



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

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

(11)



1-0028169

(51)⁷ C12N 1/00

(13) B

(21) 1-2019-05920

(22) 24/10/2019

(45) 25/05/2021 398

(43) 30/01/2020 382A

(73) Viện Kỹ thuật Nhiệt đới - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)
A13, số 18 Hoàng Quốc Việt, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Nguyễn Vũ Giang (VN); Kiều Thị Quỳnh Hoa (VN).

(54) CHỦNG VI KHUẨN KHỬ SULFAT DESULFOVIBRIO ORYZAE M10 THUẦN
KHIẾT VỀ MẶT SINH HỌC CÓ KHẢ NĂNG SỬ DỤNG THẠCH CAO NHƯ
NGUỒN SULFAT DUY NHẤT

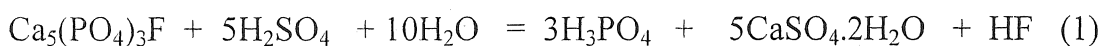
(57) Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn khử sulfat (KSF) *Desulfovibrio oryzae* M10 thuần khiết về mặt sinh học có khả năng sử dụng thạch cao như nguồn sulfat duy nhất, hữu ích để sử dụng trong phân hủy vật liệu nhựa compozit chứa thạch cao nói riêng và chất thải rắn chứa thạch cao nói chung.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực vi sinh vật ứng dụng trong xử lý và bảo vệ môi trường, cụ thể là sáng chế được đề cập đến chủng vi khuẩn khử sulfat (KSF) *Desulfovibrio oryzae* M10 thuần khiết về mặt sinh học có khả năng sử dụng thạch cao như nguồn sulfat duy nhất (hay chất nhận điện tử), hữu ích để sử dụng trong phân hủy vật liệu nhựa composit chứa thạch cao nói riêng và chất thải rắn chứa thạch cao nói chung.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Thạch cao, hay còn gọi là gypsum, là phụ phẩm công nghiệp chính được thải ra trong quá trình sản xuất phân lân. Trong quá trình này, axit phosphoric (H_3PO_4) và thạch cao (CaSO_4) được tạo ra từ việc làm ẩm đá phosphat ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) bằng axit sulfuric (H_2SO_4) (Phương trình 1) (Nguyễn Vũ Giang, 2005; Varjo et al., 2003):



Thạch cao có dạng bột, màu ghi, có tính axit (pH 2-3). Thành phần chủ yếu của thạch cao là $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, một số các oxit kim loại và lượng nhỏ kim loại nặng do đó tiềm ẩn tác động xấu tới môi trường và con người (Oliveira et al., 2012a; Pérez-López et al., 2011; Silva et al., 2010).

Nhà máy sản xuất DAP Đình Vũ, Hải Phòng hoạt động theo phương pháp này, lượng thạch cao phế thải có chứa $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ khoảng 75-80% khối lượng, còn lại là H_2O , H_2SO_4 , SiO_2 , P_2O_5 , SiO_2 , Al_2O_3 và các chất khác chiếm khoảng 20-25% khối lượng được xác định bằng phương pháp phân tích phổ ASS tại Viện Hóa học, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam (bảng 1). Thành phần hóa học của thạch cao phế thải từ nhà máy DAP Đình Vũ được xác định bằng phương pháp ICP tại trường Đại học Khoa học tự nhiên – ĐHQG Hà Nội, kết quả trình bày trong bảng 2 (Nguyễn Quang Minh, 2013).

Bảng 1. Thành phần hoá học của thạch cao phế thải từ nhà máy DAP Đình Vũ-Hải Phòng

Hợp chất với oxy	Hàm lượng (% khối lượng)
SO_4^{-2}	45 – 50
CaO	35 – 40
CO_2	0,8 – 1

Al_2O_3	0,5 – 1
Fe_2O_3	1,2 – 1,5
MgO	0,98 – 1,1
SiO_2	8 – 15
MnO	0,4 – 0,5
P_2O_5	0,15 – 1
Chất đen	2 – 5

Bảng 2. Thành phần các kim loại của thạch cao phế thải từ nhà máy DAP Đình Vũ-Hải Phòng (Nguyễn Quang Minh, 2013).

Nguyên tố	Hàm lượng (ppm)
Ca	245410,256
Al	490,382
Si	917,183
P	672,523
Ni	174,336
Mn	315,750
Fe	4106,025
Mg	619,738

Từ kết quả trên cho thấy, quá trình sản xuất phân lân thải ra một lượng chất thải vô cơ lớn có chứa nhiều tạp chất bền nhiệt, có tính axit, có thể gây ô nhiễm tới môi trường nước và không khí xung quanh. Theo ước tính cứ 1 tấn phân lân được sản xuất sẽ thải ra khoảng 5 tấn thạch cao. Trên thế giới hàng năm có tới 220-280 triệu tấn thạch cao được thải ra; trong đó 14% được sử dụng làm nguyên liệu thô cho ngành xây dựng hay công nghiệp sản xuất hóa chất, còn lại 28% được thải trực tiếp vào nguồn nước mặt (biển, ao, hồ...), 58% được đổ ra bãi rác hay chôn lấp gây ô nhiễm nguồn nước ngầm, ảnh hưởng nghiêm trọng tới môi trường và sức khỏe của con người (Komnitsas et al., 1999; Tayibi et al., 2009; Oliveira et al., 2012b).

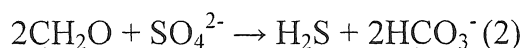
Ở nước ta, có 3 nhà máy phát sinh nguồn chất thải thạch cao lớn là nhà máy DAP - Đình Vũ tại Hải Phòng, nhà máy DAP - Lào Cai và nhà máy phân bón Đức Giang tại thành phố Lào Cai. Lượng tồn đọng thạch cao cho đến nay chưa được sử dụng trong bất kỳ lĩnh vực nào còn khoảng 5,6 triệu tấn. Dự báo lượng chất thải này sẽ tăng lên khoảng 3,8 triệu tấn mỗi năm.

Trong các biện pháp xử lý được đề cập ở trên, biện pháp đổ thải trực tiếp thạch cao vào nước mặt hoặc đổ ra bãi rác hay chôn lấp hiện đang được sử dụng rộng rãi ở các

quốc gia sản xuất phân lân nói chung và ở Việt Nam nói riêng do dễ tiến hành và chi phí thấp. Tuy nhiên, biện pháp này đe dọa nghiêm trọng tới chất lượng nước và đất đai (Kennedy và Everett, 2001). Trong những năm gần đây, lượng thạch cao thải ra ngày càng tăng đã thúc đẩy nghiên cứu các công nghệ mới để xử lý chất thải chứa thạch cao. Để giảm thiểu các tác động xấu của chất thải thạch cao đến môi trường, ngoài việc tăng cường sử dụng thạch cao làm nguyên liệu thô chế tạo vật liệu cho ngành xây dựng hay công nghiệp sản xuất hóa chất, các nhà khoa học đã tiến hành nghiên cứu tận dụng thạch cao làm phụ gia cho xi măng, sản xuất tấm thạch cao xây dựng và nghiên cứu sử dụng thạch cao phế thải làm chất độn cho polyme, cao su (Nguyễn Vũ Giang và cộng sự 2014, 2015; Khương Việt Hà, Nguyễn Vũ Giang và cộng sự, 2015). Tuy nhiên, lượng thạch cao phế thải được xử lý vẫn còn rất hạn chế. Năm 2017, Nguyễn Vũ Giang và cộng sự đã được Cục Sở hữu trí tuệ cấp bằng Độc quyền Giải pháp hữu ích “Vật liệu composít chứa hỗn hợp nhựa nhiệt dẻo và thạch cao phế thải và quy trình sản xuất composít nhựa nhiệt dẻo”, đã được ứng dụng vào thực tế sản xuất tại Công ty CP An Đạt Phát Sài Gòn, Quận Thủ Đức, Tp. Hồ Chí Minh. Ứng dụng này có lợi ích kinh tế vì giá thành thấp, góp phần cải thiện vấn đề môi trường ngay trước mắt và trong tương lai do các chất thải công nghiệp gây ra. Tuy nhiên, việc phân hủy hoàn toàn các chất thải rắn chứa thạch cao sau khi sử dụng nhằm xử lý triệt để ô nhiễm môi trường là vấn đề đang được quan tâm hiện nay.

Vì vậy, phương pháp mới xử lý chất thải rắn chứa thạch cao bằng vi khuẩn khử sulfat với chi phí phù hợp, hiệu quả và thân thiện môi trường đang thu hút được sự chú ý của các nhà nghiên cứu trong và ngoài nước.

Trong điều kiện kỵ khí, vi khuẩn khử sulfat oxy hóa các hợp chất hữu cơ đơn giản như axit cacboxylic hoặc rượu (CH_2O) làm nguồn cacbon và năng lượng để khử sulfat (SO_4^{2-}) thành ion sulfua (H_2S , HS^- và S^{2-}) (White và Gadd, 1996; Widdel và Bak, 1992) (Phương trình 2):



Như đã đề cập ở trên, thành phần chính của thạch cao là canxi sulfat (CaSO_4), trong đó chứa 50% khối lượng là sulfat (Bảng 1). Với đặc tính ưa nước và hầu như không phản ứng với oxy, thạch cao có thể được phân hủy trong quá trình khử sulfat dị dưỡng bằng vi khuẩn KSF (Wolicka và Kowalski, 2006b). Vì vậy, ở điều kiện kỵ khí hay thiếu khí, vi khuẩn khử sulfat có thể phân hủy thạch cao trong vật liệu tổng hợp.

Tuy nhiên, không phải chủng vi khuẩn KSF nào cũng có khả năng sử dụng thạch cao như nguồn sulfat (chất nhận điện tử) duy nhất và có thể phân hủy được chất thải rắn chứa thạch cao. Hơn nữa, khả năng sử dụng thạch cao như nguồn sulfat duy nhất

của các chủng vi khuẩn KSF khác nhau là không giống nhau. Vì vậy, việc tìm kiếm các chủng vi khuẩn KSF có khả năng sử dụng thạch cao như nguồn sulfat duy nhất từ các mẫu bùn và nước ô nhiễm là cần thiết.

Trong những năm gần đây, việc ứng dụng vi khuẩn KSF để phân hủy chất thải rắn công nghiệp chứa thạch cao đã được các nhà khoa học trên thế giới quan tâm nghiên cứu. Rzeczycka và cs (2001) đã chứng minh sulfat có trong thạch cao như là nguồn sulfat thay thế cho sinh trưởng của vi khuẩn KSF khi cacbon hữu cơ và nitơ được bổ sung vào môi trường. Karnachuk và cs (2002) đã thông báo rằng hàm lượng sulfua tạo ra bởi sự khử sulfat từ thạch cao và sulfat từ muối sulfat dễ hòa tan (Na_2SO_4) bởi chủng vi khuẩn KSF nghiên cứu là tương đương. Tuy nhiên, đây vẫn là hướng nghiên cứu mới nên những công bố vẫn còn hạn chế trên thế giới và hiện chưa có công bố nào ở Việt Nam.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là để giải quyết các vấn đề nêu trên. Để đạt được mục đích này, sáng chế đề xuất chủng vi khuẩn KSF *Desulfovibrio oryzae* M10 thuần khiết về mặt sinh học có khả năng sử dụng thạch cao như nguồn sulfat duy nhất dùng để xử lý vật liệu nhựa composit chứa thạch cao chủ động, hiệu quả và thân thiện với môi trường. Chủng này có hoạt tính khử sulfat thành sulfua trong môi trường khoáng có bổ sung hàm lượng thạch cao cao lên tới 50 g thạch cao/l; khả năng khử sulfat thành sulfua cao nhất của chủng này đạt được trong môi trường khoáng bổ sung 10-20 g thạch cao/l sau 14 ngày. Chủng vi khuẩn theo sáng chế này có khả năng sinh trưởng và phát triển trong môi trường chỉ bổ sung bột thạch cao được sử dụng làm chất độn cho vật liệu nhựa composit mà không cần bổ sung bất kỳ muối sulfat hòa tan nào (Na_2SO_4 , CaSO_4 , MgSO_4 ...).

Chủng vi khuẩn KSF *Desulfovibrio oryzae* M10 được đề xuất trong sáng chế này có trình tự 16S rADN nêu trong SEQ ID NO: 1, có độ tương đồng là 99,23% với chủng *Desulfovibrio oryzae* AF 273083.1. Chủng này có khả năng sinh trưởng trong môi trường có bổ sung từ 5-50 g thạch cao/l, pH từ 5-9, nhiệt độ từ 25-37°C. Tuy nhiên, chủng này sinh trưởng tốt nhất trong môi trường có bổ sung hàm lượng bột thạch cao là 10-20 g/l, nhiệt độ 30°C, pH 7-7,5. Chủng vi khuẩn KSF *Desulfovibrio oryzae* M10 hiện được lưu giữ tại phòng Vi sinh vật dầu mỏ, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến việc nuôi cấy làm giàu, phân lập và xác định các điều kiện nuôi cấy phù hợp (pH, nhiệt độ, hàm lượng thạch cao) của chủng vi khuẩn

KSF *Desulfovibrio oryzae* M10 trên môi trường đặc hiệu bằng phương pháp nuôi cấy kỵ khí.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là hình ảnh thể hiện quá trình làm giàu và phân lập chủng vi khuẩn KSF *Desulfovibrio oryzae* M10, trong đó:

Hình 1A là ống hungate kỵ khí để nuôi cấy làm giàu vi khuẩn KSF

Hình 1B là bình serum kỵ khí để nuôi cấy làm giàu vi khuẩn KSF

Hình 2 là hình ảnh thể hiện hình thái khuẩn lạc và tế bào của chủng vi khuẩn KSF *Desulfovibrio oryzae* M10, trong đó:

Hình 2A là hình thái khuẩn lạc của chủng vi khuẩn KSF *Desulfovibrio oryzae* M10 trong ống thạch kỵ khí

Hình 2B là hình thái tế bào của chủng vi khuẩn KSF *Desulfovibrio oryzae* M10 dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM)

Hình 3 là hình ảnh điện di sản phẩm PCR của đoạn 16S rADN và đoạn gen *dsrB* từ chủng *Desulfovibrio oryzae* M10, trong đó:

Hình 3A là sản phẩm PCR của đoạn 16S rADN

Hình 3B là sản phẩm PCR của đoạn *dsrB*

Hình 4 là hình thể hiện khả năng sử dụng thạch cao như nguồn sulfat duy nhất

Hình 5 là đồ thị thể hiện ảnh hưởng của pH và nhiệt độ lên khả năng tạo sulfua của chủng vi khuẩn KSF *Desulfovibrio oryzae* M10 theo thời gian, trong đó:

Hình 5A là đồ thị thể hiện ảnh hưởng của pH lên khả năng tạo sulfua của chủng vi khuẩn KSF *Desulfovibrio oryzae* M10 sau 0, 2, 4, 6, 8, 10 và 12 ngày

Hình 5B là đồ thị thể hiện ảnh hưởng của nhiệt độ lên khả năng tạo sulfua của chủng vi khuẩn KSF *Desulfovibrio oryzae* M10 sau 0, 2, 4, 6, 8, 10 và 12 ngày

Hình 6 thể hiện sự sinh trưởng và phát triển của chủng *Desulfovibrio oryzae* M10 trên môi trường bổ sung thạch cao (ở các nồng độ khác nhau) như nguồn sulfat (chất nhận điện tử) theo thời gian, trong đó:

Hình 6A là hình ảnh bình serum kỵ khí thể hiện sự sinh trưởng và phát triển của chủng *Desulfovibrio oryzae* M10 trên môi trường bổ sung thạch cao (ở các nồng độ khác nhau) như nguồn sulfat (chất nhận điện tử) sau 14 ngày

Hình 6B là đồ thị thể hiện hàm lượng sulfua tạo ra của chủng vi khuẩn KSF *Desulfovibrio oryzae* M10 sau 0, 7, 14 và 28 ngày trên môi trường khoáng của WB cải tiến có bổ sung thạch cao với hàm lượng khác nhau

Hình 6C là bột thạch cao; thành phần (Bảng 1)

Hình 7 là hình thể hiện sự phân hủy thạch cao của chủng vi khuẩn KSF *Desulfovibrio oryzae* M10 được quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM), trong đó:

Hình 7A - Mẫu thạch cao đối chứng trong môi trường WB không bổ sung chủng *Desulfovibrio oryzae* M10 sau 14 ngày

Hình 7B- Mẫu thạch cao bắt đầu bị phân hủy bởi chủng vi khuẩn KSF *Desulfovibrio oryzae* M10 sau 3 ngày

Hình 7C- Mẫu thạch cao đã bị phân hủy bởi chủng vi khuẩn KSF *Desulfovibrio oryzae* M10 sau 14 ngày

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập tới chủng vi khuẩn KSF *Desulfovibrio oryzae* M10 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ mẫu bùn ô nhiễm sulfat và kim loại nặng tại Đông Mai, Hưng Yên, Việt Nam. Chủng này có trình tự 16S rADN nêu trong SEQ ID NO: 1 được lưu giữ tại phòng Vi sinh vật dầu mỏ, Viện Công nghệ sinh học. Chủng này sinh trưởng được ở dải pH rộng từ 5 - 9, tốt nhất là ở pH trung tính hơi kiềm pH 7 - 7,5, sinh trưởng tốt ở dải nhiệt độ 25 - 37°C và sinh trưởng tốt nhất ở 30°C. Đặc biệt chủng vi khuẩn KSF này có thể sử dụng thạch cao như nguồn sulfat duy nhất (chất nhận điện tử) với hàm lượng từ 5-50g thạch cao/l thay cho các nguồn sulfat khác được cung cấp dưới dạng muối sulfat dễ hòa tan như Na_2SO_4 , MgSO_4 , CaSO_4 , v.v..

Chủng vi khuẩn KSF M10 thuần khiết được phân lập từ bùn thải ô nhiễm sulfat và kim loại nặng tại Đông Mai, Hưng Yên trên môi trường đặc hiệu cho vi khuẩn KSF (P_B cải tiến) (Postgate, 1984) (Bảng 4) có bổ sung thạch (agarose) (15g/l). Sau đó, chủng này được làm giàu trên môi trường P_B cải tiến không bổ sung thạch (agarose).

Khả năng sử dụng thạch cao như nguồn sulfat duy nhất (hay chất nhận điện tử) và ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy (pH, nhiệt độ) và hàm lượng thạch cao tới sinh trưởng và phát triển của chủng vi khuẩn KSF M10 được tiến hành trên môi trường Widdle and Bak, 1992 (WB) cải tiến (môi trường không bổ sung muối sulfat dễ hòa tan như Na_2SO_4 và MgSO_4 như môi trường làm giàu P_B). Nguồn sulfat duy nhất trong môi trường này là thạch cao (Bảng 4).

Tất cả môi trường đặc hiệu để làm giàu và phân lập vi khuẩn KSF được chuẩn bị dưới điều kiện kỵ khí theo phương pháp của Hungate cải tiến (Miller và Wolin, 1974).

Môi trường chưa khử trùng được sục với khí N₂ trong khoảng 15-20 phút để loại hết oxy cho đến khi màu hồng của resazurin trong môi trường chuyển thành không màu (chứng tỏ trong môi trường không còn oxy) (Hình 1A). Vitamin, vi lượng và thioglycolate được bổ sung vào môi trường trước khi kết thúc quá trình sục khí N₂. Môi trường được chia vào các bình serum kỵ khí hoặc ống hungate trong thiết bị nuôi cấy kỵ khí, đậy kín nắp, sau đó oxy còn lại trong bình tiếp tục bị loại bằng hỗn hợp khí N₂/CO₂ (90/10 v/v). Sau đó, môi trường được khử trùng 20 phút ở 121°C, pH được chỉnh lên bằng NaHCO₃ và HCl. Tỷ lệ tiếp giống là 1% (v/v) vi khuẩn KSF ($\approx 10^5$ tế bào/ml).

Bảng 4A: Môi trường phân lập và làm giàu vi khuẩn KSF (Postgate, 1984 và Widdel and Bak, 1992)

Thành phần (g/l)	P _B cải tiến	WB cải tiến
KH ₂ PO ₄	0,5	0,2
NH ₄ Cl	1	0,25
NaCl	1	1
Na ₂ SO ₄	1	-
Thạch cao		0-60
MgSO ₄ .7H ₂ O	2	-
Lactat Natri	3,5	2,24
CaCl ₂ .2H ₂ O	-	0,15
MgCl ₂	-	0,4
KCl	-	0,5
Cao men	0,5	-
Axit Ascobic	0,1	
Thioglycolat Na	0,1	0,1
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,2	-
Vitamin	1ml	1ml
Vi lượng	1ml	1ml
Resazurin	0,001	0,001
Nước máy	1lít	-
Nước khử ion	-	1 lít

Bảng 4B. Thành phần vi lượng và vitamin trong môi trường phân lập và làm giàu vi khuẩn khử sulfat P_B và WB trong 1 lít nước khử ion

Vi lượng		Vitamin	
Thành phần	Hàm lượng	Thành phần	Hàm lượng
HCl	25%, 7,7M (13ml)	Biotin	2mg

$\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	1,5 g	Axit Folic	2 mg
ZnCl_2	70 mg	Thiamin	5 mg
$\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	100 mg	Riboflamin	5 mg
H_3BO_3	6 mg	Pyriclokin	10 mg
$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	190 mg	Cyanocobalamin	0,1 mg
$\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	2 mg	Axit Nicotin	5 mg
$\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	24 mg	Axit p.amino bezoic	5 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	36 mg	Axit Lipoic	5 mg
Vitamin và vi lượng được khử trùng bằng lọc qua màng 0,22 μm			

Sự sinh trưởng của vi khuẩn KSF trong các mẫu làm giàu được nhận biết sau 5-7 ngày nuôi cấy (khi vi khuẩn KSF phát triển tối ưu) thông qua kết tủa FeS có màu đen (Hình 1) và hàm lượng sulfua tạo ra. Mẫu làm giàu sau 5-7 ngày được cấy truyền sang môi trường mới. Mẫu làm giàu ở lần cấy truyền thứ 3 được sử dụng để phân lập chủng vi khuẩn KSF thuần khiết M10 bằng phương pháp ống thạch bán lỏng kỵ khí (Hình 2A). Chủng M10 được tách 3 lần và được nuôi cấy trên môi trường dịch thể (P_B) sau mỗi lần tách.

Chủng M10 sau đó được nghiên cứu chi tiết về các đặc điểm hình thái khuẩn lạc (Hình 2A) trực tiếp trên ống thạch bán lỏng và hình thái tế bào dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM) (Hình 2B). Khả năng sinh trưởng của chủng M10 trong môi trường có bổ sung nguồn sulfat duy nhất là thạch cao (Hình 4) và ảnh hưởng của pH (Hình 5A) và nhiệt độ (Hình 5B) tới sinh trưởng của chủng vi khuẩn KSF M10 được đánh giá. Ảnh hưởng của hàm lượng thạch cao khác nhau tới sinh trưởng của chủng M10 cũng được đánh giá để lựa chọn ra hàm lượng thạch cao tối ưu cho sinh trưởng của chủng này (Hình 6). Gen mã hóa cho 16S rARN và đoạn gen *dsrB* mã hóa cho tiểu phần β của enzym dissimilatory sulfua reductase đã được khuếch đại bằng phản ứng PCR (Hình 3A và 3B), giải trình tự và so sánh các trình tự trên GenBank.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Phân lập chủng *Desulfovibrio oryzae* M10 từ bùn thải ô nhiễm sulfat và kim loại nặng tại Đông Mai, Hưng Yên

A. Thu và xử lý mẫu

Mẫu bùn thải ô nhiễm sulfat và kim loại nặng tại Đông Mai, Hưng Yên được đựng trong bình Duran kín khí. Mẫu được giữ 4°C trong vòng 24 giờ để làm giàu và phân lập.

B. Làm giàu vi khuẩn khử sulfat

Vi khuẩn KSF được làm giàu từ mẫu bùn thải ô nhiễm trong bình serum kỵ khí thể tích 150 ml (Hình 1B) chứa 80 ml môi trường và ống Hungate kỵ khí (Hình 1A) thể tích 15 ml với 9 ml môi trường. Môi trường làm giàu vi khuẩn KSF là môi trường P_B cải tiến (Bảng 4) với Lactate-Na như nguồn cacbon (chất cho điện tử) và Na₂SO₄ và MgSO₄ như nguồn sulfat (chất nhận điện tử). Vi khuẩn KSF được làm giàu ở điều kiện pH 7-7,5, nhiệt độ 30°C. Sự sinh trưởng của vi khuẩn KSF trong mẫu làm giàu được nhận biết sau 5-7 ngày thông qua kết tủa FeS màu đen đồng, quan sát tế bào dưới kính hiển vi phản pha của Carl Zeiss, độ phóng đại 400 × và hàm lượng sulfua tạo ra. Cây truyền dịch làm giàu được thực hiện sau mỗi 5-7 ngày. Sau 3 lần cấy truyền, mẫu làm giàu có lượng sulfua tạo ra trong môi trường khá cao, đạt mức 400-450 mg/L, chứng tỏ tập đoàn vi khuẩn KSF đã thích nghi và sinh trưởng tốt ở điều kiện làm giàu.

C. Phân lập chủng vi khuẩn khử sulfat thuần khiết M10

Dịch làm giàu vi khuẩn KSF (tập đoàn vi khuẩn KSF) được pha loãng trong các ống Hungate kỵ khí chứa 9 ml môi trường khoáng tối thiểu (WB cải tiến) như mô tả tại Bảng 4 nhưng không bổ sung cơ chất Lactate-Na. Các ống này cũng được chuẩn bị dưới điều kiện kỵ khí theo phương pháp nuôi cấy kỵ khí của Hungate cải tiến như đã trình bày ở trên. Hút 1 ml dịch làm giàu vào 9 ml môi trường được độ pha loãng 10⁻¹. Tiếp tục pha loãng đến nồng độ phù hợp (10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ và 10⁻⁶...). Sau đó ở mỗi cấp độ pha loãng 1 ml dịch làm giàu được cấy vào ống nghiệm chứa 9 ml môi trường kỵ khí có cơ chất Na-lactate và thạch 1,5% (w/v), đảo đều nhẹ rồi đặt đứng trên giá ống nghiệm cho tới khi thạch đông. Các ống thạch bán lỏng được đặt trong thiết bị nuôi cấy kỵ khí (anaerobic chamber), được nuôi trong tủ ấm 30°C cho đến khi vi khuẩn KSF hình thành khuẩn lạc riêng rẽ.

Các khuẩn lạc riêng rẽ hình thành trong ống Hungate kỵ khí (Hình 2A) được tách kỵ khí bằng pipet Pasteur, và chuyển sang ống nghiệm chứa môi trường dịch làm giàu (P_B). Quá trình tinh sạch được lặp lại 2-3 lần cho tới khi thu được chủng thuần khiết đồng nhất về hình dạng tế bào được quan sát dưới kính hiển vi.

Ví dụ 2: Nghiên cứu đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào của chủng M10

A. Quan sát hình thái khuẩn lạc của chủng M10 trong ống thạch bán lỏng

Trong ống thạch bán lỏng kỵ khí, chủng *Desulfovibrio oryzae* M10 tạo thành khuẩn lạc hình đĩa lồi hai mặt, kích thước từ 1-2 mm. Màu đen của khuẩn lạc được tạo thành là do kết tủa FeS (Hình 2A).

B. Quan sát hình thái tế bào chủng M10 bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM)

Ly tâm 6000 vòng trong 5 phút dịch nuôi cấy chứa chủng M10. Hút bỏ pha trên và thu sinh khối. Bổ sung 0,5 ml dung dịch cố định mẫu glutaraldehyt 2,5% và trộn đều bằng pipet. Chuẩn bị lamên vô trùng rửa axit và cồn, sau đó trải polylyzin 1% lên để làm đệm bám dính vi khuẩn.

Trộn đều dung dịch đã cố định trên và trải đều các lớp mỏng trên lamên đã có polylyzin, không để tạo bọt, để khô trong 15 phút đến khi bề mặt se hẳn (tránh để quá khô). Dùng dung dịch rửa PBS hoặc cabohydrat 0,1M để rửa các mẫu lamên, ngâm trong 5 phút, lặp lại 2 lần bước này và để khô. Tiếp tục sử dụng dung dịch cố định khác là OsO₄ 1% để cố định lại mẫu sau khi đã rửa trong 10 - 15 phút. Rửa lại mẫu sau khi cố định bằng 5 dung dịch cồn với nồng độ khác nhau 50%, 70%, 80%, 90% và 100% trong 5 phút, riêng dung dịch cồn 100% lặp lại 2 lần. Để khô, phủ ion mẫu, đưa lên kính SEM (S - 4800, Nhật Bản) quan sát và chụp ảnh mẫu.

Hình ảnh chụp trên kính hiển vi điện tử quét (SEM) cũng cho thấy tế bào của chủng M10 có dạng phẩy khuẩn đặc trưng cho các loài thuộc chi *Desulfovibrio*, kích thước 0,4-0,5µm × 2-3 µm (Hình 2B).

Ví dụ 3: Xác định vị trí phân loại của chủng M10 dựa trên trình tự gen 16S rARN và gen chức năng *dsrB*

A. Tách ADN tổng số của chủng M10

ADN tổng số từ dịch nuôi cấy chủng vi khuẩn KSF thuần khiết M10 được tách bằng Kit của hãng Thermo scientific, Mỹ (Thermo Scientific GeneJet Genomic DNA purification kit).

Sinh khối tế bào chủng M10 ở pha log sau 5-7 ngày nuôi cấy được ly tâm 6000 vòng/phút trong 10 phút, sau đó các thao tác được tiến hành cụ thể theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sản phẩm AND sau khi được tách sẽ được pha loãng thành các nồng độ phù hợp bằng nước khử ion vô trùng để sử dụng khuếch đại các đoạn gen trong phản ứng PCR.

B. Khuếch đại các đoạn gen trong phản ứng PCR

AND tổng số sau đó được sử dụng làm khuôn để khuếch đại các đoạn gen dùng cho việc xác định vị trí phân loại, gồm có gen 16S rARN và đoạn gen *dsrB* mã hóa cho enzym xúc tác quá trình khử sulfite thành sulfua của vi khuẩn KSF. Các cặp mồi

đặc hiệu cho từng đoạn gen đã sử dụng và chu trình nhiệt tương ứng được trình bày trong Bảng 5.

Bảng 5. Các cặp mồi sử dụng để khuếch đại các đoạn gen cho mục đích xác định vị trí phân loại của chủng M10 và chu trình nhiệt.

Tên gen	Tên mồi	Trình tự mồi/Chu trình nhiệt	Sản phẩm PCR	Tài liệu tham khảo
16S rARN	27F	5'-AGA GTT TAG TCC TGG CTC AG-3'	1500 bp	Kieu et al., 2014; Lane, 1991
	1492R	5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'		
	Chu trình nhiệt	95°C 3 phút, (95°C 30 giây, 55°C 45 giây, 72°C 1,5 phút) x 30 chu kỳ, 72°C 10 phút, kết thúc 4°C		
<i>dsrB</i>	DSRp2060F	5'-CAA CAT CGT YCA CCA GGG -3'	350 bp	Kieu et al., 2014; Wagner et al, 1998
	DSR4R	5'- CTG TAG CAG TTA CCG CA-3'		
	Chu trình nhiệt	95°C 3 phút, (94°C 30 giây, 55 °C 30 giây, 72°C 1 phút) x 30 chu kỳ, 72°C 10 phút, kết thúc 4°C		

Sản phẩm PCR của gen 16S rARN (1500 bp) và đoạn gen chức năng *dsrB* (350 bp) (Hình 3) sau đó được tinh sạch bằng Qiaquick PCR purification kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany). Sản phẩm PCR sau khi tinh sạch được phân tích trên máy đọc trình tự ABI PRISM®3100-Avant Genetic Analyzer (Applied biosystems, Foster City, CA, USA) tại Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany.

Bảng 6. Độ tương đồng về trình tự gen 16S rARN và đoạn gen chức năng *dsrB* của chủng M10 so với các loài gần gũi nhất

Gen	Độ dài	Loài gần gũi nhất	Độ tương đồng
16S rARN	1540 bp	<i>Desulfovibrio oryzae</i>	99,23%
<i>dsrB</i>	350 bp	<i>Desulfovibrio oryzae</i>	100%

So sánh cả hai trình tự gen đều cho thấy, chủng M10 gần gũi nhất với *Desulfovibrio oryzae* với độ tương đồng khi so sánh trình tự của 16S rADN (1540 bp) là 99,23%, độ tương đồng về đoạn gen *dsrB* (350bp) mã hóa cho enzym xúc tác quá trình khử sulfat thành sulfua của vi khuẩn KSF là 100%. Dựa trên các phân tích về trình tự gen, chủng M10 được định danh là *Desulfovibrio oryzae* M10. Đoạn 16S

rADN đã phân tích trình tự và được đăng ký tại ngân hàng gen NCBI với số hiệu MN483279, ký hiệu trình tự là SEQ. SUB6310524.

Ví dụ 4: Nghiên cứu đặc tính sinh học của chủng *Desulfovibrio oryzae* M10

Các đặc tính sinh học của chủng vi khuẩn KSF thuần khiết *Desulfovibrio oryzae* M10 được nghiên cứu chi tiết về (1) Khả năng sử dụng thạch cao như nguồn sulfat duy nhất (hay chất nhận điện tử); (2) Ảnh hưởng của pH, nhiệt độ và hàm lượng thạch cao tới sinh trưởng và phát triển của chủng *D. oryzae* M10 trên nguồn sulfat duy nhất là thạch cao; (3) Khả năng phân hủy thạch cao của chủng *D. oryzae* M10 thông qua việc sử dụng thạch cao như nguồn sulfat duy nhất và sự biến đổi cấu trúc quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM)

Trong các nghiên cứu này, chủng *D. oryzae* M10 được nuôi trong môi trường khoáng dịch thể kỵ khí (lặp lại 3 lần) có bổ sung các thành phần môi trường và tỷ lệ cần thiết theo mục đích của từng nghiên cứu như sau:

A. Nghiên cứu khả năng sử dụng thạch cao như nguồn sulfat duy nhất (hay chất nhận điện tử)

Chủng *D. oryzae* M10 sau khi làm giàu được nuôi cấy trên môi trường khoáng WB cải tiến (Bảng 4) bổ sung thạch cao với hàm lượng 10g/l (1% w/v). Thí nghiệm được tiến hành ở điều kiện kỵ khí với pH 7,5, 30°C, lắc 180 vòng/phút và tỷ lệ tiếp giống vi khuẩn KSF là 1% (v/v) (tương đương với 10^5 tế bào/ml). Đối chứng (1): môi trường WB cải tiến có bổ sung thạch cao (10g/l) nhưng không bổ sung chủng *D. oryzae* M10; đối chứng (2): môi trường WB cải tiến có bổ sung chủng *D. oryzae* M10 (1% (v/v) nhưng không bổ sung thạch cao hay bất kỳ muối sulfat nào và đối chứng (3): môi trường WB cải tiến có bổ sung nguồn sulfat là các muối sulfat hòa tan (2g $MgSO_4$ /l và 1g Na_2SO_4 /l) và chủng *D. oryzae* M10 (1% (v/v)). Khả năng sử dụng thạch cao như nguồn sulfat duy nhất của chủng *D. oryzae* M10 được đánh giá dựa trên sự sinh trưởng của chủng này thông qua xác định hàm lượng sulfua tạo ra (Hình 4).

Kết quả (Hình 4) cho thấy, chủng *D. oryzae* M10 sinh trưởng tốt và ổn định trong môi trường bổ sung 10 g/l thạch cao, điều này được thể hiện ở hàm lượng sulfua tạo ra sau 14 ngày trên môi trường khoáng WB cải tiến chỉ bổ sung thạch cao như nguồn sulfat duy nhất. Kết quả sau 14 ngày làm giàu cho thấy, hàm lượng sulfua của chủng *D. oryzae* M10 tạo ra trên môi trường khoáng WB cải tiến bổ sung thạch cao như nguồn sulfat duy nhất (mẫu thí nghiệm) đạt 386 mg/l gần bằng với hàm lượng sulfua chủng này tạo ra trên môi trường WB bổ sung muối sulfat hòa tan là 431 mg/l (mẫu Đ/c 3). Gần như không xác định được hàm lượng sulfua tạo ra ở mẫu Đ/c 1, và chỉ một hàm lượng sulfua rất nhỏ được tạo ra ở mẫu Đ/c 2 (17 mg/l).

B. Nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng (pH, nhiệt độ và hàm lượng thạch cao) tới sinh trưởng và phát triển của chủng *D. oryzae* M10 trong môi trường với nguồn sulfat duy nhất là thạch cao

B1. Ảnh hưởng của pH

Ảnh hưởng của pH tới sinh trưởng và phát triển của chủng *D. oryzae* M10 trên nguồn sulfat duy nhất là thạch cao được đánh giá trên môi trường khoáng WB cải tiến (Bảng 4). Thí nghiệm được tiến hành trong điều kiện kỵ khí ở 30°C, lắc (180 vòng/phút) với các giá trị pH khác nhau (3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5; 8; 8,5; 9; 9,5 và 10). Hàm lượng thạch cao được bổ sung vào môi trường khoáng là 10g/lít, tỷ lệ tiếp giống là 1% (v/v) dịch nuôi cấy vi khuẩn KSF sau 3 lần làm giàu trên môi trường WB cải tiến bổ sung 10g/l thạch cao. Sự sinh trưởng của chủng *D. oryzae* M10 được đánh giá dựa trên hàm lượng sulfua tạo ra trong 12 ngày thí nghiệm. Hàm lượng sulfua do vi khuẩn KSF tạo ra được xác định bằng phương pháp so màu dựa trên kết tủa màu nâu đen CuS bằng máy quang phổ ở bước sóng 480 nm (APHA, 1998).

Kết quả ở Hình 5A, chủng *D. oryzae* M10 có khả năng sinh trưởng ở dải pH rộng từ 5 - 9, tối ưu ở pH trung tính hơi kiềm (pH 7 - 7,5). Với pH 7,5 hiệu quả khử sulfat và tạo sulfua của *D. oryzae* M10 là cao nhất, với hàm lượng sulfua tạo ra ở mức cao 399 mg/l sau 8 ngày. Vì vậy, chúng tôi chọn pH 7,5 cho các nghiên cứu tiếp theo của chủng *D. oryzae* M10.

B2. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Ảnh hưởng của nhiệt độ tới sinh trưởng và phát triển của chủng *D. oryzae* M10 trên nguồn sulfat duy nhất là thạch cao được đánh giá trên môi trường WB cải tiến (Bảng 4). Thí nghiệm được tiến hành ở điều kiện kỵ khí với pH 7,5, lắc (180 vòng/phút) ở nhiệt độ khác nhau (25, 30, 37, 45 và 55°C). Hàm lượng thạch cao được bổ sung vào môi trường khoáng là 10g/lít, tỷ lệ tiếp giống là 1% (v/v) vi khuẩn KSF sau 3 lần làm giàu trên môi trường WB bổ sung 10g/l thạch cao như nguồn sulfat duy nhất. Sinh trưởng của chủng *D. oryzae* M10 được đánh giá dựa trên hàm lượng sulfua tạo ra trong 12 ngày thí nghiệm.

Kết quả ở hình 5B cho thấy, chủng *D. oryzae* M10 sinh trưởng tốt ở dải nhiệt độ từ 25 - 37°C và sinh trưởng tối ưu ở 30°C. Điều này được chứng minh bởi hàm lượng sulfua tạo ra trong suốt 12 ngày thí nghiệm. Hàm lượng sulfua đạt cao nhất ở dải nồng độ 25-37°C sau 8 ngày thí nghiệm là 352 - 398 mg/l. Ở 30 °C hàm lượng sulfua tạo ra là cao nhất đạt tới 398 mg/l. Vì vậy, chúng tôi chọn nhiệt độ 30°C cho các nghiên cứu tiếp theo của chủng *D. oryzae* M10.

B3. Ảnh hưởng của hàm lượng thạch cao tới sinh trưởng và phát triển của chủng *D. oryzae* M10

Để xác định hàm lượng thạch cao phù hợp tới sinh trưởng và phát triển, chủng *D. oryzae* M10 được tiến hành nuôi lắc 180 vòng/phút trên môi trường khoáng của WB cải tiến (Bảng 4) bổ sung bột thạch cao phế thải làm chất độn cho vật liệu nhựa composít (Hình 5C) với hàm lượng khác nhau (5, 10, 20, 30, 40, 50 và 60 g/l) như nguồn sulfat duy nhất. Thí nghiệm được tiến hành dưới điều kiện kỵ khí ở pH và nhiệt độ phù hợp đã lựa chọn ở ví dụ 4 (B) (30 °C, pH 7,5). Tỷ lệ tiếp giống là 1% (v/v) vi khuẩn KSF sau 3 lần làm giàu trên môi trường WB cải tiến bổ sung 10g/l thạch cao như nguồn sulfat duy nhất. Sinh trưởng của chủng *D. oryzae* M10 được đánh giá dựa trên hàm lượng sulfua tạo ra sau 0, 7, 14 và 28 ngày.

Kết quả (Hình 6B) cho thấy, chủng *D. oryzae* M10 có khả năng sinh trưởng và phát triển trong môi trường có bổ sung thạch cao với hàm lượng từ 5-50g/l. Trong môi trường khoáng WB cải tiến bổ sung thạch cao với hàm lượng 10-20 g/l, ở pH 7,5, 30 °C, lắc 180 vòng/phút, chủng *D. oryzae* M10 sinh trưởng và phát triển tốt nhất với hàm lượng sulfua tạo ra sau 14 ngày là 399-423 mg/l. Sinh trưởng của chủng *D. oryzae* M10 giảm dần (hàm lượng sulfua là 69-80 mg/l) trong môi trường bổ sung 50g/l thạch cao và hầu như không sinh trưởng trong môi trường bổ sung 60g/l thạch cao với hàm lượng sulfua từ 7-18 mg/l.

C. Khả năng phân hủy thạch cao của chủng *D. oryzae* M10

Khả năng phân hủy thạch cao của chủng *D. oryzae* M10 được đánh giá dựa trên (1) khả năng sử dụng thạch cao như nguồn sulfat duy nhất (chất nhận điện tử) và (2) sự phân rã của thạch cao dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM).

Như kết quả đã đề cập ở trên, chủng *D. oryzae* M10 có khả năng sinh trưởng và phát triển trong môi trường có bổ sung thạch cao với hàm lượng từ 5-50g/l, tốt nhất với hàm lượng thạch cao là 10-20g/l ở pH 7,5 và 30°C. Sự phân hủy thạch cao của chủng vi khuẩn KSF thuần khiết này được quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét. So sánh hình ảnh SEM của mẫu đối chứng (không bổ sung thạch cao) (7A) và mẫu thí nghiệm (7C) (bổ sung 10g/l thạch cao) nhận thấy, bột thạch cao sử dụng làm nguồn sulfat duy nhất đã bị phân hủy gần như hoàn toàn sau 14 ngày thí nghiệm. Hình ảnh bột thạch cao bắt đầu bị phân hủy sau 3 ngày bởi chủng *D. oryzae* M10 cũng đã được thể hiện ở Hình 7B (chủng *D. oryzae* M10 bám trên bề mặt thạch cao).

Ví dụ 5. Bảo quản chủng vi khuẩn khử sulfat thuần khiết *Desulfovibrio oryzae* M10 trong phòng thí nghiệm

Chủng *D. oryzae* M10 được bảo quản trong glycerol 20% ở -30°C trong điều kiện kỵ khí tuyệt đối. Chủng được nuôi trong ống Hungate kỵ khí như đã mô tả với thể tích 15 ml chứa 9 ml môi trường khoáng WB cải tiến (Bảng 4) bổ sung 2.24 ml Na-Lactate như nguồn cacbon (chất cho điện tử) và 10g/l thạch cao như nguồn sulfat duy nhất (chất nhận điện tử). Sau 7-14 ngày khi hàm lượng sulfua tạo ra đạt 380-450 mg/l thì sinh khối tế bào được ly tâm trực tiếp bằng ống Hungate kỵ khí 5000 vòng/ 15 phút ở 4°C. Loại dịch môi trường rồi hòa sinh khối tế bào với môi trường khoáng WB mới với hàm lượng glycerol là 20% và hàm lượng thạch cao là 0,1% (w/v). Ống nuôi cấy kỵ khí được để lạnh ở 4 °C, sau 2 giờ được chuyển sang điều kiện -30°C. Chủng được lưu giữ tại phòng Vi sinh vật dầu mỏ, Viện Công nghệ sinh học.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Chủng vi khuẩn KSF thuần khiết *D. oryzae* M10 thích hợp để xử lý vật liệu nhựa composit chứa thạch cao. Ngoài ra chúng còn có tiềm năng xử lý các chất thải rắn có chứa thạch cao. Bằng việc đề xuất chủng vi khuẩn KSF thuần khiết *D. oryzae* M10 có khả năng phân hủy thạch cao giúp xử lý triệt để, an toàn chất thải rắn chứa thạch cao nói chung và vật liệu nhựa composit chứa thạch cao nói riêng. Chủng *D. oryzae* M10 theo sáng chế với hoạt tính phân hủy thạch cao.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt

Khuong Viet Ha, Nguyễn Vũ Giang và các cộng sự Effect of gypsum modified by stearic acid on properties and morphology of HDPE/EVA/gypsum, Vietnam Journal of Science and Technology, Vol. 53 (4C) 149-159, 2015.

Khương Việt Hà, Nguyễn Vũ Giang và các cộng sự, Nghiên cứu tính chất và hình thái cấu trúc của vật liệu composites polyethylene/copolymer vinyl axetat/gypsum biến tính natri dodecyl sunfat, Tạp chí Khoa học và Công nghệ, tập 54 số 1A, tr. 72-79, 2016.

Khuong Viet Ha, Nguyễn Vũ Giang và các cộng sự, Study on mechanical, electrical properties and thermal stability of HDPE/EVA/gypsum composites, Journal of Science and Technology, 53 (4A), 265-273, 2015.

Nguyễn Quang Minh (2013). Nghiên cứu ứng dụng hạt gypsum phế thải chế tạo vật liệu PP/GS polyme compozit, Luận văn thạc sĩ khoa học, chuyên ngành Hóa môi trường, Trường Đại học khoa học tự nhiên, Trường Đại học quốc gia Hà Nội, mã số: 60440120.

Nguyễn Vũ Giang (2005) Study of polymer composite based on polyvinylchloride and waste-gypsum fillers, Thesis for the Degree of Doctor of Philosophy, Sunchon National University, South Korea.

Nguyễn Vũ Giang và các cộng sự, Nghiên cứu tính chất cơ lý và cấu trúc vật liệu compozit nhựa nền polypropylene và hạt gypsum biến tính natri dodecyl sunfat, Tạp chí Hóa học, Tập 52 (1), 101-106, 2014.

Nguyễn Vũ Giang và các cộng sự, Ảnh hưởng của chất hoạt động bề mặt natri dodecyl sunfat đến tính chất và cấu trúc của hạt gypsum, Tạp chí Hóa học, 53 (E2) 92-96, 2015.

Nguyễn Vũ Giang và các cộng sự, *Bằng độc quyền Giải pháp hữu ích* “Vật liệu compozit chứa hỗn hợp nhựa nhiệt dẻo và thạch cao phế thải và quy trình sản xuất”, Số 1592, Quyết định số 77061/QĐ-SHTT ngày 07.11.2017, Cục Sở hữu trí tuệ, Bộ KH-CN.

Tiếng Anh

APHA, 1998. Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, 20th ed.

Barton, L.L., Fauque, G.D., 2009. Biochemistry, Physiology and Biotechnology of Sulfate-reducing bacteria. Adv. Appl. Microbiol. 68: 41-98.

Beerder, J., Nilsen, R.K., Rosnes, J.T., Tosvik, T., Lien, T., 1994. Archaeoglobus fulgidus isolated from hot North Sea oil field waste. Appl Environ. Microbiol 60: 1227-1231.

Cerqueira B, Vega FA, Silva LFO, Andrade L. Effects of vegetation on chemical and mineralogical characteristics of soils developed on a decantation bank from a copper mine. Sci Total Environ 2012;421:220-9.

Coetser S, Pulles W, Heath R, Cloete T. Chemical characterisation of organic electron donors for sulfate reduction for potential use in acid mine drainage treatment. Biodegradation 2006;17:67-77.

Colleran, E., Finnegan S., Lens P., 2013. Anaerobic treatment of sulfate-containing waste streams. Anton. Leeuw. 67(1):29-46.

Colleran, E., Finnegan, S., Lens, P., 1995. Anaerobic treatment of sulfatecontaining waste streams. Antonie van Leeuwenhoek 67, 29-46.

Costa MC, Duarte JC. Bioremediation of acid mine drainage using acidic soil and organic wastes for promoting sulphate-reducing bacteria activity on a column reactor. *Water Air Soil Pollut* 2005;165:325–45.

Johnson, E.A., 1999. Anaerobic fermentations. *Manual of Industrial microbiology and Biotechnology*. ASM Press, Washington, DC.

Karnachuk, O.V., Kurochkina, S.Y., Tuovinen, O.H., 2002. Growth of sulfate-reducing bacteria with solid-phase electron acceptors. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58, 482–486.

Kennedy, L.G., Everett, J.W., 2001. Microbial degradation of simulated landfill leachate: solid iron/sulfur interactions. *Advances in Environmental Research* 5, 103–116.

Kieu H, Horn H, Mueller E (2014). The effect of heavy metal on microbial community structure of a sulfidogenic consortium in anaerobic semi-continuous stirred tank reactors. 37: 451-460

Komnitsas K, Lazar I, Petrisor IG. Application of a vegetative cover on phosphogypsum stacks. *Miner Eng* 1999;12:175–85.

Kowalski, W., Holub, W., Wolicka, D., Przytocka-Jusiak, M., Blaszczyk, M., 2003. Sulfur balance in anaerobic cultures of microorganisms in medium with phosphogypsum and sodium lactate. *Archiwum Mineralogiczne*, 33–40.

Lane DJ (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E. Goodfellow M (eds). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley and Sons. Chichester. United Kingdom, pp 115-175

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J., 2000. *Brock Biology of Microorganisms*. 9th ed., Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, 2006.

Miller, T.L., Wolin, M.J., 1974. A serum bottle modification of the Hungate technique for cultivating obligate anaerobes. *Appl. Microbiol.* 27 (5): 985-987.

Muyzer, G., Stams, A.J.M., 2008. The ecology and biotechnology of sulfate-reducing bacteria. *Nature reviews. Microbiology*. 6:441-453.

Neculita, C.M., Zagury, G.J., Bussière B., 2014. Passive Treatment of Acid Mine Drainage in Bioreactors using Sulfate-Reducing Bacteria: Critical Review and Research Needs. *J. Environ. Qual.* 36:1-16.

Oliveira MLS, Ward CR, French D, Hower JC, Querol X, Silva LFO. Mineralogy and leaching characteristics of beneficiated coal products from Santa Catarina, Brazil. *Int J Coal Geol* 2012b;94:314–25.

Oliveira MLS, Ward CR, Izquierdo M, Sampaio CH, de Brum IAS, Kautzmann RM, et al. Chemical composition and minerals in pyrite ash of an abandoned sulphuric acid production plant. *Sci Total Environ* 2012a; 430:34–47.

Pérez-López R, Castillo J, Sarmiento AM, Nieto JM. Assessment of phosphogypsum impact on the salt-marshes of the Tinto river (SW Spain): role of natural attenuation processes. *Mar Pollut Bull* 2011; 62:2787–96.

Pikuta E., Lysenko A., Suzina N., Osipov G., Kuznetsow B., Tourova T., Akimenkov., Laurinavichius, K., 2000. *Desulfotomaculum alkaliphilum* sp. Nov., a new alkaliphilic, moderately thermophilic, sulfate-reducing bacterium. *Int. J. Evol. Microbiol.* 50:25-33

Postgate, J.R., 1984. The sulfate-reducing bacteria, 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press.

Postgate, J.R., 1984. The sulfate-reducing bacteria, 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press.

Rueter, P., Wilkes, H., Aekersberg, F., Railney, F.A., Jannasch, H.W., Wildel, F., 1994. Anaerobic oxidation of hydrocarbons in crude oil by new types of sulfate-reducing bacteria, *Nature*. 372: 455-458.

Ruwisch, S.C., Kleinitz, W., Widdel, R., 1987. Sulfate-reducing bacteria and their activities in oil production. *J. Petrol. Technol.* 97-105.

Rzeczycka M, Mycielski R, Kowalski W, Galazka M, Biotransformation of phosphogypsum in media containing different forms of nitrogen, *Acta Microbiol. Pol.* 50 (2001)3-4.

Karnachuk O V, Kurochkina SY, Tuovinen O H, Growth of sulfatereducing bacteria with solid-phase electron acceptors, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58 (2002) 482-486.

Rzeczycka, M., Mycielski, R., Kowalski, W., Galazka, M., 2001. Biotransformation of phosphogypsum in media containing different forms of nitrogen. *Acta Microbiologica Polonica* 50, 3-4.

Silva LFO, Hower JC, Izquierdo M, Querol X. Complex nanominerals and ultrafine particles assemblages in phosphogypsum of the fertilizer industry and implications on human exposure. *Sci Total Environ* 2010;408:5117-22.

Tayibi H, Choura M, López FA, Alguacil FJ, López-Delgado A. Environmental impact and management of phosphogypsum. *J Environ Manage* 2009; 90:2377-86.

Wagner, M., Roger, A.J., Flax, J.L., Brusseau G.A., and Stahl D.A., 1998. Phylogeny of dissimilatory sulfite reductase supports an early origin of sulfate respiration. *J. Bacteriol.* 180:2975-2982.

Varjo, E., Liikanen, A., Salonen, V.-P., Martikainen, P.J., 2003. A new gypsum-based technique to reduce methane and phosphorus release from sediments of eutrophied lakes: (Gypsium treatment to reduce internal loading). *Water Res.* 37, 1-10.

White C, Gadd GM. A comparison of carbon/energy and complex nitrogen sources for bacterial sulphate-reduction: potential applications to bioprecipitation of toxic metals as sulphides. *J Ind Microbiol* 1996; 17:116-23.

Widdel F, Bak F. Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. In: Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH, editors. *The prokaryotes*, vol. 4. New York, USA: Springer-Verlag; 1992. p. 3352-78.

Wolicka, D., Kowalski, W., 2006b. Biotransformation of phosphogypsum on distillery decoctions (preliminary results). *Polish J. Microbiol.* 55, 147-151.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chúng vi khuẩn khử sulfat *Desulfovibrio oryzae* M10 thuần khiết về mặt sinh học có trình tự 16S rADN nêu trong SEQ ID NO: 1, chủng này được lưu giữ tại phòng Vi sinh vật dầu mỏ, Viện Công nghệ sinh học; trong đó, chủng *Desulfovibrio oryzae* M10 này có các đặc tính sau: có khả năng phân hủy thạch cao sau 14 ngày ở các điều kiện nhiệt độ 25-37°C, pH 5-9, sinh trưởng và phát triển trong môi trường bổ sung thạch cao với hàm lượng 5-50 g/l.
2. Chúng vi khuẩn khử sulfat *Desulfovibrio oryzae* M10 theo điểm 1, trong đó chủng này khả năng phân hủy thạch cao sau 14 ngày ở các điều kiện nhiệt độ 30°C, pH 7,5, sinh trưởng và phát triển trong môi trường bổ sung thạch cao với hàm lượng 10-20 g/l.

Danh mục trình tự

<110> Viện Kỹ thuật nhiệt đới - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)

<120> Chủng vi khuẩn khử sulfat *Desulfovibrio oryzae* M10 thuần khiết về mặt sinh học

<160>1

<170> Patent trong phiên bản 3.3

<210> 1

<211>1037

<212> ADN

<213> Trình tự phân lập

<220>

<223>16S rADN của *Desulfovibrio oryzae* M10

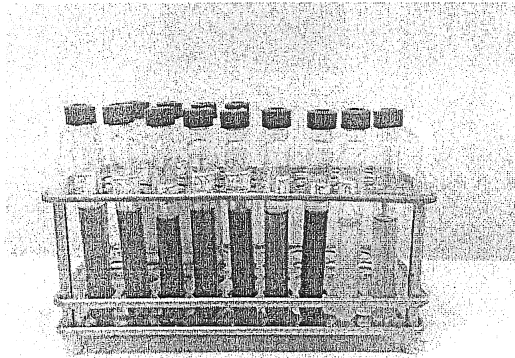
<400> 1

TACGGCTACCTTGTTACGACTTCACCCCAATCATCGGCCCTACCGTAGAC	50
GGCTGCCTCCTTGCGGTTGGCTCACCAGGTATCGGGTAAAACCGACTTTCG	100
TGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGCATTCACCCGAGCA	150
TGCTGATCTCGAATTACTAGCGATTCCAATTTTCATGCAGTCGAGTTGCAG	200
ACTGCAATCCGGACTGGGACGCATTTTTTGGGATTGGCTCCACCTCACGG	250
TATCGCTGCCCTTTGTGTGCGCCATTGTAGTACGTGTGTAGCCCTAGGCG	300
TAAGGGCCATGATGACTTGACGTCGTCCCCACCTTCCTCCCCGTTAACCG	350
GGGCGGTCTCCCTAGAGTGCCCAGCATTACCTGGTAGCAACTAAGGATAG	400
GGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACACCTCACGGCACGAGCTGA	450
CGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCGGGATTCTCCGAAGAGCACCCCTCCT	500
TTTCGGGAGGGTTTCCCGGATGTCAAGCCTGGGTAAGGTTCTTCGCGTTG	550
CATCGAATTAAACCACATACTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTT	600
CTTTGAGTTTCAGCCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGGATGCTTAACGC	650
GTTAGCTGCGGCACCGAAGCTCAAGGCCCGACACCTAGCATCCATCGTT	700
TACAGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTC	750
GCACCTCAGCGTCAGTATCGGTCCAGGTGGCCGCCTTCGCCACTGATGTT	800
CCTCCAGATATCTACGGATTTCACTCCTACACCTGGAATTCCGCCACCCT	850

CTCCCGAACTCAAGTCCGGCAGTATCAAAGGCAATTCCGCGGTTAGCCGC	900
GGCATTTCACCCCTGACTTACCAAACAGCCTACGTGCGCTTTACGCCCAG	950
TGATTCCGATTAACGCTTGACCCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACG	1000
GAGTTAGCCGGTGCTTCCTTTGGAGGTACCGTCAGAC	1037

Hình 1

A

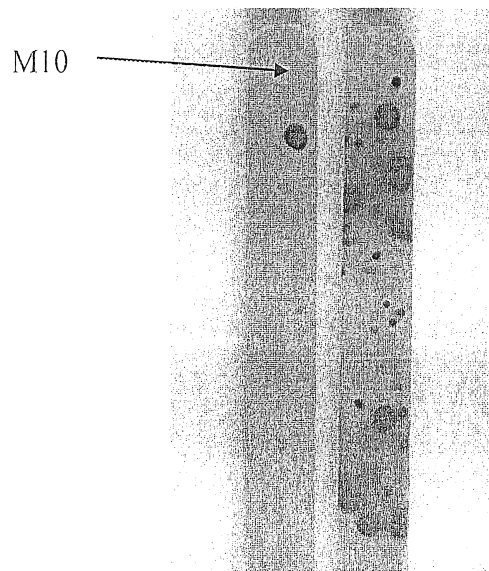


B

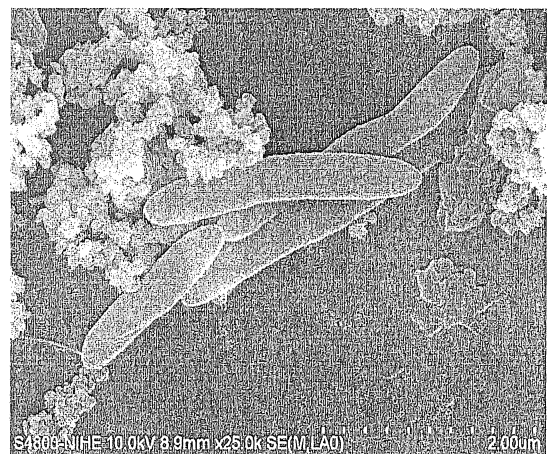


HÌNH 2

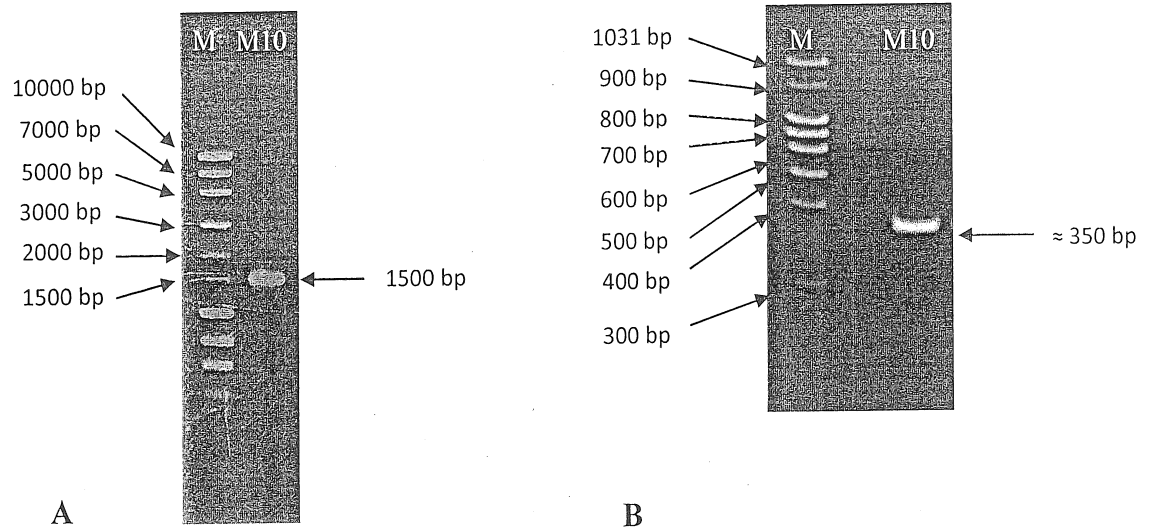
A



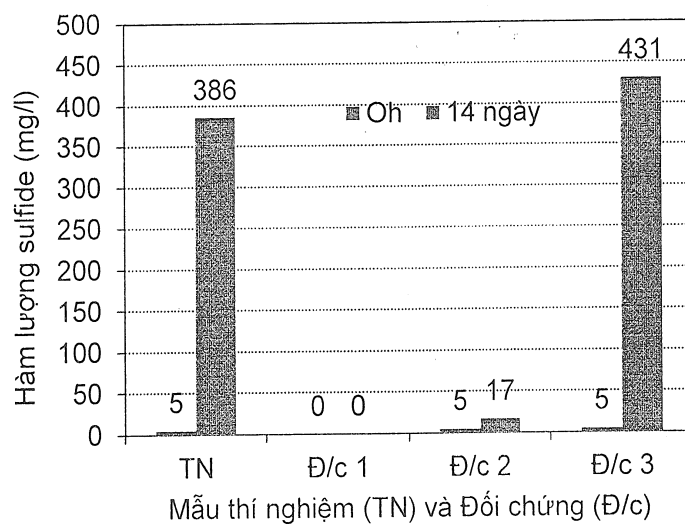
B



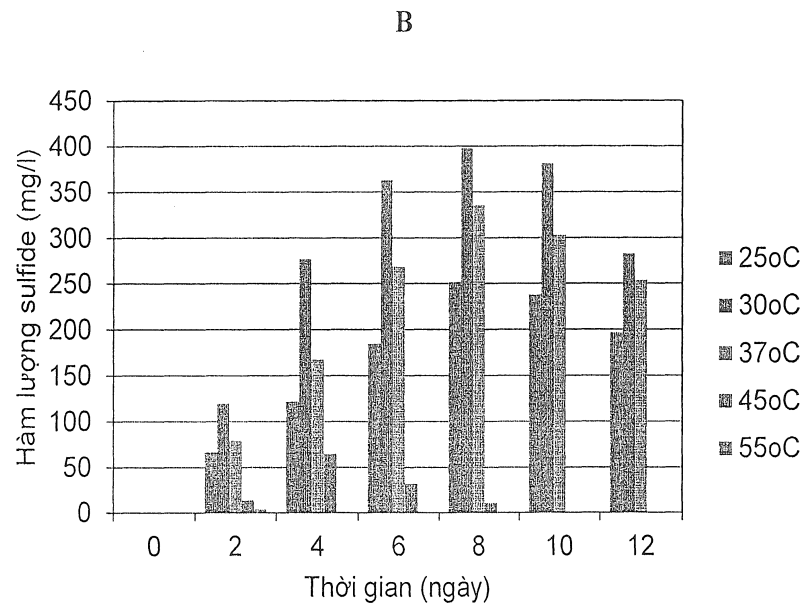
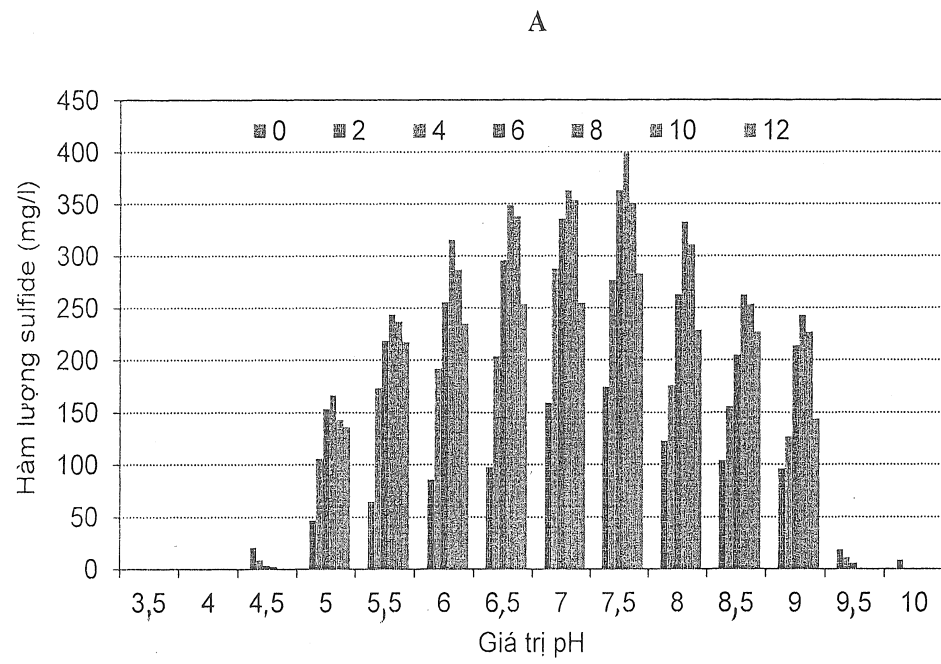
Hình 3



Hình 4

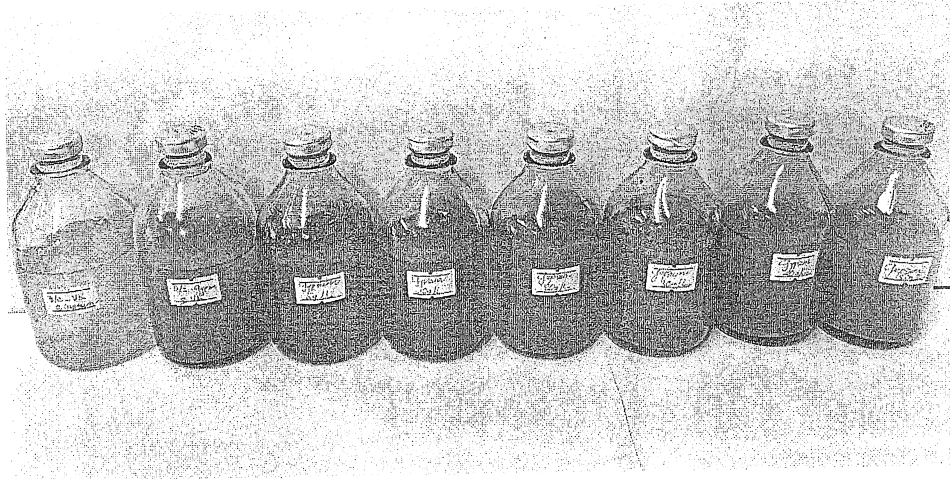


Hình 5

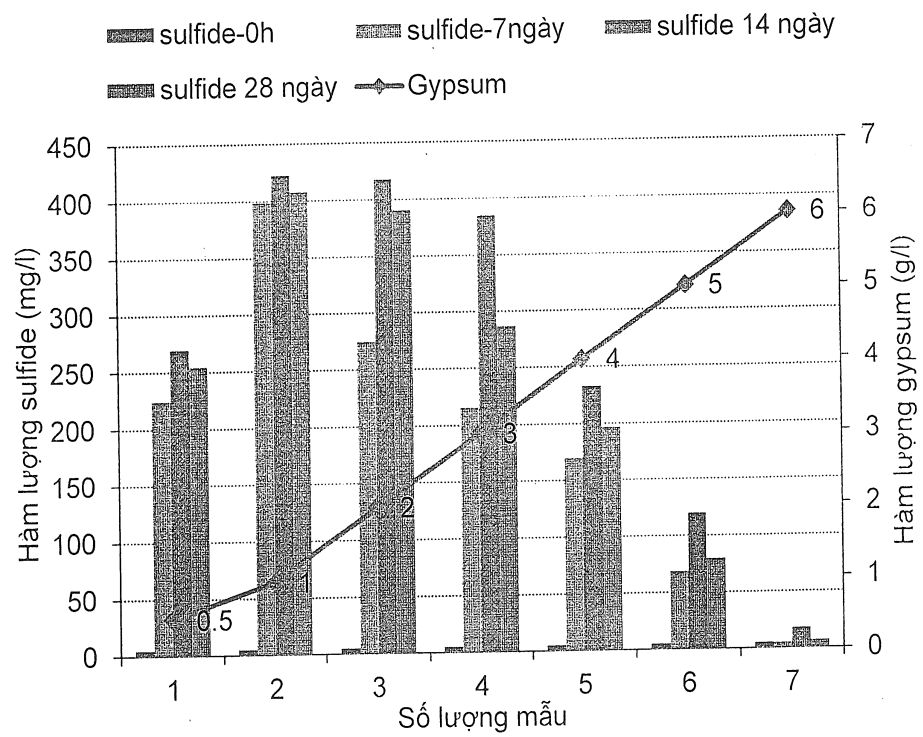


Hình 6

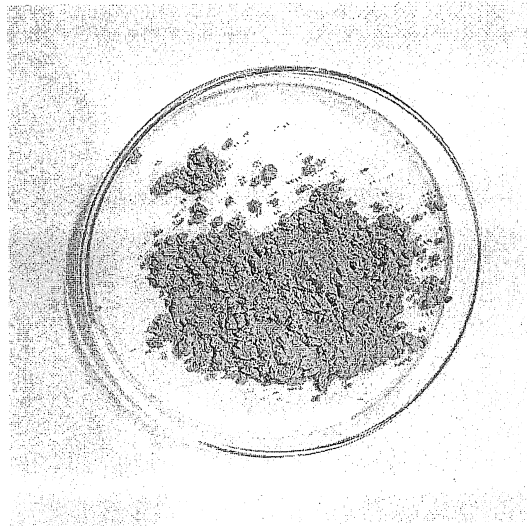
A



B



C



Hình 7

A

B

C

