



(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)



1-0037596

(51)^{2020.01} C12N 1/00; C02F 3/00

(13) B

(21) 1-2021-02035

(22) 15/04/2021

(45) 27/11/2023 428

(43) 26/07/2021 400

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

(54) CHỦNG VI KHUẨN ACINETOBACTER BAUMANNII QN01 THUẦN KHIẾT
VỀ MẶT SINH HỌC CÓ KHẢ NĂNG TẠO MÀNG SINH HỌC VÀ PHÂN HỦY
DẦU DIEZEN, TOLUEN, NAPHTALEN, PHENOL VÀ PYREN CÓ TRONG DẦU
MỎ

(57) Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn Acinetobacter baumannii QN01 thuần khiết về
mặt sinh học được phân lập từ mẫu đất nhiễm dầu có khả năng tạo màng sinh học, trong đó
chủng này có khả năng phân hủy dầu diezen, piren, naphtalen, phenol và toluen.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn *Acinetobacter baumannii* QN01 có khả năng tạo màng sinh học với hoạt tính cao có nhiều ứng dụng trong xử lý dầu diezen, toluen, naphtalen, phenol và pyren có trong dầu mỏ.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các thành phần hiđrocacbon của dầu mỏ

Dầu mỏ hay dầu thô là một chất lỏng sánh đặc màu nâu hoặc ngả lục. Dầu mỏ tồn tại trong các lớp đất đá tại một số nơi trong vỏ Trái Đất. Dầu mỏ là một hỗn hợp hóa chất hữu cơ ở thể lỏng đậm đặc, thành phần chính là các thành phần hiđrocacbon bao gồm: alkan, cycloalkan, các hiđrocacbon thơm đa vòng (như anthracen, naphtalen, phenanthren, piren, v.v.) và phenol (Andrade và cộng sự, 2010). Hiện nay dầu mỏ chủ yếu dùng để sản xuất dầu hỏa, diezen và xăng nhiên liệu. Ngoài ra, dầu mỏ cũng là nguồn nguyên liệu chủ yếu để sản xuất ra các sản phẩm của ngành hóa dầu như dung môi, phân bón hóa học, nhựa, thuốc trừ sâu, nhựa đường, v.v. (Eneh, 2011).

Quá trình hình thành và thành phần hoá học của dầu mỏ đã được nghiên cứu và báo cáo chi tiết bởi Tissot & Welte (1979) và Hunt (1979). Dầu thô được khai thác ở các vùng khác nhau thì có thành phần hóa học khác nhau, bao gồm hai nhóm chính: Các hợp chất hiđrocacbon, là hợp chất mà trong thành phần của nó chỉ chứa hai nguyên tố là cacbon (chiếm từ 80-87%) và hiđro (chiếm từ 10-15%); Các hợp chất phi hiđrocacbon, là các hợp chất mà trong thành phần của nó ngoài cacbon, hiđro thì chúng còn chứa thêm các nguyên tố khác như N (0-1%), S (0-10%), O (0-5%), kim loại (dưới 0,1% bao gồm Ni, Fe, Cu và V), v.v. (Posthuma, 1977).

Trong thành phần của dầu mỏ thì hàm lượng các hiđrocacbon luôn chiếm thành phần chủ yếu (50-98%). Trong thực tế thì dựa vào thành phần của các hiđrocacbon trong dầu mỏ mà người ta quyết định các loại sản phẩm được sản xuất từ một loại dầu mỏ cho trước, thành phần này cũng quyết định đến hiệu suất của các loại sản phẩm. Đối với các hợp chất phi hiđrocacbon thì mặc dù thành phần nguyên tố của chúng

không lớn nhưng hầu hết đây là các hợp chất có hại vì vậy trong quá trình chế biến cần phải loại bỏ nó ra khỏi thành phần của sản phẩm do đó chúng quyết định đến công nghệ của nhà máy (Clark & Brown, 1977).

Hiđrocacbon là thành phần chính và quan trọng nhất của dầu mỏ và các sản phẩm từ dầu mỏ. Hiđrocacbon trong dầu mỏ bao gồm 3 nhóm: ankans, cycloankans và các thành phần hiđrocacbon vòng thơm trong cấu trúc chứa ít nhất một vòng benzen.

Nhóm ankan có cấu trúc mạch thẳng (hay paraffin) và ankan mạch nhánh (hay isoparaffin) đều có cấu trúc phân tử dạng (C_nH_{2n+2}) với n trong khoảng từ 1 đến 40, các báo cáo còn cho thấy ankan có cấu trúc chứa số nguyên tử cacbon lên tới 60. Các paraffin thấp bao gồm metan, etan, propan và butan ở thể khí, các paraffin từ pentan trở lên trong điều kiện thường ở thể lỏng. Ở khoảng trên C_{13} nhóm hiđrocacbon quan trọng nhất của isoparaffin đó là isoprenoid với cấu trúc bởi các vòng isopren. Các isoprenoid có cấu trúc từ C_{10-20} là thành phần chính của xăng, dầu nhiên liệu. Các isoparaffin cho chất lượng xăng, dầu nhiên liệu tốt hơn, trong khi các paraffin lại là thành phần không mong muốn trong xăng, dầu nhiên liệu bởi với cùng số lượng nguyên tử cacbon, nhưng ở dạng cấu trúc mạch nhánh thì isoparaffin có tỷ trọng, nhiệt độ đông đặc và nhiệt độ sôi thấp hơn so với cấu trúc mạch thẳng của paraffin (Albaiges, 1980).

Cycloankan hay còn được gọi là cycloparaffin hoặc napthen, là dẫn xuất của cyclopentan và cyclohexan. Trong dầu mỏ chứa các napthen có từ 1- 4 vòng, sự phân bố của chúng trong các phân đoạn rất khác nhau, trong một số dầu hàm lượng naphthene tăng khi phân đoạn nặng dần, trong các dầu khác hàm lượng của chúng lại không đổi hoặc giảm. Naphthene là thành phần quan trọng của nhiên liệu động cơ và dầu nhờn, naphthene đơn vòng với mạch nhánh dài là thành phần mong muốn của nhiên liệu phản lực, diezen và dầu nhờn.

Hiđrocacbon thơm hay aromatic hiđrocacbon là hợp chất hiđrocacbon trong phân tử chứa một hoặc nhiều vòng benzen. Hiđrocacbon một vòng và các đồng đẳng của nó là loại phổ biến nhất trong dầu mỏ. Những đồng đẳng của benzen (C_7-C_{15}) nói chung đều tách và xác định được trong nhiều loại dầu mỏ, những loại ankybenzen với 1,2,3,4 nhánh phụ như toluen, xylen, 1-2-4 trimetylbenzen đều là những loại chiếm đa số trong các hiđrocacbon thơm. Tuy vậy, loại 4 nhánh phụ tetra metylbenzen (1,2,3,4 và 1,2,3,5) thường thấy với tỷ lệ cao nhất. Theo Smith thì hàm lượng tối đa của toluen

trong dầu vào khoảng 2-3%, xylen và benzen vào khoảng 1-6% (Smith và Hussey, 2005).

Loại hiđrocacbon thơm 2 vòng có cấu trúc ngưng tụ như naphtalen và đồng đẳng hoặc cấu trúc cầu nối như diphenyl nói chung đều có trong dầu mỏ. Loại cấu trúc đơn giản như diphenyl thì ít hơn so với cấu trúc 2 vòng ngưng tụ kiểu naphtalen. Trong các diphenyl cũng xác định được một số đồng đẳng của nó như 2-metyl,3-metyl,4-methyl diphenyl; 3-etyl và izopropyl diphenyl, cũng như loại có 2, 3 nhóm methyl (Đinh Thị Ngọc, 2006).

Hiện tượng nước bị nhiễm dầu đang ngày càng trở nên phổ biến ở các quốc gia ngoài các nguyên nhân khách quan không thường xuyên do hiện tượng tràn dầu tự nhiên thì các hoạt động sản xuất của con người lại thường xuyên thải ra môi trường một lượng lớn nước thải nhiễm dầu. Nước thải nhiễm dầu không chỉ gây nên những tác hại nghiêm trọng tới môi trường, mà còn tác động mạnh mẽ tới hệ sinh vật, sức khỏe con người cũng như kinh tế và xã hội.

Nước thải nhiễm dầu làm thay đổi tính chất hóa lý của nước, lớp dầu nổi trên mặt nước làm giảm oxygen hòa tan dẫn đến giảm khả năng tự làm sạch của nước. Lớp dầu cũng ngăn cản sự bốc hơi nước làm suy giảm lượng mưa, ảnh hưởng đến khí hậu khu vực. Các thành phần cặn dầu lắng xuống là nguyên nhân gây nên ô nhiễm đất (Fingas và Charles, 2000).

Nước ô nhiễm dầu có ảnh hưởng nghiêm trọng đến hầu hết các sinh vật sinh sống, hoạt động trong khu vực đặc biệt là sinh vật phù du, ấu trùng cá và các sinh vật ở dưới đất có nước nhiễm dầu đều bị ảnh hưởng một cách mạnh mẽ. Lớp dầu nổi trên mặt nước làm giảm ánh sáng ảnh hưởng đến sự quang hợp của nhóm sinh vật quang tự dưỡng gây biến động đến các chuỗi thức ăn, mất cân bằng hệ sinh thái. Đặc biệt trong dầu còn chứa các hợp chất hiđrocacbon thơm như: toluen, benzen, phenol, v.v., là những chất có độc tính cao với sinh vật và con người, tác động trực tiếp đến khả năng trao đổi chất của sinh vật, làm giảm khả năng sinh trưởng, phát triển hoặc khiến cho sinh vật dưới nước bị chết. Hơn nữa các hợp chất này có thể được tích lũy trong cơ thể sinh vật, khi trở thành thực phẩm lại là nguyên nhân gây độc cho con người (Lưu Văn Diệu và Đỗ Công Trung, 1990).

Khi hàm lượng dầu trong nước cao hơn 0,2 mg/l thì nước sẽ có mùi hôi, không thể dùng cho ăn uống, với hàm lượng 0,1 - 0,5 mg/l sẽ làm giảm năng suất và chất

lượng cá. Dầu có thể xâm nhập vào sinh vật thông qua một số con đường như tiếp xúc vật lý, tiêu hóa, hấp thụ hay thông qua chuỗi thức ăn. Các hợp chất dễ bay hơi có trong dầu mỏ như benzen, toluen có thể dễ dàng hấp thụ qua da hoặc màng tế bào thực vật và gây độc cho cơ thể sinh vật. Ở sinh vật phù du - *Daphnia magna* sẽ mất định hướng khi bị nhiễm dầu thô ở nồng độ 2 ppm sau 48 giờ tiếp xúc (Fingas & Charles, 2000).

Không chỉ vậy, nước ô nhiễm dầu là nguyên nhân gây nên thiệt hại kinh tế đặc biệt là ngành khai thác, nuôi trồng thủy, hải sản và du lịch. Để xử lý hậu quả của ô nhiễm, việc đầu tư công nghệ xử lý đòi hỏi tốn kém nhiều chi phí, hơn nữa tình trạng ô nhiễm thường xảy ra trên diện rộng với lượng nước nhiễm dầu rất lớn, công tác xử lý khắc phục hậu quả tốn nhiều thời gian và tiền bạc (Lamphear & Restrepo, 1982).

Các biện pháp xử lý

Tuyển nổi là công nghệ được sử dụng rất phổ biến trong xử lý nước thải trên thế giới và cả ở Việt Nam giai đoạn hiện nay. Tuyển nổi là quá trình tách các chất lơ lửng, chất hoạt tính bề mặt, dầu mỡ, v.v., trong nước thải bằng bọt khí trên nguyên tắc lợi dụng sự chênh lệch giữa khối lượng riêng của hạt và pha lỏng để tách hạt rắn ra. Trong quá trình tuyển nổi các phân tử chất bẩn được dính kết với bề mặt phân chia giữa khí và nước và được chuyển động lên trên mặt nước (Moosai & Dawe, 2003).

Công nghệ oxy hóa nâng cao (advance oxidation process – AOPs) là công nghệ xử lý hóa học nước thải thông qua phản ứng của các gốc hydroxyl ($\text{OH}^\cdot$) với các chất ô nhiễm để tạo thành các phân tử vô cơ nhỏ. Các gốc hydroxyl có thể được tạo ra từ một hay nhiều chất oxy hóa như ozon, hydrogen peroxit, v.v., hay các nguồn năng lượng như tia cực tím, sự điện hóa. Công nghệ AOPs được sử dụng phổ biến trong xử lý nước thải công nghệ, sinh hoạt và nước thải nhiễm dầu. Trong xử lý các thành phần dầu trong nước thải, 02 dạng AOPs được ứng dụng phổ biến đó là: xúc tác điện hóa (Electrochemical catalysis) và oxy hóa nước siêu tới hạn (Supercritical water oxidation) (Yu và cộng sự, 2013).

Công nghệ xúc tác điện hóa sử dụng dòng điện là tác nhân gây điện ly hóa học tạo ra các gốc hydroxyl từ đó oxy hóa các chất ô nhiễm trong nước thải. Công nghệ xúc tác điện hóa có khả năng xử lý nồng độ cao các chất gây ô nhiễm, không gây ô nhiễm thứ cấp, dễ dàng thiết kế và vận hành hệ thống nên được quan tâm đề xuất ứng dụng trong xử lý nước thải của các nhà máy (Lin và cộng sự, 2003; Koper, 2005). Santos và cộng sự (2006) đã sử dụng hệ thống xúc tác điện hóa để xử lý nước thải nhiễm dầu, hệ

thống vận hành trong 70h ở 50°C với độ dẫn điện là 100mA/cm² cho kết quả xử lý đạt 57% COD. Wang (2006) sử dụng anode đôi bằng kim loại hoạt hóa và than chì, cathode bằng sắt và kim loại quý đem lại hiệu quả xử lý nước thải nhiễm dầu đạt 90% COD sau 6 phút xử lý, 99% chất rắn lơ lửng sau 3 phút dưới dòng điện 15v/120A.

Vi sinh vật từ lâu đã nghiên cứu ứng dụng trong xử lý nước thải, trong đó rất nhiều nghiên cứu ứng dụng các chủng vi khuẩn và nấm men trong xử lý ô nhiễm dầu mỏ đem lại hiệu quả cao, tiết kiệm chi phí và thân thiện với môi trường sống (Akpor và cộng sự, 2014). Trong những năm gần đây nhiều nghiên cứu về màng sinh học đã cho thấy việc sử dụng màng sinh học trong xử lý nước thải là một hướng đi hiệu quả trong các phương pháp xử lý sinh học. Đã có nhiều ứng dụng của phương pháp sử dụng màng sinh học trong xử lý nước thải.

Màng sinh học là gì

Màng sinh học (biofilm) là một cấu trúc phức tạp bao gồm các tế bào vi sinh vật và các sản phẩm polyme do chính chúng tạo ra. Trong tự nhiên biofilm được hình thành từ nhiều loài vi khuẩn, nấm, tảo và nguyên sinh động vật hay các tế bào tự do ở dạng trôi nổi trong môi trường lỏng. Trong điều kiện phù hợp, chúng có thể chiếm đại đa số của chuỗi thức ăn do khả năng kết dính với nhau và được bao bọc trong khối chất nền bao gồm các polymer ngoại bào EPS (exo-cellular polymeric substances), do đó giúp các tế bào có thể bám lên hầu hết các bề mặt của vật thể rắn (Decho, 2000; Flemming & Wingender, 2010).

Các tế bào vi sinh vật trong biofilm có mật độ cao, liên kết chặt chẽ với nhau tạo thành một cấu trúc bền vững. Chính vì vậy khả năng đồng hóa, trao đổi chất, phân hủy các cơ chất xảy ra nhanh và mạnh mẽ hơn tế bào ở dạng đơn lẻ. Hơn nữa, sự cộng sinh của nhiều loài vi sinh vật trong biofilm giúp tạo nên một chuỗi thức ăn liên tục, phân giải triệt để các nguồn cơ chất. Cấu trúc bền vững của biofilm giúp vi sinh vật chống chịu tốt hơn với các điều kiện bất lợi của môi trường, tăng khả năng cạnh tranh với các nhóm vi sinh vật khác (O'Toole và cộng sự, 2000).

Những nghiên cứu trước đây cho rằng, cấu trúc của biofilm bao gồm nhiều lớp mỏng được tạo thành từ ma trận các tế bào liên kết với nhau trên đó tạo thành. Bằng việc sử dụng kính hiển vi điện tử quét lazer (Confocal Scanning Laser Microscopy) và các công cụ phân tích hình ảnh đã cho thấy cấu trúc biofilm có tổ chức, đặc thù và phản ánh các chức năng nhất định của biofilm (Costerton và cộng sự, 1994; Gjaltema và cộng sự, 1994). Trong biofilm có các kênh vận chuyển có chức năng cung cấp nước,

các chất dinh dưỡng cho vi sinh vật tồn tại trong chúng và đem chất thải đi. Giữa các tế bào vi sinh vật diễn ra sự trao đổi thông tin liên tục đảm bảo cho biofilm được hình thành một cách chính xác, trao đổi thông tin liên tục giữa các tế bào. Biofilm có cấu trúc không đồng nhất, bao gồm nhiều lớp vi sinh vật hiếu khí bên trên và nhiều lớp vi sinh vật kỵ khí bên trong. Do các luồng nước chảy qua khuấy động nên các vi sinh vật kỵ khí và hiếu khí song song tồn tại trong các hốc nhỏ phân bố khắp trong biofilm. Chiều dày của biofilm thay đổi từ một vài µm thậm chí đến vài cm tùy thuộc vào loài vi sinh vật, tuổi biofilm, lượng dinh dưỡng và áp lực dòng chảy (Cheng và cộng sự, 2010).

Ứng dụng của màng sinh học trong xử lý các thành phần hiđrocacbon có trong dầu mỏ

Hiện nay, vấn đề phòng chống ô nhiễm môi trường do dầu gây ra đang là mối quan tâm hàng đầu của nhiều quốc gia, nhất là những nước có nền công nghiệp dầu khí phát triển. Hàng năm các hoạt động khai thác, vận chuyển, sử dụng và các sự cố rò rỉ, tràn dầu đã làm cho hàng trăm triệu tấn dầu rơi vãi gây ô nhiễm nghiêm trọng môi trường nước. Đã có nhiều nghiên cứu và thực tế ứng dụng chứng minh phương pháp sinh học là phương pháp xử lý nước nhiễm dầu hiệu quả, với chi phí thấp và đảm bảo cân bằng sinh thái. Trong nhóm phương pháp xử lý sinh học thì phương pháp sử dụng màng sinh học (biofilm) đang được nhiều nước trên thế giới quan tâm nghiên cứu, ứng dụng và thu được nhiều kết quả khả quan.

Những phát hiện đầu tiên về biofilm trong phân hủy sinh học các thành phần dầu phải kể đến đó là Teh và Lee (1973) đã sử dụng 2 chủng vi khuẩn tạo màng sinh học phân lập trong các kho xăng ở Australia và chứng minh chúng có khả năng phân hủy tốt các thành phần *n*-ankan từ C₁₃-C₁₈. Cafone và cộng sự cũng nghiên cứu 2 chủng vi khuẩn phân lập từ kho xăng và cũng thấy rằng chúng có khả năng sinh trưởng tối ưu với nguồn cacbon là C₁₁. Một số, chủng nấm mốc phân lập cũng từ kho xăng cũng cho thấy khả năng phân hủy tốt các hợp chất hiđrocacbon từ C₁₂-C₂₄. Đặc biệt, các chủng *Hormoconis resiniae* và *A. fumigatus* phân lập từ các mẫu ô nhiễm dầu diezen cũng chứng minh khả năng sinh trưởng tốt trên nguồn cơ chất này. Nghiên cứu của Prince và Morton (1989) cho rằng, tại lớp bề mặt tương tác giữa dầu và nước sẽ tạo ra lớp màng sinh học của các vi sinh vật. Lớp màng này có khả năng phân cắt dầu thành các hạt nhỏ hơn, nhờ đó chúng có thể dễ dàng phân hủy và chuyển hóa các thành phần dầu mỏ. Các nhóm vi sinh vật này thường là *Hormoconis resiniae*, *Cladosporium*

vesinae, *Amorphotheca resinae*, v.v.. Các chủng này có khả năng sử dụng các loại nhiên liệu như xăng máy bay, dầu diezen, v.v., rất tốt. Do đó, chúng đã được ứng dụng trong xử lý nước ô nhiễm dầu. Tiếp đó càng ngày càng có nhiều nghiên cứu, công nghệ, hệ thống ứng dụng hiệu quả biofilm trong xử lý ô nhiễm dầu mỏ.

Những nghiên cứu trong nước về ứng dụng biofilm trong xử lý nước thải nhiễm dầu còn hạn chế, các kết quả nghiên cứu cho thấy Việt Nam có sự đa dạng về các chủng vi sinh vật vừa có khả năng tạo biofilm vừa có hiệu suất phân hủy các thành phần hiđrocacbon trong dầu cao, thời gian phân hủy nhanh trong điều kiện phòng thí nghiệm. Tuy nhiên các nghiên cứu vẫn chưa đánh giá được khả năng phân hủy các thành phần dầu diezen, anthracen, naphtalen, phenanthren, phenol và pyren có trong dầu mỏ bởi màng sinh học do chi vi khuẩn *Acinetobacter* đặc biệt là bởi loài *Acinetobacter baumannii* tạo thành để nâng cao hiệu suất xử lý nước thải nhiễm dầu trong thực tế.

Loài *Acinetobacter baumannii* và những đặc tính của nó

Trong tự nhiên, loài *A. baumannii* được xem là có khả năng tạo màng sinh học rất tốt (Longo và cộng sự, 2014). Nhờ đặc tính này mà chúng có khả năng chống chịu lại các điều kiện khắc nghiệt của môi trường thậm chí cả môi trường chứa các chất kháng sinh. Người ta đã biểu hiện được các gen liên quan tới hiện tượng tạo màng như operon *pgaABCD* chịu trách nhiệm cho việc sinh tổng hợp poly- β -1,6-N-acetylglucosamin (NAG) có trong thành tế bào (Choi và cộng sự, 2009). Đây là thành phần rất quan trọng có trong biofilm của các vi khuẩn. Từ việc biểu hiện các gen này, người ta đã chứng minh được có 1621 gen liên quan tới khả năng tạo màng của loài *A. baumannii*. Như vậy có thể thấy rằng, đây là loài có tiềm năng rất lớn trong việc tạo biofilm để có thể khai thác trong lĩnh vực bảo vệ môi trường, cụ thể là trong xử lý ô nhiễm dầu.

Năm 2018, Zhan và cộng sự đã công bố về động học và con đường phân hủy permetrin ($C_{21}Cl_2H_{20}O_3$) bởi chủng *A. baumannii* ZH-14. Permetrin là một chất hiđrocacbon khó phân hủy, gây ô nhiễm và tồn tại ở bề mặt các suối và các loại đất. Trong công bố này, các tác giả đã cho thấy chủng *A. baumannii* ZH-14 này có khả năng phân hủy 100% permetrin sau 72 giờ với nồng độ cơ chất ban đầu là 50 mg/L. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, chủng được nuôi ở dạng tế bào tự do, không phải ở dạng tạo màng sinh học. Tương tự như vậy, năm 2016, Nkem và cộng sự đã công bố về 2 loài *Acinetobacter baumannii* và *Cellulosimicrobium cellulans* phân lập từ than bị

nhiễm dầu cũng có khả năng phân hủy hiđrocacbon rất tốt. Các thành phần n-alkan có trong dầu diezen đã được loài *A. baumannii* phân hủy từ 0,2 – 95,4 %.

Như vậy, có thể thấy rằng loài *A. baumannii* là một trong số các loài của chi *Acinetobacter* vừa có khả năng tạo màng sinh học cao và vừa có thể ứng dụng trong xử lý các thành phần khó phân hủy có trong dầu mỏ. Tuy nhiên, cho tới nay chưa có các công bố về khả năng dầu diezen, anthracen, naphtalen, phenanthren, phenol và pyren ở dạng tạo màng sinh học của loài *A. baumannii*.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn *Acinetobacter baumannii* QN01 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ mẫu đất nhiễm dầu, trong đó chủng vi khuẩn này có trình tự gen 16S rARN với kích thước 1441 bp và được đăng ký trên GenBank với mã số LC602830, và có các đặc tính sau:

có khả năng tạo màng sinh học khi được nuôi cấy trong môi trường LB, điều kiện nuôi cấy ở độ pH 5-9, nồng độ muối NaCl 0-40%, nhiệt độ 25-45°C, nguồn cacbon gồm saccaroza, lactoza, glucoza và mantoza, nguồn nitơ gồm KNO₃, NaNO₃, pepton và cao men, giá trị OD ở bước sóng 570 nm cao nhất lên tới 44,58±0,43;

có khả năng phân hủy dầu diezen là 90,21 % tương ứng với nồng độ ban đầu là 50.000 mg/l; và

có khả năng phân hủy phenol là 95,13 %; piren 95,21 %; naphtalen 95,84 %; và toluen là 98,32 % với nồng độ ban đầu của từng hợp chất này là 300 ppm.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1. thể hiện hình thái khuẩn lạc của chủng vi khuẩn QN01.

Fig. 2. thể hiện hình thái tế bào của chủng QN01 dưới kính hiển vi điện tử với độ phóng đại 30000 lần.

Fig. 3. thể hiện cây phát sinh chủng loài của chủng vi khuẩn QN01.

Fig. 4. thể hiện khả năng tạo màng sinh học bởi đối chứng môi trường không có vi sinh vật (a), chủng QN01 (b) và đối chứng dương là chủng *Acinetobacter calcoaceticus* P23.

Fig. 5. thể hiện khả năng sinh trưởng trên nguồn cơ chất dầu diezen của đối chứng âm - không có vi sinh vật (a) và chủng QN01 (b).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn *Acinetobacter baumannii* QN01 thuần khiết về mặt sinh học phân lập từ mẫu đất nhiễm dầu lấy tại Dung Quất, Quảng Ngãi, Việt Nam.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn *Acinetobacter baumannii* QN01 được nuôi cấy để tạo màng sinh học. Đồng thời sáng chế cũng đề cập tới khả năng phân hủy phenol, piren, naphtalen, toluen và phân hủy dầu diezen của chủng QN01.

A. Phân lập và định danh chủng vi khuẩn *Acinetobacter baumannii* QN01

Mẫu đất nhiễm dầu thu được từ Dung Quất, Quảng Ngãi, 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 3 lần liên tiếp trên môi trường dịch thể khoáng Gost có cải tiến bằng cách thay thế nguồn cacbon bằng nguồn cơ chất là dầu diezen. Môi trường khoáng Gost được dùng trong quá trình phân lập được đề cập ở đây là môi trường có thành phần như sau:

Na ₂ HPO ₄	0,7	MgSO ₄	0,4
KH ₂ PO ₄	0,3	NaCl	1
KNO ₃	3	pH	6,9 ÷ 7,2

Môi trường Gost được khử trùng ở 121°C trong 30 phút.

Kết quả đã phân lập được chủng vi khuẩn QN01. Mô tả chi tiết hình thái khuẩn lạc và tế bào của chủng QN01 như sau: khuẩn lạc có hình tròn, bề mặt lồi, trơn, bóng, màu trắng nhạt, d = 1-2 mm (Fig 1). Tế bào của chúng có dạng hình que ngắn, bề mặt xù xì. Hình thái tế bào thể hiện trên Fig 2.

Thực hiện phân loại chủng vi khuẩn bằng cách xác định trình tự đoạn gen 16S rARN với cặp mồi xuôi 5'-AGA AAG GAG GTG ATC CAG CC-3' và 5'-AAAGGAGGTGATCCAGCC - 3'. Các điều kiện thực hiện nhân trình 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 QN01 đã được xác định trình tự có kích thước 1470 nucleotit và có mức độ tương đồng 100% với trình tự tương ứng của chủng *Acinetobacter baumannii* DSM30007 (mã số X81660). Trình tự đoạn gen của chủng QN01 đã được đăng ký trên Genbank với mã số LC602830. Mối quan hệ phát sinh chủng loài của chủng QN01 với một số chủng vi khuẩn đã được xây dựng và thể hiện trên Fig. 3. Như vậy, dựa trên các đặc điểm hình thái như khuẩn lạc cũng như tế bào và so sánh trình tự đoạn gen 16S rARN thì chủng

QN01 thuộc loài *Acinetobacter baumannii* và được đặt tên là *Acinetobacter baumannii* QN01. Tên chủng “QN01”, trong phạm vi bản mô tả này, vẫn được sử dụng để chỉ chủng *Acinetobacter baumannii* QN01 vừa được định tên trên đây.

Chủng *Acinetobacter baumannii* QN01 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 30.

B. Phân tích khả năng tạo màng sinh học của chủng *Acinetobacter baumannii* QN01

Chủng QN01 sau khi phân lập được được tiến hành xác định một số yếu tố ảnh hưởng đến khả năng tạo màng sinh học của nó.

Chủng QN01 được nuôi cấy trên môi trường LB có thành phần gồm (g/l): NaCl 10, trypton 10, cao men 5, độ pH = 7-7,2 và bổ sung một số nhân tố có khả năng sẽ ảnh hưởng đến khả năng tạo màng sinh học bởi chủng QN01.

Khả năng tạo màng của chủng QN01 được xác định như sau: nuôi cấy chủng QN01 trên môi trường LB, sau 24 giờ nuôi cấy trong điều kiện tĩnh, đem ly tâm 1 ml loại dịch và thu sinh khối (ly tâm ở 4.000 rpm, 4°C trong vòng 10 phút, lặp lại 3 lần để loại bỏ hoàn toàn môi trường nuôi cấy). Đánh tan sinh khối trong 1 ml nước cất vô trùng và tiến hành pha loãng để đạt OD₆₀₀ là 0,3. Bổ sung 3 µl dịch này vào các ống eppendorf 1,5 ml chứa 297 µl môi trường LB. Cứ sau 24 giờ lấy các ống eppendorf chứa mẫu nuôi để đánh giá khả năng tạo biofilm (mỗi chủng tương ứng với 3 ống eppendorf cho mỗi ngày trong 3 ngày liên tiếp). Dùng pipetman hút nhẹ dịch nuôi (không làm vỡ biofilm), rửa bằng 500 µl nước cất vô trùng (lặp lại 2 lần). Tiếp đó, bổ sung 300 µl dung dịch tím kết tinh 0,1% vào các ống eppendorf, cố định 10 phút ở nhiệt độ phòng và rửa 2 lần bằng nước cất vô trùng. Sau đó bổ sung 300 µl dung dịch acetic acid 33% trộn đều rồi pha loãng và đo OD ở bước sóng 570 nm.

Tiến hành đánh giá ảnh hưởng của một số nhân tố như độ pH, nhiệt độ, nồng độ muối, nguồn cacbon, nguồn nitơ để từ đó xác định được các điều kiện thích hợp cho việc sinh tổng hợp màng của chủng QN01 theo sáng chế.

Để khảo sát độ pH thích hợp cho sự tạo màng sinh học của chủng QN01 chúng tôi đã tiến hành nuôi cấy tĩnh trong môi trường LB với độ pH khác nhau từ 4-9, thí nghiệm được tiến hành lặp lại ba lần, cứ sau 24 giờ nuôi cấy, tiến hành đánh giá khả năng tạo biofilm của chủng QN01, kết quả được trình bày trên Bảng 1.

Bảng 1: Ảnh hưởng của pH đến khả năng tạo màng của chủng QN01 (OD570nm)

pH	Thời gian theo dõi (giờ)		
	24	48	72
4	3,12±0,12	5,62 ±0,19	2,32±0,12
5	10,95±0,15	11,90±0,18	8,18±0,13
6	12,67±0,19	16,53±0,20	11,75±0,11
7	18,70±0,20	22,80±0,15	19,18±0,19
8	13,00±0,17	13,72±0,11	10,73±0,15
9	7,93±0,13	12,00±0,13	8,85±0,15

Kết quả từ Bảng 4 cho thấy: chủng QN01 có khả năng tạo màng tốt từ độ pH 5-9 và màng sinh học vẫn được duy trì tốt sau 72 giờ thí nghiệm. Với kết quả thu được chúng tôi có thể ứng dụng chủng QN01 để tạo màng xử lý ô nhiễm dầu trong điều kiện độ pH từ 5 đến 9 mà không phải điều chỉnh độ pH của môi trường.

Để đánh giá khả năng tạo màng và xử lý được ô nhiễm dầu ở điều kiện ngoài tự nhiên, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của các khoảng nhiệt độ 25, 30, 37, 40, 45, 50°C (là các khoảng nhiệt độ trung bình đặc trưng cho mùa đông và mùa hè ở nước ta) đến khả năng tạo màng của chủng QN01. Thí nghiệm được tiến hành ở điều kiện kỵ khí sáng. Kết quả về khả năng tạo màng ở các nhiệt độ khác nhau sau 5 ngày được trình bày trên Bảng 2.

Bảng 2. Khả năng tạo màng của chủng QN01 ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau (OD570nm)

Nhiệt độ (°C)	Thời gian theo dõi (giờ)		
	24	48	72
25	14,95±0,20	17,15±0,19	13,72±0,12
30	15,45±0,17	18,63±0,11	16,47±0,17
37	14,45±0,25	17,23±0,13	16,02±0,13
40	11,17±0,20	13,72±0,15	11,58±0,11
45	7,55±0,17	9,75±0,11	8,68±0,15
50	3,33±0,13	3,77±0,12	1,98±0,13

Từ kết quả trên Bảng 2 cho thấy chủng QN01 có khả năng tạo màng ở phổ nhiệt độ khá rộng từ 25 – 45°C, trong khoảng này sự sai khác về khả năng tạo màng của chủng này là không có ý nghĩa thống kê. Điều này chứng tỏ chủng QN01 có khả năng tạo màng tốt ở các dải nhiệt độ khá rộng. Như vậy, chủng QN001 có thể ứng dụng để tạo màng xử lý ô nhiễm dầu ở nhiều khu vực khác nhau cũng như mùa khác nhau. Đồng thời, kết quả tạo màng sinh học của chủng QN01 cao hơn rất nhiều so với chủng

đối chứng dương là chủng *Acinetobacter calcoaceticus* P23 - chỉ đạt $9,1 \pm 0,20$ (Yamada và cộng sự, 2010).

Chủng QN01 được phân lập từ vùng ô nhiễm dầu ven biển, vì vậy, chúng tôi tiến hành đánh giá ảnh hưởng của nồng độ muối đến khả năng tạo màng của chúng. Sau 24, 48 và 72 giờ nuôi cấy khả năng tạo màng ở các nồng độ muối khác nhau được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3: Ảnh hưởng của nồng độ NaCl đến khả năng tạo màng của chủng QN01 (OD570 nm)

Nồng độ muối (%)	Thời gian theo dõi (giờ)		
	24	48	72
0	$17,13 \pm 0,12$	$21,70 \pm 0,16$	$27,65 \pm 0,21$
5	$17,85 \pm 0,03$	$21,30 \pm 0,20$	$28,2 \pm 0,12$
10	$18,23 \pm 0,07$	$22,25 \pm 0,23$	$29,10 \pm 0,24$
15	$18,21 \pm 0,12$	$28,16 \pm 0,21$	$28,01 \pm 0,14$
20	$19,01 \pm 0,21$	$28,26 \pm 0,32$	$27,23 \pm 0,21$
25	$18,07 \pm 0,23$	$27,9 \pm 0,13$	$27,5 \pm 0,15$
30	$15,32 \pm 0,17$	$22,98 \pm 0,41$	$18,73 \pm 0,17$
35	$14,36 \pm 0,10$	$16,73 \pm 0,23$	$16,54 \pm 0,10$
40	$10,39 \pm 0,11$	$12,97 \pm 0,15$	$11,43 \pm 0,14$

Kết quả ở Bảng 3 cho thấy, chủng QN01 có khả năng tạo màng khá tốt từ nồng độ 0 đến 40‰. Như vậy, chủng này có thể ứng dụng trong xử lý ô nhiễm dầu từ thủy vực nước ngọt cho đến những vùng biển nhiễm dầu có độ mặn đến 40‰.

Để đánh giá khả năng tạo màng sinh học của chủng QN01 trên các nguồn cacbon khác nhau như saccaroza, lactoza, glucoza và mantoza. Cứ sau mỗi 24 giờ nuôi cấy, khả năng tạo màng sinh học của chủng QN01 ở các nguồn cacbon khác nhau được trình bày ở Bảng 4.

Bảng 4: Ảnh hưởng của nguồn cacbon đến khả năng tạo màng của chủng QN01 (OD570 nm)

Nguồn cacbon	Thời gian theo dõi (giờ)		
	24	48	72
Saccaroza	$27,43 \pm 0,21$	$34,20 \pm 0,15$	$32,35 \pm 0,19$
Lactoza	$26,87 \pm 0,13$	$35,73 \pm 0,11$	$32,43 \pm 0,12$
Glucoza	$24,42 \pm 0,43$	$31,67 \pm 0,13$	$27,08 \pm 0,26$
Mantoza	$28,00 \pm 0,24$	$36,47 \pm 0,10$	$33,80 \pm 0,09$

Kết quả trên Bảng 4 cho thấy, chủng QN01 tạo màng sinh học rất tốt trên các nguồn cacbon khác nhau, đặc biệt là trên nguồn mantoza. Đây cũng là nguồn cơ chất sẵn có trong tự nhiên và có giá thành thấp. Vì vậy, khi nuôi cấy ở quy mô lớn, có thể sử dụng làm nguồn cacbon cho chủng QN01 tạo màng sinh học và dùng màng này để xử lý ô nhiễm dầu.

Nitơ cũng là một thành phần quan trọng trong các môi trường nuôi cấy vi sinh vật. Một số nguồn nitơ vô cơ và hữu cơ đã được sử dụng để đánh giá khả năng tạo màng sinh học của chủng QN01. Kết quả về ảnh hưởng của nguồn nitơ được thể hiện trong Bảng 5.

Bảng 5: Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến khả năng tạo màng của chủng QN01 (OD570 nm)

Nitơ	Thời gian theo dõi (giờ)		
	24	48	72
KNO ₃	25,50±0,23	37,13±0,21	29,95±0,26
NaNO ₃	27,10±0,32	37,23±0,31	33,38±0,27
Pepton	34,77±0,14	44,58±0,43	37,78±0,38
Cao men	31,62±0,25	40,30±0,41	30,52±0,34

Kết quả trên Bảng 5 cho thấy, với nguồn nitơ là pepton thì chủng QN01 tạo màng sinh học tốt nhất. Tuy nhiên, với các nguồn nitơ vô cơ, khi so sánh với chủng đối chứng dương là chủng *Acinetobacter calcoaceticus* P23 - chỉ đạt 9,1±0,20 (Yamada và cộng sự, 2010) thì 2 nguồn nitơ vô cơ còn lại là KNO₃ và NaNO₃ đều cho hiệu quả tạo màng sinh học rất cao. Vì vậy, trong thực tế, có thể sử dụng các nguồn nitơ này để tạo môi trường nuôi cấy chủng QN01 nhằm ứng dụng trong xử lý ô nhiễm dầu ở các địa điểm khác nhau.

C. Phân tích khả năng phân hủy dầu diezen và một số hợp chất vòng thơm của chủng QN01

1. Phân tích khả năng phân hủy dầu diezen

Hàm lượng dầu diezen được sử dụng để đánh giá khả năng phân hủy bởi chủng *Acinetobacter baumannii* QN01 có khả năng tạo màng sinh học với nồng độ màu ban đầu là 1, 3, 5, 7, 9 và 10% tương đương với 5.000, 15.000, 25.000, 35.000, 45.000 và 50.000 ppm.

Chủng vi khuẩn sau khi phân lập được nhân giống trong các bình tam giác thể tích 100ml. Môi trường sử dụng trong quá trình nhân giống này là môi trường khoáng

Gost cải tiến, trong đó nguồn cacbon được sử dụng là nguồn dầu diezen có thành phần như sau:

Na ₂ HPO ₄	0,7	MgSO ₄	0,4
KH ₂ PO ₄	0,3	NaCl	1
KNO ₃	3	pH	6,9 ÷ 7,2

Môi trường khoáng Gost này được khử trùng ở 121°C trong 30 phút.

Lượng giống ban đầu được cấp vào môi trường là 10% (mật độ tế bào trong các bình nuôi giống đạt mật độ khoảng 10⁸ CFU/ml) tiến hành nuôi ở điều kiện tĩnh nhiệt độ nằm trong khoảng 28±2°C, trong thời gian 7 ngày. Kết quả được trình bày trên Bảng 6.

Kết quả cho thấy: chủng *A. baumannii* QN01 có khả năng sinh trưởng tốt trên môi trường chứa dầu diezen với nồng độ dầu từ 1 – 10% theo thể tích dịch lỏng. Trong đó, chủng QN01 có khả năng sinh trưởng tốt nhất trên môi trường chứa dầu diezen trong khoảng 1 – 5% sau đó có sự giảm nhẹ về khả năng sinh trưởng ở nồng độ dầu 9 – 10 %. Tuy nhiên, để đánh giá chính xác về khả năng phân hủy dầu diezen của màng sinh học chủng QN01 chúng tôi lựa chọn nồng độ 10% đã gửi mẫu đi phân tích khả năng phân hủy dầu diezen QN01 bằng phương pháp phân tích khối lượng ở Viện Hóa công nghiệp, Bộ Công thương. Kết quả cho thấy sau 7 ngày nuôi cấy, màng sinh học do chủng *A. baumannii* QN01 tạo thành đã có khả năng xử lý là 90,21 % tương ứng với nồng độ ban đầu là 50.000 mg/l.

2. Phân tích khả năng phân hủy phenol

Đối với nguồn các hợp chất hiđrocacbon thơm như phenol, để đánh giá khả năng phân hủy phenol của màng sinh học bởi chủng *A. baumannii* QN01 các tác giả tiến hành thí nghiệm trên môi trường khoáng Gost cải tiến, với nồng độ phenol ban đầu 100, 150, 200, 250, 300 và 350 ppm.

Lượng giống ban đầu được cấp vào môi trường là 10% (mật độ tế bào trong các bình nuôi giống đạt mật độ khoảng 10⁸ CFU/ml) tiến hành nuôi ở điều kiện tĩnh nhiệt độ nằm trong khoảng 28±2°C, trong thời gian 7 ngày. Kết quả được trình bày trên Bảng 6.

Kết quả thu được cho thấy chủng *A. baumannii* QN01 có khả năng sinh trưởng khá tốt trên dải nồng độ phenol từ 100 – 300 ppm, Tuy nhiên, khi nồng độ càng cao sinh trưởng của chủng *A. baumannii* QN01 giảm đi, ở nồng độ 350 ppm chủng này gần như không sinh trưởng được. Để đánh giá chính xác về khả năng phân hủy phenol của màng sinh học chủng QN01, nồng độ 300 ppm được lựa chọn để phân tích khả

năng phân hủy phenol. Kết quả cho thấy sau 7 ngày nuôi cấy, màng sinh học do chủng *A. baumannii* QN01 tạo thành đã có khả năng xử lý là 95,13 %.

3. Phân tích khả năng phân hủy piren

Đối với nguồn piren, để đánh giá khả năng phân hủy piren bởi màng sinh học chủng *A. baumannii* QN01, chúng tôi tiến hành thí nghiệm trên môi trường khoáng Gost cải tiến, với nồng độ piren ban đầu 100, 150, 200, 250, 300 và 350 ppm.

Lượng giống ban đầu được cấy vào môi trường là 10% (mật độ tế bào trong các bình nuôi giống đạt mật độ khoảng 10^8 CFU/ml) tiến hành nuôi ở điều kiện tĩnh nhiệt độ nằm trong khoảng $28 \pm 2^\circ\text{C}$, trong thời gian 7 ngày. Kết quả được trình bày trên Bảng 6.

Kết quả thu được cho thấy chủng *A. baumannii* QN01 có khả năng sinh trưởng khá tốt trên dải nồng độ piren từ 100 – 300 ppm. Tuy nhiên, ở nồng độ càng cao thì sinh trưởng càng giảm và đến nồng độ 350 ppm chủng này sinh trưởng kém hơn. Để đánh giá chính xác về khả năng phân hủy piren của màng sinh học chủng *A. baumannii* QN01, chúng tôi lựa chọn nồng độ 300 ppm để phân tích khả năng phân hủy piren. Kết quả cho thấy sau 7 ngày nuôi cấy, màng sinh học do chủng *A. baumannii* QN01 tạo thành đã có khả năng xử lý là 95,21 %.

4. Phân tích khả năng phân hủy naphtalen

Đối với nguồn naphtalen, để đánh giá khả năng phân hủy naphtalen bởi chủng *A. baumannii* QN01 có khả năng tạo màng sinh học với nồng độ màu ban đầu 100, 150, 200, 250, 300 và 350 ppm.

Lượng giống ban đầu được cấy vào môi trường là 10% (mật độ tế bào trong các bình nuôi giống đạt mật độ khoảng 10^8 CFU/ml) tiến hành nuôi ở điều kiện tĩnh nhiệt độ nằm trong khoảng $28 \pm 2^\circ\text{C}$, trong thời gian 7 ngày. Kết quả được trình bày trên Bảng 6.

Kết quả thu được cho thấy chủng *A. baumannii* QN01 có khả năng sinh trưởng khá tốt trên dải nồng độ naphtalen từ 100 – 300 ppm. Để đánh giá chính xác về khả năng phân hủy naphtalen của màng sinh học chủng *A. baumannii* QN01, chúng tôi lựa chọn nồng độ 300ppm để phân tích khả năng phân hủy naphtalen. Kết quả cho thấy sau 7 ngày nuôi cấy, màng sinh học do chủng *A. baumannii* QN01 tạo thành đã có khả năng xử lý là 95,84 %.

5. Phân tích khả năng phân hủy toluen

Đối với nguồn toluen, để đánh giá khả năng phân hủy toluen bởi màng sinh học chủng *A. baumannii* QN01, chúng tôi tiến hành thí nghiệm trên môi trường khoáng Gost cải tiến, với nồng độ toluen ban đầu 100, 150, 200, 250, 300 và 350 ppm.

Lượng giống ban đầu được cấp vào môi trường là 10% (mật độ tế bào trong các bình nuôi giống đạt mật độ khoảng 10^8 CFU/ml) tiến hành nuôi ở điều kiện tĩnh nhiệt độ nằm trong khoảng $28 \pm 2^\circ\text{C}$, trong thời gian 7 ngày. Kết quả được trình bày trên Bảng 6.

Kết quả thu được cho thấy chủng *A. baumannii* QN01 có khả năng sinh trưởng khá tốt trên dải nồng độ toluen từ 100 – 300 ppm. Để đánh giá chính xác về khả năng phân hủy toluen của màng sinh học chủng *A. baumannii* QN01, chúng tôi lựa chọn nồng độ 300 ppm để phân tích. Kết quả cho thấy sau 7 ngày nuôi cấy, màng sinh học do chủng *A. baumannii* QN01 tạo thành đã có khả năng xử lý là 98,32 %.

Bảng 6. Khả năng sinh trưởng của chủng QN01 trên các nồng độ dầu diezen và một số hợp chất vòng thơm khác nhau

DO (%)	OD ₈₀₀	Phenol (ppm)	OD ₈₀₀	Piren (ppm)	OD ₈₀₀	Naphtalen (ppm)	OD ₈₀₀	Toluen (ppm)	OD ₈₀₀
1	1,59 $\pm$ 0,10	100	1,48 $\pm$ 0,10	100	1,51 $\pm$ 0,06	100	1,49 $\pm$ 0,05	100	1,54 $\pm$ 0,06
3	1,54 $\pm$ 0,12	150	1,46 $\pm$ 0,13	150	1,44 $\pm$ 0,04	150	1,35 $\pm$ 0,04	150	1,44 $\pm$ 0,05
5	1,42 $\pm$ 0,09	200	1,33 $\pm$ 0,14	200	1,32 $\pm$ 0,07	200	1,28 $\pm$ 0,06	200	1,35 $\pm$ 0,04
7	1,38 $\pm$ 0,11	250	1,27 $\pm$ 0,15	250	1,19 $\pm$ 0,04	250	1,14 $\pm$ 0,05	250	1,29 $\pm$ 0,05
9	1,21 $\pm$ 0,08	300	1,15 $\pm$ 0,13	300	0,99 $\pm$ 0,04	300	1,11 $\pm$ 0,07	300	1,16 $\pm$ 0,03
10	1,20 $\pm$ 0,11	350	0,41 $\pm$ 0,15	350	0,31 $\pm$ 0,02	350	0,31 $\pm$ 0,05	350	0,41 $\pm$ 0,02

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Phân lập và định danh chủng vi khuẩn QN01

Mẫu đất nhiễm dầu thu được từ Dung Quất, Quảng Ngãi, 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 3 lần liên tiếp trên môi trường dịch thể khoáng Gost có cải tiến bằng cách thay thế nguồn cacbon bằng nguồn cơ chất là dầu diezen. Các khuẩn lạc được tách và làm sạch, thu được chủng vi khuẩn QN01 có hình thái khuẩn lạc cũng như hình thái tế bào như được thể hiện trong Fig. 1 và Fig. 2.

Thực hiện phân loại chủng vi khuẩn QN01 bằng cách xác định trình tự đoạn gen 16S rARN với cặp mồi 27F/1527R ADN tổng số của chủng vi khuẩn QN01 được thu như sau:

- Nuôi cấy thu sinh khối vi khuẩn trong LB trong 18 giờ thì ADN của chúng được tách chiết theo mô tả của Zhou và cộng sự, 1996; quy trình cụ thể như sau: i) hút dịch nuôi cấy vào các ống eppendorf 1,5 ml, tế bào được thu lại bằng cách ly tâm 6000 v/ph trong 5 phút. ii) bổ sung 540 μ l đệm phân tách và lắc đều cho tan hết tế bào; iii)

bổ sung 20 µl proteaza K (20 mg/ml) lắc ở 37 °C trong 1 giờ; iv) bổ sung 60 µl SDS 20 % rồi ủ ở 65 °C trong 2 giờ; v) protein được loại bỏ bằng cách bổ sung 600 µl hỗn hợp chlorophom và isoamylalcohol (tỉ lệ 24:1), ly tâm 12.000 vòng/phút trong 15 phút. Hút dịch ở pha trên và chuyển sang ống eppendorf mới, lặp lại 2 lần. Chú ý: đảo nhẹ nhàng để tránh đứt gãy ADN; vi) ADN được rửa bằng 0,6 lần thể tích định pha trên, ủ ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ; vii) Ly tâm 12.000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C, thu rửa ADN; viii) rửa rửa bằng 500 µl etanol lạnh 70%, ly tâm 12.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C rồi bỏ dịch; ix) Để khô tự nhiên và hòa tan rửa trong 25-30 µl nước đã được loại bỏ ion vô trùng 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 (Lane, 1991).

Mồi xuôi (27f): 5'-AGA AAG GAG GTG ATC CAG CC-3'

Mồi ngược (1527r): 5'- AAAGGAGGTGATCCAGCC - 3'.

ADN thu được từ chủng vi khuẩn 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):

Dream tag buffer (10x)	: 2,5 µl
dNTPs (2,5 mM)	: 2,5 µl
Dream tag (5 Unit/µl)	: 0,2 µl
Mồi xuôi (20 µM)	: 1,5 µl
Mồi ngược (20 µM)	: 1,5 µl
ADN khuôn (20 ng/µl)	: 2,5 µl
dH ₂ O	: 14,3 µl

Chu trình nhiệt:

Bước 1: 95°C (5 phút)

Bước 2: 95°C (50 giây)

Bước 3: 52°C (30 giây)

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 QN01 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.

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 Mega4 để xây dựng cây phát sinh chủng loại của chủng vi khuẩn QN01.

Trình tự gen 16S rARN của chủng QN01 có kích thước 1470 nucleotit và được đăng ký trên GenBank với mã số truy cập LC602830.

Trình tự gen của chủng QN01 có mức độ tương đồng 100 % (số nucleotit so sánh là 1470) với trình tự tương ứng của các chủng *Acinetobacter baumannii* DSM30007 (mã số X81660), và tương đồng xa hơn (97,48 %) so với chủng *Acinetobacter soli* B1 (EU290155). Mỗi quan hệ phát sinh chủng loài của chủng QN01 với một số chủng vi khuẩn đã được xây dựng và kết quả được thể hiện ở Fig. 3.

Như vậy, dựa trên các đặc điểm hình thái khuẩn lạc cũng như hình thái tế bào và so sánh trình tự gen 16S rARN thì chủng QN01 thuộc loài *Acinetobacter baumannii* và được đặt tên là *Acinetobacter baumannii* QN01.

Chủng *Acinetobacter baumannii* QN01 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 30.

Ví dụ 2. Tác động của độ pH lên khả năng tạo màng của chủng QN01

Khả năng tạo màng của chủng vi khuẩn QN01 trên môi trường LB (có thành phần gồm (g/l): NaCl 10, trypton 10, cao men 5) có độ pH được thay đổi giá trị từ 4 đến 9 đã được khảo sát. Sau 3 ngày nuôi cấy, QN01 tạo màng sinh học trong môi trường có độ pH khác nhau. Chủng vi khuẩn này có hoạt tính tạo màng cao ở độ pH 5 đến độ pH 9. Ở các độ pH 4 khả năng tạo màng của chủng QN01 rất thấp chỉ đạt khoảng $3,12 \pm 0,12$ và hầu như không có khả năng tạo màng sau 3-5 ngày nuôi cấy.

Kết quả được thể hiện trên Bảng 1.

Như vậy, độ pH 4,5 đến độ pH 9 phù hợp cho khả năng tạo màng cao ở chủng QN01.

Ví dụ 3. Tác động của nhiệt độ lên khả năng tạo màng của chủng QN01

Dải nhiệt độ 25 – 50 °C đã được sử dụng để đánh giá ảnh hưởng của chúng lên khả năng tạo màng bởi chủng QN01 trong 3 ngày nuôi cấy.

Kết quả được thể hiện trên Bảng 2.

Kết quả cho thấy, chủng QN01 có khả năng tạo màng ở phổ nhiệt độ khá rộng từ 25 – 45°C, trong khoảng này sự sai khác về khả năng tạo màng của chủng này là không có ý nghĩa thống kê. Điều này chứng tỏ chủng QN01 có khả năng tạo màng tốt

ở các dải nhiệt độ khá rộng. Như vậy, chủng QN001 có thể ứng dụng để tạo màng xử lý ô nhiễm dầu ở nhiều khu vực khác nhau cũng như mùa khác nhau.

Ví dụ 4. Tác động của nồng độ muối lên khả năng tạo màng của chủng QN01

Nồng độ muối NaCl khác nhau từ 0 đến 40‰ đã được chọn để khảo sát tìm ra nồng độ muối thích hợp cho khả năng tạo màng cao bởi chủng QN01.

Kết quả được thể hiện ở Bảng 3.

Kết quả cho thấy, chủng QN01 có khả năng tạo màng khá tốt từ nồng độ 0 đến 40‰.

Ví dụ 5. Tác động của nguồn cacbon lên khả năng tạo màng của chủng QN01

Các nguồn cacbon khác nhau bao gồm saccaroza, lactoza, glucoza và mantoza đã được sử dụng để đánh giá ảnh hưởng lên khả năng tạo màng sinh học của chủng QN01.

Kết quả được thể hiện ở Bảng 4.

Kết quả trên Bảng 4 cho thấy, chủng QN01 tạo màng sinh học rất tốt trên các nguồn cacbon khác nhau, đặc biệt là trên nguồn mantoza. Đây cũng là nguồn cơ chất sẵn có trong tự nhiên và có giá thành thấp. Vì vậy, khi nuôi cấy ở quy mô lớn, có thể sử dụng làm nguồn cacbon cho chủng QN01 tạo màng sinh học và dùng màng này để xử lý ô nhiễm dầu.

Ví dụ 6. Tác động của nguồn nitơ lên khả năng tạo màng sinh học của chủng QN01

Một số nguồn nitơ vô cơ và hữu cơ gồm KNO_3 , NaNO_3 , pepton và cao men đã được sử dụng để đánh giá khả năng tạo màng sinh học của chủng QN01.

Kết quả được thể hiện trong Bảng 5.

Kết quả trên Bảng 5 cho thấy, với nguồn nitơ vô cơ hay hữu cơ thì chủng QN01 đều tạo màng sinh học rất tốt, đặc biệt là trên nguồn pepton.

Ví dụ 7. Khả năng xử lý dầu diezen của chủng QN01

Dầu diezen ở các dải nồng độ khác nhau từ 1-10% tương đương với 5.000, 15.000, 25.000, 35.000 và 50.000 ppm đã được sử dụng để đánh giá khả năng sinh trưởng và phân hủy của màng sinh học chủng QN01 trong 7 ngày. Kết quả được thể hiện ở Bảng 6.

Kết quả cho thấy: *A. baumannii* QN01 có khả năng sinh trưởng tốt trên môi trường chứa dầu diezen với nồng độ dầu từ 1 – 10% theo thể tích dịch lỏng. Trong đó, chủng *A. baumannii* QN01 có khả năng sinh trưởng tốt nhất trên môi trường chứa dầu diezen trong khoảng 1 – 5% sau đó có sự giảm nhẹ về khả năng sinh trưởng ở nồng độ dầu 9 – 10%. Ở nồng độ 10% được lựa chọn để gửi mẫu đi phân tích bằng phương

pháp phân tích khối lượng. Kết quả cho thấy sau 7 ngày nuôi cấy, màng sinh học do chủng *A. baumannii* QN01 tạo thành đã có khả năng xử lý là 90,21 % tương ứng với nồng độ ban đầu là 50.000mg/l.

Ví dụ 8. Khả năng phân hủy phenol của chủng QN01

Phenol ở các dải nồng độ khác nhau từ 100 – 350ppm đã được sử dụng để đánh giá khả năng sinh trưởng và phân hủy của màng sinh học chủng QN01 trong 14 ngày. Kết quả được thể hiện ở Bảng 6.

Kết quả thu được cho thấy chủng *A. baumannii* QN01 có khả năng sinh trưởng khá tốt trên dải nồng độ phenol từ 100 – 300 ppm, chúng tôi lựa chọn nồng độ 300 ppm để phân tích khả năng phân hủy phenol của màng sinh học chủng QN01. Kết quả cho thấy sau 7 ngày nuôi cấy, màng sinh học do chủng *A. baumannii* QN01 tạo thành đã có khả năng xử lý là 95,13 %.

Ví dụ 9. Khả năng phân hủy piren của chủng QN01

Piren ở các dải nồng độ khác nhau từ 100 – 350 ppm đã được sử dụng để đánh giá khả năng sinh trưởng và phân hủy của màng sinh học chủng QN01 trong 7 ngày. Kết quả được thể hiện ở Bảng 6.

Kết quả thu được cho thấy chủng *A. baumannii* QN01 có khả năng sinh trưởng khá tốt trên dải nồng độ piren từ 100 – 300 ppm. Tuy nhiên, ở nồng độ càng cao thì sinh trưởng càng giảm và đến nồng độ 350 ppm chủng này sinh trưởng kém hơn. Nồng độ 300 ppm được lựa chọn để phân tích khả năng phân hủy piren của màng sinh học bởi chủng QN01. Kết quả cho thấy sau 7 ngày nuôi cấy, màng sinh học do chủng *A. baumannii* QN01 tạo thành đã có khả năng xử lý là 95,21 %.

Ví dụ 10. Khả năng phân hủy naphtalen của chủng QN01

Naphtalen ở các dải nồng độ khác nhau từ 100 – 350 ppm đã được sử dụng để đánh giá khả năng sinh trưởng và phân hủy của màng sinh học chủng QN01 trong 7 ngày. Kết quả được thể hiện ở Bảng 6.

Kết quả thu được cho thấy chủng *A. baumannii* QN01 có khả năng sinh trưởng khá tốt trên dải nồng độ naphtalen từ 100 – 300ppm. Để đánh giá chính xác về khả năng phân hủy naphtalen của màng sinh học chủng *A. baumannii* QN01, chúng tôi lựa chọn nồng độ 300 ppm để phân tích khả năng phân hủy naphtalen. Kết quả cho thấy sau 14 ngày nuôi cấy, màng sinh học do chủng *A. baumannii* QN01 tạo thành đã có khả năng xử lý là 95,84 %.

Ví dụ 11. Khả năng phân hủy toluen của chủng QN01

Toluen ở các dải nồng độ khác nhau từ 100 – 350 ppm đã được sử dụng để đánh giá khả năng sinh trưởng và phân hủy của màng sinh học chủng QN01 trong 7 ngày. Kết quả được thể hiện ở Bảng 6.

Kết quả thu được cho thấy chủng *A. baumannii* QN01 có khả năng sinh trưởng khá tốt trên dải nồng độ toluen từ 100 – 300 ppm. Để đánh giá chính xác về khả năng phân hủy toluen của màng sinh học chủng *A. baumannii* QN01, chúng tôi lựa chọn nồng độ 300 ppm để phân tích khả năng phân hủy toluen. Kết quả cho thấy sau 7 ngày nuôi cấy, màng sinh học do chủng *A. baumannii* QN01 tạo thành đã có khả năng xử lý là 98,32 %.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn *A. baumannii* QN01 có khả năng tạo màng sinh học cao phân lập từ đất ô nhiễm dầu ở Việt Nam.

Chủng vi khuẩn này có khả năng tạo màng sinh học tốt ở nhiều điều kiện sinh lý sinh hóa khác nhau như độ pH 5-9, nồng độ muối NaCl 0-40%, nhiệt độ 25-45°C, nguồn cacbon gồm saccaroza, lactoza, glucoza và mantoza, nguồn nitơ gồm KNO₃, NaNO₃, pepton và cao men. Như vậy, chủng QN01 có thể ứng dụng để tạo màng xử lý ô nhiễm dầu ở các điều kiện tương đối rộng và rất phù hợp với thực tế.

Sau từ 7 ngày thí nghiệm, màng sinh học do chủng này tạo thành có khả năng phân hủy 90,21 % hàm lượng dầu diezen với nồng độ ban đầu là 50.000 mg/l; phân hủy 95,13 % phenol với nồng độ ban đầu là 300 ppm; phân hủy 95,21 % piren với nồng độ ban đầu là 300 ppm; phân hủy 95,84 % naphtalen với nồng độ ban đầu là 300 ppm và phân hủy được 98,32 % toluen với nồng độ ban đầu là 300 ppm. Kết quả cho thấy chủng QN01 này có khả năng xử lý các thành phần hiđrocacbon có trong dầu mỏ và nước nhiễm dầu là rất hiệu quả. Việc sử dụng chủng *A. baumannii* QN01 phân lập từ vùng ven biển bị nhiễm dầu Dung Quất, Quảng Ngãi đã giúp tận dụng được nguồn sinh vật phong phú của Việt Nam cũng như giúp làm giảm chi phí cho việc xử lý nước thải ô nhiễm dầu từ các khu vực bị ô nhiễm dầu.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chúng vi khuẩn *Acinetobacter baumannii* QN01 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ mẫu đất nhiễm dầu, trong đó chủng vi khuẩn này có trình tự gen 16S rARN với kích thước 1441 bp và được đăng ký trên GenBank với mã số LC602830, và có các đặc tính sau:

có khả năng tạo màng sinh học khi được nuôi cấy trong môi trường LB, điều kiện nuôi cấy ở độ pH 5-9, nồng độ muối NaCl 0-40‰, nhiệt độ 25-45°C, nguồn cacbon gồm saccaroza, lactoza, glucoza và mantoza, nguồn nitơ gồm KNO₃, NaNO₃, pepton và cao men, giá trị OD ở bước sóng 570 nm cao nhất lên tới 44,58±0,43;

có khả năng phân hủy dầu diezen là 90,21% tương ứng với nồng độ ban đầu là 50.000 mg/l; và

có khả năng phân hủy phenol là 95,13%; piren 95,21%; naphtalen 95,84%; và toluen là 98,32% với nồng độ ban đầu của từng hợp chất này là 300 ppm.

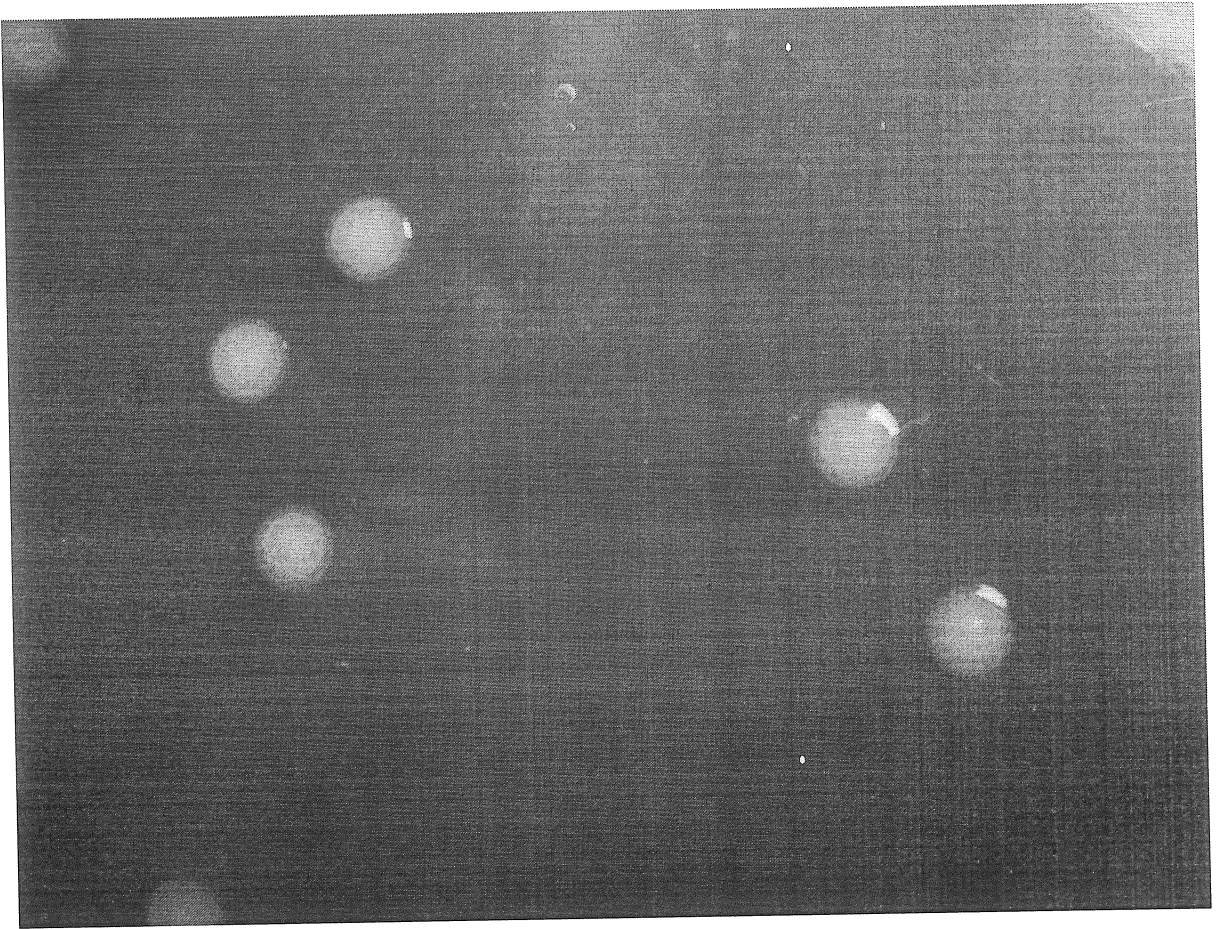


Fig. 1

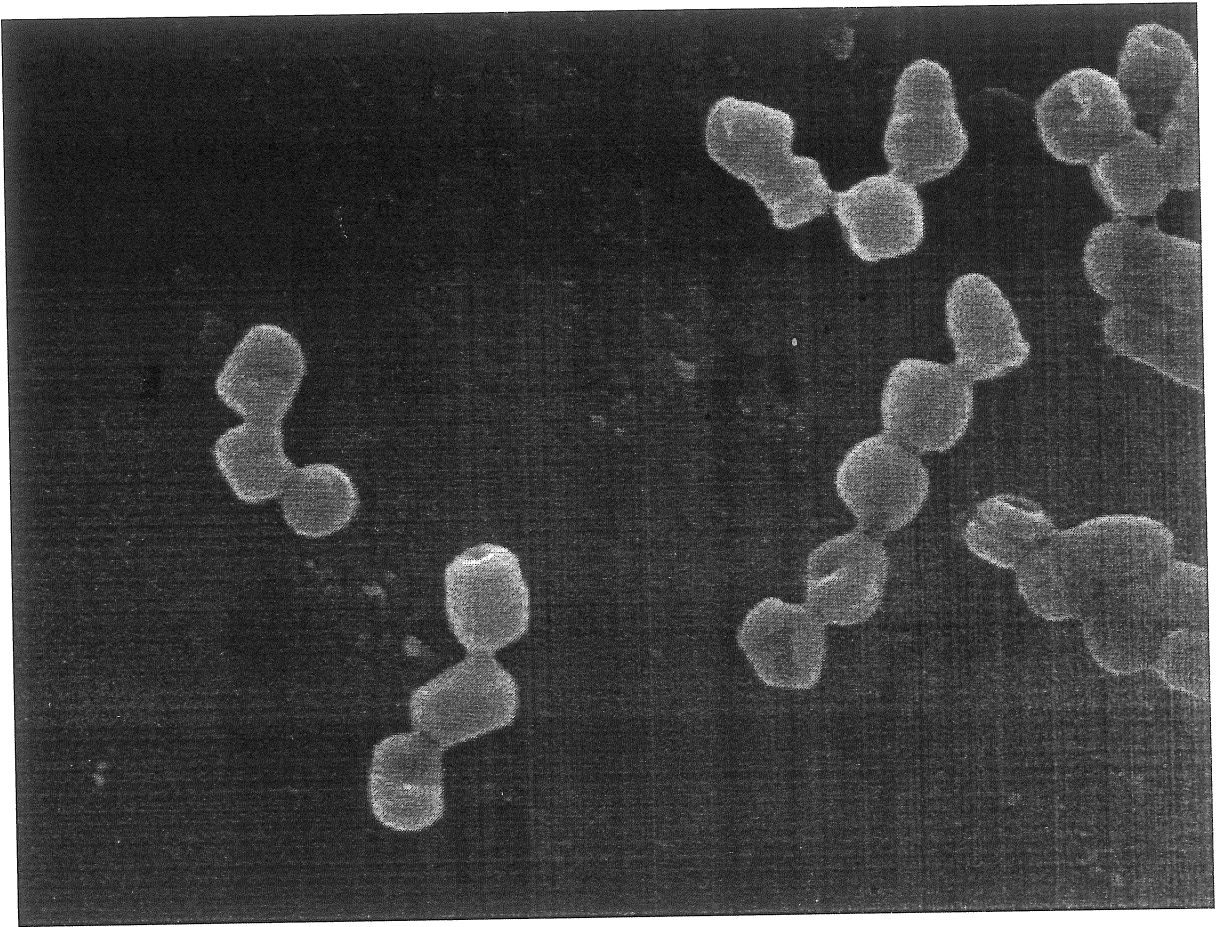


Fig. 2

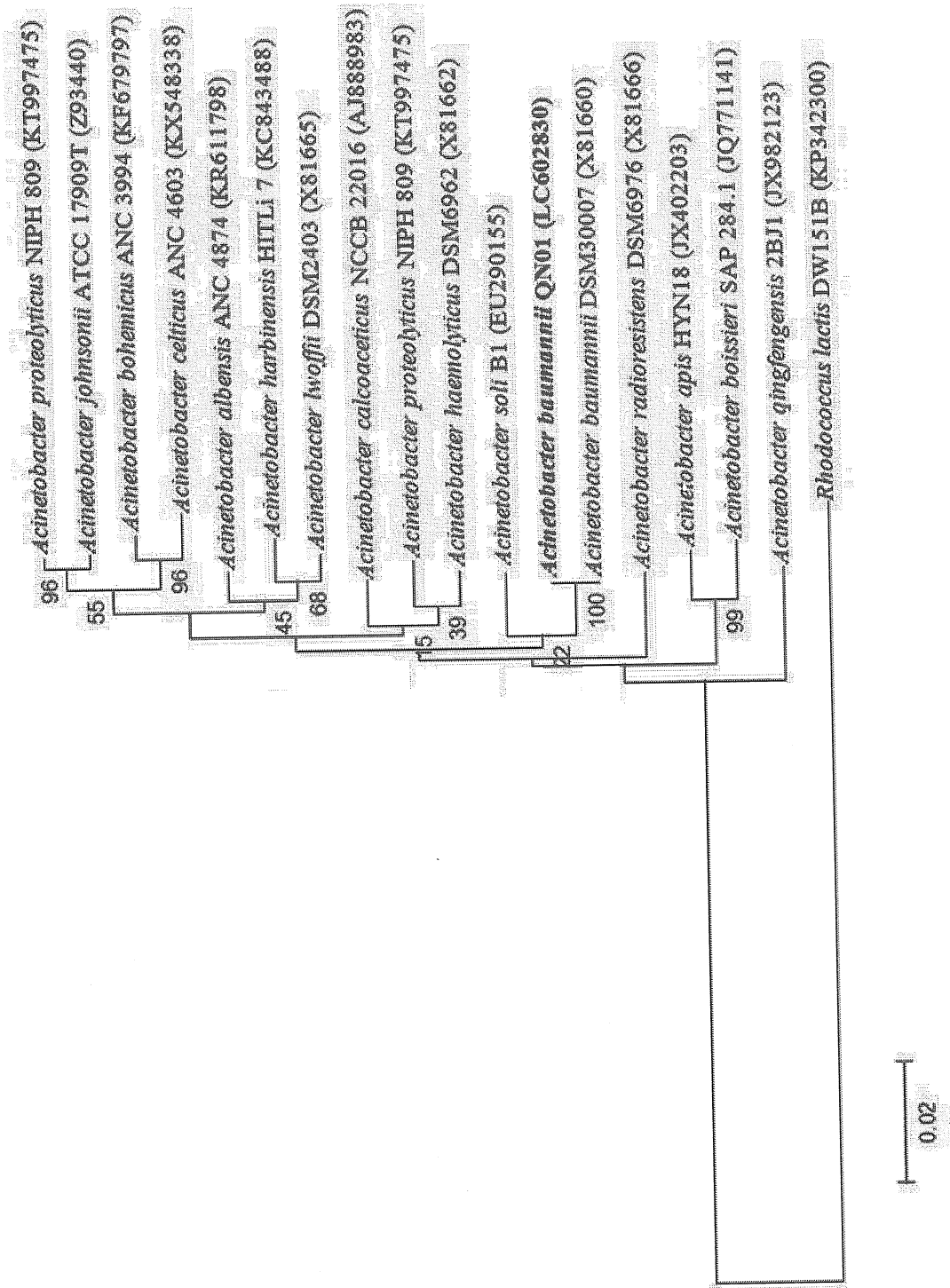


Fig 3.

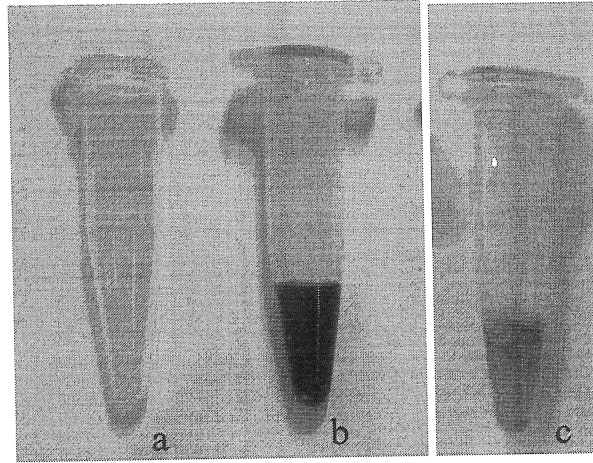


Fig. 4

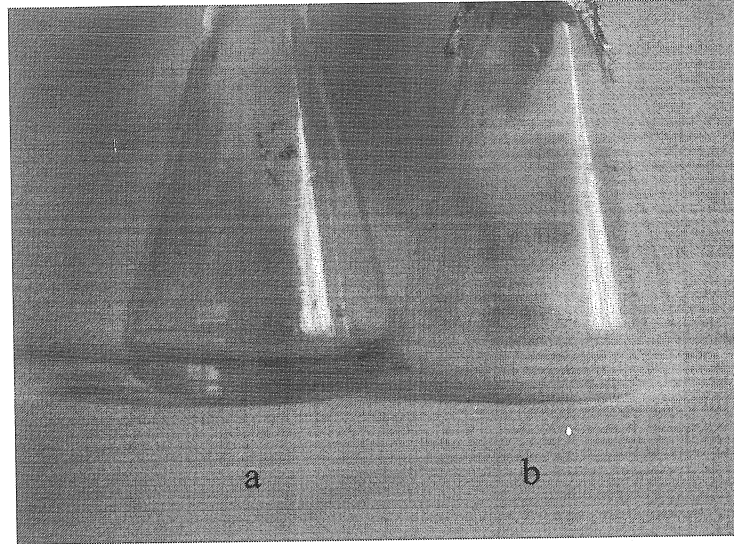


Fig. 5

DANH MỤC TRÌNH TỰ

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

<120> Chủng vi khuẩn *Acinetobacter baumannii* QN01 thuần khiết về mặt sinh học có khả năng tạo màng sinh học và phân hủy dầu diesel, toluen, naphthalen, phenol và pyren có trong dầu mỏ

<160> 1

<210> 1

<211> 1270

<212> ADN

<213> *Acinetobacter baumannii*

<400> 1

```

1  cagattgaac gctggcggca ggcttaacac atgcaagtcg agcgggggaa ggtagcttgc
61  taccggacct agcggcggac gggtagtaaa tgcttaggaa tctgcctatt agtgggggac
121 aacatctcga aagggatgct aataccgcat acgtcctacg ggagaaaagca ggggatcttc
181 ggaccttgcg ctaatagatg agcctaagtc ggattagcta gttggtgggg taaaggccta
241 ccaaggcgac gatctgtagc gggcttgaga ggatgatccg ccacactggg actgagacac
301 ggcccagact cctacgggag gcagcagtcg ggaatattgg acaatggggg gaaccctgat
361 ccagccatgc cgcgtgtgtg aagaaggcct tatggttgta aagcacttta agcagggagg
421 aggctacttt agttaatacc tagagatagt ggacgttact cgcagaataa gcaccggcta
481 actctgtgcc agcagccgcg gtaatacaga ggggtgcgagc gttaatcgga ttactgggc
541 gtaaagcgtg cgtaggcggc ttattaagtc ggatgtgaaa tccccgagct taacttggga
601 attgcattcg atactggtga gctagagtat gggagaggat ggtagaattc caggtgtagc
661 ggtgaaatgc gtagagatct ggaggaatac cgatggcgaa ggcagccatc tggcctaata
721 ctgacgctga ggtacgaaag catggggagc aaacaggatt agataccctg gtagtccatg
781 ccgtaaacga tgtctactag ccgttggggc ctttgaggct ttagtggcgc agctaacgcg
841 ataagtagac cgcctgggga gtacggtcgc aagactaaaa ctcaaataaa ttgacggggg
901 cccgcacaag cgggtggagca tgtggtttta ttgatgcaa cgcgaagaac cttacctggc
961 cttgacatac tagaaacttt ccagagatgg attggtgcct tcgggaatct agatacaggt
1021 gctgcatggc tgtcgtcagc tcgtgtcgtg agatggtggg ttaagtcccc caacgagcgc
1081 aacctttttc cttacttgcc agcatttcgg atgggaactt taaggatact gccagtgaca
1141 aactggagga aggcggggac gacgtcaagt catcatggcc cttacggcca gggctacaca
1201 cgtgctacaa tggtcggtac aaagggttgc tacacagcga tgtgatgcta atctcaaaaa
1261 gccgatcgta gtccggattg gagtctgcaa ctcgactcca tgaagtcgga atcgctagta
1321 atcgcggatc agaatgccgc ggtgaatacg ttcccgggcc ttgtacacac cgcccgtcac
1381 accatgggag tttgttgcac cagaagtagc tagcctaact gcaaagaggg cggttaccac
1441 ggtgtggccg atgactgggg tgaatctcaa

```