



(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)



1-0042198

(51)^{2016.01} C12N 1/00; C02F 3/00

(13) B

(21) 1-2022-03460

(22) 02/06/2022

(45) 25/12/2024 441

(43) 25/11/2022 416

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

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

(54) CHỦNG VI KHUẨN STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA QNG02 THUẦN
KHIẾT VỀ MẶT SINH HỌC CÓ KHẢ NĂNG TẠO MÀNG SINH HỌC TRÊN
THAN SINH HỌC VÀ XỬ LÝ ĐẤT Ô NHIỄM NAPHTALEN, PHENANTREN,
ANTRAXEN VÀ PIREN

(57) Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas maltophilia* QNG02 thuần
khiết về mặt sinh học được phân lập từ mẫu đất ô nhiễm các hidrocarbon thơm có khả
năng tạo màng sinh học. Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến việc nuôi cấy chủng vi khuẩn
này để tạo màng sinh học cao và có khả năng phân hủy một số hidrocarbon đa vòng như
naphtalen, phenantren, antraxen và piren.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas maltophilia* QNG02 có khả năng tạo màng sinh học trên chất mang là than sinh học với hoạt tính cao có nhiều ứng dụng trong xử lý đất ô nhiễm naphtalen, phenantren, antraxen và piren.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Khái niệm về các hidrocarbon thơm đa vòng

Hiđrocacbon thơm đa vòng (PAH - Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) được sử dụng để chỉ một số các chất hữu cơ gồm hai hay nhiều vòng hidrocarbon thơm liên kết với nhau. Có hơn 100 loại các hidrocarbon thơm đa vòng khác nhau trong đó có 17 loại hidrocarbon thơm đa vòng khác và được xác định là có nồng độ cao nhất tại các vị trí nguy hiểm trong Danh sách các quốc gia được ưu tiên (NPL - National Priorities List) do cơ quan bảo vệ môi trường của Mỹ quy định, đó là các hợp chất: naphtalen, acenaphthen, acenaphthilen, fluoren, phenanthren, antraxen, fluoranthen, piren, chrisen, benzo[a]antraxen, benzo[b]fluoranthen, benzo[k]fluoranthen, benzo[a]piren, indeno[1,2,-c,d]piren, benzo[g,h,i]perilen, dibenzo[a,h]antraxen, coronen (Agency for toxic substances and disease registry, 1995).

Thông thường các hidrocarbon thơm đa vòng tồn tại ở dạng hỗn hợp, ít thấy ở dạng đơn lẻ. Tại nhiệt độ thường (từ 15-35°C), Các hidrocarbon thơm đa vòng tinh khiết tồn tại ở thể rắn, không màu hoặc có màu trắng hay màu vàng chanh và có mùi hăng nhẹ. Tùy thuộc vào khối lượng phân tử mà các hidrocarbon thơm đa vòng có những tính chất vật lý, hoá học khác nhau. Nhìn chung chúng có nhiệt độ nóng chảy và nhiệt độ sôi cao, áp suất bay hơi thấp và rất ít tan trong nước nhưng tan tốt trong chất béo. Bên cạnh đó, các hidrocarbon thơm đa vòng là những chất kỵ nước. Khả năng gây ô nhiễm môi trường tùy thuộc khả năng hòa tan của chúng trong môi trường nước. Số lượng vòng benzen trong cấu trúc hóa học của các hidrocarbon thơm đa vòng quyết định khả năng hòa tan của chúng trong nước. Các hidrocarbon thơm đa vòng giảm khả năng hòa tan trong nước (hay tăng tính kỵ nước) khi số lượng vòng benzen tăng (Cerniglia CE, 1992).

Nguồn gốc phát sinh và tình trạng ô nhiễm của các hidrocarbon thơm đa vòng

Các hidrocarbon thơm đa vòng được hình thành trong suốt quá trình đốt cháy không hoàn toàn của than đá, dầu mỏ, gỗ, rác thải hay các hợp chất hữu cơ như thuốc lá và thịt cháy thành than. Chúng cũng là sản phẩm của quá trình đốt cháy không hoàn toàn tại nhiệt độ cao (500-800°C) hay sự hình thành của các hợp chất hữu cơ ở nhiệt độ thấp (100-300°C) (Haritash và Kaushik, 2009).

Một vài hiđrocacbon thơm đa vòng được sử dụng trong dược phẩm và được làm thuốc nhuộm, nhựa và thuốc trừ côn trùng. Một số khác trong nhựa thông được sử dụng để sản xuất nhựa đường. Chúng cũng được tìm thấy trong các nguồn cơ chất như dầu thô, than đá, nhựa đường, dầu hỏa. Chúng cũng được tìm thấy ở mọi nơi trong môi trường trong không khí, nước và đất. Chúng tồn tại trong không khí, tích tụ nhiều trong đất hay trầm tích. Cụ thể, chúng chủ yếu được phát sinh từ: Các động cơ chạy bằng dầu diesel và các loại khí đốt; các môi trường làm việc, các khu dịch vụ, các lò nung sử dụng khí ga và các nhà máy sản xuất và tiêu thụ nhựa đường; các thiết bị đốt nóng, các thiết bị sưởi, các tháp chưng cất và các loại lò đốt, luyện kim; các lò đốt rác: rác thải đô thị, nguy hiểm và rác thải y tế; các sinh hoạt hàng ngày của con người: việc hút thuốc, đun nấu bằng củi và dầu hỏa, đốt nóng các loại dầu khác nhau và nướng thịt; các quá trình công nghiệp: quá trình cracking bẻ gãy các liên kết mạch dài của các chất hữu cơ có trong dầu mỏ, các công đoạn đúc sắt thép và sản xuất nhôm, than chì, v.v... (Haritash và Kaushik, 2009).

Trong môi trường nước, người ta ước tính có khoảng $2,3 \times 10^5$ tấn hiđrocacbon thơm đa vòng xâm nhập vào hệ sinh thái nước mỗi năm. Đặc biệt với hệ sinh thái biển, tình trạng ô nhiễm hiđrocacbon thơm đa vòng thực sự đáng báo động. Nguồn phát sinh hiđrocacbon thơm đa vòng chủ yếu ở đây là từ phế thải của công nghiệp hóa dầu, công nghiệp khai thác và vận chuyển dầu mỏ, nước thải công nghiệp và sinh hoạt v.v... Không chỉ tồn tại trong môi trường nước tự nhiên hiđrocacbon thơm đa vòng còn được tìm thấy trong nhiều mẫu nước uống. Người ta đã tiến hành kiểm tra 1 số lượng nước khoáng nhất định và xác định được 6 loại hiđrocacbon thơm đa vòng có trong đó: flouranthen, benzo[b] flouranthen, benzo[k] fluoranthen, BaP, benzo[g,h,i]perylene và indeno [1,2,3- cd] piren. Trong đó 90% mẫu nước kiểm tra có nồng độ 6 loại hiđrocacbon thơm đa vòng trên từ 0,001-0,01 $\mu\text{g/l}$, 1% mẫu nước có nồng độ trung bình lớn hơn 0,11 $\mu\text{g/l}$ và nồng độ BaP trong đó là khoảng 0,002-0,024 $\mu\text{g/l}$ (Agency for toxic substances and disease registry (1995)).

Nhiều nghiên cứu cũng cho thấy sự có mặt của các hiđrocacbon thơm đa vòng trong các mẫu trầm tích với nồng độ cao. Ở vịnh Boston (Mỹ) nồng độ hiđrocacbon thơm đa vòng lên tới 100.000 ng/g. Hiđrocacbon thơm đa vòng tích lũy nhiều như vậy là do chúng có khả năng hòa tan kém trong nước nên bị hấp phụ với số lượng lớn vào trong các lớp đá trầm tích (Hiroshi và cộng sự, 1998).

Thông qua các kết quả nghiên cứu của các nhà khoa học được tiến hành ở Bắc Mỹ thì trung bình một ngày con người lấy vào 3,12 mg hiđrocacbon thơm đa vòng trong đó 96,2% là từ thực phẩm, 1,6% từ không khí, 0,2% từ nước và 0,4% từ đất. Như vậy sự ô nhiễm hiđrocacbon thơm đa vòng đã trở nên rất phổ biến trong môi trường và cần thiết phải có những biện pháp để hạn chế và ngăn chặn sự phát tán hiđrocacbon thơm đa vòng để bảo vệ con người và các hệ sinh thái xung quanh chúng ta.

Tính độc và ảnh hưởng của các hiđrocacbon thơm đa vòng tới môi trường và sức khỏe con người

Tính độc của hiđrocacbon thơm đa vòng đã được người ta biết đến từ những năm 30 của thế kỷ XX khi Hieger và Cook cùng những cộng sự khác nghiên cứu và thấy tính thể

benzo[a]pyren màu vàng gây khối u ở động vật thí nghiệm. Cũng không giống như hầu hết các hợp chất hữu cơ độc hại bị cấm hoặc bị giới hạn thải, hidrocarbon thơm đa vòng tiếp tục được thải vào môi trường bởi sự hình thành phổ biến trong quá trình đốt các nguyên liệu hóa thạch và việc thải ra trong quá trình tìm kiếm, vận chuyển và sử dụng dầu mỏ. Sự tồn lưu trong một thời gian dài của hidrocarbon thơm đa vòng trong môi trường sẽ dẫn đến việc con người có thể bị nhiễm hidrocarbon thơm đa vòng tại nhà, ngoài đường hay nơi làm việc. Một điều cần lưu ý là hidrocarbon thơm đa vòng thường tồn tại ở dạng hỗn hợp, ít thấy ở dạng đơn lẻ do vậy khi bị nhiễm hidrocarbon thơm đa vòng, con người sẽ bị nhiễm hỗn hợp các hidrocarbon thơm đa vòng, chính điều này càng làm cho độc tính của chúng được tăng cường.

Do độ hoà tan trong nước thấp và độ hoà tan trong dầu cao, khi xâm nhập vào cơ thể người qua những con đường khác nhau, hidrocarbon thơm đa vòng có xu hướng bị tích tụ nhiều hơn ở thận, gan và các mô mỡ của con người. Một lượng nhỏ hidrocarbon thơm đa vòng có thể bị tích tụ ở lá lách, tuyến thượng thận và buồng trứng. Khi bị tích tụ, chúng có thể kết hợp hay phản ứng với một số chất khác trong cơ thể để hình thành nhiều loại hợp chất khác nhau. Một số sản phẩm gây ra những tác hại nghiêm trọng hơn hidrocarbon thơm đa vòng và một số khác thì ít nghiêm trọng hơn đối với sức khoẻ của con người. Tuy nhiên, cũng theo những nghiên cứu này, một số loại hidrocarbon thơm đa vòng thông thường không tồn trữ lâu dài trong cơ thể con người. Thời gian lưu giữ của chúng trong cơ thể người chỉ khoảng vài ngày, sau đó là được thải ra ngoài qua phân và nước tiểu.

Khi bị nhiễm các hợp chất hidrocarbon thơm đa vòng, có nhiều yếu tố được tìm hiểu để xem liệu các tác động gây hại lên sức khỏe của hidrocarbon thơm đa vòng có xảy ra không và mức độ nghiêm trọng của các tác động đó là như thế nào. Các yếu tố đó có thể là: liều lượng, thời gian tiếp xúc, con đường bị nhiễm (ăn, uống, tiếp xúc qua da, v.v...), các hợp chất khác mà người đó đang bị nhiễm, các đặc tính cá nhân của người đó, ví dụ như tuổi, giới tính, kiểu sống, tình trạng sức khỏe.

Các hidrocarbon thơm đa vòng có thể gây ảnh hưởng xấu tới sức khỏe con người dưới một số hoàn cảnh. Khi nghiên cứu động vật trong phòng thí nghiệm, người ta nhận thấy, một vài PAH bao gồm benz[a]anthracen, benzo[a]pyren, benzo[b]fluoranthene, benzo[j]fluoranthene, benzo[k]fluoranthene, chrisen, dibenz[a,h]anthracen, and indeno [1,2,3-c,d]piren, có thể gây ra các khối u khi những động vật đó hít phải những cơ chất đó có ở trong không khí, khi chúng ăn những cơ chất này hay khi chúng tiếp xúc một thời gian dài với những chất đó. Những nghiên cứu trên người đã chỉ ra rằng sự phơi nhiễm của từng hidrocarbon thơm đa vòng đơn lẻ khi con người hít thở hay tiếp xúc qua da trong thời gian dài các hỗn hợp chứa hidrocarbon thơm đa vòng và các hợp chất khác có thể dẫn tới ung thư.

Để phòng tránh sự xâm nhập của hidrocarbon thơm đa vòng, chúng ta cần hạn chế và kiểm soát sự phát sinh của những hợp chất này trong sản xuất và sinh hoạt. Ví dụ như giảm thiểu việc sử dụng những nguồn nguyên, nhiên liệu có thể sản sinh ra hidrocarbon thơm đa vòng trong giao thông và công nghiệp, kiểm soát nghiêm ngặt các quá trình đốt để tránh các quá trình cháy không hoàn toàn của một số lò đốt rác thải, hạn chế hút thuốc và ăn các sản phẩm nướng cháy.

Các biện pháp xử lý

Để xử lý các hợp chất này, các phương pháp vật lý, hóa lý đã được sử dụng và cho kết quả khả quan. Các phương pháp này có ưu điểm là xử lý nhanh, tuy nhiên quá trình xử lý không được triệt để và thường tạo ra các sản phẩm phụ thứ cấp ảnh hưởng tới môi trường xung quanh. Phương pháp phân hủy sinh học sử dụng các chủng vi sinh vật và các chất có hoạt tính sinh học do vi sinh vật sản sinh ra đã được sử dụng ngày càng rộng rãi do hiệu quả, rẻ, thân thiện với môi trường. Đặc biệt khi vi sinh vật có khả năng phân hủy các hidrocarbon thơm đa vòng sinh trưởng trong cấu trúc màng sinh học (biofilm) thì hiệu quả xử lý các hợp chất này trong nước bị ô nhiễm dầu cao hơn khi ở dạng tế bào tự do. Biofilm là một tập hợp các vi sinh vật bám trên một bề mặt của vật thể rắn hoặc bề mặt chất lỏng, tạo thành lớp màng bao phủ bề mặt đó. Khu hệ vi sinh vật trong biofilm có khả năng chống chịu các điều kiện khắc nghiệt của môi trường (sự thay đổi về pH, nhiệt độ, sự thẩm thấu hay sự mất nước của tế bào, v.v...) tốt hơn, hỗ trợ trao đổi chất tốt hơn và hạn chế sự cạnh tranh của các vi sinh vật khác từ đó làm tăng hiệu suất phân hủy các hợp chất ô nhiễm khi xử lý ngoài hiện trường.

Biofilm có thể được hình thành từ một chủng (biofilm đơn chủng) hoặc nhiều chủng vi sinh vật khác nhau (biofilm đa chủng), v.v.... Trong tự nhiên, biofilm thường tồn tại ở dạng đa chủng. Một nghiên cứu của đã chỉ ra rằng, biofilm được tạo thành từ 4 loài vi khuẩn *Microbacterium phyllosphaerae*, *Shewanella japonica*, *Dokdonia donghaensis* và *Acinetobacter lwoffii* có mật độ cao hơn 167% so với biofilm đơn chủng của các chủng đó tương ứng (Burmolle và cộng sự, 2006). Vi khuẩn bám vào bề mặt theo nhiều cách khác nhau. Một số vi khuẩn tự bản thân đã có tính kết dính nhờ lipopolysaccharide ngoại bào cộng với những đặc tính cấu trúc tế bào hỗ trợ cho việc di chuyển đến bề mặt là các phân phụ gốc protein như lông nhung hoặc lông roi. Các vi khuẩn khác chỉ tổng hợp chất kết dính cần thiết khi xuất hiện bề mặt cho chúng bám vào, điển hình như trong vòng 15 phút khi vi khuẩn gây viêm đường hô hấp *P. aeruginosa* gặp một mặt kính, nó sẽ kích hoạt ngay một gen cần để tổng hợp polysaccharide, khi vi khuẩn đã gắn vào bề mặt, chúng phân chia và liên tục sản xuất nhiều polysaccharide để tạo nên 1 biofilm hoàn chỉnh (Barken và cộng sự, 2008). Sự ổn định cũng như cấu trúc của màng sinh học sẽ được tăng lên khi chúng được cố định trên một bề mặt chất rắn (giá thể). Khi sử dụng biofilm thì đặc tính bề mặt giá thể cố định tế bào vi sinh vật là một trong những yếu tố quyết định tới sự hình thành cũng như sự ổn định của biofilm và từ đó tăng hiệu suất xử lý chất ô nhiễm. Các giá thể để vi sinh vật bám dính cần có những tính chất đặc trưng giúp vi sinh vật có thể dễ dàng bám dính như: bề mặt thô ráp, diện tích tiếp xúc lớn, xốp, có khả năng giữ nước và chất dinh dưỡng đảm bảo cho màng sinh học luôn được duy trì và sản xuất liên tục, từ đó làm tăng hiệu quả xử lý. Việc sử dụng các loại giá thể như: zeolit, than hoạt tính, sợi cotton, xơ dừa, nhựa tổng hợp, đĩa quay chất liệu tổng hợp đã được các nhà khoa học nghiên cứu và ứng dụng trong nhiều nguồn nước thải ô nhiễm (Liang và cộng sự, 2009; Meng và cộng sự, 2014).

Việt Nam là một nước nông nghiệp, nguyên liệu sản xuất than sinh học rất phong phú và đa dạng: từ vỏ đậu phụng, bã mía, vỏ dừa, vỏ ca cao cho đến cây tre, lau sậy, phế thải từ khai thác rừng, cùng rất nhiều các chất thải xanh khác. Ngoài ra, than sinh học còn có thể được sản xuất từ vỏ trấu, một phế phẩm gần gũi với người nông dân Việt Nam. Nông dân Việt Nam thường loại bỏ hoặc dùng vỏ trấu để đun nấu nhưng hiệu quả mang lại không đáng kể, nay với công nghệ sản xuất than sinh học, vỏ trấu có thể mang lại giá trị cho người nông dân hiệu quả to lớn. Ở Việt Nam phân bón hoặc các thành phần để sản xuất phân bón phần lớn được nhập khẩu từ nước ngoài, tạo nên áp lực nhập siêu lớn cho đất nước. Bên cạnh đó dân số vẫn còn hơn 70% lao động trong lĩnh vực nông nghiệp. Các phụ phẩm nông nghiệp rất lớn với chi phí thấp. Việc áp dụng công nghệ sản xuất than sinh học ở Việt Nam sẽ giúp giải quyết được nhiều vấn đề mang lại lợi ích vô cùng to lớn, đó là: tận dụng được nguồn nguyên liệu sẵn có, phong phú, rẻ tiền, đáp ứng được nhu cầu trong nước.

Ngoài những ưu điểm khi sử dụng than sinh học làm giá thể để các vi sinh vật tạo màng sinh học bám dính để xử lý các hiđrocacbon thơm kể trên thì việc sử dụng than sinh học còn giải quyết được vấn đề về mùi-một trong những vấn đề đáng lo ngại khi xử lý các hợp chất hữu cơ.

Loài Stenotrophomonas maltophilia và những đặc tính của nó

Trong tự nhiên, loài *S. maltophilia* được xem là có khả năng tạo màng sinh học tốt (Bonaventura và cs, 2004; Zhuo và cs, 2014). Trong nghiên cứu của Zhuo và cộng sự (2014), gen *spgM*, mã hóa cho 2 enzym đa chức năng là phosphoglucosyltransferase (PGM) và phosphomannosyltransferase. Gen này cũng có thể tham gia vào khả năng tạo màng sinh học vì sự tương đồng với gen *algC* – gen chịu trách nhiệm sản xuất PGM được liên kết với (lipopolysaccharide – LPS) và sinh tổng hợp alginate ở loài *Pseudomonas aeruginosa* (McKay và cs, 2003).

Nhiều vi sinh vật đã được phân lập có khả năng phân hủy PAH, nhưng ít có khả năng phân hủy sinh học có cấu trúc hóa học từ bốn vòng thơm trở lên (Bastiaens và cộng sự, 2000). Juhasz và Britz, 2000 đã công bố, chủng *Stenotrophomonas maltophilia* VUN 10,003 có khả năng phân hủy các hiđrocacbon thơm đa vòng trọng lượng phân tử cao như: piren, fluoranthen, benz [a] anthracen, benzo [a] pyren, dibenz [a, h] anthracen và coronen trong môi trường lỏng cơ bản từ 98, 45, 26, 22, 22 và 55% trong thời gian từ 5 đến 42 ngày.

Chủng *Stenotrophomonas maltophilia* (BR-12) được phân lập từ đất bị ô nhiễm dầu thô từ nhà máy lọc dầu Vadodara (Ấn Độ) có khả năng sản xuất chất hoạt động bề mặt sinh học và có tiềm năng về phân hủy sinh học piren trong môi trường tối thiểu được bổ sung piren ở 20, 50 và 100 µg/ml. Phân tích các thông số phát triển của vi sinh vật cho thấy, chủng BR-12 phát triển tốt nhất ở nồng độ piren 50 µg/ml và hiệu suất phân hủy đạt 87% trong 20 ngày và tạo ra lượng chất hoạt động bề mặt sinh học cao (2,2 g/l). Từ đó, các tác giả cho rằng, khả

năng sản xuất chất hoạt động bề mặt của vi khuẩn có thể đóng một vai trò quan trọng trong việc tăng cường khả năng phân hủy piren của nó (Singh, 2015).

Như vậy, có thể thấy rằng loài *S. maltophilia* là một trong số 24 loài của chi *Stenotrophomonas* vừa có khả năng tạo màng sinh học cao và vừa có thể ứng dụng trong xử lý các hidrocarbon vòng thơm, đặc biệt là các hợp chất có cấu trúc hóa học từ bốn vòng. Tuy nhiên, cho tới nay chưa có các công bố về khả năng phân hủy pyren ở dạng tạo màng sinh học của loài *S. maltophilia*.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas maltophilia* QNG02 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ mẫu đất nhiễm naphtalen, phenantren, antraxen và piren, trong đó chủng vi khuẩn này có trình tự gen 16S rARN với kích thước 1385 bp và được đăng ký trên GenBank với mã số LC699795, và có các đặc tính sau:

có khả năng tạo màng sinh học khi được nuôi cấy trong môi trường HKTS, điều kiện nuôi cấy ở pH 6-9, nồng độ muối NaCl 0-40‰, nhiệt độ 25-45°C, nguồn cacbon gồm saccaroza, lactoza, glucoza và mantoza, nguồn nitơ gồm KNO₃, NH₄NO₃, pepton và cao nấm men, giá trị OD ở bước sóng 570 nm cao nhất lên tới **43,5 ± 0,4**;

có khả năng phân hủy 91,29 % naphtalen với nồng độ ban đầu là 250 ppm; phân hủy 100 % phenantren với nồng độ ban đầu là 250 ppm; phân hủy 100 % antraxen với nồng độ ban đầu là 200 ppm; và phân hủy 98,02 % piren với nồng độ ban đầu là 200 ppm.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1. thể hiện hình thái khuẩn lạc của chủng vi khuẩn QNG02.

Fig. 2. thể hiện hình thái tế bào của chủng QNG02 dưới kính hiển vi điện tử quét với độ phóng đại 10.000 lần.

Fig. 3. thể hiện cây phát sinh chủng loài của chủng vi khuẩn QNG02.

Fig. 4. thể hiện khả năng tạo màng sinh học bởi chủng QNG02 (a) và đối chứng môi trường không có vi sinh vật (b).

Fig. 5. thể hiện khả năng sinh trưởng trên nguồn cơ chất piren của chủng QNG02 (a) và đối chứng môi trường không có vi sinh vật (b).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas maltophilia* QNG02 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 *Stenotrophomonas maltophilia* QNG02 được nuôi cấy để tạo màng sinh học. Đồng thời sáng chế cũng đề cập tới khả năng phân hủy naphtalen, phenantren, antraxen và piren của chủng QNG02.

A. Phân lập và định danh chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas maltophilia* QNG02

Mẫu đất nhiễm naphtalen, phenantren, antraxen và piren 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 hỗn hợp các hidrocarbon thơm đa vòng. 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 QNG02. Mô tả chi tiết hình thái khuẩn lạc và tế bào của chủng QNG02 như sau: khuẩn lạc có hình tròn, bề mặt lồi, trơn, bóng, màu vàng nhạt, d = 1-2 mm (Fig 1). Tế bào của chủng có dạng hình que ngắn, bề mặt xù xì, kích thước (0,82-0,9) x (2,87-3,55) µm. Hình thái tế bào thể hiện trên Fig 2.

Tiến hành giải trình tự đoạn gen 16S rARN để định danh chủng *Stenotrophomonas maltophilia* QNG02 với cặp mồi sử dụng bao gồm:

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

Mồi ngược (1527r): 5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-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 QNG02 đã được xác định trình tự có kích thước 1385 nucleotit và có mức độ tương đồng 99,93% với trình tự tương ứng của chủng *Stenotrophomonas maltophilia* H9-3 (mã số GU170361). Trình tự đoạn gen của chủng QNG02 đã được đăng ký trên Genbank với mã số LC699795. Mối quan hệ phát sinh chủng loài của chủng QNG02 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 QNG02 thuộc loài *Stenotrophomonas maltophilia* và được đặt tên là *Stenotrophomonas maltophilia* QNG02.

Tên chủng “QNG02”, trong phạm vi bản mô tả này, vẫn được sử dụng để chỉ chủng *Stenotrophomonas maltophilia* QNG02 vừa được định tên trên đây.

Chủng *Stenotrophomonas maltophilia* QNG02 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 31.

B. Phân tích khả năng tạo màng sinh học của chủng *Stenotrophomonas maltophilia* QNG02

Chủng QNG02 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 QNG02 được nuôi cấy trên môi trường HKTS có thành phần gồm (g/l): NH_4NO_3 2; KH_2PO_4 4; NaCl 5; KCl 0,25; MgCl_2 1,25; glucoza 1; peptone 5; cao men 0,2; cao thịt 3, 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 QNG02.

Khả năng tạo màng của chủng QNG02 được xác định như sau: nuôi cấy chủng QNG02 trên môi trường HKTS, 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 HKTS. 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 axit axetic 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 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 QNG02 theo sáng chế.

Để khảo sát pH thích hợp cho sự tạo màng sinh học của chủng QNG02 chúng tôi đã tiến hành nuôi cấy tĩnh trong môi trường HKTS với 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 QNG02, kết quả được trình bày trên Bảng 1.

Bảng 1: Ảnh hưởng của pH đến khả năng tạo màng của chủng QNG02 (OD570nm)

pH	Thời gian theo dõi (giờ)		
	24	48	72
4	3,44±0,13	5,12 ±0,19	2,56±0,15
5	11,35±0,16	12,85±0,17	7,98±0,15

6	12,58±0,13	17,03±0,19	11,95±0,12
7	19,27±0,21	22,85±0,15	19,38±0,20
8	13,40±0,15	14,02±0,14	10,33±0,12
9	8,23±0,11	11,89±0,12	9,35±0,10

Kết quả từ Bảng 1 cho thấy: chủng QNG02 có khả năng tạo màng tốt từ pH 6-9 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 QNG02 để tạo màng xử lý ô nhiễm dầu trong điều kiện pH từ 6 đến 9 mà không phải điều chỉnh 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 QNG02. 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 QNG02 ở các nhiệt độ khác nhau (OD570nm)

Nhiệt độ (°C)	Thời gian theo dõi (giờ)		
	24	48	72
25	15,25±0,17	17,15±0,19	13,72±0,12
30	15,75±0,16	18,63±0,15	16,47±0,17
37	14,25±0,15	17,53±0,15	16,02±0,15
40	11,77±0,18	13,85±0,14	11,78±0,13
45	7,75±0,12	9,85±0,12	8,42±0,11
50	3,83±0,12	3,97±0,14	2,08±0,16

Từ kết quả trên Bảng 2 cho thấy chủng QNG02 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 QNG02 có khả năng tạo màng tốt ở các dải nhiệt độ khá rộng. Như vậy, chủng QNG02 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 QNG02 cao hơn rất nhiều so với chủng đối chứng dương là chủng *Acinetobacter calcoaceticus* P23 - chỉ đạt 9,1±0,20 (Yamada và cộng sự, 2010).

Chủng QNG02 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 QNG02 (OD570 nm)

Nồng độ muối (‰)	Thời gian theo dõi (giờ)		
	24	48	72
0	17,13±0,12	21,70±0,16	27,65 ±0,21
5	17,85±0,03	21,30±0,20	28,2±0,12
10	18,23±0,07	22,25±0,23	29,10±0,24

15	18,21±0,12	28,16±0,21	28,01±0,14
20	19,01±0,21	28,26±0,32	27,23±0,21
25	18,07±0,23	27,9± 0,13	27,5±0,15
30	15,32±0,17	22,98±0,41	18,73±0,17
35	14,36±0,10	16,73±0,23	16,54±0,10
40	10,39±0,11	12,97±0,15	11,43±0,14

Kết quả ở Bảng 3 cho thấy, chủng QNG02 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 QNG02 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 QNG02 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 QNG02 (OD570 nm)

Nguồn cacbon	Thời gian theo dõi (giờ)		
	24	48	72
Saccaroza	27,53±0,24	34,30±0,25	32,45±0,29
Lactoza	27,07±0,26	35,62±0,21	32,43±0,22
Glucoza	24,97±0,26	32,45±0,23	27,48±0,24
Mantoza	28,20±0,24	35,67±0,30	34,78±0,29

Kết quả trên Bảng 4 cho thấy, chủng QNG02 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 QNG02 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 QNG02. 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 QNG02 (OD570 nm)

Nitơ	Thời gian theo dõi (giờ)		
	24	48	72
KNO ₃	25,50±0,24	38,43±0,35	30,45±0,34
NH ₄ NO ₃	19,80±0,22	28,13±0,30	30,78±0,32
Pepton	34,77±0,14	43,50±0,40	37,78±0,38
Cao men	31,52±0,28	40,30±0,40	30,42±0,32

Kết quả trên Bảng 5 cho thấy, với nguồn nitơ là pepton thì chủng QNG02 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 KNO_3 và NH_4NO_3 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 QNG02 nhằm ứng dụng trong xử lý ô nhiễm dầu ở các địa điểm khác nhau.

C. Phân tích khả năng phân hủy naphtalen, phenantren, antraxen và piren có trong đất ô nhiễm của chủng *Stenotrophomonas maltophilia* QNG02 trên chất mang là than sinh học

Chủng *Stenotrophomonas maltophilia* QNG02 trước tiên được nhân giống cấp 1 và cấp 2, và cuối cùng được tạo màng trên than sinh học. Lên men cấp 1: chủng QNG02 tươi sau khi được nhân từ những khuẩn lạc riêng rẽ qua đêm được cấy chuyển sang bình tam giác thủy tinh 10 ml riêng rẽ chứa 9 ml môi trường HKTS với tỷ lệ dịch chủng giống tươi: môi trường là 1:9 (ml/ml) – nghĩa là cho 1 ml dịch chủng giống tươi vào 9 ml môi trường. Bình được lắc 180 vòng/phút ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 28 đến 30°C trong thời gian 18 giờ. Lên men cấp 2: dịch nuôi cấy chủng QNG02 sau khi lên men cấp 1 được cấy truyền sang các bình tam giác thủy tinh 500 ml chứa 90 ml môi trường HKTS với tỷ lệ dịch lên men cấp 1: môi trường là 1:9 (ml/ml) - nghĩa là cho 10 ml dịch lên men cấp 1 vào 90 ml môi trường. Bình được lắc 180 vòng/phút ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 28 đến 30°C trong thời gian 18 giờ.

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

Trong bước thu sản phẩm phối trộn bằng cách phối trộn dịch vi khuẩn gốc, môi trường HKTS và than sinh học theo tỷ lệ tương ứng 1:10:15 (thể tích/thể tích/trọng lượng), sau khi trộn đều, thu được sản phẩm phối trộn.

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

Hỗn hợp được phối trộn trong điều kiện nhiệt độ từ 28 đến 30°C, đảo trộn theo chu kỳ 6 giờ, thời gian lên men trong 48 giờ, thu được chế phẩm xử lý đất nhiễm các hidrocarbon thơm có độ ẩm 40-45 %. Chủng QNG02 sau khi phối trộn với than sinh học được trộn vào đất ô nhiễm hidrocarbon thơm đa vòng.

1. Phân tích khả năng phân hủy naphtalen

Đối với nguồn naphthalen, để đánh giá khả năng phân hủy naphthalen bởi chủng *Stenotrophomonas maltophilia* QNG02 có khả năng tạo màng sinh học với nồng độ mẫu ban đầu 150, 200 và 250 ppm.

Lượng giống ban đầu được cấp vào môi trường là 10 % (mật độ tế bào trong 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 *Stenotrophomonas maltophilia* QNG02 có khả năng sinh trưởng khá tốt trên dải nồng độ naphthalen từ 150 – 250 ppm. Để đánh giá chính xác về khả năng phân hủy naphthalen của màng sinh học chủng *Stenotrophomonas maltophilia* QNG02, chúng tôi lựa chọn nồng độ 250 ppm để phân tích khả năng phân hủy naphthalen. Kết quả cho thấy sau 7 ngày nuôi cấy, màng sinh học do chủng *Stenotrophomonas maltophilia* QNG02 tạo thành đã có khả năng xử lý là 91,29 %.

2. Phân tích khả năng phân hủy phenantren

Đối với nguồn phenantren, để đánh giá khả năng phân hủy phenantren bởi chủng *Stenotrophomonas maltophilia* QNG02 có khả năng tạo màng sinh học với nồng độ mẫu ban đầu 150, 200 và 250 ppm.

Lượng giống ban đầu được cấp vào môi trường là 10 % (mật độ tế bào trong 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 *Stenotrophomonas maltophilia* QNG02 có khả năng sinh trưởng khá tốt trên dải nồng độ phenantren từ 150 – 250 ppm. Để đánh giá chính xác về khả năng phân hủy phenantren của màng sinh học chủng *Stenotrophomonas maltophilia* QNG02, chúng tôi lựa chọn nồng độ 200 ppm để phân tích khả năng phân hủy phenantren. Kết quả cho thấy sau 7 ngày nuôi cấy, màng sinh học do chủng *Stenotrophomonas maltophilia* QNG02 tạo thành đã có khả năng xử lý là 100 %.

3. Phân tích khả năng phân hủy antraxen

Đối với nguồn naphthalen, để đánh giá khả năng phân hủy antraxen bởi chủng *Stenotrophomonas maltophilia* QNG02 có khả năng tạo màng sinh học với nồng độ mẫu ban đầu 150, 200 và 250 ppm.

Lượng giống ban đầu được cấp vào môi trường là 10 % (mật độ tế bào trong 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 *Stenotrophomonas maltophilia* QNG02 có khả năng sinh trưởng khá tốt trên dải nồng độ antraxen từ 150 – 250 ppm. Để đánh giá chính xác về khả năng phân hủy antraxen của màng sinh học chủng *Stenotrophomonas maltophilia* QNG02, chúng tôi lựa chọn nồng độ 200 ppm để phân tích khả năng phân hủy antraxen. Kết quả cho thấy sau 7 ngày nuôi cấy, màng sinh học do chủng *Stenotrophomonas maltophilia* QNG02 tạo thành đã có khả năng xử lý là 100 %.

4. Phân tích khả năng phân hủy piren

Đối với nguồn piren, để đánh giá khả năng phân hủy piren bởi màng sinh học chủng *Stenotrophomonas maltophilia* QNG02, chúng tôi tiến hành thí nghiệm trên môi trường khoáng Gost cải tiến, với nồng độ piren ban đầu 150, 200 và 250 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 *Stenotrophomonas maltophilia* QNG02 có khả năng sinh trưởng khá tốt trên dải nồng độ piren từ 150 – 250 ppm. Tuy nhiên, ở nồng độ càng cao thì sinh trưởng càng giảm và đến nồng độ 250 ppm chủng này sinh trưởng kém hơn. Để đánh giá chính xác về khả năng phân hủy piren của màng sinh học chủng *Stenotrophomonas maltophilia* QNG02, chúng tôi lựa chọn nồng độ 200 ppm để phân tích khả năng phân hủy piren. Kết quả cho thấy sau 7 ngày nuôi cấy, màng sinh học do chủng *Stenotrophomonas maltophilia* QNG02 tạo thành đã có khả năng xử lý là 98,02 %.

Bảng 6. Khả năng sinh trưởng của chủng QNG02 trên một số hợp chất vòng thơm khác nhau

Nồng độ (ppm)	Khả năng sinh trưởng của chủng QNG02 (OD_{600})			
	Naphtalen	Phenantren	Antraxen	Piren
150	1,67	1,81	1,78	1,54
200	1,65	1,69	1,70	1,49
250	1,60	1,58	1,53	1,40

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Phân lập và định danh chủng vi khuẩn QNG02

Mẫu đất nhiễm naphtalen, phenantren, antraxen và piren 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 naphtalen, phenantren, antraxen và piren. Các khuẩn lạc được tách và làm sạch, thu được chủng vi khuẩn QNG02 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 QNG02 bằng cách xác định trình tự đoạn gen 16S rARN với cặp mồi 27F/1527R ARN tổng số của chủng vi khuẩn QNG02 được thu như sau:

- Nuôi cấy thu sinh khối vi khuẩn trong môi trường HKTS dịch 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 μl 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 DNA; viii) rửa rửa bằng 500 µl ethanol 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
DNA 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 QNG02 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 QNG02.

Trình tự gen 16S rARN của chủng QNG02 có kích thước 1385 nucleotit và được đăng ký trên GenBank với mã số truy cập LC699795.

Trình tự gen của chủng QNG02 có mức độ tương đồng 99,93 % (số nucleotit so sánh là 1385) với trình tự tương ứng của các chủng *Stenotrophomonas maltophilia* H9-3 (mã số GU17361), và tương đồng xa hơn (96,55 %) so với chủng *Stenotrophomonas acidaminiphila* (AF273080). Mối quan hệ phát sinh chủng loài của chủng QNG02 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 QNG02 thuộc loài chủng *Stenotrophomonas maltophilia* và được đặt tên là chủng *Stenotrophomonas maltophilia* QNG02.

Chủng *Stenotrophomonas maltophilia* QNG02 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 31.

Ví dụ 2. Tác động của pH lên khả năng tạo màng của chủng QNG02

Khả năng tạo màng của chủng vi khuẩn QNG02 trên môi trường HKTS (có thành phần gồm (g/l): NH_4NO_3 2; KH_2PO_4 4; NaCl 5; KCl 0,25; MgCl_2 1,25; glucoza 1; peptone 5; cao men 0,2; cao thịt 3) có pH được thay đổi giá trị từ 4 đến 9 đã được khảo sát. Sau 3 ngày nuôi cấy, QNG02 tạo màng sinh học trong môi trường có pH khác nhau. Chủng vi khuẩn này có hoạt tính tạo màng cao ở pH 5 đến pH 9. Ở các pH 4 khả năng tạo màng của chủng QNG02 rất thấp chỉ đạt khoảng $5,12 \pm 0,19$ 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, pH 5 đến pH 9 phù hợp cho khả năng tạo màng cao ở chủng QNG02.

Ví dụ 3. Tác động của nhiệt độ lên khả năng tạo màng của chủng QNG02

Dải nhiệt độ 25 – 50 °C đã được sử dụng để đánh giá ảnh hưởng của chúng lên khả năng tạo màng bởi chủng QNG02 trong 3 ngày nuôi cấy.

Kết quả được thể hiện trên Bảng 2.

Kết quả cho thấy, chủng QNG02 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 QNG02 có khả năng tạo màng tốt ở các dải nhiệt độ khá rộng. Còn ở 50°C, khả năng tạo màng của chủng này gần như không có sau 3 ngày nuôi cấy, giá trị OD thấp chỉ đạt $3,97 \pm 0,14$. Như vậy, chủng QNG02 có thể ứng dụng để tạo màng xử lý ô nhiễm các hợp chất hiđrocacbon thơm 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 QNG02

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 QNG02.

Kết quả được thể hiện ở Bảng 3.

Kết quả cho thấy, chủng QNG02 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 QNG02

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 QNG02.

Kết quả được thể hiện ở Bảng 4.

Kết quả trên Bảng 4 cho thấy, chủng QNG02 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 QNG02 tạo màng sinh học và dùng màng này để xử lý ô nhiễm các hợp chất hiđrocacbon thơm.

Ví dụ 6. Tác động của nguồn nitơ lên khả năng tạo màng sinh học của chủng QNG02

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 QNG02.

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 QNG02 đều tạo màng sinh học rất tốt, đặc biệt là trên nguồn pepton.

Ví dụ 7. Khả năng xử lý naphtalen của chủng QNG02

Naphtalen ở các dải nồng độ khác nhau từ 150 – 250 ppm đã được sử dụng để đánh giá khả năng sinh trưởng và phân hủy của màng sinh học chủng QNG02 sau khi được cố định trên than sinh học trong 7 ngày. Kết quả được thể hiện ở Bảng 6.

Kết quả thu được cho thấy chủng *Stenotrophomonas maltophilia* QNG02 có khả năng sinh trưởng khá tốt trên dải nồng độ naphtalen từ 150 – 250 ppm. Tuy nhiên, ở nồng độ càng cao thì sinh trưởng càng giảm và đến nồng độ 250 ppm chủng này sinh trưởng kém hơn. Nồng độ 250 ppm được lựa chọn để phân tích khả năng phân hủy naphtalen của màng sinh học trên than sinh học bởi chủng QNG02. Kết quả cho thấy sau 7 ngày nuôi cấy, màng sinh học trên than sinh học do chủng *Stenotrophomonas maltophilia* QNG02 tạo thành đã có khả năng xử lý là 91,29 %.

Ví dụ 8. Khả năng phân hủy phenantren của chủng QNG02

Phenantren ở các dải nồng độ khác nhau từ 150 – 250 ppm đã được sử dụng để đánh giá khả năng sinh trưởng và phân hủy của màng sinh học chủng QNG02 sau khi được cố định trên than sinh học trong 7 ngày. Kết quả được thể hiện ở Bảng 6.

Kết quả thu được cho thấy chủng *Stenotrophomonas maltophilia* QNG02 có khả năng sinh trưởng khá tốt trên dải nồng độ phenantren từ 150 – 250 ppm. Để đánh giá chính xác về khả năng phân hủy phenantren của màng sinh học trên than sinh học bởi chủng QNG02 chủng *Stenotrophomonas maltophilia* QNG02, chúng tôi lựa chọn nồng độ 200 ppm để phân tích khả năng phân hủy phenantren. Kết quả cho thấy sau 7 ngày nuôi cấy, màng sinh học trên than

sinh học do chủng *Stenotrophomonas maltophilia* QNG02 tạo thành đã có khả năng xử lý là 100 %.

Ví dụ 9. Khả năng phân hủy antraxen của chủng QNG02

Antraxen ở các dải nồng độ khác nhau từ 150 - 250 ppm đã được sử dụng để đánh giá khả năng sinh trưởng và phân hủy của màng sinh học chủng QNG02 trong 7 ngày. Kết quả được thể hiện ở Bảng 6.

Kết quả thu được cho thấy chủng *Stenotrophomonas maltophilia* QNG02 có khả năng sinh trưởng khá tốt trên dải nồng độ antraxen từ 150 – 250 ppm. Để đánh giá chính xác về khả năng phân hủy antraxen của màng sinh học trên than sinh học chủng *Stenotrophomonas maltophilia* QNG02, chúng tôi lựa chọn nồng độ 200 ppm để phân tích khả năng phân hủy antraxen. Kết quả cho thấy sau 7 ngày nuôi cấy, màng sinh học do chủng *Stenotrophomonas maltophilia* QNG02 tạo thành đã có khả năng xử lý là 100 %.

Ví dụ 10. Khả năng phân hủy piren của chủng QNG02

Piren ở các dải nồng độ khác nhau từ 150 – 250 ppm đã được sử dụng để đánh giá khả năng sinh trưởng và phân hủy của màng sinh học chủng QNG02 trong 7 ngày. Kết quả được thể hiện ở Bảng 6.

Kết quả thu được cho thấy chủng *Stenotrophomonas maltophilia* QNG02 có khả năng sinh trưởng khá tốt trên dải nồng độ piren từ 150 – 250 ppm. Để đánh giá chính xác về khả năng phân hủy piren của màng sinh học trên than sinh học chủng *Stenotrophomonas maltophilia* QNG02, chúng tôi lựa chọn nồng độ 200 ppm để phân tích khả năng phân hủy piren. Kết quả cho thấy sau 7 ngày nuôi cấy, màng sinh học do chủng *Stenotrophomonas maltophilia* QNG02 tạo thành đã có khả năng xử lý là 98,02 %.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas maltophilia* QNG02 có khả năng tạo màng sinh học cao phân lập từ đất ô các hợp chất hiđrocacbon thơm đa vòng 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 pH 6-9, nồng độ muối NaCl 0-40‰, nhiệt độ 25-45°C, nguồn cacbon gồm saccaroza, lactoza, glucoza và mantoza, nguồn nitơ gồm KNO₃, NH₄NO₃, pepton và cao men. Như vậy, chủng QNG02 có thể ứng dụng để tạo màng xử lý ô nhiễm các hợp chất hiđrocacbon thơm đa vòng 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 91,29 % naphtalen với nồng độ ban đầu là 250 ppm; phân hủy 100 % phenantren với nồng độ ban đầu là 200 ppm; phân hủy 100 % antraxen với nồng độ ban đầu là 200 ppm; và phân hủy 98,02 % piren với nồng độ ban đầu là 200 ppm. Kết quả cho thấy chủng QNG02 này có khả năng xử lý một số hiđrocacbon thơm đa vòng hiệu quả. Việc sử dụng chủng *Stenotrophomonas maltophilia* QNG02 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 *Stenotrophomonas maltophilia* QNG02 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ mẫu đất nhiễm các hidrocarbon thơm đa vòng, trong đó chủng vi khuẩn này có trình tự gen 16S rARN với kích thước 1385 bp và được đăng ký trên GenBank với mã số LC699795, và có các đặc tính sau:

có khả năng tạo màng sinh học khi được nuôi cấy trong môi trường HKTS, điều kiện nuôi cấy ở 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, NH₄NO₃, pepton và cao men, giá trị OD ở bước sóng 570 nm cao nhất lên tới 43,5±0,4;

có khả năng phân hủy 91,29 % naphtalen với nồng độ ban đầu là 250 ppm; phân hủy 100 % phenantren với nồng độ ban đầu là 200 ppm; phân hủy 100 % antraxen với nồng độ ban đầu là 200 ppm; và phân hủy 98,02 % piren với nồng độ ban đầu là 200 ppm.

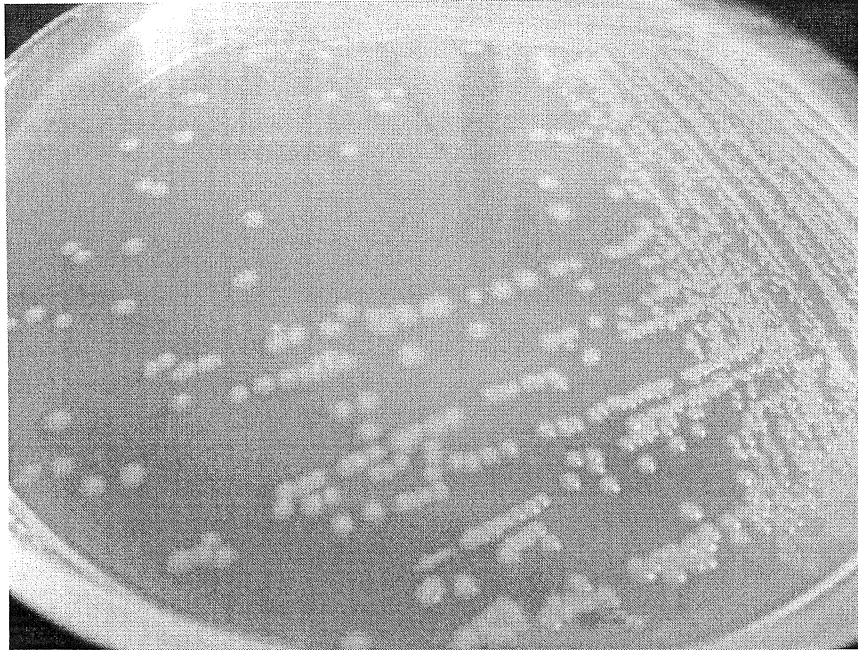


Fig. 1

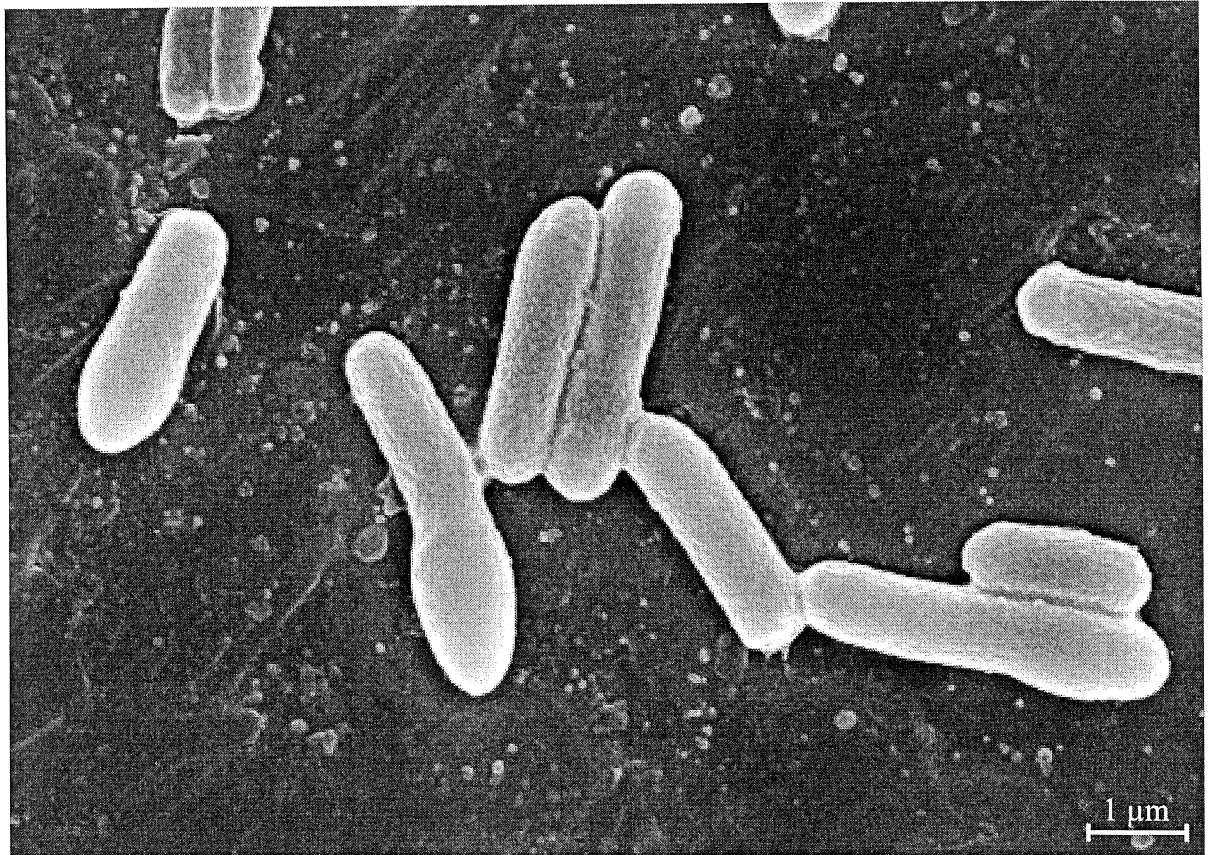


Fig. 2

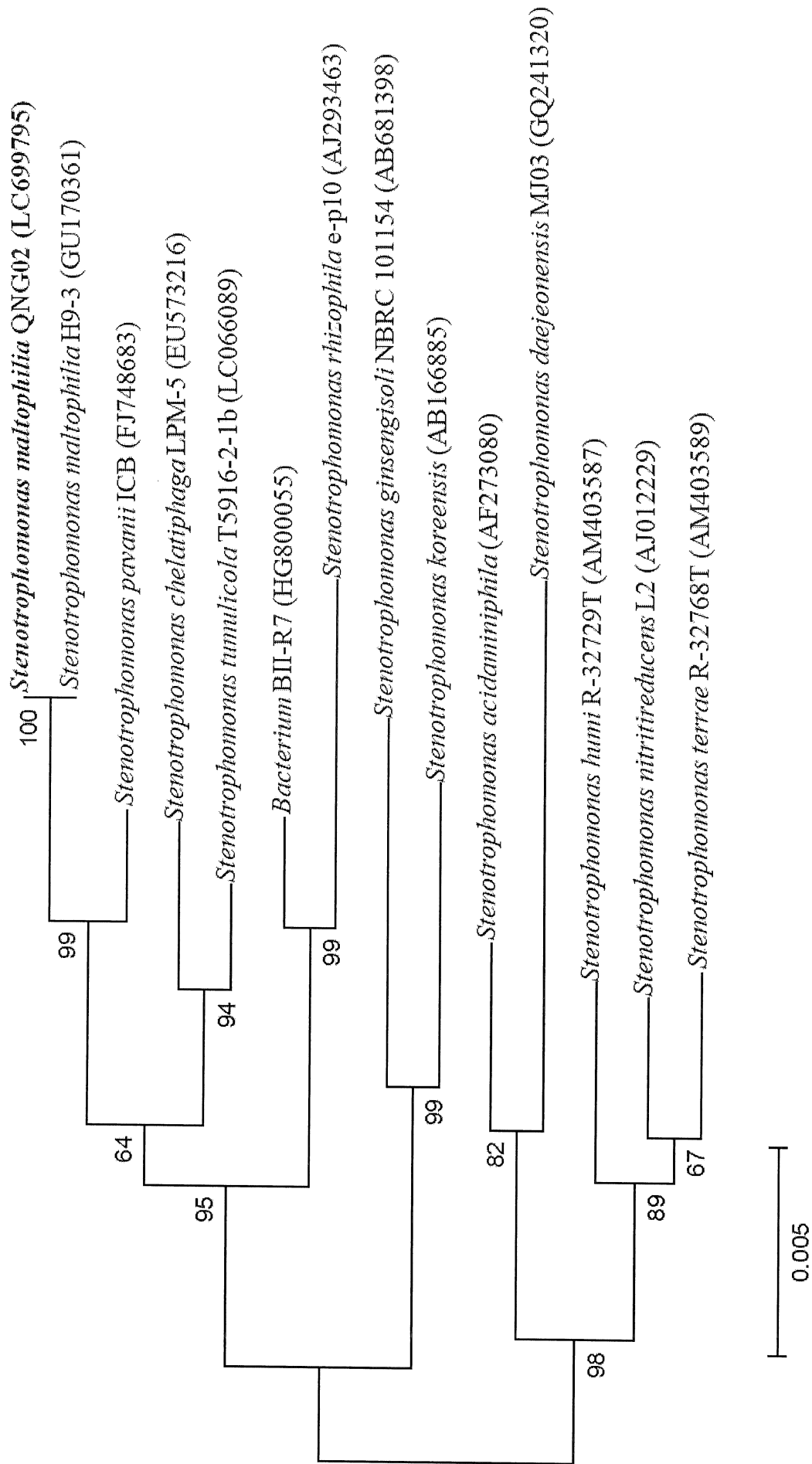


Fig 3.



Fig. 4

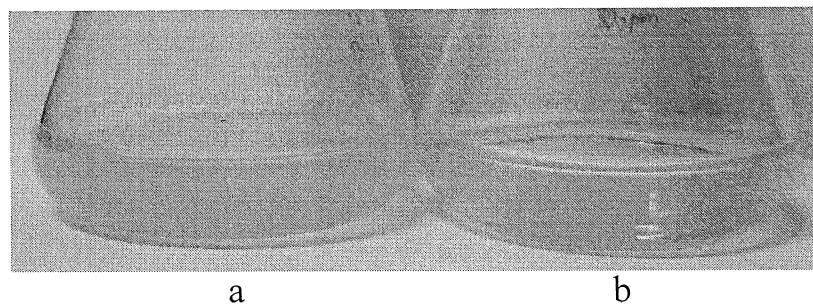


Fig. 5

DANH MỤC TRÌNH TỰ

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

<120> Chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas maltophilia* QNG02 thuần khiết về mặt sinh học có khả năng tạo màng sinh học, phân hủy pyren có trong đất ô nhiễm các hidrocarbon thơm

<160> 1

<210> 1

<211> 1385

<212> ADN

<213> *Stenotrophomonas maltophilia*

<400> 1

```

1 atgcagtcga acggcagcac aggagagctt gctctctggg tggcgagtgg cggacgggtg
   61 aggaatacat cggaatctac tctgtcgtgg gggataacgt agggaaactt acgctaatac
  121 cgcatacgac ctacgggtga aagcagggga ccttcgggcc ttgcgcgatt gaatgagccg
  181 atgtcggatt agctagttgg cggggtaaag gccaccaag gcgacgatcc gtagctggtc
  241 tgagaggatg atcagccaca ctggaactga gacacggtcc agactcctac gggaggcagc
  301 agtggggaat attggacaat gggcgcaagc ctgatccagc cataccgctg gggatgaaga
  361 ggccttcggg ttgtaaagcc cttttgttgg gaaagaaatc cagctggcta ataccgggtt
  421 gggatgacgg tacccaaaga ataagcaccg gctaacttcg tgccagcagc cgcggtaata
  481 cgaaggggtg aagcgttact cggaattact gggcgtaaag cgtgcgtagg tggtcgttta
  541 agtccgttgt gaaagccctg ggctcaacct gggaactgca gtggatactg gatgactaga
  601 atgtggtaga gggtagcgga attcctgggtg tagcagtga atgcgtagag atcaggagga
  661 acatccatgg cgaaggcagc tacctggacc aacattgaca ctgaggcacg aaagcgtggg
  721 gagcaaacag gattagatac cctggtagtc cagccctaa acgatgcgaa ctggatgttg
  781 ggtgcaattt ggcacgcagt atcgaagcta acgcgttaag ttcgccgcct ggggagtacg
  841 gtcgcaagac tgaaactcaa aggaattgac gggggcccgc acaagcgggtg gagtatgttg
  901 ttttaattcg tgcaacgcga agaaccctac ctggccttga catgtcgaga actttccaga
  961 gatggattgg tgcccttcggg aactcgaaca cagggtgctgc atggctgtcg tcagctcgtg
1021 tcgtgagatg ttgggttaag tcccgcacag agcgcaaccc ttgtccttag ttgccagcac
1081 gtaatgggtg gaactctaag gagaccgccg gtgacaaacc ggaggaaggt ggggatgacg
1141 tcaagtcatc atgggccctt acggccaggg ctacacacgt actacaatgg tagggacaga
1201 gggctgcaag ccggcgacgg taagccaatc ccagaaaccc tatctcagtc cggattggag
1261 tctgcaactc gactccatga agtcggaatc gctagtaatc gcagatcagc attgctgcgg
1321 tgaatacgtt cccgggcctt gtacacaccg cccgtcacac catgggagtt tgttgcacca
1381 gaagc

```

//