



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

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

(11)



2-0002558

(51)⁷ **C12N 1/100; C02F 3/00**

(13) **Y**

(21) 2-2019-00081

(22) 14/03/2019

(45) 25/02/2021 395

(43) 25/06/2019 375A

(73) Viện Công nghệ sinh học (VN)

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

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

(54) QUY TRÌNH SẢN XUẤT CHẾ PHẨM VI SINH TẠO MÀNG SINH HỌC TRÊN CHẤT MANG THAN SINH HỌC ĐỂ XỬ LÝ ĐẤT Ô NHIỄM HIĐROCACBON THƠM VÀ CHẾ PHẨM VI SINH THU ĐƯỢC BẰNG QUY TRÌNH NÀY

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học trên chất mang than sinh học để xử lý đất nhiễm hiđrocacbon thơm, trong đó quy trình này bao gồm các bước: (a) nhân giống vi sinh vật; (b) thu sinh khối vi khuẩn; (c) thu sản phẩm phối trộn; và thu chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học trên chất mang than sinh học, trong đó khác biệt ở chỗ các chủng vi sinh được sử dụng bao gồm bốn chủng vi khuẩn *Rhodococcus* sp. BQN11, *Pseudomonas* sp. BQN21, *Stenotrophomonas* sp. QND8, *Klebsiella* sp. VTD8. Ngoài ra, giải pháp hữu ích còn đề cập đến chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học trên chất mang than sinh học thu được bằng quy trình này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực xử lý ô nhiễm môi trường bằng công nghệ sinh học, cụ thể là đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học trên chất mang than sinh học để xử lý đất nhiễm các hidrocarbon thơm và chế phẩm vi sinh thu được bằng quy trình này.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Trong những năm gần đây, các khu công nghiệp ở Việt Nam được xây dựng một cách nhanh chóng. Tuy nhiên theo thống kê của Bộ Kế hoạch và Đầu tư, hiện nay mới chỉ có 74/171 khu công nghiệp có nhà máy xử lý nước thải tập trung. Chính việc xây dựng các khu công nghiệp một cách ồ ạt và thiếu kiểm soát như vậy đã khiến môi trường tại những khu vực này và các khu vực xung quanh bị ô nhiễm nghiêm trọng. Trong thành phần nước thải công nghiệp, ngoài các hợp chất gây ô nhiễm như metan, các kim loại nặng, các hợp chất ammoni, xianua, v.v. thì hỗn hợp các hợp chất hidrocarbon thơm là những hợp chất hữu cơ có cấu trúc bền vững, khó phân hủy trong điều kiện tự nhiên và ảnh hưởng tới sức khỏe con người ngay cả ở nồng độ rất thấp đặc biệt nó cũng là tác nhân tiềm ẩn gây ung thư. Bên cạnh đó, chúng thường tồn tại ở dạng hỗn hợp, ít thấy ở dạng đơn lẻ do vậy độc tính của chúng ngày càng cao. Vì vậy, việc loại bỏ hidrocarbon thơm ra khỏi nguồn nước thải là một việc làm cần thiết và cấp bách.

Để xử lý các hợp chất này, các quy trình vật lý, hóa lý đã được sử dụng và cho kết quả khả quan. Các quy trình này có ưu điểm là xử lý nhanh, tuy nhiên quá trình xử lý không được triệt để và thường tạo ra các sản phẩm phụ thứ cấp ảnh hưởng tới môi trường xung quanh. Quy trình phân hủy sinh học sử dụng các chủng vi sinh vật và các chất có hoạt tính sinh học do vi sinh vật sản sinh ra đã được sử dụng ngày càng rộng rãi do hiệu quả, rẻ, thân thiện với môi trường. Người ta ước tính có hơn 60 chi vi

khuẩn có khả năng phân hủy các hiđrocacbon thơm như naphtalen, antraxen, phenantren, piren, benzo[a]piren và chúng chủ yếu thuộc các chi: *Achromobacter*, *Acidovorax*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Clostridium*, v.v. (Whyte và cộng sự, 1996). Năm 2009, tác giả Bayoumi đã phân lập thành công một số loài vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* có khả năng phân hủy các hiđrocacbon thơm bao gồm: *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus firmus*, v.v.. Không chỉ có khả năng phân hủy các hiđrocacbon thơm có khối lượng phân tử thấp như naphtalen, antraxen, phenathren, mà một số chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* còn có thể phân hủy các hiđrocacbon thơm có khối lượng phân tử tương đối lớn như benzo[a]antraxen, piren, benzo[b]fluoranthren cũng như nhiều hợp chất độc khác.

Việc đưa các chủng vi sinh vật có khả năng phân hủy các hiđrocacbon thơm ra các vùng ô nhiễm đôi khi gặp một số khó khăn khi xử lý ngoài hiện trường tại những khu vực có hàm lượng ô nhiễm cao, nhiệt độ, pH thường xuyên thay đổi. Nhưng khi vi sinh vật được bảo vệ bởi lớp màng sinh học kị nước (do lớp polysacarit ngoại bào do chính chúng sản xuất ra) sẽ giúp chúng liên kết chặt chẽ với nhau, chống được các điều kiện ngoại cảnh bất lợi (Morikawa và cộng sự, 2006; O'Toole và cộng sự, 2000). Bên cạnh đó, lớp polysacarit có tính kết dính cao, sẽ giúp vi sinh vật dễ tiếp cận với nguồn ô nhiễm và sử dụng chính các hiđrocacbon trong nguồn ô nhiễm là nguồn cacbon giúp chúng sinh trưởng và phát triển từ đó tăng cường hiệu quả xử lý.

Hiện nay, trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu về các chủng vi sinh vật tạo màng sinh học nhằm ứng dụng trong xử lý các hiđrocacbon thơm như benzen, naphtalen, phenon, toluen, xilen, v.v. (Yamaga và cộng sự, 2010; Shimada và cộng sự, 2012; Meliani, Bensoltane, 2014). Chủng vi khuẩn *Acinetobacter calcoaceticus* P23 được phân lập từ khu hệ rễ bèo *Lemna aoukikusa* có khả năng tạo màng sinh học và phân hủy phenon tốt hơn dạng tế bào tự do (Yamaga và cộng sự, 2010). Shimada và cộng sự, 2012 đã sử dụng chủng vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* T102 phân lập từ các mẫu đất nhiễm dầu để tạo màng sinh học và chứng minh khả năng phân hủy tốt naphtalene của chủng này ở dạng tạo màng sinh học hơn ở dạng tế bào tự do. Đặc biệt, màng sinh học đa chủng được tạo thành từ 5 chi vi khuẩn *Polaromonas*, *Sphingomonas*, *Alcaligenes*, *Caulobacter* và *Variovorax* phân lập từ các mẫu lấy ở Bắc

cực có khả năng phân hủy 20 µg/ml piren và 39 µg/ml phenantren sau 60 ngày nuôi cấy (Eriksson et al. và cộng sự, 2003). Bằng quy trình nuôi cấy vi sinh thông thường, 2 chủng vi khuẩn thuộc chi *Pseudomonas* có khả năng phân hủy piren rất tốt đã được phân lập từ màng sinh học này (El-Masry và cộng sự, 2004).

Bên cạnh đó, để tăng cường hiệu quả xử lý ô nhiễm và để có thể dễ dàng áp dụng trong nhiều điều kiện địa hình khác nhau, việc sử dụng chất mang làm giá thể cho các vi sinh vật tạo màng sinh học gắn lên đã và đang được ứng dụng rộng rãi. Các giá thể để vi sinh vật bám dính cần có những tính chất đặc trưng giúp vi sinh vật có thể dễ dàng bám dính như tải trọng nhỏ, diện tích bề mặt tiếp xúc trên một đơn vị thể tích lớn, độ nhám cao, có độ bền phù hợp (không bị ăn mòn, hòa tan, phản ứng...) với các hợp chất hòa tan trong nước. Giá thể vi sinh có tải trọng bề mặt càng lớn, bề mặt tiếp xúc càng nhiều thì càng tạo điều kiện tối ưu cho quá trình sinh trưởng phát triển và tạo màng của vi sinh vật, từ đó làm tăng hiệu quả xử lý. Trong số các loại giá thể này, than sinh học được xem là một chất mang tiềm năng trong xử lý môi trường cũng như xử lý ô nhiễm đất và nước nhiễm các hydrocacbon thơm đa vòng có trong dầu do có chi phí thấp, đa dạng và các khả năng hấp thụ tương đối tốt hơn than hoạt tính (Kearns *et al.*, 2014). Than sinh học là một chất xốp có các gốc cacbon và có nguồn gốc từ quá trình nhiệt phân sinh khối các loại chất thải, xác động, thực vật, v.v. dưới điều kiện hạn chế oxy hoặc không có oxy (Ahmad *et al.*, 2014).

Trong xử lý đất ô nhiễm, than sinh học có diện tích bề mặt tiếp xúc lớn, có khả năng trao đổi điện tích dương, và được tạo ra từ nhiều loại nguyên vật liệu khác nhau với các giá trị nhiệt độ nhiệt phân khác nhau, nhờ đó có thể tăng cường khả năng hấp thụ các chất ô nhiễm hữu cơ và vô cơ lên bề mặt của các loại vật liệu này đồng thời giữ lại các chất ô nhiễm (Ahmad *et al.*, 2012). Các hiệu ứng bẫy dính hoặc nhả cacbon vào đất có thể làm tăng khả năng hấp thụ các kim loại nặng như asen do đó nó duy trì các chất dinh dưỡng cho thực vật; sự kết hợp của các loại phân bón sinh học (compost), phân bón hóa học và các chất xử lý khác cùng với than sinh học có thể làm tăng tối đa hiệu quả xử lý các loại đất.

Đặc biệt, than sinh học tạo ra từ trấu gạo nhờ quá trình nhiệt phân nhanh ở 450°C và với tốc độ 1 tấn/h có diện tích bề mặt đặc hiệu là 34 m²/g, hàm lượng tro 42% và một lượng lớn các nhóm C-O, ví dụ phenolic, hydroxin và ete moiety làm cho

chúng thích hợp để hấp thụ các hợp chất hữu phân cực như các hiđrocacbon thơm có trong các thành phần của dầu và dầu mỏ (Liu *et al.*, 2012).

Tuy nhiên, cho tới nay chưa có nhiều công bố ở Việt Nam về hiệu quả xử lý ô nhiễm dầu bằng than sinh học. Trong khi đó, đã có nhiều công bố trên thế giới về khả năng hấp thụ các hợp chất hiđrocarbon trong dầu mỏ có trong đất và nước nhiễm dầu bởi than sinh học. Chẳng hạn như than sinh học đã được chứng minh có khả năng ứng dụng trong xử lý một số loại hiđrocarbon thơm đa vòng khó phân hủy như naphtalen (Chen và Chen, 2009), phenantren (Kong *et al.*, 2011), piren (Hale *et al.*, 2011) v.v.. Đối với đất nhiễm dầu, việc sử dụng than sinh học còn tốn nhiều thời gian và còn nhiều hạn chế do hệ thống đất và chất thải rắn có tính chất phức tạp. Đồng thời chưa có nhiều công bố về việc sử dụng than sinh học làm chất mang cho các vi khuẩn tạo màng sinh học để tăng hiệu quả xử lý đất nhiễm dầu.

Do đó, từ những yêu cầu cấp bách được đặt ra là phải có quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học trên chất mang than sinh học để xử lý đất ô nhiễm hiđrocacbon thơm và chế phẩm vi sinh thu được bằng quy trình này nhằm ứng dụng xử lý những vùng đất ô nhiễm tương tự.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là nhằm giải quyết các tồn tại nêu trên. Theo đó, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học trên chất mang than sinh học để xử lý đất nhiễm các hiđrocacbon thơm và chế phẩm vi sinh thu được bằng quy trình này.

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học trên chất mang than sinh học để xử lý đất ô nhiễm hiđrocacbon thơm, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

(a) nhân giống vi sinh vật bằng cách lên men bốn chủng vi khuẩn bao gồm: *Rhodococcus* sp. BQN11, *Pseudomonas* sp. BQN21, *Stenotrophomonas* sp. QND8, *Klebsiella* sp. VTD8 và có số lưu giữ tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam với số lưu giữ lần lượt từ CNSHMT 15 đến CNSHMT 18, tương ứng trong môi trường lên men thể dịch thu được các dịch lên men vi khuẩn;

(b) thu sinh khối vi khuẩn bằng cách ly tâm từng dịch lên men vi khuẩn thu được từ bước a) với tốc độ 4000 vòng/phút ở nhiệt độ 4°C trong thời gian 10 phút, sau đó được rửa hai lần bằng nước cất đã khử trùng và phối trộn các sinh khối với tỷ lệ bằng nhau, bổ sung dung dịch muối sinh lý để thu sinh khối vi khuẩn có nồng độ 10^7 CFU/ml;

(c) thu sản phẩm phối trộn bằng cách phối trộn sinh khối vi khuẩn có nồng độ 10^7 CFU/ml, môi trường LB và than sinh học theo tỷ lệ tương ứng 1:10:15 (thể tích/thể tích/trọng lượng), sau khi trộn đều, thu được sản phẩm phối trộn; và

(d) thu chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học trên chất mang than sinh học bằng cách lên men sản phẩm phối trộn trong điều kiện nhiệt độ từ 28 đến 30°C, đảo trộn theo chu kỳ 6 giờ, thời gian lên men trong 48 giờ, sau đó sấy sản phẩm lên men ở nhiệt độ từ 40 đến 45°C trong thời gian từ 3 đến 4 giờ để thu được vi sinh tạo màng sinh học trên chất mang than sinh học có độ ẩm 40 %.

Theo khía cạnh thứ hai, giải pháp hữu ích đề cập đến chế phẩm vi sinh thu được bằng quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học trên chất mang than sinh học để xử lý đất ô nhiễm hidrocarbon thơm, trong đó chế phẩm này chứa các chủng vi khuẩn bao gồm *Rhodococcus* sp. BQN11, *Pseudomonas* sp. BQN21, *Stenotrophomonas* sp. QND8, *Klebsiella* sp. VTD8 và có số lưu giữ tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam với số lưu giữ từ CNSHMT 15 đến CNSHMT 18.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là hình thái khuẩn lạc của bốn chủng vi khuẩn, trong đó (A) là *Rhodococcus* sp. BQN11, (B) là *Pseudomonas* sp. BQN21, (C) là *Stenotrophomonas* sp. QND8, (D) là *Klebsiella* sp. VTD8.

Fig.2 là cây phát sinh chủng loại của 4 chủng vi khuẩn.

Fig.3 là chế phẩm vi sinh thu được bằng quy trình theo giải pháp hữu ích.

Fig.4 là chế phẩm vi sinh thu được bằng quy trình theo giải pháp hữu ích ở độ phóng đại 5.000 lần.

Fig.5 là biểu đồ thể hiện hiệu suất phân hủy antraxen (a), naphtalen (b), phenantren (c) và piren (d) của chế phẩm xử lý đất ô nhiễm hidrocarbon thơm từ các chủng vi khuẩn tạo màng sinh học trên chất mang than sinh học sau 10 ngày nuôi tĩnh.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích mô tả chi tiết các phương án cụ thể, tuy nhiên, các phương án này chỉ nhằm mục đích nhằm mô tả chi tiết giải pháp hữu ích chứ không nhằm mục đích hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học trên chất mang than sinh học để xử lý đất ô nhiễm hidrocarbon thơm và chế phẩm vi sinh thu được bằng quy trình này.

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học trên chất mang than sinh học để xử lý đất nhiễm các hidrocarbon thơm.

Trong bước nhân giống vi sinh vật bằng cách lên men hai cấp, các chủng vi khuẩn được sử dụng bao gồm các chủng vi khuẩn: *Rhodococcus* sp. BQN11, *Pseudomonas* sp. BQN21, *Stenotrophomonas* sp. QND8, *Klebsiella* sp. VTD8 trong môi trường lên men thể dịch thu được các dịch lên men vi khuẩn.

Chủng vi khuẩn *Rhodococcus* sp. BQN11 là chủng thuần được phân lập từ mẫu nước nhiễm dầu lấy lấy tại đất ô nhiễm dầu tại Quảng Ninh. Mẫu sau khi thu thập được làm giàu trong môi trường khoáng Gost dịch sau 7 ngày nuôi lắc với tốc độ 200 vòng/phút ở 30°C với hỗn hợp các hidrocarbon thơm là naphtalen, antraxen, phenantren, piren là nguồn cacbon và năng lượng. Vi khuẩn được phân lập và tuyển chọn dựa trên khả năng phân hủy các hidrocarbon thơm như naphtalen, antraxen, phenantren, piren và khả năng tạo màng sinh học. Sau khi tuyển chọn, thu được chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy các hidrocarbon thơm như naphtalen, antraxen, phenantren, piren vượt trội, chủng này được ký hiệu là *Rhodococcus* sp. BQN11 và được lưu giữ tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm và Công nghệ Việt Nam với số lưu giữ là CNSHMT 15.

Để định danh chủng *Rhodococcus* sp. BQN11, tiến hành giải trình tự với cặp mồi sử dụng bao gồm:

Mồi xuôi (27f): 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

Mồi ngược (1527r): 5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3'

Kết quả giải trình tự thu được trình tự nêu trong SEQ IP NO.1, kết quả này được dùng để định danh loài bằng cách sử dụng chương trình BLAST (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>) để so sánh các đoạn gen 16S rARN trên ngân hàng gen. Kết quả cho thấy chủng *Rhodococcus* sp. BQN11 theo giải pháp hữu ích thuộc chi *Rhodococcus* và đây là một biến chủng mới gần loài *ruber* và đây được xác định là một chủng mới được đăng ký trên Genbank với mã số truy cập KC151262.

Chủng vi khuẩn *Pseudomonas* sp. BQN21 là chủng thuần được phân lập từ mẫu đất nhiễm dầu lấy tại Kho xăng dầu B12, Quảng Ninh. Mẫu sau khi thu thập được làm giàu trong môi trường khoáng Gost dịch sau 7 ngày nuôi lắc với tốc độ 200 vòng/phút ở 30°C với dầu thô là nguồn cacbon và năng lượng duy nhất. Vi khuẩn được phân lập và tuyển chọn dựa trên khả năng phân hủy tốt các hidrocarbon thơm có trong dầu thô như naphtalen, antraxen, phenantren, piren và khả năng tạo màng sinh học. Sau khi tuyển chọn, thu được chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy tốt naphtalen, antraxen, phenantren, piren, chủng này được ký hiệu là *Pseudomonas* sp. BQN21 và được lưu giữ tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm và Công nghệ Việt Nam với số lưu giữ là CNSHMT 16.

Để định danh chủng *Pseudomonas* sp. BQN21, tiến hành giải trình tự với cặp mồi sử dụng bao gồm:

Mồi xuôi (27f): 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

Mồi ngược (1527r): 5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3'

Kết quả giải trình tự thu được trình tự nêu trong SEQ IP NO.1, kết quả này được dùng để định danh loài bằng cách sử dụng chương trình BLAST (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>) để so sánh các đoạn gen 16S rARN trên ngân hàng gen. Kết quả cho thấy chủng *Pseudomonas* sp. BQN21 theo giải pháp hữu ích thuộc chi *Pseudomonas* là một biến chủng mới gần loài *mendocina* và đây được xác định là một chủng mới được đăng ký trên Genbank với mã số truy cập KC151263.

Chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas* sp. QND8 là chủng thuần được phân lập từ mẫu đất nhiễm dầu lấy từ mẫu nước nhiễm dầu lấy tại bờ biển tỉnh Quảng Ngãi. Mẫu sau khi thu thập được làm giàu trong môi trường khoáng Gost dịch sau 7 ngày nuôi lắc

với tốc độ 200 vòng/phút ở 30°C với nguồn cơ chất là dầu thô là nguồn cacbon và năng lượng duy nhất. Vi khuẩn được phân lập và tuyển chọn dựa trên khả năng phân hủy dầu thô chứa một số hợp chất hidrocarbon thơm như naphtalen, antraxen, phenantren, piren và khả năng tạo màng sinh học. Sau khi tuyển chọn, thu được chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy những nguồn cơ chất này vượt trội, chủng này được ký hiệu là *Stenotrophomonas* sp. QND8 và được lưu giữ tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm và Công nghệ Việt Nam với số lưu giữ là CNSHMT 17.

Để định danh chủng *Stenotrophomonas* sp. QND8, tiến hành giải trình tự với cặp môi sử dụng bao gồm:

Môi xuôi (27f): 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

Môi ngược (1527r): 5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3'

Kết quả giải trình tự thu được trình tự nêu trong SEQ IP NO.1, kết quả này được dùng để định danh loài bằng cách sử dụng chương trình BLAST (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>) để so sánh các đoạn gen 16S rARN trên ngân hàng gen. Kết quả cho thấy chủng *Stenotrophomonas* sp. QND8 theo giải pháp hữu ích thuộc chi *Stenotrophomonas* và đây là một biến chủng mới gần loài *maltophilia* và đây được xác định là một chủng mới được đăng ký trên Genbank với mã số truy cập LC034303.

Chủng vi khuẩn *Klebsiella* sp. VTD8 là chủng thuần được phân lập từ mẫu đất nhiễm dầu lấy tại Vũng Tàu. Mẫu sau khi thu thập được làm giàu trong môi trường khoáng Gost dịch sau 7 ngày nuôi lắc với tốc độ 200 vòng/phút ở 30°C với dầu diesel là nguồn cacbon và năng lượng duy nhất. Vi khuẩn được phân lập và tuyển chọn dựa trên khả năng phân hủy một số hidrocarbon thơm như naphtalen, antraxen, phenantren, piren có trong dầu thô và khả năng tạo màng sinh học. Sau khi tuyển chọn, thu được chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy những hidrocarbon thơm vượt trội, chủng này được ký hiệu là *Klebsiella* sp. VTD8 và được lưu giữ tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm và Công nghệ Việt Nam với số lưu giữ là CNSHMT 18.

Để định danh chủng *Klebsiella* sp. VTD8, tiến hành giải trình tự với cặp môi sử dụng bao gồm:

Môi xuôi (27f): 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

Môi ngược (1527r): 5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3'

Kết quả giải trình tự thu được trình tự nêu trong SEQ IP NO.1, kết quả này được dùng để định danh loài bằng cách sử dụng chương trình BLAST (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>) để so sánh các đoạn gen 16S rARN trên ngân hàng gen. Kết quả cho thấy chủng *Klebsiella* sp. VTD8 theo giải pháp hữu ích thuộc chi *pneumoniae* và đây được xác định là một chủng mới được đăng ký trên Genbank với mã số truy cập LC381758.

Hình thái khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn được thể hiện trên Fig.1. Cây phát sinh chủng loại của các chủng 4 chủng vi khuẩn này được thể hiện tương ứng trên Fig.2.

Các quy trình, kỹ thuật nhân giống vi khuẩn thuần chủng là đã biết và được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này hiểu rõ và có thể áp dụng dễ dàng.

Lên men cấp 1: Các dịch chủng giống tươi sau khi được nhân từ những khuẩn lạc riêng rẽ qua đêm được cấy chuyển sang 4 bình tam giác thủy tinh 100 ml riêng rẽ chứa 9 ml môi trường Luria Bertani (LB) với tỷ lệ dịch chủng giống tươi:môi trường là 1:9 (ml/ml) – nghĩa là cho 1 ml dịch chủng giống tươi vào 9 ml môi trường. Bình được lắc 180 vòng/phút ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 28 đến 30°C trong thời gian 24 giờ. Các thành phần môi trường có công thức như sau:

Thành phần môi trường LB nuôi cấy vi khuẩn (g/l): 10 g/l NaCl, 10g/l trypton, 5 g/l cao men, pH = 7-7,2.

Môi trường nuôi cấy thạch được bổ sung 2 % thạch agar.

Các thành phần môi trường được cân cẩn thận và được khử trùng ở 115°C trong 30 phút.

Lên men cấp 2: Dịch nuôi cấy sau khi lên men cấp 1 được cấy truyền sang các bình tam giác thủy tinh 500 ml chứa 90 ml một trong hai môi trường sau: Luria Bertani (LB) với tỷ lệ dịch lên men cấp 1: môi trường là 1:9 (ml/ml) - nghĩa là cho 10 ml dịch lên men cấp 1 vào 90 ml môi trường. Bình được lắc 180 vòng/phút ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 28 đến 30°C trong thời gian 24 giờ.

Trong bước thu sinh khối vi khuẩn bằng cách ly tâm từng dịch lên men vi khuẩn thu được riêng biệt với tốc độ 4000 vòng/phút ở nhiệt độ 4°C trong thời gian 10 phút, sau đó được rửa hai lần bằng nước cất đã khử trùng và phối trộn các sinh khối với tỷ lệ

bằng nhau, bổ sung dung dịch muối sinh lý để thu sinh khối vi khuẩn có nồng độ 10^7 CFU/ml.

Trong bước thu sản phẩm phối trộn bằng cách phối trộn sinh khối vi khuẩn có nồng độ 10^7 CFU/ml, môi trường LB và than sinh học theo tỷ lệ tương ứng 1:10:15 (thể tích/thể tích/trọng lượng), sau khi trộn đều, thu được sản phẩm phối trộn.

Than sinh học được sử dụng làm cơ chất không những có vai trò gắn các vi sinh vật có khả năng phân hủy các hydrocacbon thơm và tạo màng sinh học cao mà còn là nguồn cơ chất giúp thấm hút một phần các hợp chất thơm tạo chế phẩm sinh học. Than sinh học được khử trùng ướt ở 121°C trong 30 phút để loại các nhóm vi sinh vật ngoại lai.

Trong bước thu chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học bằng cách lên men sản phẩm phối trộn trong điều kiện nhiệt độ từ 28 đến 30°C , đảo trộn theo chu kỳ 6 giờ, thời gian lên men trong 48 giờ, thu được chế phẩm xử lý đất nhiễm các hydrocacbon thơm có độ ẩm 40-45 %.

Chế phẩm này có dạng xốp, màu đen, kích cỡ hạt từ 1-3 mm, có mật độ vi khuẩn đạt $\geq 10^9$ CFU/g (ml), có khả năng loại bỏ trên 92 % từng loại hydrocacbon thơm là naphthalen, antraxen, phenantren, piren với hàm lượng ban đầu là 200 mg/l; khai thác ổn định trong thời gian ≥ 6 tháng; an toàn cho môi trường và đạt độ ẩm 40-45 %.

Chế phẩm vi sinh này sẽ được đóng gói trong túi kẽm và được kiểm định mật độ vi sinh vật cũng như khả năng phân hủy hydrocacbon thơm sau 1 tuần, 2 tuần, 1 tháng, 3 tháng và 6 tháng.

Theo khía cạnh thứ hai, giải pháp hữu ích đề cập đến chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học trên chất mang than sinh học để xử lý đất nhiễm các hydrocacbon thơm thu được bằng quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học trên chất mang than sinh học để xử lý đất nhiễm các hydrocacbon thơm, trong đó chế phẩm này chứa các chủng vi khuẩn bao gồm *Rhodococcus* sp. BQN11, *Pseudomonas* sp. BQN21, *Stenotrophomonas* sp. QND8, *Klebsiella* sp. VTD8 có số lưu giữ tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam với số lưu giữ lần lượt từ CNSHMT 15 đến CNSHMT 18.

Cơ chế xử lý đất nhiễm các hidrocarbon thơm của chế phẩm vi sinh để xử lý đất ô nhiễm hidrocarbon thơm từ vi khuẩn tạo màng sinh học trên chất mang than sinh học theo giải pháp hữu ích này được thể hiện như sau: khi bổ sung chế phẩm vào đất nhiễm các hợp chất hidrocarbon thơm, các chủng vi khuẩn tạo màng sinh học có trong chế phẩm đang ở trạng thái tĩnh sẽ nhanh chóng sinh trưởng và phát triển trên nguồn cơ chất là các hidrocarbon thơm và liên kết với nhau tạo màng sinh học bám trên các bề mặt vật thể lỏng và rắn. Trong màng sinh học, các chủng vi khuẩn có mật độ cao liên kết với nhau và được bao phủ bởi 1 lớp polysaccarit ngoại bào tạo thành một cấu trúc bền vững. Nhờ đó, chúng có khả năng hỗ trợ trao đổi chất và dễ dàng phân hủy các hidrocarbon thơm. Đồng thời, nhờ khả năng tạo màng sinh học nên chúng có khả năng chống chịu lại các điều kiện khắc nghiệt của môi trường đất nhiễm các hidrocarbon thơm tốt hơn ở dạng các tế bào đơn lẻ và hạn chế được sự cạnh tranh của các vi sinh vật khác.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Quy trình sản xuất 50 kg chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học trên chất mang than sinh học để xử lý đất ô nhiễm hidrocarbon thơm.

Nhân giống 4 chủng vi sinh vật bằng cách lên men hai cấp các chủng này. Cụ thể là: *Rhodococcus* sp. BQN11, *Pseudomonas* sp. BQN21, *Stenotrophomonas* sp. QND8, *Klebsiella* sp. VTD8.

Lên men cấp 1: lấy mỗi dịch chủng giống tươi với lượng 1 ml sau khi được nhân từ những khuẩn lạc riêng rẽ qua đêm được cấy chuyển sang 4 bình tam giác thủy tinh 100 ml riêng rẽ chứa 9 ml một trong hai môi trường sau: Luria Bertani (LB) dùng cho vi khuẩn. Bình được lắc 180 vòng/phút ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 24 giờ. Các thành phần môi trường có công thức như sau:

Thành phần môi trường LB nuôi cấy vi khuẩn (g/l): 10 g/l NaCl, 10 g/l trypton, 5 g/l cao men, pH = 7.

Môi trường nuôi cấy thạch được bổ sung 2 % thạch agar.

Các thành phần môi trường được cân cẩn thận và được khử trùng ở 115°C trong 30 phút.

Lên men cấp 2: lấy 10 ml dịch nuôi cấy sau khi lên men cấp 1 được cấy truyền sang các bình tam giác thủy tinh 500 ml chứa 90 ml môi trường Luria Bertani (LB). Bình được lắc 180 vòng/phút ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 24 giờ.

Các chủng vi khuẩn nuôi cấy riêng rẽ được ly tâm với tốc độ 4000 vòng/phút ở nhiệt độ 4°C trong thời gian 10 phút để thu sinh khối vi khuẩn. Sinh khối của vi khuẩn thu được, sẽ được rửa hai lần bằng nước cất đã khử trùng. Bổ sung 100 ml dung dịch muối sinh lý vào các bình chứa sinh khối vi khuẩn sau ly tâm và thu dịch này.

Thu 1 lít dịch chứa vi sinh có nồng độ khoảng 10^7 CFU/ml bằng cách phối trộn sinh khối vi khuẩn và pha loãng để có nồng độ khoảng 10^7 CFU/ml.

Phối trộn 500 ml dịch của từng loại vi khuẩn ta có được 2 lít dịch của hỗn hợp 4 chủng vi khuẩn sử dụng làm chế phẩm, và pha loãng để có nồng độ khoảng 10^7 CFU/ml – gọi là dịch chứa vi sinh. Dịch thu được sẽ được pha loãng để thu dịch chứa vi sinh đạt nồng độ cuối cùng khoảng 10^7 CFU/ml. Dịch thu được sẽ được xác định mật độ vi sinh vật có trong hỗn hợp dịch sinh khối bằng cách đo OD₆₀₀.

Phối trộn 2 lít dịch chứa vi sinh có nồng độ 10^7 CFU/ml, 20 lít hỗn hợp môi trường và 30 kg than sinh học, thu được 52 kg sản phẩm phối trộn. Than sinh học được khử trùng ướt ở 121°C trong 30 phút để loại các nhóm vi sinh vật ngoại lai.

Lên men 52 kg sản phẩm phối trộn trong tủ lên men có nhiệt độ 30°C, cách 6 giờ lại đảo trộn nhẹ hỗn hợp này, sau thời gian 48 giờ thu được 62 kg sản phẩm lên men. Tủ lên men có dung tích 5x1x1,5 (m), sử dụng khay inox với độ dày của cơ chất lên men 6 cm. Sản phẩm lên men đạt độ ẩm 45 %.

Chế phẩm này có dạng xốp, màu đen, kích cỡ hạt từ 1-3 mm, có mật độ vi khuẩn đạt $\geq 10^9$ CFU/g (ml), có năng lực phân hủy từ 92 – 100% từng loại hidrocarbon thơm là naphtalen, antraxen, phenantren, piren với hàm lượng ban đầu mỗi loại là 200 mg/l; khai thác ổn định trong thời gian ≥ 6 tháng; an toàn cho môi trường và đạt độ ẩm 40 %.

Chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học trên chất mang than sinh học sẽ được đóng gói trong túi kẽm.

Ví dụ 2. Ứng dụng của chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học trên chất mang than sinh học trong xử lý đất ô nhiễm hidrocarbon thơm như naphtalen, antraxen, phenantren, piren.

Đất được gây ô nhiễm nhân tạo với các thành phần hiđrocacbon thơm như naphtalen, antraxen, phenantren, piren, nồng độ mỗi loại hợp chất là 200 mg/l. Hàm lượng naphtalen, antraxen, phenantren, piren còn lại sau các thí nghiệm đã được phân tích tại Viện Công nghệ mới, Viện KH-CN Quân sự. Thí nghiệm xử lý đất nhiễm hiđrocacbon thơm của chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học trên chất mang than sinh học được thiết kế như sau:

Mẫu số 1: chủng vi khuẩn *Rhodococcus* sp. BQN11 tạo màng sinh học không có chất mang than sinh học và bổ sung 100 g đất ô nhiễm.

Mẫu số 2: chủng vi khuẩn *Pseudomonas* sp. BQN21 tạo màng sinh học không có chất mang than sinh học và bổ sung 100 g đất ô nhiễm.

Mẫu số 3: chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas* sp. QND8 tạo màng sinh học không có chất mang than sinh học và bổ sung 100 g đất ô nhiễm.

Mẫu số 4: chủng vi khuẩn *Klebsiella* sp. VTD8 tạo màng sinh học không có chất mang than sinh học và bổ sung 100 g đất ô nhiễm.

Mẫu số 5: hỗn hợp bốn chủng vi khuẩn tạo màng sinh học không có chất mang than sinh học và bổ sung 100 g đất ô nhiễm.

Mẫu số 6: phối trộn 1 g chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học trên chất mang than sinh học và bổ sung 100 g đất ô nhiễm.

Mẫu số 7: phối trộn 100 g đất ô nhiễm thu thập ở trên với 1 g than sinh học không có chứa vi khuẩn.

Mẫu số 8: sử dụng 100 g đất ô nhiễm không bổ sung vi khuẩn hay than sinh học.

Đặt 8 khay chứa các mẫu như trên vào tủ ẩm nhiệt độ từ 28 đến 30°C, sau mỗi 6 giờ đảo trộn một lần. Sau 10 ngày, chuẩn bị dung môi hữu cơ etinaxetat, các mẫu sẽ được tách chiết bằng dung môi này, cụ thể là cho 20 ml dung môi vào 10 g mẫu mỗi loại, hỗn hợp mẫu và dung môi được lắc để đảo trộn trên máy lắc trong 30 phút ở nhiệt độ phòng để tách chiết. Quá trình tách chiết được thực hiện 3 lần. Dịch tách chiết được tiến hành quay cô chân không và làm khan bằng Na₂SO₄. Sau đó bổ sung 1 ml metanol vào dịch tách chiết. Tiến hành phân tích bằng máy sắc ký lỏng cao áp (HPLC). So sánh với thư viện chất chuẩn có sẵn trong máy, kết quả cho thấy, ở các mẫu sử dụng màng sinh học từ đơn chủng vi khuẩn như mẫu số 1, 2, 3 và 4 thì có 78, 75, 74 và 76% hàm lượng antraxen đã được phân hủy sau 10 ngày với hàm lượng ban đầu là 200 mg/l. Trong khi đó, hiệu suất phân hủy antraxen ở mẫu số 5 là 83%; mẫu số 6 (có sử

dụng chế phẩm) là 100%; mẫu số 7 (chỉ chứa than sinh học, không có vi khuẩn) là 32% và mẫu số 8 là 0% (Fig. 5a).

Tương tự với naphtalen, hiệu suất phân hủy ở các mẫu từ số 1 đến số 8 lần lượt là 62, 67, 64, 62, 74, 92,3, 12 và 0% (Fig.5b).

Tương tự với phenantren, hiệu suất phân hủy ở các mẫu từ số 1 đến số 8 lần lượt là 74, 76, 78, 73, 89, 100, 22 và 0% (Fig.5c).

Tương tự với piren, hiệu suất phân hủy ở các mẫu từ số 1 đến số 8 lần lượt là 74, 71, 72, 75, 79, 99, 21 và 0% (Fig.5d).

Như vậy, sau 10 ngày thử nghiệm với đất nhiễm các thành phần hidrocarbon thơm như naphtalen, antraxen, phenantren, piren, chế phẩm đã cho thấy hiệu quả phân hủy đạt tương ứng là 100; 92,3; 100 và 99%. Việc sử dụng chế phẩm tạo thành có hiệu quả cao hơn rất nhiều so với các thí nghiệm còn lại (đạt từ 0-83%).

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình theo giải pháp hữu ích đã tạo được chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học trên chất mang than sinh học và thử nghiệm có hiệu quả trong xử lý đất nhiễm các hidrocarbon thơm. Khi sử dụng hỗn hợp các chủng vi khuẩn có khả năng tạo màng sinh học sẽ hỗ trợ nhau chống lại sự cạnh tranh của các nhóm vi sinh vật khác và tăng hiệu suất xử lý ô nhiễm các hidrocarbon thơm. Đất nhiễm các hidrocarbon thơm sau khi được xử lý bằng các chế phẩm màng sinh học đa chủng trên chất mang than sinh học đã loại bỏ trên 92 % các hidrocarbon thơm với hàm lượng ban đầu là 200 mg/l. Bên cạnh đó, việc dùng than sinh học làm chất mang giúp cho màng sinh học đa chủng được bền vững, ổn định hơn khi sử dụng các chủng vi khuẩn đơn lẻ đặc biệt xử lý ngoài hiện trường.

Quy trình theo giải pháp hữu ích đơn giản, dễ thực hiện và phù hợp với các điều kiện thực tế, có thể ứng dụng trong các công nghệ xử lý các hidrocarbon thơm có trong dầu tại các vùng đất nhiễm dầu ở Việt Nam.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học trên chất mang than sinh học để xử lý đất nhiễm hiđrocacbon thơm, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

(a) nhân giống vi sinh vật bằng cách lên men bốn chủng vi khuẩn bao gồm: *Rhodococcus* sp. BQN11, *Pseudomonas* sp. BQN21, *Stenotrophomonas* sp. QND8, *Klebsiella* sp. VTD8 có số lưu giữ tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam với số lưu giữ lần lượt từ CNSHMT 15 đến CNSHMT 18, tương ứng trong môi trường lên men thể dịch thu được các dịch lên men vi khuẩn;

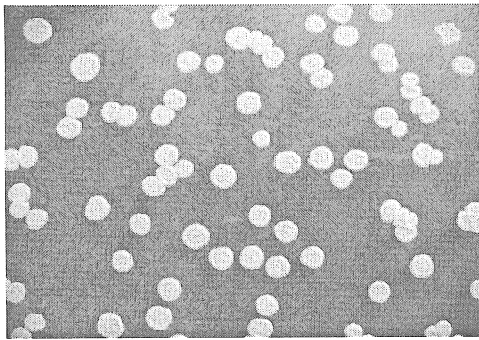
(b) thu sinh khối vi khuẩn bằng cách ly tâm từng dịch lên men vi khuẩn thu được từ bước a) riêng biệt với tốc độ 4000 vòng/phút ở nhiệt độ 4°C trong thời gian 10 phút, sau đó được rửa hai lần bằng nước cất đã khử trùng và phối trộn các sinh khối với tỷ lệ bằng nhau, bổ sung dung dịch muối sinh lý để thu được sinh khối vi khuẩn có nồng độ 10^7 CFU/ml;

(c) thu sản phẩm phối trộn bằng cách phối trộn sinh khối vi khuẩn có nồng độ 10^7 CFU/ml, môi trường LB và than sinh học theo tỷ lệ tương ứng 1:10:15 (thể tích/thể tích/trọng lượng), sau khi trộn đều để thu được sản phẩm phối trộn; và

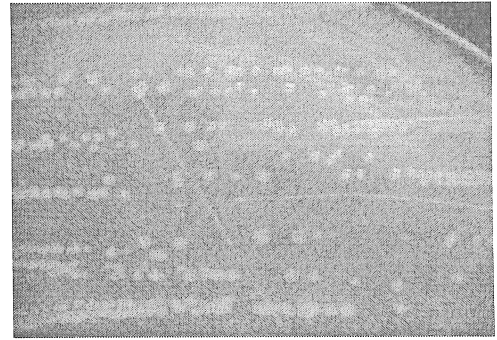
(d) thu chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học trên chất mang than sinh học bằng cách lên men sản phẩm phối trộn trong điều kiện nhiệt độ từ 28 đến 30°C, đảo trộn theo chu kỳ 6 giờ, thời gian lên men trong 48 giờ, sau đó sấy sản phẩm lên men ở nhiệt độ từ 40 đến 45°C trong thời gian từ 30 phút đến 1 giờ để thu được chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học trên chất mang than sinh học có độ ẩm từ 40 đến 45 %.

2. Chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học trên chất mang than sinh học để xử lý đất ô nhiễm hiđrocacbon thơm thu được bằng quy trình theo điểm 1, trong đó chế phẩm này chứa các chủng vi khuẩn bao gồm *Rhodococcus* sp. BQN11, *Pseudomonas* sp. BQN21, *Stenotrophomonas* sp. QND8, *Klebsiella* sp. VTD8 có số lưu giữ tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam với số lưu giữ lần lượt từ CNSHMT 15 đến CNSHMT 18.

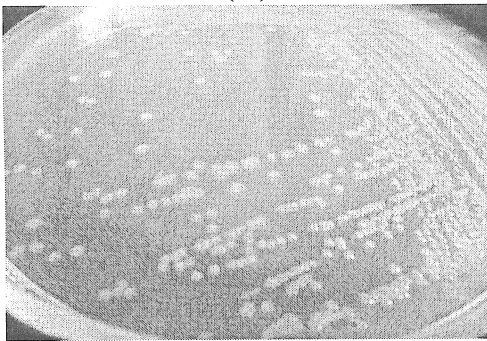
Fig.1



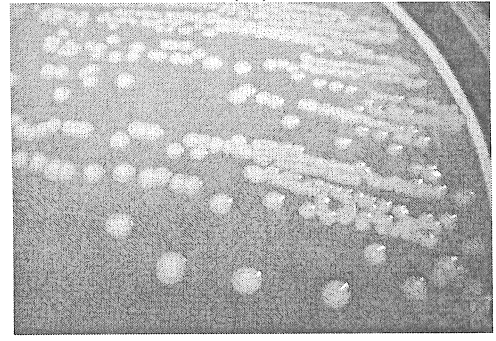
(A)



(B)



(C)



(D)

Fig.2

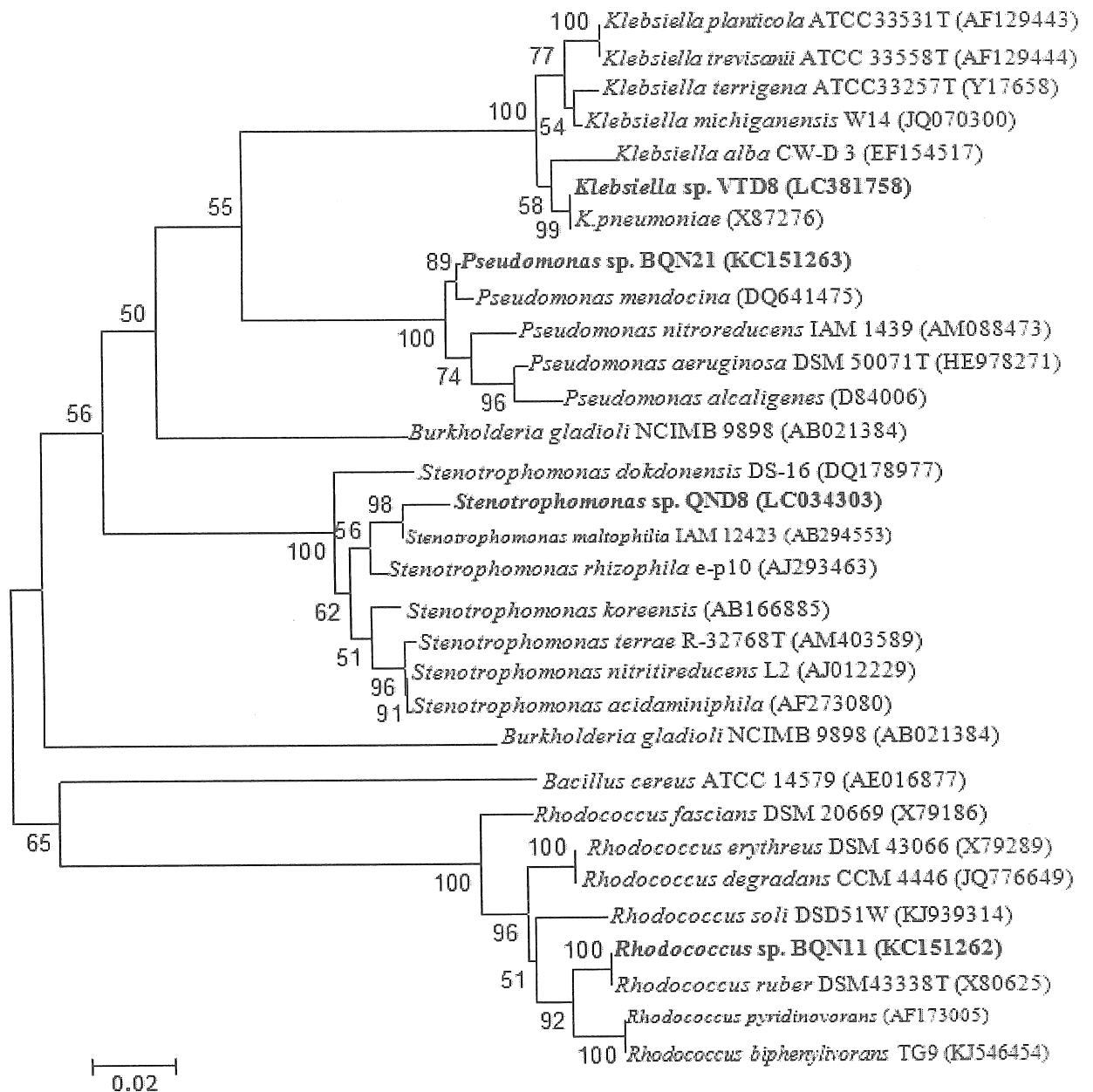


Fig.3



Fig.4

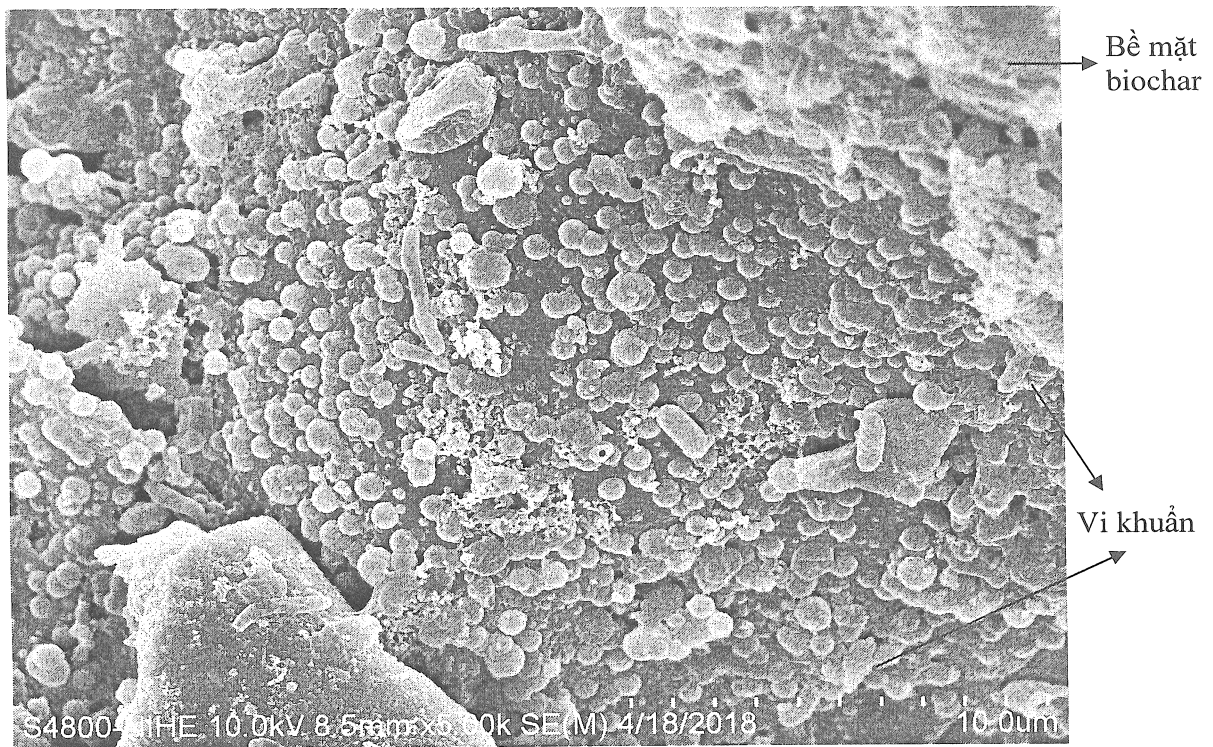
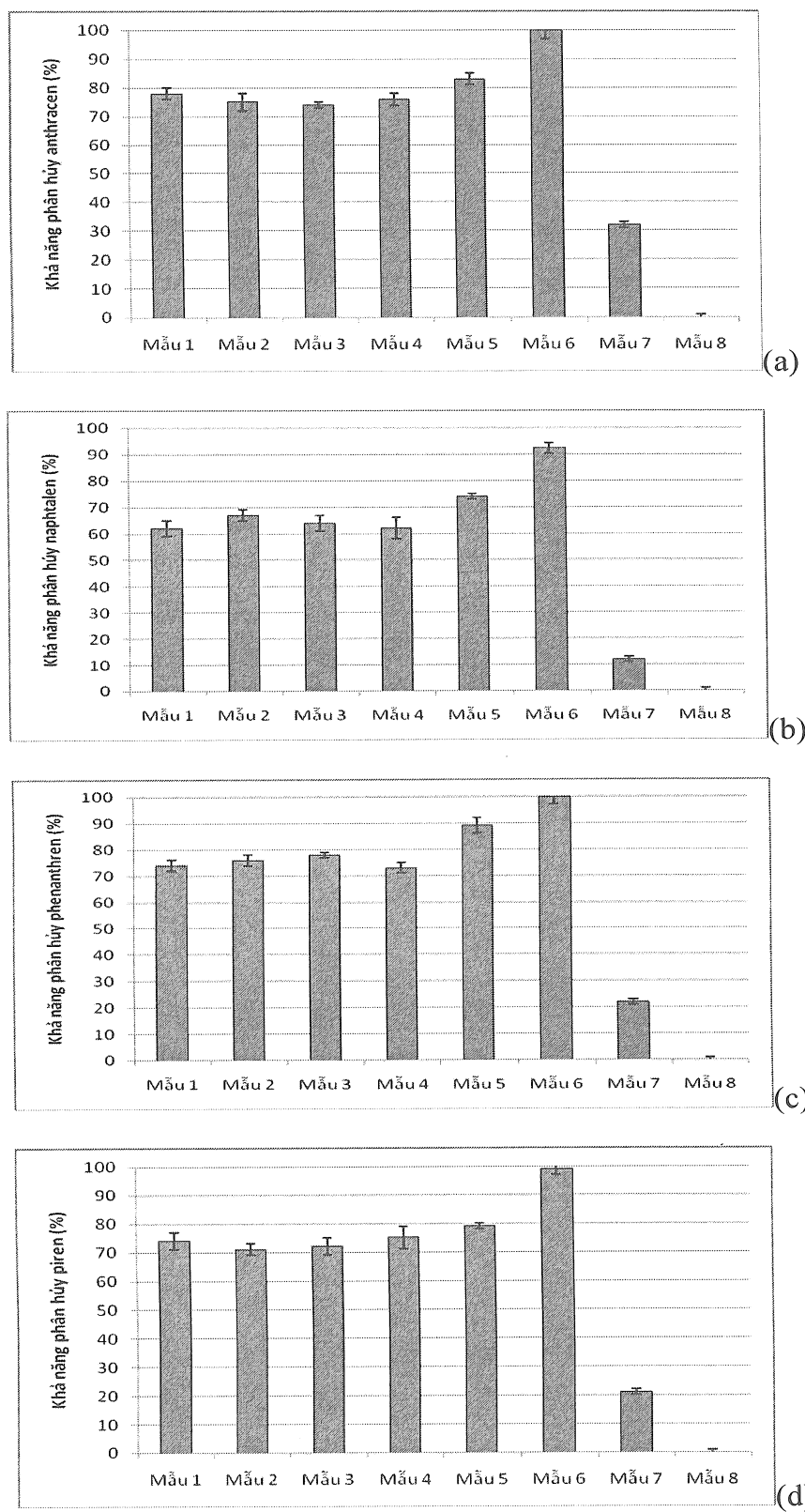


Fig.5



DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> Viện Công nghệ sinh học
- <120> Quy trình sản xuất chế phẩm xử lý đất ô nhiễm hidrocarbon thom từ vi khuẩn tạo màng sinh học trên chất mang than sinh học và chế phẩm thu được bằng quy trình này
- <130>
- <160> 4
- <170>
- <210> 1
- <211> 1381
- <212> ADN
- <213> *Rhodococcus* sp. BQN11
- <220>
- <223>
- <220>
- <400> 1381

```

1      gggcattcga ttaaccatgc agtcgaacga tgagcccage ttgctgggtg gattagtggc
61     gacgggtgag taacacgtgg gtgatctgcc ctgcacttcg ggataagcct gggaaactgg
121    gtctaatacc ggataggacc tcgggatgca tgttccgggg tggaaagggt ttccgggtgca
181    ggatggggccc gcggcctatc agcttggttg tggggtaacg gccaccaag gcgacgacgg
241    gtagccggcc tgagagggcg accggccaca ctgggactga gacacggccc agactcctac
301    gggaggcagc agtggggaat attgcacaat gggcgcaagc ctgatgagca cgccgcgtga
361    gggatgacgg ccttcggggt gtaaacctct ttcagtaccg acgaagcgcg agtgacggta
421    ggtacagaag aagcaccggc caactacgtg ccagcagccg cggtaatagc taggggtgcga
481    gcgttggtcc gaattactgg gcgtaaagag ctcgtaggcg gtttgctcgc tcgtctgtga
541    aaaccgcgag ctcaactgcg ggcttgacag cgatacgggc agacttgagt actgcagggg
601    agactggaat tcctgggtga gcggtgaaat gcgcagatat caggaggaaac accggtggcg
661    aaggcggggtc tctgggcagt aactgacgct gaggagcgaa agcgtgggta gcgaacagga
721    ttagataccc tggtagtcca cgccgtaaac ggtgggcgct aggtgtgggt ttccttcac
781    gggatccgtg ccgtagctaa cgcattaagc gcccgcctg gggagtacgg ccgcaaggct
841    aaaactcaaa ggaattgacg ggggcccgcg caagcggcgg agcatgtgga ttaattcgat
901    gcaacgcgaa gaaccttacc tgggtttgac atacaccgga ccgccccaga gatgggggtt
961    ccctgtgggtc ggtgtcaggt ggtcatgctg tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggta
1021   agtcccgcga cgagcgcaac ccttgctcctg tggtgccagc acgtaatggg ggggactcgc
1081   aggagactgc cggggtcaac tcggaggaag gtggggacga cgtcaagtca tcatgccctt
1141   tatgtccagg gcttcacaca tgctacaatg gccggtacag agggctgcga taccgcgagg
1201   tggagcgaat cccttaaagc cggctctcagt tcggatcggg gtctgcaact cgaccccggt
1261   aagtcggagt cgctagtaat gcagatcagc aacgctgcgg gaatacgttc ccgggccttg
1321   tacacaccgc ccgtcacgtc atgaaagtcg gtaacaccgg aagccggggc ctaaccctc
1381   gtgggaggga gccgt

```

<210> 2

<211> 1436

<212> ADN

<213> *Pseudomonas* sp. BQN21

<220>

<223>

<220>

<400> 1436

```

1      gcctaacaca tgcagtcgag cggatgacgg gagcttgctc cctgatttag cggcggacgg
61     gtgagtaatg cctaggaatc tgcctggtag tgggggataa cgttccgaaa ggaacgctaa
121    taccgcatac gtcctacggg agaaagcagg ggaccttcgg gccttgcgct atcagatgag
181    cctaggtcgg attagctagt tggtagaggta atggctcacc aaggcgacga tccgtaactg
241    gtctgagagg atgatcagtc aactgggaac tgagacacgg tccagactcc tacgggaggc
301    agcagtgggg aatattggac aatgggcgaa agcctgatcc agccatgccg cgtgtgtgaa
361    gaaggtcttc ggattgtaaa gcactttaag ttgggaggaa gggctgtagg ctaatatcct
421    gcggttttga cgttaccaac agaataagca ccggctaact tcgtgcccagc agccgcggta
481    atacgaaggg tgcaagcggt aatcggaatt actgggcgta aagcgcgcgt aggtggttcg
541    ttaagttgga tgtgaaagcc ccgggctcaa cctgggaact gcatccaaaa ctggcgagct
601    agagtacggt agagggtagt ggaatttcct gtgtagcggg gaaatgcgta gatataggaa
661    ggaacaccag tggcgaaggc gactacctgg actgatactg aactgaggt gcgaaagcgt
721    ggggagcaaa caggattaga taccctggta gtccacgccg taaacgatgt caactagccg
781    ttggaatcct tgagatttta gtggcgcagc taacgcatta agttgaccgc ctggggagta
841    cggccgcaag gttaaaactc aaatgaattg acgggggccc gcacaagcgg tggagcatgt
901    ggtttaattc gaagcaacgc gaagaacctt acctggcctt gacatgctga gaactttcca
961    gagatggatt ggtgccttcg ggaactcaga cacagggtgt gcatggctgt cgtcagctcg
1021   tgtcgtgaga tgttggttta agtcccgtaa cgagcgcaac ccttgctcctt agttaccagc
1081   acgttatggg gggcactcta aggagactgc cggtgacaaa ccggaggaag gtggggatga
1141   cgtcaagtca tcatggccct tacggccagg gctacacacg tgctacaatg gtcggtacaa
1201   agggttgcca agccgcgagg tggagctaata ccataaaac cgatcgtagt ccggatcgca
1261   gtctgcaact cgactgcgtg aagtcggaat cgctagtaat cgtgaatcag aatgtcacgg
1321   tgaatacgtt cccgggcctt gtacacaccg cccgtcacac catgggagtg ggttgctcca
1381   gaagtagcta gtctaactt cggggggacg gtaccacggg agtgattcta agcctc

```

<210> 3

<211> 1259

<212> ADN

<213> *Stenotrophomonas* sp. QND8

<220>

<223>

<220>

<400> 1259

```

1      atgcagtcga acggcagcac aggagagctt tcctctctgg gtggcgagtg gcggacgggt
61     gaggaataca tcggaatcta ctctgtcgtg ggggataacg tagggaaact tacgctaata
121    ccgcatacga cctacgggtg aaagcaaggg gaccttcggg ccttgcgcgga ttgaatgagc
181    cgatgtcggg ttagctagtt ggcggggtaa aggccacca aggcgacgat ccgtagctgg
241    tctgagagga tgatcagcca cactggaact gagacacggt ccagactcct acgggaggca
301    gcagtgggga atattggaca atgggcgcaa gcctgatcca gccataccgc gtgggtgaag
361    aaggccttcg ggttgtaaa ggccttttgg gggaaagaaa tccagctggc taataccggg
421    ttgggatgac ggtacccaaa gaataagcac cggctaactt cgtgccagca gccgcggtaa
481    tacgaagggt gcaagcggtta ctcggaatta ctgggcgtaa agcgtgcgta ggtggtcggt
541    taagtccggt gtgaaagccc tgggctcaac ctgggaactg cagtggatac tggatgacta
601    gaatgtggta gagggtagcg gaattcctgg tgtagcagtg aaatgcgtag agatcaggag
661    gaacatccat ggcgaaggca gctacctgga ccaacattga cactgaggca cgaaagcggtg
721    gggagcaaac aggattagat accctggtag tccacgcctt aaacgatgcg aactggatgt
781    tgggtgcaat ttggcacgca gtatcgaagc taacgcgtta agttctccgc ctggggagta
841    cggtcgcaag acttatactg aaaggaattg acgggggccc gcacaagcgg tggagtatgt
901    ggtttaatta gatgcaacga gaagaacctt actgggcctt gacatgtcaa gaactttcaa
961    gagatggatt ggtgccttcg ggaactcgaa cacagggtgaa gcatttcggt tgtcagctcg
1021   tgtcctgaga tgttcgggta agtcccgcaa cgagtgcagc ccttgtcctt acaggccatc
1081   aagtaatggt ggcaactcta aggagactgc cggagacaaa ccggaggaag gtggggatga
1141   cgtcaagtca tcatgtcctc tacgtccagg gctacacacg tactacaatg gtagggacag
1201   agggctgcaa gccggcgacg gtaagccaat cccagaaacc ctatctcagt ccggattgg

```

<210> 4

<211> 1428

<212> ADN

<213> *Klebsiella* sp. VTD8

<220>

<223>

<220>

<400> 1428

```

1      ggcctaacac atgcaagtcg agcggtagca cagagagctt gctctcgggt gacgagcggc
61     ggacgggtga gtaatgtctg ggaaactgcc tgatggaggg ggataactac tggaaacggg
121    agctaatacc gcataatgtc gcaagaccaa agtggggggac cttcggggcct catgccatca
181    gatgtgcca gatgggatta gctagtaggt ggggtaacgg ctcacctagg cgacgatccc
241    tagctggtct gagaggatga ccagccacac tggaaactgag acacgggtcca gactcctacg
301    ggaggcagca gtggggaata ttgcacaatg ggcgcaagcc tgatgcagcc atgccgcgtg
361    tgtgaagaag gccttcgggt tgtaaagcac tttcagcggg gaggaaggcg gtgaggttaa
421    taaccttgct gattgacgtt accgcagaa gaagcaccgg ctaactccgt gccagcagcc
481    gcggtataac ggagggtgca agcgtaatac ggaattactg ggcgtaaagc gcacgcaggc
541    ggtctgtcaa gtcggatgtg aaatccccgg gctcaacctg ggaactgcat tcgaaactgg
601    caggctagag tcttgtagag gggggtagaa ttccagggtg agcggtgaaa tgcgtagaga
661    tctggaggaa taccggtggc gaaggcggcc ccctggacaa agactgacgc tcaggtgcga
721    aagcgtgggg agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc acgccgtaaa cgatgtcgat
781    ttggaggttg tgcccttgag gcgtggcttc cgagactaac gcgttaaatac gaccgcctgg
841    ggagtacggc cgcaaggtta aaactcaaata gaattgacgg gggcccgcac aagcgggtgga
901    gcatgtggtt taattcgatg caacgcgaag aaccttacct ggtcttgaca tccacagaac
961    tttccagaga tggattgggt ccttcgggaa ctgtgagaca ggtgctgcat ggctgtcgtc
1021   agctcgtggt gtgaaatggt ggggttaagtc ccgcaacgag cgcaaccctt atcctttggt
1081   gccagcgggt aggccgggaa ctcaaaggag actgccagtg ataaactgga ggaagggtggg
1141   gatgacgtca agtcatcatg gcccttacga ccagggttac acacgtgcta caatggcata
1201   taaaaagaga agcgacctcg cgagagcaag cgacacctcat aaagtatgtc gtagtccgga
1261   ttggagtctg caactcgact ccatgaagtc ggaatcgcta gtaatcgtag atcagaatgc
1321   tacggtgaat acgttccccg gccttgtaca caccgcccgt cacaccatgg gagtgggttg
1381   caaaagaagt aggtagctta accttcggga gggcgtagca cattgtga

```