



(12) **BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ**

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

(11) 
1-0020127

(51)⁷ **A61K 35/741**

(13) **B**

(21) 1-2016-04987

(22) 20.12.2016

(45) 25.12.2018 369

(43) 27.02.2017 347

(73) **VIỆN VI SINH VẬT VÀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC, ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI (VN)**

Nhà E2, 144 Xuân Thủy, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) **Đinh Thúy Hằng (VN), Nguyễn Thị Hải (VN)**

(54) **CHỦNG VI KHUẨN DESULFOVIBRIO OXAMICUS S4 THUẦN KHIẾT VỀ MẶT SINH HỌC DÙNG ĐỂ XỬ LÝ NƯỚC THẢI AXIT TỪ MỎ QUẶNG**

(57) Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn *Desulfovibrio oxamicus* S4 thuần khiết về mặt sinh học có khả năng sinh trưởng được ở độ pH = 5, sử dụng SO_4^{2-} và NO_3^- làm chất nhận điện tử để sinh trưởng. Chủng vi khuẩn theo sáng chế khả năng sinh trưởng tốt ở độ pH = 5, chịu được môi trường có nồng độ các ion kim loại cao như Fe^{2+} tới 500 mg/L, Zn^{2+} tới 120 mg/L, Cu^{2+} tới 50 mg/L. Ngoài sulfat (SO_4^{2-}), chủng S4 theo sáng chế còn sử dụng nitrat (NO_3^-) làm chất nhận điện tử cuối cùng để oxy hóa các hợp chất hữu cơ, tích lũy năng lượng cho quá trình sinh trưởng. Với những đặc điểm sinh lý này, chủng S4 thích hợp cho việc ứng dụng trong xử lý AMD có độ pH thấp và nồng độ các kim loại nặng cao.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực vi sinh vật ứng dụng trong xử lý và bảo vệ môi trường, cụ thể là sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn *Desulfovibrio oxamicus* S4 thuần khiết về mặt sinh học, chịu được độ pH thấp và chịu nồng độ kim loại nặng cao, hữu ích để sử dụng trong xử lý nước thải axit mỏ.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Dòng thải axit mỏ (Acid Mine Drainage - AMD) được hình thành khi các khoáng sulfua (như pyrit, FeS_2) trong quặng tiếp xúc với oxy và nước (Brown *et al.*, 2002). Sự oxy hóa các khoáng này sinh ra axit và thường đi kèm với nồng độ cao các kim loại được hòa tan (đặc biệt là sắt) và sulfat, do vậy AMD thường có độ pH rất thấp (2 -- 3) và màu vàng của ion sắt bị oxy hóa (Watzlaf *et al.*, 2003).

Là một trong các mối đe dọa lớn nhất của hoạt động khai thác khoáng sản tới môi trường, AMD có ảnh hưởng lâu dài đối với các nguồn nước sông, suối, cũng như cuộc sống của các sinh vật (động, thực vật và con người) liên quan đến những nguồn nước này. Đối với cuộc sống ở nước, AMD có thể ngay lập tức giết chết các động thực vật thủy sinh hoặc gây ảnh hưởng tới sinh trưởng, tập tính sinh hoạt, khả năng sinh sản của chúng và thay đổi toàn bộ cân bằng sinh thái (Farag *et al.*, 2003).

AMD còn gây ảnh hưởng ô nhiễm nghiêm trọng tới môi trường đất thông qua việc tích lũy các kim loại nặng như Cu, Cd, Fe, Pb, và Zn trong lớp đất bề mặt tạo ra môi trường không thuận lợi cho hệ sinh thái tại đây, theo đó các lớp đất này bị phá hủy đáng kể, dễ bị xói mòn bởi mưa lũ vì thiếu gắn kết nhờ hệ thực vật (Rodriguez *et al.*, 2009; Boularbah *et al.*, 2006). Hậu quả tiếp theo là các vùng đất ô nhiễm này trở thành nguồn ô nhiễm nguy hiểm do các dòng chảy bề mặt và dòng chảy ngầm ở vị trí hạ lưu (Vega *et al.*, 2006).

Ba yếu tố then chốt trong thành phần của AMD gây ảnh hưởng tới môi trường cần phải được xử lý trong các quy trình công nghệ gồm có độ pH thấp, hàm lượng kim loại nặng cao và hàm lượng sulfat cao. Các yếu tố ô nhiễm này có thể được loại bỏ một cách hiệu quả khi có mặt vi khuẩn khử sulfat trong môi trường cùng với các điều kiện sinh trưởng phù hợp được thiết lập.

Vi khuẩn khử sulfat (sulfate reducing bacteria - SRB) là các vi khuẩn sinh trưởng kỵ khí, sử dụng sulfat làm chất nhận điện tử cuối cùng để oxy hóa hydro hay các hợp chất hữu cơ đơn giản và tận thu năng lượng cho mục đích sinh trưởng:



Các sản phẩm trao đổi chất của SRB (H_2S và HCO_3^-) có tác dụng trong việc xử lý AMD, trong đó sulfua hòa tan sẽ tạo phản ứng kết tủa với nhiều ion kim loại trong AMD ($\text{H}_2\text{S} + \text{Me}^{2+} \rightarrow \text{MeS} + 2\text{H}^+$) (Bảng 1), các ion bicarbonat thì làm tăng pH và tính kiềm của nước thải. Ngoài ra, khi độ pH trong môi trường tăng (nhờ các sản phẩm trao đổi chất từ quá trình khử sulfat), nhiều kim loại còn bị tủa ở dạng hydroxit (Gadd, 2004).

Bảng 1. Phản ứng của kim loại trong môi trường có sulfua

Nhóm kim loại	Hiện tượng phản ứng	TLTK
Cd, Cu, Fe, Pb, Mer, Ni, Zn	Tủa ở dạng sulfua	(Doshi, 2006)
As, Ath, Mo	Tạo thành các phức hợp với sulfua	(Figueroa, 2005)
Mn, As	Đồng kết tủa với các muối sulfua kim loại khác	(Figueroa, 2005)
U (VI), As (V)	Có thể bị khử thành U(IV), As(III) ít tan trong nước (nhờ SRB)	(Spear <i>et al.</i> , 2000)

Để tạo điều kiện cho quá trình khử sulfat chiếm ưu thế so với quá trình oxy hóa bằng các chất nhận điện tử khác như oxy, nitrat, Mn^{4+} hay Fe^{3+} , thế oxy hóa khử của hệ thống xử lý AMD cần duy trì ở mức ≤ -200 mV (ở mức oxy hóa khử này quá trình khử Fe^{3+} thành Fe^{2+} cũng có thể diễn ra, tuy nhiên Fe^{2+} sau đó phản ứng với S^{2-} và kết tủa ở dạng sulfua) (Cabrera *et al.*, 2006).

SRB phân bố rộng rãi trong môi trường tự nhiên có chứa sulfat, chúng được phân lập hoặc được tìm thấy dựa trên các chỉ thị phân tử từ trầm tích biển (Webster *et al.*, 2006; Musmann *et al.*, 2005), suối nước nóng hay nham thạch núi lửa (Stadnitskaia *et al.*, 2005; Jeanthon *et al.*, 2002), trong nước thải khai mỏ axit pH2 (Sen, 2001), v.v.. Mặc dù số lượng các loài SRB được phân lập từ môi trường biển rất phong phú do sulfat ở đây là chất nhận điện tử quan trọng thứ hai sau oxy, nhiều đại diện SRB cũng được tìm thấy ở môi trường nước ngọt như trầm tích các thủy vực (Sass *et al.*, 1998),

trong rễ của thực vật (Bahr *et al.*, 2005), đặc biệt trong tầng bùn đáy của các hệ thống xử lý nước thải kỵ khí (Dar *et al.*, 2007; Ben-Dov *et al.*, 2007).

Dựa trên phân tích so sánh trình tự 16S rADN và đặc tính sinh lý sinh hóa, SRB được xếp vào 3 nhóm (Rabus *et al.*, 2000):

SRB ưa ấm Gram âm: gồm hầu hết các loài SRB được biết đến hiện nay, xếp vào 23 chi nằm trong phân lớp δ -*Proteobacteria*, thường gặp nhất là *Desulfovibrio*, *Desulfobacter*, *Desulfobacterium*, *Desulfococcus*...

SRB Gram dương sinh bào tử: chỉ gồm một chi *Desulfotomaculum*, sinh trưởng ở nhiệt độ ấm, nhưng có thể chịu được nhiệt độ cao nhờ tạo bào tử.

SRB ưa nhiệt: gồm các loài vi khuẩn và cổ khuẩn, sinh trưởng tối ưu ở 65 – 70°C (vi khuẩn) hay trên 80°C (cổ khuẩn), thường được tìm thấy ở các suối nước nóng hay miệng núi lửa ở biển.

Hầu hết SRB có nhu cầu dinh dưỡng đơn giản, nguồn cacbon và điện tử thích hợp đối với SRB bao gồm sản phẩm của các quá trình lên men kỵ khí như hydro, các axit hữu cơ mạch ngắn (axetat, lactat, pyruvat) và rượu (Rabus *et al.*, 2000). Một số SRB có thể sinh trưởng tự dưỡng với H_2 là chất cho điện tử và CO_2 là nguồn cacbon duy nhất. Phụ thuộc vào cách oxy hóa chất hữu cơ mà SRB có thể được phân chia thành hai nhóm trao đổi chất như sau (Rabus *et al.*, 2000):

Nhóm oxy hóa không hoàn toàn: oxy hóa các hợp chất hữu cơ đến axetat. Thuộc nhóm này chủ yếu là các loài thuộc chi *Desulfovibrio* spp.

Nhóm oxy hóa hoàn toàn: Oxy hóa các hợp chất hữu cơ (bao gồm cả acetate) hoàn toàn thành CO_2 . Trong nhóm này có đa dạng các loài SRB khác nhau, như *Desulfobacter* spp., *Desulfobacterium* spp., *Desulfosarcina* spp.

SRB thực hiện trao đổi chất oxy hóa các cơ chất hữu cơ sử dụng sulfat làm chất nhận điện tử cuối cùng (Rabus *et al.*, 2000). Sự khử sulfat thành sulfua tiêu thụ 8 điện tử và các quá trình sinh hóa thông qua nhiều bước trung gian với sự tham gia của nhiều enzym (Kremer, Hansen, 1988). Các bước phản ứng có thể được tóm tắt như sau: $SO_4^{2-} \rightarrow SO_3^{2-} \rightarrow HSO_3^- \rightarrow HS^- \rightarrow S^{2-}$.

Ngoài sulfat, SRB còn có khả năng sử dụng một số hợp chất ở mức oxy hóa cao khác làm chất nhận điện tử trong quá trình tích lũy năng lượng, ví dụ như nitrat (NO_3^-), sắt (Fe^{3+}), hay thậm chí cả oxy như một số loài thuộc chi *Desulfovibrio* (Muyzer, Stams, 2008). Bên cạnh đó phải kể đến một số chất đặc biệt khác có thể làm chất nhận điện tử cho SRB như acrylat, arsenat, chromat hay uranium, các hợp chất chứa clo, theo đó mà SRB có vai trò quan trọng trong các quá trình phân hủy sinh học, loại bỏ chất độc ô nhiễm trong môi trường (Muyzer, Stams, 2008).

SRB có thể sinh trưởng trong dải độ pH rộng (5,5 – 9,0), tuy nhiên tốt nhất ở điều kiện kiềm nhẹ với độ pH trong khoảng 7,0 – 7,8. Nhiệt độ sinh trưởng tối ưu nằm trong khoảng 28 – 38°C đối với SRB ưa ấm (Rabus *et al.* 2000). Dải muối từ 1 – 4% NaCl thích hợp đối với sự sinh trưởng của hầu hết SRB (Ollivier *et al.*, 1994). Tuy nhiên, quá trình khử sulfat do vi khuẩn còn được quan sát ở các môi trường khắc nghiệt có nhiệt độ, độ pH hay độ mặn đặc biệt (Zeikus *et al.*, 1983; Rabus *et al.* 2000).

Sulfua có tính độc cao đối với tế bào sinh vật, gây phá hủy các protein và bất hoạt tế bào. Phần lớn vi sinh vật chỉ có khả năng hoạt động ở môi trường không có sulfua hoặc sulfua ở nồng độ thấp. Đối với SRB, sự kết tủa các kim loại nguyên tố vết ở dạng sulfua kim loại là cần thiết để giảm nồng độ sulfua trong môi trường, tạo điều kiện cho sự sinh trưởng (Bharathi *et al.*, 1990). Ngoài ra, các polyme ngoại bào ở SRB có tác dụng bảo vệ tế bào khỏi sự ảnh hưởng của chất độc ở mức độ nhất định (Teitzel, Parsek, 2003). Trạng thái của sulfua phụ thuộc vào độ pH của môi trường. Tại độ pH = 7, sulfua tồn tại ở cả dạng H_2S và S^{2-} , nhưng chủ yếu là ở dạng H_2S và chỉ có dạng này mới thẩm thấu qua màng tế bào và gây ức chế sinh trưởng (Perry, Green, 1984).

Công nghệ xử lý AMD sử dụng SRB là phương pháp thụ động dựa trên những quá trình chuyển hóa sinh học vào mục đích loại bỏ chất ô nhiễm. Ưu thế của công nghệ là chi phí thấp, tự vận hành, có thể triển khai ở những vùng xa, sử dụng những vật liệu thải hoặc tái chế. Xét về tổng thể công nghệ được đánh giá là có hiệu quả xử lý và hiệu quả kinh tế cao (Doshi, 2006). Sơ đồ quy trình công nghệ được biểu diễn như sau: AMD có độ pH = 2 – 3, hàm lượng kim loại nặng cao và SO_4^{2-} cao trong bể thu gom, AMD sau đó được chuyển sang bể đá dăm để xử lý hóa học để tăng độ pH của AMD tới 4,5 – 5, sau đó chuyển sang bể khử sulfat mà trong đó khử SO_4^{2-} thành S^{2-} ,

kết tủa kim loại và tăng độ pH tới 6 – 7 và sau đó chuyển sang bể lọc cát để lọc chất rắn lơ lửng và ổn định nước thải trước khi dẫn dòng nước thải ra.

Là quy trình công nghệ dựa trên hoạt động của vi sinh vật, quá trình xử lý AMD bị chi phối bởi các yếu tố ảnh hưởng đến tính chất sinh lý, sinh hóa của SRB, cụ thể là:

Nguồn SRB: Trong xử lý AMD, để có nguồn SRB người ta có thể sử dụng phân bò, bùn cống hay bùn cặn từ các hệ thống xử lý nước thải yếm khí và các nguồn khác. Tuy nhiên việc chủ động nguồn SRB có đặc tính sinh học phù hợp với điều kiện có trong hệ thống xử lý là một trong các yếu tố dẫn đến thành công của công nghệ. Theo nhiều nghiên cứu, SRB có khả năng chịu độ pH thấp và nồng độ kim loại nặng cao khi được bổ sung vào hệ thống xử lý AMD có khả năng tăng hiệu quả xử lý (Higgins *et al.*, 2003; Johnson, Hallberg, 2005; Cabera *et al.*, 2006).

Nguồn cơ chất: SRB sử dụng các chất hữu cơ đơn giản như axit hữu cơ, rượu và H_2 làm chất cho điện tử để khử sulfat (Logan *et al.*, 2005). Trong xử lý AMD, cacbon đơn giản đôi khi được bổ sung vào hệ thống xử lý cho SRB phát triển, thông dụng nhất là methanol và ethanol (Tsukamoto *et al.*, 2004). Trong trường hợp chất hữu cơ cao phân tử (như chất thải giàu tinh bột, cellulosa) được sử dụng thì trước hết bị phân hủy bởi vi khuẩn dị dưỡng thành các hợp chất cacbon đơn giản, sau đó làm cơ chất cho SRB (Logan *et al.*, 2005). Thông thường, bể khử sulfat được nhồi giá thể như gỗ (dầm bào) và đá sỏi để ổn định hệ vi khuẩn kỵ khí tại đây (Tsukamoto *et al.*, 2004).

Độ pH: SRB ưa axit hoặc có tính chống chịu cao đối với môi trường axit có lợi thế trong xử lý AMD. Thông thường SRB sinh trưởng tốt nhất ở pH trung tính và bị ức chế tại pH thấp của AMD (Jong, Parry, 2006). Trong hệ thống xử lý AMD, pH ban đầu thường được điều chỉnh lên mức ~ 5 qua bể đá dăm ở bước đầu tiên để phù hợp hơn với hệ SRB (có khả năng chịu pH thấp) ở bước xử lý tiếp theo trong bể khử sulfat sinh học.

Thành phần hóa học của AMD: AMD với nồng độ kim loại quá cao khó xử lý hơn do ức chế sinh trưởng của vi khuẩn nói chung (Cabera *et al.*, 2006). Mặc dù có khả năng chịu được nồng độ kim loại trong môi trường cao hơn so với nhiều loài vi sinh vật khác, SRB cũng bị ức chế tại các giới hạn nhất định, như ở nồng độ Cu, Cd, Ni: 20 mg/L; Zn: 25 mg/L; Cr: 60 mg/L; Pb: 75 mg/L (Hao *et al.*, 1994; Cabera *et al.*, 2006).

Nhiệt độ: SRB sinh trưởng ở nhiệt độ thấp nhất là 6°C (Tsukamoto *et al.*, 2004). Ở những nơi có nhiệt độ thấp, việc bổ sung SRB chịu lạnh có thể cải thiện đáng kể tình trạng hoạt động của hệ thống xử lý (Higgins *et al.*, 2003). Thông thường công nghệ xử lý AMD bằng bể khử sulfat sinh học có thể hoạt động ổn định trong khoảng nhiệt độ môi trường nước từ 10 – 30°C là nhiệt độ phổ biến trong năm ở Việt Nam.

Điều kiện địa chất Việt Nam phức tạp tạo nên một nguồn tài nguyên khoáng sản phong phú, đa dạng nhưng cũng manh mún. Theo thống kê, trên lãnh thổ Việt Nam đã phát hiện được trên 50 trong số 66 loại khoáng sản phổ biến nhất trong vỏ trái đất với khoảng hơn 5.000 mỏ và điểm quặng (Hồ Sỹ Giao, Mai Thế Toàn, 2010). Các khoáng sản được khai thác chủ yếu là than, quặng sắt, titan, đồng, apatit, pyrit.

Hiện nay, nước thải AMD mới được quan tâm xử lý tại một số khu mỏ khai thác tập trung thuộc tập đoàn Than và Khoáng sản Vinacomin sử dụng biện pháp hóa học nhờ các hóa chất kiềm (như CaCO_3 , Ca(OH)_2 , Na_2CO_3 , NaOH). Mặc dù có ưu điểm là thời gian xử lý nhanh, biện pháp hóa học có một số yếu điểm là có giá thành cao và gây ô nhiễm thứ cấp do lượng bùn kết tủa tạo ra thường rất lớn (Doshi, 2006; Nguyễn Danh Sơn, 2011).

Xử lý AMD bằng biện pháp khử sulfat sinh học có tính hiệu quả, thân thiện với môi trường, tuy nhiên ở Việt Nam mới chỉ có một số nhóm nghiên cứu quan tâm. Các nhà khoa học tại Viện Công nghệ sinh học (VAST) đã chứng minh việc sử dụng tổ hợp SRB làm giàu trực tiếp từ môi trường xử lý kết hợp với hiệu chỉnh các yếu tố dinh dưỡng (nguồn cacbon, tỷ lệ COD/SO_4^{2-}) và các yếu tố lý hóa (độ pH, độ kiềm) đã có thể loại bỏ các ion kim loại trong nước thải (Fe, Cr, Al, Pb) ở mức > 90% (Kiều Thị Quỳnh Hoa và cs., 2013). Bước đầu nghiên cứu ứng dụng SRB để xử lý AMD từ nhà máy chế biến thiếc ở Tuyên Quang do Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học (ĐHQGHN) phối hợp với Vinacomin thực hiện cho thấy công nghệ có thể triển khai tốt ở quy mô pilot, sau thời gian lưu là 3 ngày thì nước thải AMD đã đạt tiêu chuẩn xả thải theo QCVN 40:2011 về độ pH và các mức giới hạn đối với kim loại nặng (Báo cáo kỹ thuật trình Tập đoàn công nghiệp than & khoáng sản Việt nam tháng 10 năm 2014). Các nghiên cứu đều chỉ ra rằng nguồn SRB thích hợp cho vận hành công nghệ xử lý nếu được bổ sung một cách chủ động sẽ giúp ổn định và tăng hiệu quả xử lý đáng kể.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất chủng vi khuẩn dùng để xử lý thuốc thải từ mỏ nhằm triển khai ứng dụng công nghệ xử lý AMD nhờ vi khuẩn khử sulfat một cách chủ động và hiệu quả, nguồn SRB có hoạt tính khử sulfat cao. Chủng vi khuẩn theo sáng chế có khả năng thích ứng với điều kiện khắc nghiệt của môi trường xử lý là độ pH thấp và hàm lượng kim loại nặng cao. Cụ thể là sáng chế này đề xuất chủng *Desulfovibrio oxamicus* S4 thuần khiết về mặt sinh học có trình tự 16S rADN nêu trong SEQ ID NO.1 được đăng ký tại ngân hàng gen DDBJ với số hiệu LC186051. Chủng vi khuẩn này sinh trưởng được ở độ pH = 5, sử dụng SO_4^{2-} và NO_3^- làm chất nhận điện tử để sinh trưởng, và chịu được nồng độ kim loại nặng, trong đó nồng độ Fe lên tới 500 mg/L, Zn lên tới 120 mg/L và Cu lên tới 50 mg/L.

Chủng vi khuẩn *Desulfovibrio oxamicus* S4 thuần khiết về mặt sinh học theo sáng chế được lưu giữ tại Bảo tàng giống chuẩn Vi sinh vật Việt Nam (VTCC) với mã số lưu giữ VTCC-B-2180.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là hình ảnh thể hiện quá trình làm giàu và phân lập chủng *D. oxamicus* S4 thuần khiết về mặt sinh học: 1A – bình làm giàu, 1B - ống thạch bán lỏng được đặt ở tư thế đảo đầu.

Hình 2 là hình ảnh thể hiện hình thái khuẩn lạc (A) và tế bào của chủng *D. oxamicus* S4 thuần khiết về mặt sinh học dưới kính hiển vi phản pha (B) và kính hiển vi điện tử quét (C, D).

Hình 3 là hình ảnh điện di sản phẩm PCR của đoạn 16S rADN (A) và sản phẩm PCR của đoạn gen *dsrB* (B) từ chủng *D. oxamicus* S4 thuần khiết về mặt sinh học.

Hình 4 là hình ảnh cây phân loại dựa trên trình tự gần đủ của 16S rADN của chủng *D. oxamicus* S4 thuần khiết về mặt sinh học so với các loài gần gũi trên ngân hàng dữ liệu GenBank.

Hình 5 là biểu đồ thể hiện sinh trưởng của chủng *D. oxamicus* S4 thuần khiết về mặt sinh học trong môi trường chứa Na-lactat là chất cho điện tử và sulfat (SO_4^{2-}) là chất nhận điện tử duy nhất ở các giá trị pH khác nhau.

Hình 6 là biểu đồ thể hiện khả năng khử sulfat của chủng *D. oxamicus* S4 thuần khiết về mặt sinh học trong môi trường lactat/sulfat có bổ sung các kim loại nặng ở nồng độ khác nhau.

Hình 7 là biểu đồ thể hiện đường cong sinh trưởng của chủng *D. oxamicus* S4 trong môi trường chứa Na-lactat là chất cho điện tử, nitrat (NO_3^-) hoặc sulfat (SO_4^{2-}) là chất nhận điện tử duy nhất ở độ pH = 5.

Hình 8 là hình ảnh chủng *D. oxamicus* S4 thuần khiết về mặt sinh học được bảo quản trong các ống mao quản thủy tinh ($\phi = 1 \text{ mm}$) đảm bảo điều kiện kỵ khí hoàn toàn. A – ống mao quản thủy tinh đựng dịch huyền phù tế bào chứa 25% glycerol; B – kiểm tra đầu mao quản sau khi được hàn kín.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập tới chủng vi khuẩn *Desulfovibrio oxamicus* S4 thuần khiết về mặt sinh học có trình tự 16S rADN nêu trong SEQ ID NO.1 được đăng ký tại ngân hàng gen DDBJ với số hiệu LC186051 và được lưu giữ tại Bảo tàng giống chuẩn Vi sinh vật Việt Nam (VTCC) với mã số lưu giữ VTCC-B-2180. Chủng vi khuẩn này sinh trưởng được ở độ pH = 5, sử dụng SO_4^{2-} và NO_3^- làm chất nhận điện tử để sinh trưởng, và chịu được nồng độ kim loại nặng, trong đó nồng độ $\text{Fe} \leq 500 \text{ mg/L}$, $\text{Zn} \leq 120 \text{ mg/L}$, $\text{Cu} \leq 50 \text{ mg/L}$.

Chủng vi khuẩn theo sáng chế được phân lập từ bùn thải quặng wolfram ở Tuyên Quang, Việt Nam. Chủng vi khuẩn hữu ích trong việc khởi động và ổn định hoạt động của bể khử sulfat sinh học trong các hệ thống xử lý AMD.

Mẫu bùn được lấy từ tầng đáy và nước 10 – 20 cm trên bề mặt bùn trong hồ chứa bùn thải mỏ quặng wolfram ở Tuyên Quang. Vi khuẩn khử sulfat (SRB) được làm giàu từ mẫu bùn trong môi trường khoáng dịch thể chứa sulfat (28 mM) làm chất nhận điện tử duy nhất và Na-Lactat (10 mM) là chất cho điện tử (Bảng 2). Độ pH môi trường trong thí nghiệm làm giàu là 5, nhiệt độ nuôi cấy là 30°C .

Bảng 2 - Môi trường phân lập và nuôi cấy vi khuẩn khử sulfat (Widdel, Bak, 1992)

Môi trường		Dung dịch vi lượng		Hỗn hợp vitamin	
Thành phần	Hàm lượng	Thành phần	Hàm lượng	Thành phần	Hàm lượng
Nước cất	1 lít	HCl 25%	13 ml	Đệm $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$	25 mM pH 7,1, 100 ml
Na_2SO_4	4 g	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	200 mg	Axit 4-aminobenzoic	4 mg
NaCl	1 g	H_3BO_3	30 mg	D(+)- Biotin	1 mg
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,4 g	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	100 mg	Axit nicotinic	10 mg
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,15 g	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	190 mg	Calcium-D(+)-	5 mg

				Pantothenat	
KCl	0,5 g	NiCl ₂ .6H ₂ O	24 mg	Pyridoxin 2 HCl	15 mg
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25 g	CuCl ₂ .2H ₂ O	2 mg	Axit lipoic	1,5 mg
NH ₄ Cl	0,25 g	ZnSO ₄ .7H ₂ O	144 mg	Axit folic	4 mg
KH ₂ PO ₄	0,2 g	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	36 mg	Na-2- mercapto-ethan sulfonat	25 mg
Khử trùng môi trường ở 121°C, 20 phút lấy ra ở 80°C, sục khí N ₂ trong 5 phút, làm nguội, sau đó bổ sung các chất sau: - Hỗn hợp vitamin (1 ml/L). - Dung dịch vi lượng (1 ml/L). - NaHCO ₃ 1M đã đuổi oxy bằng CO ₂ (30 ml/L). - Na-lactat 1M (10 ml/L)		Nước cất	Dẫn tới 1000 ml	Khử trùng qua màng lọc 0,2 µm, giữ trong tối tại 4°C.	
		Khử trùng ở 121°C, 20 phút. Giữ trong tối tại 4°C.			

Sự sinh trưởng của SRB trong các mẫu làm giàu được nhận biết sau 5 – 7 ngày nuôi thông qua xác định mật độ tế bào và lượng sulfua được tạo thành. Cây truyền dịch làm giàu được thực hiện sau mỗi 5 – 7 ngày khi dịch nuôi có mật độ tế bào cao (quan sát dưới kính hiển vi, độ phóng đại 400×) và tạo nhiều sulfua.

Chủng vi khuẩn *Desulfovibrio oxamicus* S4 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ dịch làm giàu SRB với bùn thải AMD ở lần cấy truyền thứ ba bằng phương pháp ống thạch bán lỏng kỵ khí (Hình 1), sau đó nuôi trên môi trường dịch thể chứa lactat và sulfat là nguồn cho và nhận điện tử tương ứng.

Chủng vi khuẩn *Desulfovibrio oxamicus* S4 thuần khiết về mặt sinh học sau đó được nghiên cứu chi tiết về các đặc điểm hình thái (khuẩn lạc, tế bào) (Hình 2), khả năng sinh trưởng ở độ pH thấp (Hình 5), khả năng chịu nồng độ kim loại nặng cao (Hình 6), khả năng sử dụng các chất nhận điện tử khác ngoài SO₄²⁻ như NO₃⁻, Fe³⁺ (Hình 7) trên cơ sở đó đánh giá tiềm năng ứng dụng trong việc xử lý AMD. Gen mã hóa cho 16S rARN và đoạn gen *dsrB* mã hóa cho tiểu phần β của enzym dissimilatory sulphite reductaza đã được khuếch đại (Hình 3), giải trình tự và so sánh với các trình tự liên quan trên GenBank. Dữ liệu so sánh được sử dụng để dựng cây phân loại bằng phần mềm ClustalX 1.8 và thuật toán neighbour-joining (Hình 4) (Saitou, Neil, 1987).

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Phân lập chủng *Desulfovibrio oxamicus* S4 từ môi trường nước thải chế biến khoáng sản

A. Thu và xử lý mẫu

Mẫu bùn và nước thải từ khu vực khai thác wolfram (Tuyên Quang) được thu trong bình Scott kín khí và đưa về phòng thí nghiệm để làm giàu và phân lập.

B. Làm giàu và phân lập

Làm giàu vi khuẩn khử sulfat từ mẫu bùn thải chế biến khoáng sản được tiến hành trong bình serum thể tích 100 ml (Hình 1A) chứa 50 ml môi trường lactat/sulfat (Bảng 2) có độ pH = 5, nhiệt độ nuôi là 30°C. Sự sinh trưởng của SRB trong mẫu làm giàu được nhận biết sau 5 – 7 ngày thông qua xác định mật độ tế bào (quan sát dưới kính hiển vi phản pha, độ phóng đại 400×) và lượng sulfua tạo thành. Cây truyền dịch làm giàu được thực hiện sau mỗi 5 – 7 ngày. Sau 4 lần cấy truyền, mẫu làm giàu có lượng sulfua tạo ra trong môi trường khá cao, đạt mức 1,37 mM (43,8 mg/L), chứng tỏ tập đoàn SRB đã thích nghi và sinh trưởng tốt ở điều kiện làm giàu.

Dịch làm giàu SRB được pha loãng trong các ống nghiệm kín khí chứa 9 ml môi trường khoáng kỵ khí như mô tả tại bảng 2 nhưng không bổ sung cơ chất Na-lactat. Sau đó ở mỗi cấp độ pha loãng 1 ml mẫu được cấy vào ống nghiệm (loại ϕ 18, đáy nút cao su) chứa 9 ml môi trường kỵ khí có cơ chất Na-lactat và thạch 1%, đảo đều nhẹ rồi đặt đứng trên giá ống nghiệm cho tới khi thạch đông. Đuổi oxy trong ống nuôi bằng khí N₂/CO₂ 90/10 (v/v) (Messer Vietnam) trong thời gian 30 giây, sau đó đặt ống nghiệm ở tư thế đảo đều (Hình 1B) trong tủ ấm 30°C để vi khuẩn sinh trưởng tạo khuẩn lạc.

Các khuẩn lạc riêng lẻ hình thành trong ống thạch (Hình 1B) được tách riêng bằng mao quản thủy tinh (làm từ pipet Pasteur kéo dài) và chuyển sang ống nghiệm chứa môi trường dịch thể kỵ khí dành cho SRB. Quá trình tinh sạch được lặp lại 2 – 3 lần cho tới khi thu được chủng thuần khiết đồng nhất về hình dạng tế bào khi được quan sát dưới kính hiển vi.

Ví dụ 2: Nghiên cứu đặc điểm hình thái của chủng S4

Trong ống thạch bán lỏng kỵ khí chủng S4 tạo thành các khuẩn lạc hình đĩa lồi hai mặt, kích thước 0,5 – 1 mm, màu xám đen do tích lũy sulfua kim loại (Hình 2A).

A. Quan sát tế bào trên kính hiển vi phản pha:

Lấy 1 ml dịch nuôi vi khuẩn thu ở pha log của chu kỳ sinh trưởng, ly tâm 10.000 vòng/phút trong thời gian 10 phút tại 4°C. Sinh khối tế bào sau đó được hòa trong 100 μ l nước muối sinh lý vô trùng, đã được đuổi oxy bằng sục khí nitơ. Lấy 20 – 30 μ l dịch tế bào đưa lên lam kính phủ thạch (2%) và chụp ảnh trên kính hiển vi phản pha (Axiostar Plus, Zeiss) vật kính 40 $\times$ bằng camera chuyên dụng (Axiocam ICc3, Zeiss).

Chủng vi khuẩn S4 thuần khiết về mặt sinh học bao gồm các tế bào dạng phẩy khuẩn, kích thước rất nhỏ, chuyển động rất tích cực theo nhiều hướng trong môi trường dịch thể (Hình 2B).

B. Quan sát tế bào trên kính hiển vi điện tử quét:

Tế bào được thu từ dịch nuôi bằng ly tâm, rửa trong dung dịch cacodylat 100 mM trong 2 – 3 lần, sau đó xử lý trong dung dịch chứa 2.5% glutaraldehyt, 100 mM cacodylat trong ≥ 1 giờ. Sau khi xử lý, mẫu được rửa 2 – 3 lần trong dung dịch cacodylat 100 mM, sau đó cố định trong dung dịch chứa 1% OsO₄ và 100 mM cacodylat trong 1 giờ tại nhiệt độ phòng. Sau khi cố định, mẫu được rửa trong dung dịch 100 mM cacodylat 2 lần, sau đó loại nước trong dung dịch còn ở các nồng độ 50, 70, 80, 90 và 100%. Tế bào vi khuẩn sau quy trình xử lý được hòa trong 100% ethanol tới mật độ phù hợp, đưa lên để gắn mẫu có bọc màng nhôm và phủ màng Pt-Pd. Sau cùng mẫu được phân tích trên kính hiển vi điện tử quét (Hitachi, Nhật Bản).

Hình ảnh chụp trên kính hiển vi điện tử quét (SEM) cũng cho thấy tế bào của chủng vi khuẩn S4 là dạng phẩy khuẩn đặc trưng cho các loài thuộc chi *Desulfovibrio*, kích thước rất nhỏ 0,2 – 0,3 μ m $\times$ 2 – 3 μ m (Hình 2C, D).

Ví dụ 3: Xác định vị trí phân loại của chủng S4 dựa trên trình tự 16S rADN

A. Tách ADN hệ gen của chủng S4

Sử dụng phương pháp do Marmur (1961) mô tả, gồm các bước như sau:

1 ml dịch tế bào được ly tâm 5000 – 10.000 vòng/phút trong 5 phút, sau đó rửa với 1 ml đệm TE (độ pH = 8) rồi hòa tế bào trong 0,5 ml 5 mM EDTA (độ pH = 8).

Thêm 50 μ l lysozym (40 mg/ml), trộn đều, ủ trong bể ỏn nhiệt ở 37°C trong 1 giờ.

Thêm 50 μ l SDS (20%) và 50 μ l proteinaza K (4 mg/ml), trộn đều và ủ trong bể ỏn nhiệt ở 55°C trong 1 giờ.

Thêm 400 µl PCI, trộn đều trong 1- 3 phút, ly tâm 13000 vòng/phút ở 4°C trong 15 phút. Lặp lại bước vừa rồi thêm 1 lần.

Chuyển lớp dịch trong ở trên sang ống eppendorf mới. Thêm 1/10 thể tích dung dịch 3M Na-acetat (độ pH = 5,2) và 2 lần thể tích dung dịch 2-propanol (để lạnh -20°C), trộn đều và giữ ở -20°C trong vòng 15 phút đến 1 giờ.

Ly tâm 13000 vòng/phút ở 4°C trong 15 phút, chất dịch trên để thu kết tủa ADN.

Rửa ADN trong ethanol 70% (để lạnh -20°C) trong 1 phút, ly tâm 13000 vòng/phút, đổ cặn, làm khô ADN ở nhiệt độ phòng.

Hòa tan ADN trong 50 µl MQ vô trùng (hoặc đệm TE) và bảo quản tại -20°C cho các thí nghiệm tiếp theo.

B. Khuếch đại các đoạn gen trong phản ứng PCR

ADN hệ gen sau đó được sử dụng làm khuôn để khuếch đại các đoạn gen dùng cho việc xác định vị trí phân loại, gồm có 16S rADN và đoạn gen *dsrB* mã hóa cho tiểu phần β của enzym dissimilatory sulphite reductase. Các cặp mồi đặc hiệu cho từng đoạn gen đã sử dụng và chu trình nhiệt tương ứng được trình bày trong Bảng 3.

Bảng 3 - Các cặp mồi sử dụng để khuếch đại các đoạn gen cho mục đích xác định vị trí phân loại của chủng S4 và chu trình nhiệt

Tên gen	Tên mồi	Trình tự mồi/ chu trình nhiệt	Sản phẩm PCR	Tài liệu tham khảo
16SrADN	27F	5'-AGAGTTTGATCCTGG CTCAG-3'	1500 bp	Weisburg <i>et al.</i> , 1991
	1492R	5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'		
	Chu trình nhiệt	94°C 3 phút, (94°C 30 giây, 55°C 45 giây, 72°C 1,5 phút) × 35 chu kỳ, 72°C 7 phút, kết thúc 4°C.		
<i>dsrB</i>	Dsrp2060F	5'-CAACATCGTYCAYACCCAGGG-3'	390 bp	Shabir <i>et al.</i> , 2007
	Dsr4R	5'-GTGTAGCAGTTACCGCA-3'		
	Chu trình nhiệt	94°C 4 phút, (94°C 30 giây, 55°C 30 giây, 72°C 1 phút) × 35 chu kỳ, 72°C 10 phút, kết thúc 4°C.		

Sản phẩm PCR của 16S rADN (1500 bp) và đoạn gen *dsrB* (390 bp) (Hình 3) sau đó được tinh sạch bằng PCR purification Kit (Bioneer, Hàn Quốc) rồi tiến hành phản

ứng đọc trình tự với ABI Prism BigDye Terminator cycle sequencing kit và đọc trình tự trên máy tự động 3110 Avant Applied Biosystems.

Trình tự gen sau đó được phân tích, so sánh với trình tự 16S rADN và *dsrB* của các loài có liên quan hiện đã công bố trên ngân hàng dữ liệu GenBank sử dụng phần mềm BLAST Search (Bảng 4). Cây phân loại được dựng theo phương pháp neighbour-joining (Hình 4) (Saitou, Nei, 1987), trong đó định dạng cây được tiến hành dựa trên 1000 phép so sánh đa chiều (Felsenstein, 1985).

Bảng 4 - Độ tương đồng về trình tự 16S rADN và đoạn gen *dsrB* của chủng BfH so với các loài gần gũi nhất

Gen	Độ dài	Loài gần gũi nhất	Độ tương đồng
16S rADN	1410 bp	<i>Desulfovibrio oxamicus</i>	99%
<i>dsrB</i>	390 bp	<i>Desulfovibrio oxamicus</i>	100%

So sánh cả hai trình tự gen đều cho thấy chủng S4 gần gũi nhất với *Desulfovibrio oxamicus* với độ tương đồng khi so sánh trình tự gần đủ của 16S rADN (1443 bp) là 99%, độ tương đồng về đoạn gen *dsrB* (390 bp) mã hóa cho tiểu phần β của enzym dissimilatory sulphite reductaza là 100%. Gen *dsrB* là gen chức năng đặc hiệu cho vi khuẩn tham gia chu trình sulfur, trong đó có SRB (Shabir *et al.*, 2007). Dựa trên các phân tích về trình tự gen, chủng S4 được định danh khoa học là *Desulfovibrio oxamicus* S4. Đoạn 16S rADN đã giải trình tự được đăng ký tại ngân hàng gen DDBJ với mã số LC186051 có trình tự nêu tại SEQ ID NO.1.

Ví dụ 4: Nghiên cứu đặc tính sinh học của chủng *Desulfovibrio oxamicus* S4

Các đặc tính sinh học của chủng S4 được nghiên cứu chi tiết gồm có khả năng sinh trưởng trong môi trường có độ pH thấp, khả năng chịu hàm lượng kim loại cao, các chất nhận điện tử thích hợp. Trong các nghiên cứu này, chủng S4 được nuôi trong môi trường khoáng dịch thể kỵ khí (lập lại trong 3 ống nuôi) có bổ sung các thành phần cần môi trường cần nghiên cứu theo tỷ lệ cần thiết, cụ thể như sau:

A. Khả năng sinh trưởng trong môi trường có độ pH thấp

Chủng S4 được nuôi trong môi trường lactat/sulfat kỵ khí có độ pH ở các giá trị 4 – 8 điều chỉnh bằng các dung dịch HCl 1M hoặc Na₂CO₃ 1M. Sinh trưởng của vi khuẩn được đánh giá thông qua thay đổi của mật độ quang trong dịch nuôi đo tại bước sóng 600 nm.

Hàm lượng sulfat do vi khuẩn sử dụng được xác định bằng phương pháp tạo kết tủa BaSO_4 khi cho môi trường có chứa sulfat phản ứng với dung dịch BaCl_2 0,2 M (trong HCl 0,2 M) (Dinh *et al.*, 2004). BaSO_4 kết tủa được thu hồi bằng cách lọc qua màng nitrocelluloza 0,2 μm , sấy khô tới trọng lượng ổn định và cân.

Hàm lượng sulfua do vi khuẩn tạo ra được xác định bằng phương pháp tạo kết tủa CuS khi môi trường nuôi vi khuẩn chứa sulfua phản ứng với dung dịch CuSO_4 5 mM (pha trong dung dịch HCl 50 mM) (Cord-Ruwish, 1985). Dịch huyền phù của CuS kết tủa màu nâu đen được đo nhanh trên máy so màu ở bước sóng 480 nm. Đường chuẩn được dựng với dung dịch Na_2S trong khoảng nồng độ từ 0 – 20 mM.

Chủng *D. oxamicus* S4 sinh trưởng tốt và tạo sulfua tối ưu ở điều kiện độ pH = 7. Tuy nhiên, tại độ pH = 5 và 6 chủng này vẫn giữ được mức sinh trưởng khoảng 50% (Hình 5). Hàm lượng sulfua tạo ra tương ứng vào lượng sulfat mất đi, chứng tỏ quá trình khử sulfat sinh học do chủng vi khuẩn S4 thực hiện là con đường duy nhất tạo ra sulfua trong môi trường. Đặc tính này là ưu thế của chủng S4 khi được ứng dụng cho mục đích xử lý AMD, là loại nước thải có độ pH ban đầu rất thấp.

B. Khả năng chịu nồng độ kim loại nặng cao

Chủng *D. oxamicus* S4 được nuôi trong môi trường khoáng dịch thể kỵ khí chứa Na-lactat (10 mM) làm chất cho điện tử và SO_4^{2-} (28 mM) làm chất nhận điện tử. Để tránh ảnh hưởng của sulfua dùng là chất khử oxy trong môi trường, trong thí nghiệm này ascorbat được sử dụng thay. Môi trường được bổ sung một trong các kim loại sau: Fe^{2+} (ở nồng độ 60 mg/L, 200 mg/L, 400 mg/L), Zn^{2+} (20 mg/L, 150 mg/L), Cu^{2+} (10 mg/L, 80 mg/L). Sinh trưởng của *D. oxamicus* S4 được đánh giá thông qua lượng sulfat bị khử trong môi trường.

Kết quả (Hình 6) cho thấy chủng *D. oxamicus* S4 chịu được nồng độ sắt rất cao, hoạt tính khử sulfat chỉ bị giảm nhẹ ở nồng độ sắt 400 mg/L. Kẽm và đồng có ảnh hưởng ức chế cao hơn so với sắt, tuy nhiên so với nhiều loài vi sinh vật đã công bố thì mức chịu các kim loại này ở chủng *D. oxamicus* S4 được đánh giá ở mức cao hơn, cụ thể là 120 – 150 mg/L đối với kẽm, 50 mg/L đối với đồng.

C. Xác định các chất nhận điện tử thích hợp

Chủng *D. oxamicus* S4 được nuôi trong môi trường khoáng dịch thể kỵ khí chứa Na-lactat (10 mM) làm chất cho điện tử và một trong các chất nhận điện tử tiềm năng ở điều kiện không có oxy là SO_4^{2-} (20 mM, đối chứng dương), NO_3^- (5 mM) (được bổ sung định kỳ sau mỗi 24 h) và Fe^{3+} (30 mM). Khả năng sinh trưởng với oxy được nghiên cứu thông qua việc nuôi vi khuẩn trong bình Erlenmeyer chứa môi trường khoáng không có chất nhận điện tử và không được loại oxy, kết hợp chế độ lắc 100 vòng/phút. Sinh trưởng của vi khuẩn trong môi trường được đánh giá thông qua thay đổi mật độ quang của dịch nuôi (đo tại bước sóng 600 nm).

Kết quả cho thấy chủng *D. oxamicus* S4 sinh trưởng tốt với sulfat hoặc nitrat, thể hiện qua tốc độ sinh trưởng tương đương, thậm chí có phần trội hơn khi sinh trưởng với nitrat do không có ảnh hưởng ức chế ngược của sản phẩm trao đổi chất sulfid (Hình 7). Tuy nhiên với Fe^{3+} hay oxy thì chủng này hoàn toàn không có khả năng sinh trưởng. Khả năng sử dụng nitrat là chất nhận điện tử duy nhất có ý nghĩa quan trọng trong việc tạo sinh khối của chủng S4 mà không sản sinh H_2S gây ảnh hưởng tới môi trường (khi không cần thiết sử dụng để kết tủa kim loại), thay vào đó là khí N_2 không độc hại.

Ví dụ 5: Bảo quản chủng D. oxamicus S4 trong điều kiện phòng thí nghiệm

Chủng *D. oxamicus* S4 thuần khiết về mặt sinh học được bảo quản trong phòng thí nghiệm trong glyxerol 25% tại -20°C sử dụng các mao quản thủy tinh để đảm bảo điều kiện kỵ khí tuyệt đối (Hình 8). Chủng S4 được nuôi trong ống nghiệm kín khí (có nút cao su và nắp xoáy nhựa) thể tích 10 ml chứa 5 ml môi trường khoáng kỵ khí sử dụng Na-lactat (10 mM) là chất cho điện tử và sulfat (28 mM) làm chất nhận điện tử cuối cùng. Sau 5 – 7 ngày khi mật độ quang của dịch nuôi đạt khoảng 0,2 thì thu sinh khối tế bào bằng ly tâm (sử dụng trực tiếp ống nuôi thay cho ống falcon 15 ml) ở 4°C trong 15 phút. Loại dịch môi trường rồi hòa sinh khối tế bào trong 1 ml môi trường khoáng kỵ khí không bổ sung chất cho và nhận điện tử, nhưng có 25% glyxerol.

Bằng dụng cụ trợ hút lấy 0,1 ml dịch huyền phù tế bào vào các mao quản thủy tinh (cách hai đầu mao quản 1 cm mỗi đầu), sau đó hàn kín hai đầu mao quản trên ngọn lửa đèn cồn. Kiểm tra độ kín của mỗi hàn dưới kính lúp, sau đó đặt các mao quản tại 4°C trong thời gian 2 – 4 giờ rồi chuyển sang điều kiện lạnh sâu -20°C . Ở điều

kiện này chủng *Desulfovibrio oxamicus* S4 có thể được bảo quản duy trì khả năng sinh trưởng và hoạt tính khử sulfat trong thời gian tới 24 tháng.

Chủng *Desulfovibrio oxamicus* S4 được lưu giữ tại Bảo tàng giống chuẩn Vi sinh vật Việt Nam (VTCC) dưới mã số VTCC-B-2180.

Ví dụ 6: Ứng dụng chủng *D. oxamicus* S4 trong xử lý AMD trong mô hình bể khử sulfate sinh học quy mô phòng thí nghiệm

Mô hình bể khử sulfat sinh học quy mô phòng thí nghiệm để xử lý AMD gồm các bước lần lượt như sau:

Bể 1 – Bể trung hòa: chứa đá dăm tới 1/2 thể tích để nâng độ pH của nước thải tới 4,5 – 5, phù hợp cho vi khuẩn khử sulfat phát triển.

Bể 2 – Bể phản ứng khử sulfat sinh học: là nơi diễn ra quá trình khử sulfat nhờ vi khuẩn. Bể này có lớp giá thể ở đáy gồm đá dăm dưới cùng, sau đó đến lớp phoi bào và trên cùng là một lớp đá dăm mỏng. Độ dày của toàn bộ lớp giá thể là 1/2 chiều cao của bể (tính tới mức nước). Để cung cấp nguồn cacbon và năng lượng cho quá trình khử sulfat sinh học, cám gạo được bổ sung vào bể theo tỷ lệ 0,1%. Dịch nuôi chủng vi khuẩn *D. oxamicus* S4 được bổ sung làm giống khởi động (tới mật độ 10^6 MPN/mL).

Bể 3 – Bể lọc cát: Nước thải sau khi được xử lý ở bể khử sulfat được lọc qua lớp cát vàng trước khi thải ra ngoài.

Thí nghiệm được tiến hành với nước thải AMD nhân tạo có thành phần như sau (mg/L) (Kim *et al.*, 2014): Fe^{2+} , 188,4; Cu^{2+} , 5,52; Zn^{2+} , 11,3; Pb^{2+} , 4,2; As^{5+} , 3,17; Ni^{2+} , 7,4; độ pH của nước thải là 3.

Đầu tiên, AMD nhân tạo được đưa vào mô hình, giữ ở trạng thái tĩnh trong một thời gian để tạo điều kiện cho quá trình khử sulfat khởi động. Với sự có mặt của chủng *D. oxamicus* S4, quá trình khởi động diễn ra hoàn toàn trong 5 ngày. Từ ngày thứ 6, mô hình được vận hành theo chế độ liên tục với thời gian lưu của AMD nhân tạo trong quy trình xử lý là 3 ngày, kết quả xử lý được trình bày tại bảng 5.

Bảng 5 - Xử lý AMD trong mô hình bể khử sulfat sinh học sử dụng chủng *D. oxamicus* S4 làm nguồn SRB khởi động

Yếu tố xử lý (mg/L)	AMD đầu vào (mg/L)*	Nước thải đầu ra (mg/L)*	QCVN 40:2011/BTNMT	
			Loại A	Loại B

pH	3	7	6 - 9	5,5 - 9
Fe (II)	188,44	0	1	5
Sulfate	1152	782,4	–	–
Cu	5,520	0,0055	2	2
Zn	11,30	0,0308	3	3
Pb	4,2	0,0009	0,1	0,5
As	3,17	0,0094	0,05	0,1
Ni	7,4	0,0141	0,2	0,5
COD	468	34	75	150
BOD5	150	2	30	50

* Phân tích được tiến hành tại Viện Hóa học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Có thể thấy rằng nước thải AMD nhân tạo mô phỏng theo các loại AMD trong thực tế (Harry *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2014) đã được xử lý một cách hiệu quả trên mô hình phòng thí nghiệm với sự có mặt của chủng vi khuẩn *D. oxamicus* S4 làm nguồn SRB khởi động. Nước thải đầu ra đạt loại A theo QCVN 40:2011 của Bộ Tài nguyên và môi trường.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Chủng vi khuẩn *Desulfovibrio oxamicus* S4 thuần khiết về mặt sinh học thích hợp để xử lý nước thải axit từ mỏ có hàm lượng kim loại nặng cao như AMD trước khi xả ra môi trường. Bằng việc đề xuất chủng vi khuẩn theo chịu được axit, nồng độ kim loại nặng, có khả năng sử dụng SO_4^{2-} và NO_3^- làm chất nhận điện tử để sinh trưởng giúp cho hoàn thiện công nghệ xử lý bằng bể khử sulfat sinh học thông qua vi khuẩn khử sulfat có hiệu quả cao về môi trường cũng như về kinh tế.

Chủng vi khuẩn *Desulfovibrio oxamicus* S4 thuần khiết về mặt sinh học theo sáng chế có các đặc tính quý như chịu độ pH thấp, chịu được hàm lượng kim loại nặng cao, rất phù hợp cho việc ứng dụng trong xử lý AMD. Chủng vi khuẩn này có thể hỗ trợ cho việc khởi động và chủ động vận hành các bể khử sulfat sinh học, cũng như xử lý các sự cố trong quá trình vận hành hệ thống xử lý.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng vi khuẩn *Desulfovibrio oxamicus* S4 thuần khiết về mặt sinh học có trình tự 16S rADN nêu trong SEQ ID NO.1 được đăng ký tại ngân hàng gen DDBJ với số hiệu LC186051 và được lưu giữ tại Bảo tàng giống chuẩn Vi sinh vật Việt Nam (VTCC) với mã số lưu giữ VTCC-B-2180 được dùng để xử lý nước thải axit từ mỏ, trong đó chủng vi khuẩn này có các đặc tính như sau:

- sinh trưởng được ở độ pH = 5;
- sử dụng SO_4^{2-} và NO_3^- làm chất nhận điện tử để sinh trưởng; và
- chịu được nồng độ kim loại nặng, trong đó nồng độ Fe lên tới 500 mg/L, Zn lên tới 120 mg/L và Cu lên tới 50 mg/L.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội
 <120> Chúng vi khuẩn *Desulfovibrio oxamicus* S4 thuần khiết về mặt sinh học để xử lý nước thải từ dầu mỏ

<130>

<160> 1

<170>

<210> 1

<211> 1443

<212> ADN

<213> 16S

<220>

<223> *Desulfovibrio oxamicus* S4

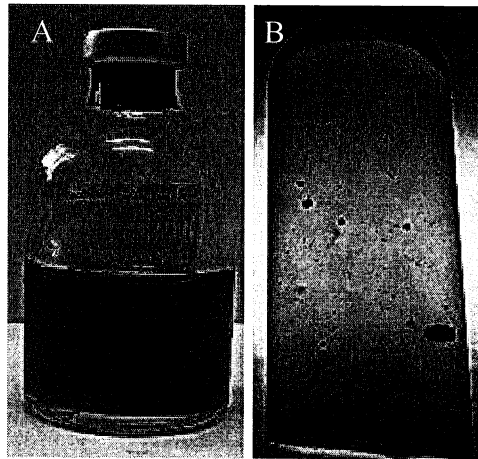
<220>

<400> 1

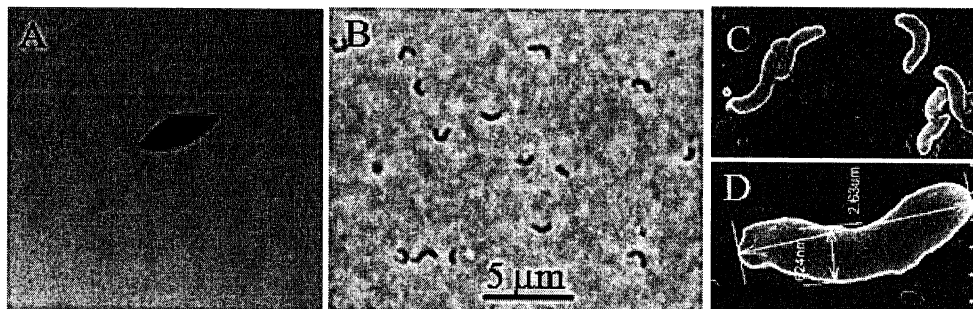
CAGATTGAAC	GCTGGCGGCG	TGCCTAACAC	ATGCAAGTCG	TGCGTGAAAG	GGCTTCGGCC	60
TGAGCTAAAG	CGGCGCACGG	GTGAGTAACG	CGTGGATGAT	CTGCCCATGA	GTTGGGAATA	120
ACGGCTGGAA	ACGGTCGCTA	ATACCGAATA	CGCTCCGATT	TCATAGTTTCG	GGGGAAAGGT	180
GGCCTCTGCT	TGCAAGCTAC	CGCTCATGGA	TGAGTCCGCG	TCCCATTAGC	TAGTTGGCGG	240
GGTAATGGCC	CACCAAGGCG	ACGATGGGTA	GCCGACCTGA	GAGGGTGATC	GGCCACACTG	300
GGACTGGAAC	ACGGCCCAGA	CTCCTACGGG	AGGCAGCAGT	GGGGAATATT	GCGCAATGGG	360
CGAAAGCCTG	ACGCAGCGAC	GCCGCGTGAG	GGATGAAGGC	CTTCGGGTTCG	TAAACCTCTG	420
TCAGGAGGGA	AGAACCGCCA	TGGTGCTAAT	CAGCCATGGT	CTGACGGTAC	CTCCAAAGGA	480
AGCACCGGCT	AACTCCGTGC	CAGCAGCCGC	GGTAATACGG	AGGGTGCAAG	CGTTAATCGG	540
AATCACTGGG	CGTAAAGCGC	ACGTAGGCTG	TTTGGTAAGT	CAGGGGTGAA	ATCCCGCGGC	600
TCAACCGCGG	AATTGCCCTT	GATACTGCTG	GACTTGAGTT	CGGGAGAGGG	TGGCGGAATT	660
CCAGGTGTAG	GAGTGAAATC	CGTAGATATC	TGGAGGAACA	TCAGTGGCGA	AGGCGGCCAC	720
CTGGACCGAT	ACTGACGCTG	AGGTGCGAAA	GCGTGGGGAG	CAAACAGGAT	TAGATACCCT	780
GGTAGTCCAC	GCTGTAAACG	ATGGATGCTA	GGTGTCTGGG	CCTTGAGCTT	CGGTGCCGCA	840
GCTAACGCGT	TAAGCATCCC	GCCTGGGGAG	TACGGTTCGA	AGGCTGAAAC	TCAAAGAAAT	900
TGACGGGGGC	CCGCACAAGC	GGTGGAGTAT	GTGGTTTAAT	TCGATGCAAC	GCGAAGAACC	960
TTACCCAGGC	TTGACATCCG	GGAAACCTC	CCGAAAAGGA	GGGGTGCTCT	TCGGAGAATC	1020
CCGAGACAGG	TGCTGCATGG	CTGTCTGTCAG	CTCGTGCCGT	GAGGTGTTGG	GTTAAGTCCC	1080
GCAACGAGCG	CAACCCCTAT	CCTTAGTTGC	TACCAGGTGA	TGCTGGGCAC	TCTATGGAGA	1140
CCGCCCCGGT	TAACGGGGAG	GAAGGTGGGG	ATGACGTCAA	GTCAATCATGG	CCCTTACGCC	1200
TGGGGCTACA	CACGTACTAC	AATGGCGCAC	ACAAAGGGCA	GCGATACCGT	GAGGTGGAGC	1260
CAATCCCAA	AAATGCGTCC	CAGTCCGGAT	TGCAGTCTGC	AACTCGACTG	CATGAAGTTG	1320
GAATCGCTAG	TAATTCGAGA	TCAGCATGCT	CGGGTGAATG	CGTTCCCGGG	CCTTGTACAC	1380
ACCGCCCGTC	ACACCACGAA	AGTCGGTTTA				1410

20127

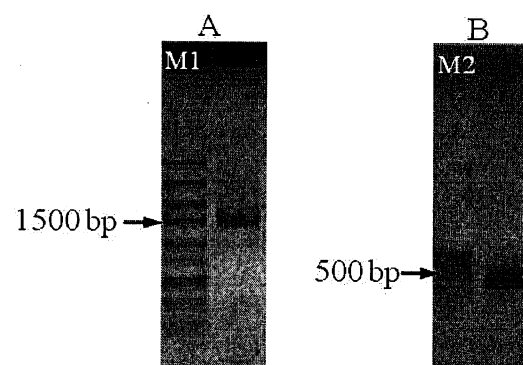
HÌNH 1



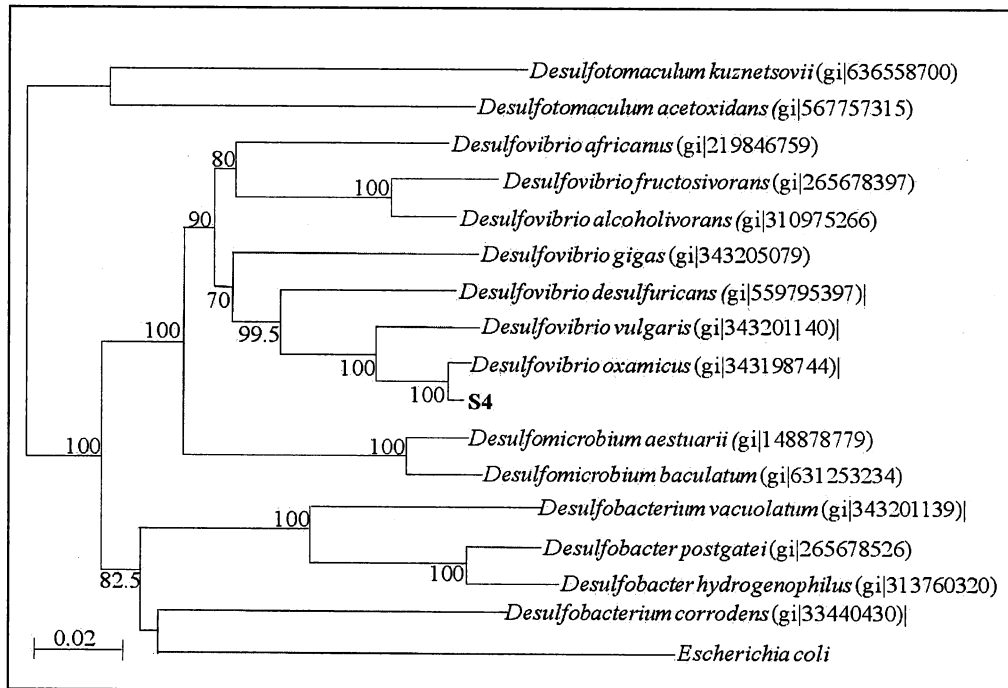
HÌNH 2



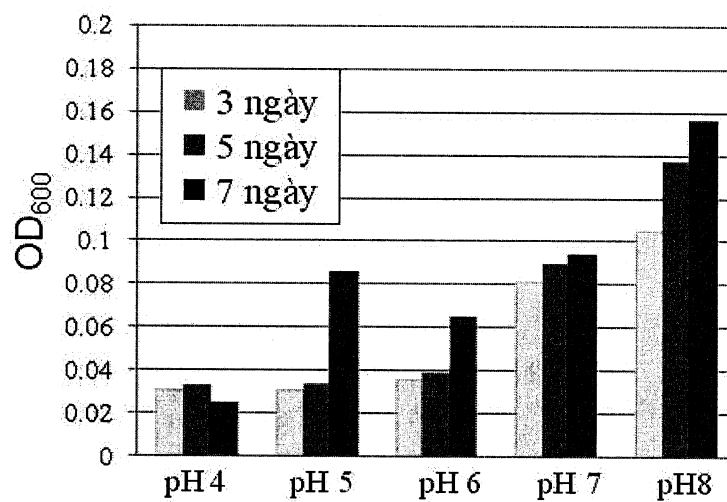
HÌNH 3



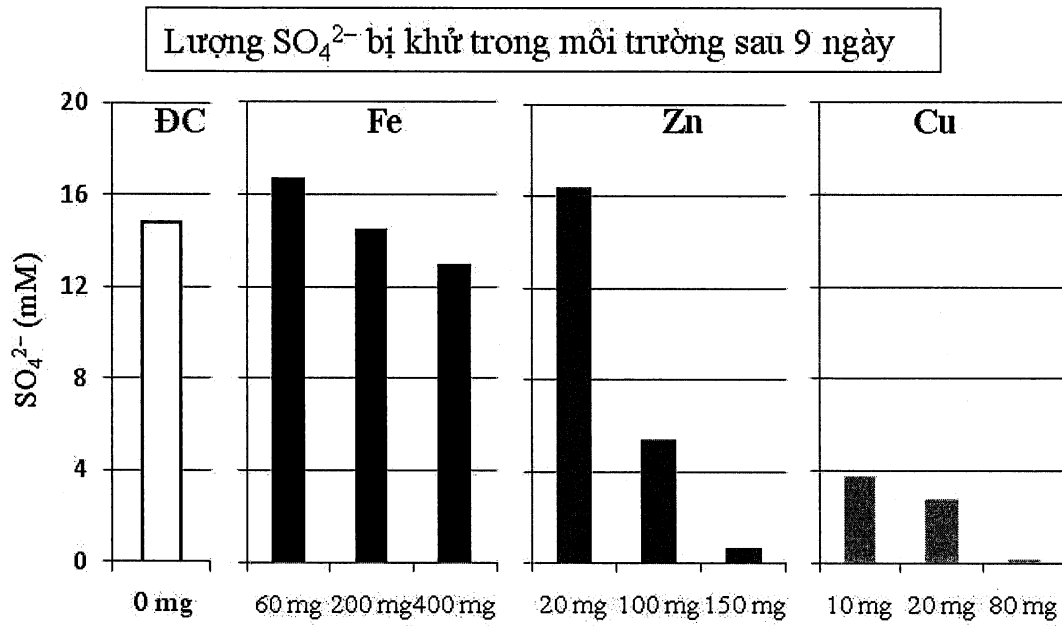
HÌNH 4



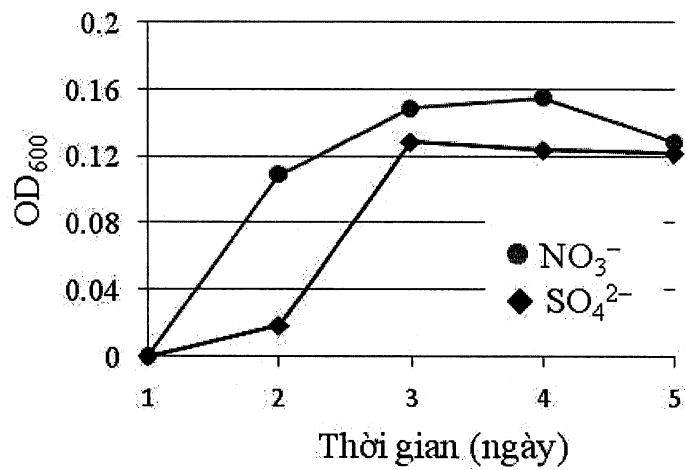
HÌNH 5



HÌNH 6



HÌNH 7



HÌNH 8

