sáng 3000 lux và nhiệt độ phòng 25 – 30 °C. Sau 48h, các dịch nuôi cấy được ly tâm ở tốc độ

8000 vòng/phút trong 15 phút, thu được dịch nổi phía trên để đánh giá hàm lượng NH_4^+ tạo ra trong môi trường bằng thuốc thử Nessler (Sakpirom *et al.*, 20). Kết quả được thể hiện trên Bảng 2.

Kết quả cho thấy chủng GT10 có khả năng cố định N_2 tốt ở cả hai điều kiện hiếu khí, tối và vi hiếu khí, sáng

Ví dụ 3. Đánh giá khả năng cố định nitơ phân tử ở các nồng độ muối khác nhau của chủng GT10

Nhằm mục đích ứng dụng chủng GT10 có khả năng cố định N_2 làm phân bón ở những vùng nhiễm mặn, thí nghiệm được tiến hành đánh giá ảnh hưởng của nồng độ muối lên khả năng cố định N_2 . Chủng GT10 được nuôi cấy trong môi trường khoáng không chứa nguồn nitơ và bổ sung muối ở các nồng độ khác nhau từ 0 – 3%. Kết quả về khả năng cố định N_2 thành NH_4^+ (mg/L) sau 48 h thể hiện trên Bảng 3. Kết quả từ Bảng 3 cho thấy chủng VKTQH GT10 có thể sinh trưởng và cố định N_2 khá tốt với nồng độ muối từ 0 – 3% ở cả hai điều kiện vi hiếu khí có chiếu sáng và hiếu khí, tối. Chủng này khi bổ sung muối đến 3% đều có khả năng cố định nitơ cao hơn khi không bổ sung muối. Do vậy, chủng VKTQH GT10 có thể ứng dụng để sản xuất phân bón vi sinh cho lúa nước và đặc biệt có thể ứng dụng làm phân bón cho các địa phương có đất canh tác bị nhiễm mặn.

Ví dụ 4. Đánh giá khả năng cố định nitơ phân tử ở các pH khác nhau của chủng GT10

Chủng GT10 cũng được tiến hành đánh giá khả năng cố định N_2 ở các pH khác nhau từ 4 - 9. Kết quả hàm lượng NH_4^+ (mg/L) tạo ra trong môi trường ở các pH khác nhau thể hiện trên Bảng 4. Kết quả từ Bảng 4 cho thấy chủng GT10 có khả năng cố định N_2 ở phổ khá rộng từ pH 4 – 9 ở cả hai điều kiện vi hiếu khí, có chiếu sáng và điều kiện hiếu khí, tối. Ở mỗi giá trị pH khác nhau chủng GT10 có khả năng cố định N_2 khác nhau và chủng này có khả năng cố định N_2 mạnh nhất trong môi trường axit. Trong khi đó, rất nhiều nhóm vi khuẩn khác khó sinh trưởng và cố định N_2 trong môi trường có pH 4 và 5. Điều này cho thấy đặc điểm nổi bật của chủng GT10 so với các nhóm VSV có khả năng cố định nitơ khác là khả năng chống chịu tốt trong các điều kiện pH môi trường khác nhau, đặc biệt là trong môi trường đất bị chua, phèn (môi trường axit). Đây được coi là một trong những ưu điểm nổi bật trong ứng dụng sản xuất phân bón vi sinh không chỉ sử dụng trên đồng ruộng có pH trung tính mà còn trên đồng ruộng tại các địa phương bị nhiễm phèn, nhiễm axit.

Ví dụ 5. Đánh giá khả năng phân giải các nguồn phosphat khó tan của chủng GT10

Chủng GT10 được tiến hành đánh giá khả năng phân giải phosphat khó tiêu bằng cách bằng cách nuôi chủng trong môi trường Pikovskaya cải tiến dạng dịch chứa các nguồn lân khó tan như $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, FePO_4 và AlPO_4 nồng độ 5g/L, giống VKTQH chủng GT10 bổ sung 10% (v/v) (mật độ tế bào trong các bình nuôi giống đạt mật độ khoảng 10^9 CFU/ml), các bình thí nghiệm được đậy nắp cao su, đối chứng chỉ chứa môi trường không bổ sung chủng GT10. Thí nghiệm được tiến ở 2 điều kiện: vi hiếu khí sáng và hiếu khí tối. Trong điều kiện vi hiếu khí, cường độ chiếu sáng 3000 lux và nhiệt độ phòng 25 – 30 °C. Hàm lượng phát phát dễ tiêu trong môi trường nuôi được xác định bằng phương pháp hiện màu Molybdate. Môi trường Pikovskaya cải tiến gồm các thành phần sau : CH_3COONa 1 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5 g/L, NaCl 0,2 g/L, KCl 0,2g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g/L, yeast extract 0,5 g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,002 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,002 g/L. trong đó, nguồn phosphat khó tan sử dụng 3 nguồn là $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, FePO_4 và AlPO_4 nồng độ 5g/L

Kết quả đánh giá khả năng hòa tan các dạng lân khó tan trong 7 ngày được thể hiện trên Bảng 5.

Kết quả từ Bảng 5 cho thấy chủng GT10 có khả năng hòa tan 3 dạng photphat khó tan ở cả hai điều kiện vi hiếu khí, sáng và hiếu khí tối. Chủng GT10 hòa tan photphat dạng $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ là cao nhất, kế đến là nghiệm thức chứa nguồn photphat dạng FePO_4 và sau cùng là nghiệm thức chứa nguồn photphat dạng AlPO_4 . Kết quả này cho thấy chủng GT10 có thể hòa tan hai nguồn FePO_4 và AlPO_4 trong đất phèn có ý nghĩa hết sức quan trọng giúp cây lúa vượt qua bất lợi về sự thiếu hụt photphat trong điều kiện đất nhiễm phèn.

Ví dụ 6. Đánh giá khả năng phân giải phosphat khó tan của chủng GT10 ở các độ mặn khác nhau

Chủng GT10 còn được tiến hành đánh giá khả năng sinh trưởng và phân giải phosphat khó tan ở các nồng độ muối khác nhau từ 0-3%. Thí nghiệm được tiến hành trên môi trường Pikovskaya cải tiến dạng lỏng. Kết quả sau 7 ngày nuôi cấy chủng GT10 được thể hiện trên Bảng 6.

Kết quả cho thấy, với nồng độ muối từ 0 – 3 % chủng VKTQH GT10 có khả năng sinh trưởng và phân giải phosphat khó tan khá tốt. Chủng GT10 cho thấy khả năng sinh trưởng cũng như hòa tan phosphat cao nhất ở nồng độ muối 1,5 %. Như vậy, chủng này có khả năng sinh trưởng và hòa tan phosphat đến 3%. Kết quả cho thấy nồng độ muối 0 – 2 % là nồng độ muối mà chủng GT10 có thể sinh trưởng và hòa tan phosphat tốt nhất. Do vậy, chủng GT10 có tiềm năng ứng dụng ở những vùng trồng lúa bị nhiễm mặn nhằm giúp cung cấp lượng lân hữu dụng vốn đã bị bất động trong đất cho cây lúa sinh trưởng và phát triển tốt.

Ví dụ 7. Đánh giá khả năng phân giải phosphat khó tan của chủng GT10 ở các pH khác nhau

Chủng VKTQH GT10 được tiến hành đánh giá khả năng phân giải photphat khó tan trong môi trường Pikovskaya cải tiến, ở các pH khác nhau từ 4 – 9, thí nghiệm được lặp lại 3 lần, sau 7 ngày nuôi cấy kết quả được thể hiện trên Bảng 7.

Kết quả cho thấy chủng GT10 có khả năng sinh trưởng và phân giải phosphat khó tan từ pH 4 – 9, tuy nhiên, ở mỗi mức pH khác nhau thì sinh trưởng và khả năng hòa tan khác nhau. Chủng GT10 có khả năng hòa tan lân cao nhất ở pH 6 – 7. Ở pH 4 chủng GT10 sinh trưởng yếu hơn nhưng vẫn hòa tan photphat khó tan, ở pH 5 chủng GT10 có khả năng sinh trưởng và phân giải photphat khó tan khá tốt. Như vậy, chủng GT10 có khả năng ứng dụng hòa tan nguồn lân khó tiêu cho những vùng đất trồng lúa nhiễm phèn ở Việt Nam thường dao động từ pH 5 - 6, thậm chí một số vùng có pH 4.

Ví dụ 8. Đánh giá khả năng sản sinh IAA của chủng GT10

Chủng GT10 còn được tiến hành đánh giá khả năng sản sinh chất kích thích sinh trưởng IAA bằng cách nuôi chủng trong môi trường GA cải tiến với nồng độ giống bổ sung 10% (v/v) (mật độ tế bào trong các bình nuôi giống chủng GT10 đạt mật độ khoảng 10^9 CFU/ml), các bình thí nghiệm được đậy nắp cao su, đối chứng chỉ chứa môi trường không bổ sung chủng GT10. Thí nghiệm được tiến ở 2 điều kiện: vi hiếu khí sáng và hiếu khí tối. Trong điều kiện vi hiếu khí, cường độ chiếu sáng 3000 lux và nhiệt độ phòng 25 – 30 °C. Hàm lượng IAA sản sinh trong môi trường nuôi được xác định bằng phương pháp Salkowski cải tiến. Dịch nuôi VKTQH được ly tâm ở 8000 vòng/phút trong 10 phút. Hút 1 ml dung dịch sau ly tâm vào các lọ penicilin sau đó thêm 2 ml thuốc thử Salkowski và ủ trong bóng tối (30°C, 10 phút). Tiến hành đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 530 nm. Từ các kết quả OD_{530} và đồ thị chuẩn IAA, hàm lượng IAA sinh ra được xác định. Sau 5 ngày nuôi cấy, kết quả thu được trình bày trên Bảng 8.

Kết quả thu được cho thấy: chủng GT10 có khả năng sinh trưởng tốt và sản sinh IAA khá cao ở cả hai điều kiện nuôi. Tuy nhiên, ở điều kiện tối ưu là vi hiếu khí sáng thì chủng sinh trưởng tốt cũng như tích lũy IAA cao, ở điều kiện hiếu khí, tối thì sinh trưởng và sản sinh IAA thấp hơn... Như vậy, chủng GT10 có khả năng sinh trưởng tốt, sản sinh IAA cao và có tiềm năng trong sử dụng làm phân bón kích thích sinh trưởng cho lúa.

Ví dụ 9. Đánh giá khả năng sản sinh IAA của chủng GT10 ở các độ mặn khác nhau

Chủng GT10 được tiến hành đánh giá khả năng sinh trưởng và sản sinh IAA ở các nồng độ muối từ 0 – 3%. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, sau 5 ngày nuôi cấy kết quả được thể hiện trên Bảng 9.

Chủng GT10 có ưu việt là sinh trưởng và sản sinh IAA rất tốt ở nồng độ muối từ 0 – 3%. Hàm lượng IAA sinh ra của chủng GT10 khá cao, cao hơn so với các chủng vi khuẩn vùng rễ kích thích sinh trưởng ở cây nghệ vàng được phân lập tại Việt Nam do nhóm tác giả Hoàng Kim Chi và cộng sự công bố 2019 (63,11- 73,87 ppm) (Hoàng Kim Chi et al., 2019). Theo nghiên cứu của Nguyễn Anh Huy và cộng sự (2018), tuyển chọn 02 chủng có kí hiệu PL2 và PL9 vừa có khả năng cố định nitơ, vừa có khả năng sản sinh IAA và có khả năng chịu mặn ở độ muối 10‰ (1%). So với chủng GT10, hai chủng PL2 và PL9 có khả năng chịu mặn thấp hơn. Như vậy, chủng GT10 có tiềm năng ứng dụng làm phân bón kích thích sinh học cho những vùng đất trồng lúa bị nhiễm mặn.

Ví dụ 10. Đánh giá khả năng sản sinh IAA của chủng GT10 ở các pH khác nhau

Chủng GT10 được đánh giá khả năng sinh IAA ở các pH từ 4 – 9, thí nghiệm được lặp lại 3 lần, sau 5 ngày nuôi cấy kết quả được thể hiện trên Bảng 10.

Kết quả thu được cho thấy chủng GT10 có khả năng sinh trưởng và sản sinh IAA ở phổ pH rộng từ 4 – 9 trong điều kiện vi hiếu khí, có chiếu sáng và hiếu khí, tối. Chủng GT 10 có khả năng sinh trưởng và sản sinh IAA cao nhất ở pH 6, ở pH 5 chủng này sinh trưởng khá tốt và sản sinh IAA tương đối cao. Như vậy, chủng GT10 có khả năng ứng dụng làm phân bón kích thích sinh trưởng cho những vùng đất trồng lúa nhiễm phèn ở Việt Nam thường dao động từ pH 5 -6, thậm chí một số vùng có pH 4.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn tía quang hợp *Rhodobacter capsulatus* GT10 thuần khiết về mặt sinh học có khả năng cố định nitơ phân tử, phân giải phosphat khó tan, sản sinh chất kích thích sinh trưởng IAA với nồng độ muối từ 0 – 3% và pH từ 4-9 ở hai điều kiện vi hiếu khí, chiếu sáng và hiếu khí, tối. Chủng GT10 được phân lập từ mẫu đất lấy từ ruộng lúa nhiễm mặn (sau sạ 1,5 tháng) ven đê biển tại Giao Thủy, Nam Định.

Với các đặc điểm nổi bật về khả năng cố định N_2 phân tử, phân giải photphat khó tan, sản sinh chất kích thích sinh trưởng trong điều kiện độ mặn từ 0 – 3% và pH từ 4-9 của chủng GT10, nên chủng này có tiềm năng làm phân bón cho lúa nước ở các ruộng lúa thường, ruộng lúa nhiễm mặn và nhiễm phèn nơi các nhóm vi sinh vật hữu ích bị ức chế khó sinh trưởng và phát huy các đặc tính như cố định nito, phân giải phosphat khó tiêu và sản sinh các chất kích thích sinh trưởng. Do vậy, việc sử dụng chủng GT10 làm phân bón cho cho lúa nước ở các ruộng lúa thường, ruộng lúa nhiễm mặn và nhiễm phèn góp phần tăng năng suất, thân thiện môi trường, giảm sử dụng phân bón hóa học, do vậy, hạn chế ô nhiễm và độc tố tích tụ trong đất, tăng chất lượng sản phẩm và xu hướng phát triển thành nông nghiệp hữu cơ.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng vi khuẩn tía quang hợp *Rhodobacter capsulatus* GT10 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ mẫu đất lấy từ ruộng lúa nhiễm mặn sau gieo sạ 1,5 tháng ven đê biển tại Giao Thủy, Nam Định có trình tự gen 16S rARN với kích thước 1321 bp có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 và được đăng ký trên ngân hàng gen với mã số LC791252 và có các đặc tính sau:

có khả năng cố định nitơ phân tử thành NH_4^+ sau 48h ở điều kiện vi hiếu khí, chiếu sáng là $4,34 \pm 0,85$ mg/L, ở điều kiện hiếu khí tối là $4,05 \pm 0,56$, có khả năng cố định nitơ phân tử ở pH 4-9, nồng độ muối 0-3%;

có khả năng phân giải các nguồn phosphat khó tan sau 7 ngày nuôi cấy ở điều kiện vi hiếu khí, chiếu sáng cụ thể là $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ phân giải được $51,4 \pm 3,85$ mg/L, AlPO_4 phân giải được $35,67 \pm 3,37$ mg/L, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ phân giải $75,05 \pm 4,56$ mg/L, ở điều kiện hiếu khí, tối phân giải $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ phân giải được $27,5 \pm 3,67$ mg/L, AlPO_4 phân giải được $18,4 \pm 3,67$ mg/L, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ phân giải $40,14 \pm 2,3$ mg/L, có khả năng phân giải phosphat khó tan $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ở pH 4-9 và nồng độ muối 0 – 3%;

có khả năng sản sinh chất kích thích sinh trưởng IAA ở điều kiện vi hiếu khí chiếu sáng là $205,4 \pm 5,85$ $\mu\text{g/ml}$ và ở điều kiện hiếu khí tối là $140,05 \pm 4,56$ $\mu\text{g/ml}$ và có khả năng sản sinh IAA ở nồng độ muối từ 0 – 3 % và pH từ 4-9 trong đó tối ưu ở pH 6 – 7.

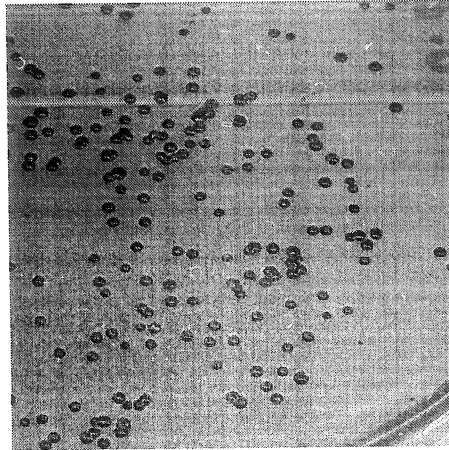


Fig. 1

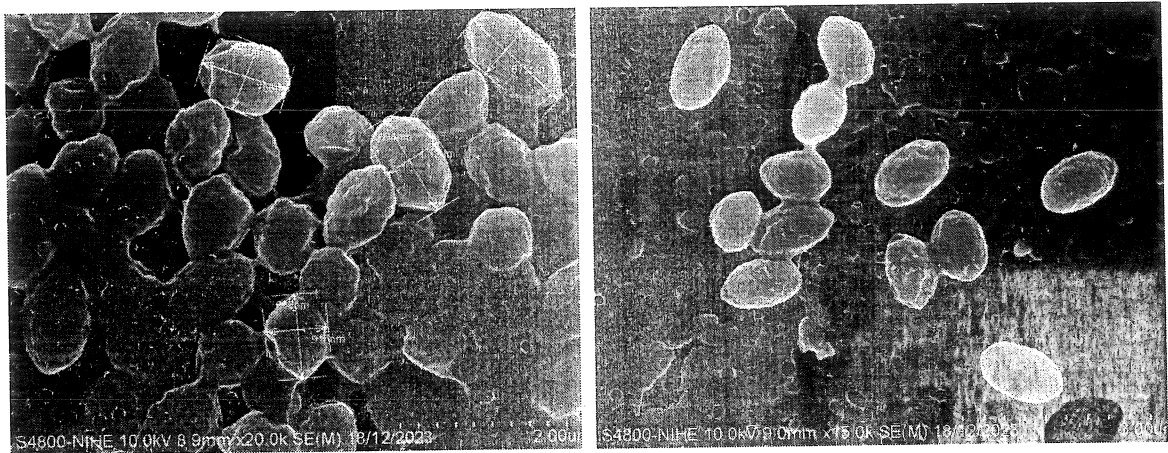


Fig. 2

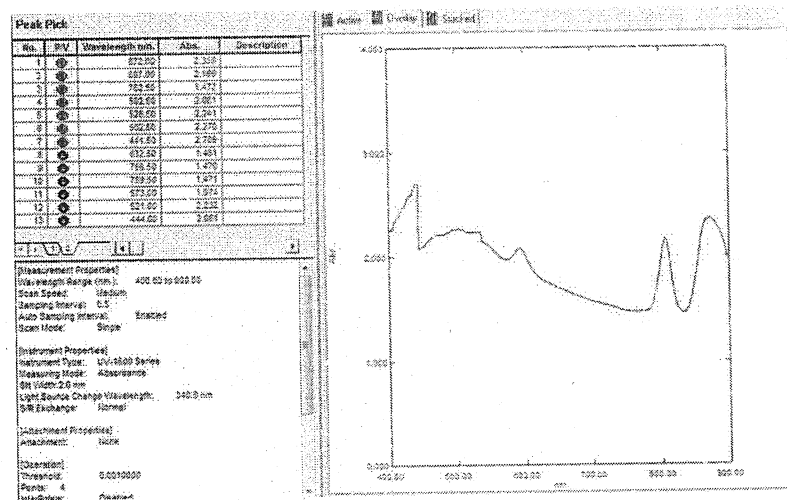


Fig. 3

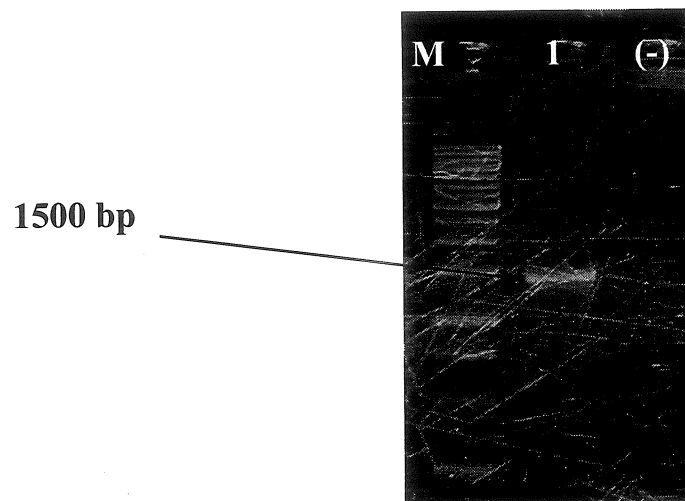


Fig. 4

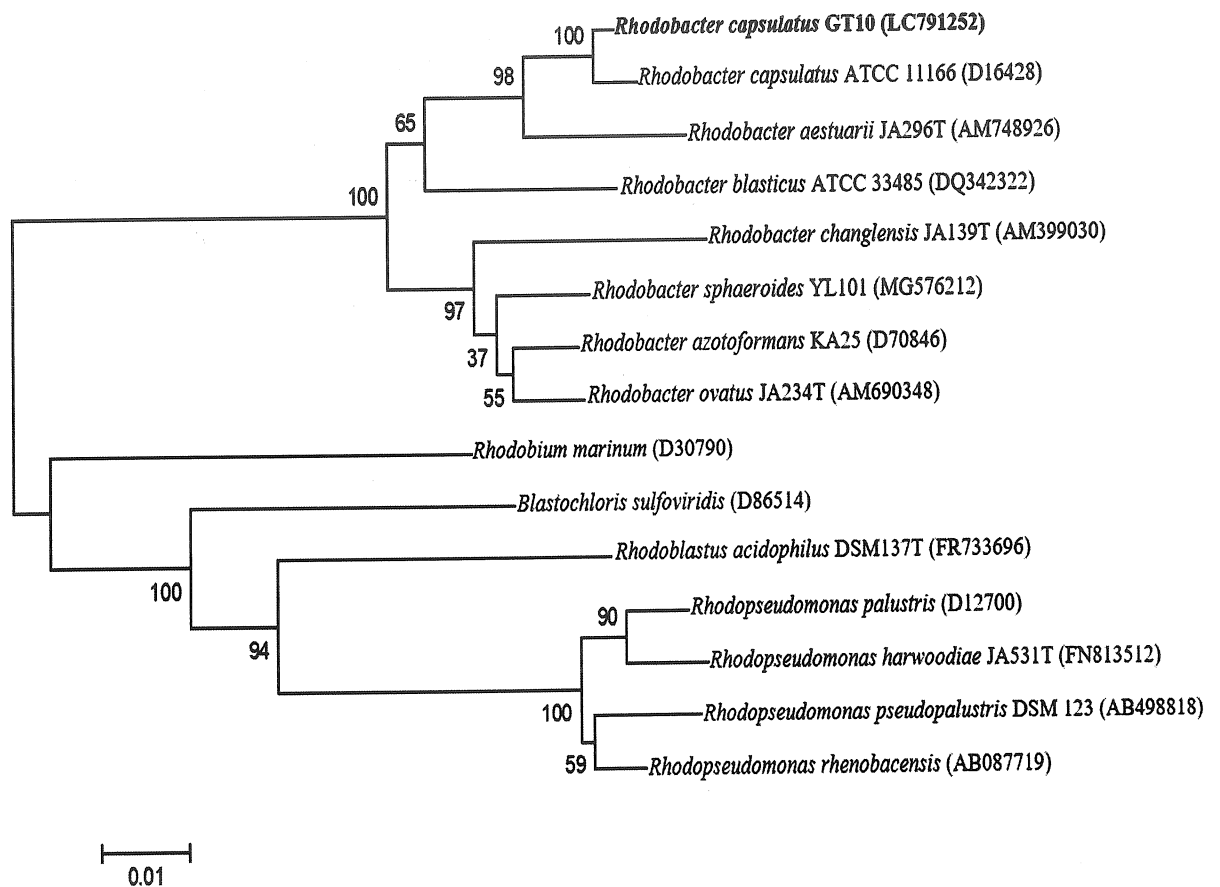
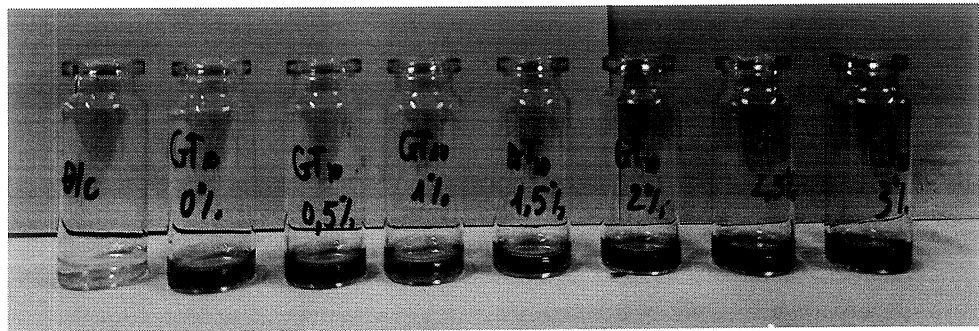


Fig. 5

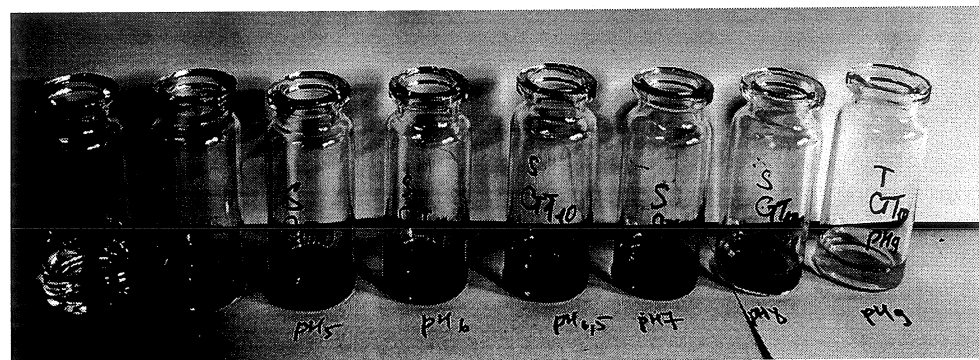
A



B



C



D

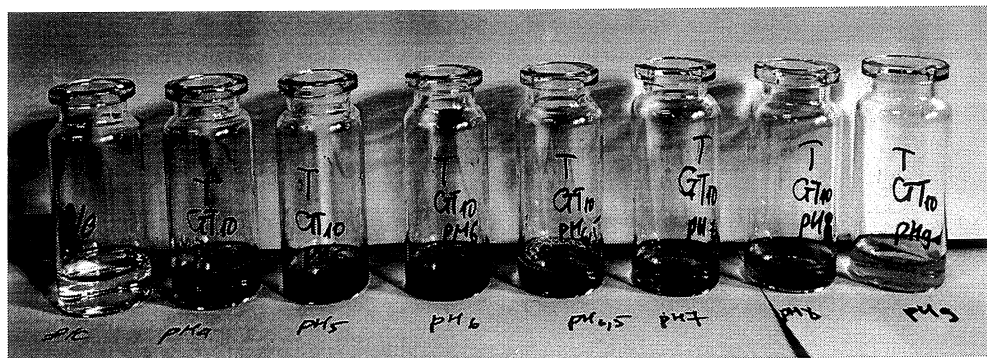


Fig. 6

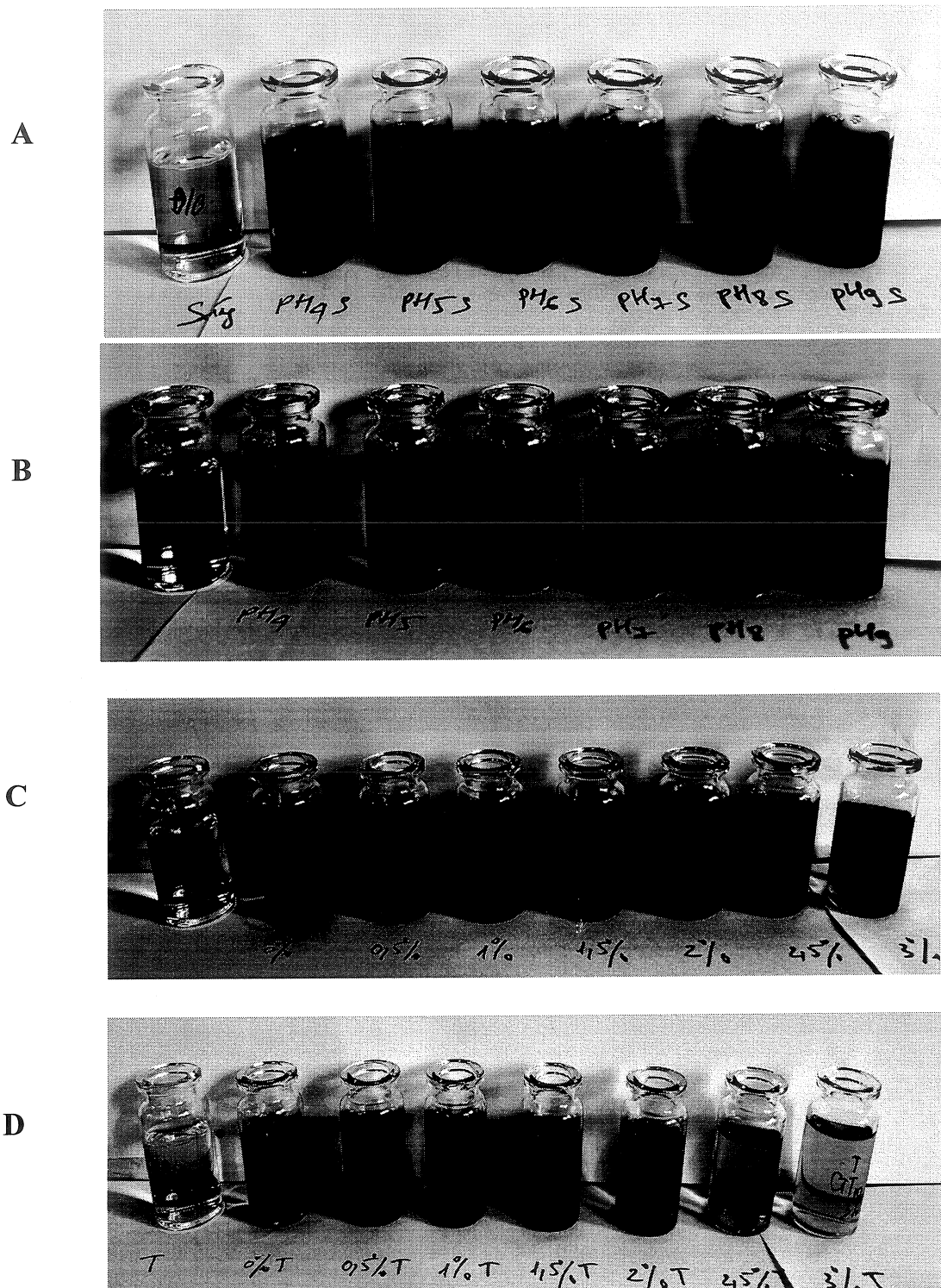


Fig. 7

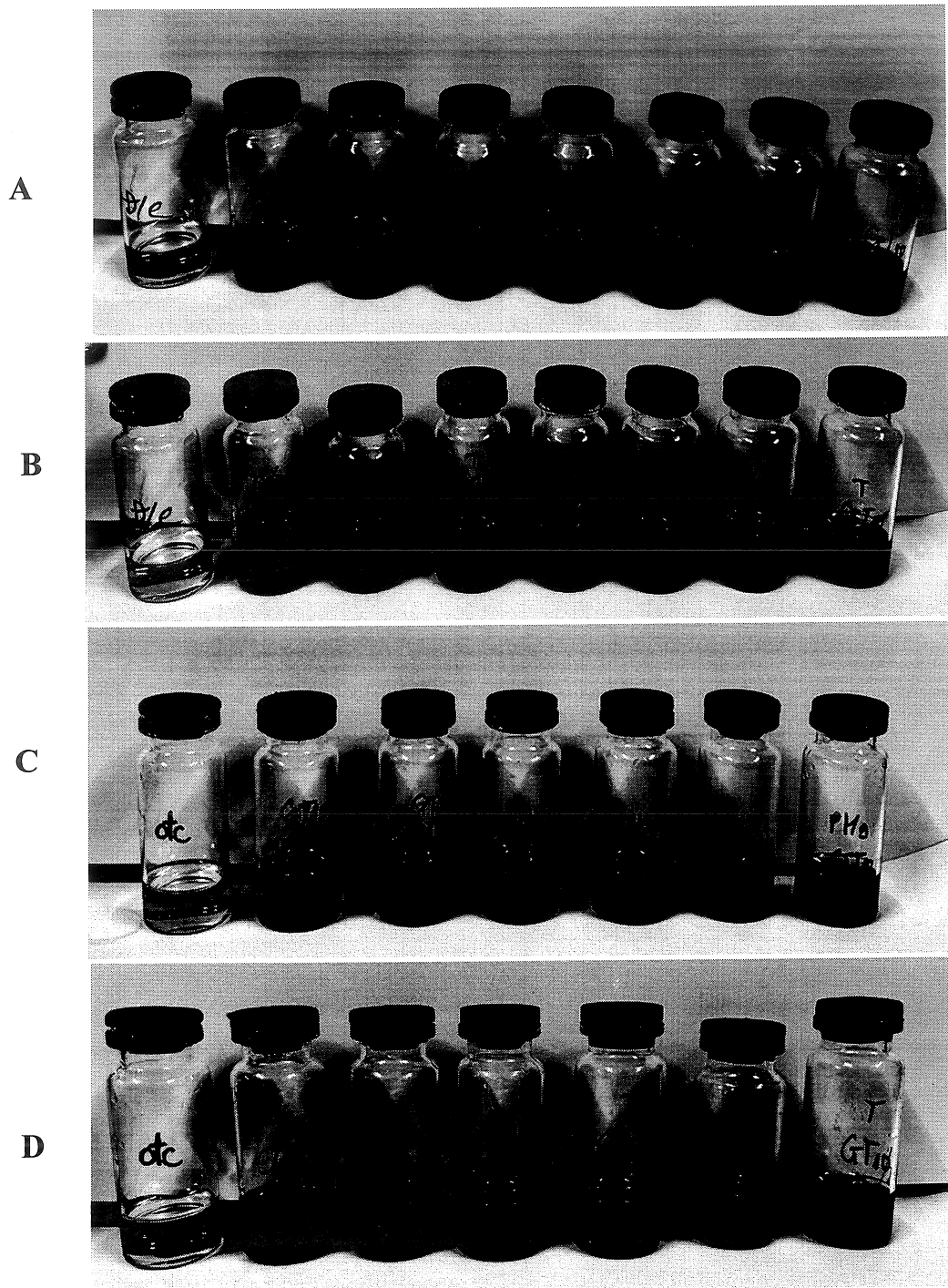


Fig. 8

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<120> Chủng vi khuẩn tía quang hợp *Rhodobacter capsulatus* GT10 thuần khiết về mặt sinh học có khả năng cố định nitơ phân tử, phân giải phosphat khó tan, sản sinh chất kích thích sinh trưởng IAA, chống chịu được điều kiện mặn hóa, phen hóa

<160> 1

<210> 1

<211> 1321

<212> ADN

<213> *Rhodobacter capsulatus*

<400> 1

```

1  tggcggcagg cctaacacat gcaagtcgag cgagaccttc gggctctagcg gcggacgggt
61  gagtaacgcg tgggaacgtg ccctttgcta cggaatagcc cgggaaact gggagtaata
121 ccgtatgtgc ctttcggggg aaagatttat cggcaaagga tcggcccgcg ttggattagg
181 tagttggtgg ggtaatggcc taccaagccg acgatccata gctggtttga gaggatgatc
241 agccacactg ggactgagac acggcccaga ctctacggg aggcagcagt ggggaatctt
301 agacaatggg ggaaaccctg atctagccat gccgcgtgag cgatgaaggc cttagggttg
361 taaagctctt tcaggtggga agataatgac ggtaccacca gaagaagccc cggctaactc
421 cgtgccagca gccgcggtta tacggagggg gctagcgttg ttcggaatta ctgggcgtaa
481 agcgcacgta ggcggatcag aaagtcagag gtgaaatccc agggctcaac cttggaactg
541 cctttgaaac tcctggtctt gaggtcgaga gaggtgagtg gaattccgag tgtagagggtg
601 aaattcgtag atattcggag gaacaccagt ggcgaaggcg gctcactggc tcgatactga
661 cgctgagggtg cgaaagcgtg gggagcaaac aggattagat accctggtag tccacgccgt
721 aaacgatgaa tgccagtcgt cggcaggcat gcctgtcggg gacacacctc acggattaag
781 cattccgcct ggggagtagc gtcgcaagat taaaactcaa aggaattgac gggggcccg
841 acaagcgggtg gagcatgttg tttaattcga agcaacgcgc agaaccttac caacccttga
901 catcgagatc gcggttacca gagatggttt ccttcagttc ggctggatct tagacagggtg
961 ctgcatggct gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttcggg taagtccggc aacgagcgca
1021 acccacactt tcagttgcca tcattcagtt gggcactctg gaagaactgc cgatgataag
1081 tcggaggaag gtgtggatga cgtcaagtcc tcatggccct tacgggttg gctacacacg
1141 tgctacaatg gtggtgacaa tgggccaatc caaaaagcc atctcagttc ggattggggg
1201 ctgcaactcg accccatgaa gtcggaatcg ctagtaatcg cgtaacagca tgacgcgggtg
1261 aatacgttcc cgggccttgt acacaccgcc cgtcacacca tgggaattgg gtctacccta
1321 agatgggtgcg ccaaccagca atggaggcag ccagccacgt ag

```