



(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)



1-0025759

(51)⁷ C12N 1/20

(13) B

(21) 1-2018-02609

(22) 15/06/2018

(45) 26/10/2020 391

(43) 27/08/2018 365A

(73) Viện Công nghệ sinh học (VN)

Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam; Nhà A10, số 18 Hoàng Quốc Việt, Nghĩa Đô, Cầu Giấy, Hà Nội

(72) Lê Thị Nhi Công (VN); Đỗ Thị Liên (VN); Cung Thị Ngọc Mai (VN); Đỗ Thị Tố Uyên (VN); Đinh Thị Thu Hằng (VN); Hoàng Phương Hà (VN).

(54) CHỦNG VI KHUẨN TÍA QUANG HỢP RHODOPSEUDOMONAS SP. PLC1 THUẦN KHIẾT VỀ MẶT SINH HỌC CÓ KHẢ NĂNG TẠO MÀNG SINH HỌC, PHÂN HỦY DẦU DIEZEN VÀ TÍCH LŨY CO-ENZYM Q10

(57) Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn *Rhodopseudomonas* sp. PLC1 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ mẫu đất nhiễm dầu 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 dầu diezen, piren, naphtalen và toluen. Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập tới khả năng tích lũy Co-enzym Q10 của chủng vi khuẩn này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn tía quang hợp *Rhodopseudomonas* sp. PLC1 có khả năng tạo màng sinh học với hoạt tính cao có nhiều ứng dụng trong xử lý dầu diezen, các thành phần hydrocarbon thơm và no có trong dầu mỏ và nước ô nhiễm dầu đồng thời có khả năng tích lũy Co-enzym Q10.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Màng sinh học

Màng sinh học (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. Phần lớn các vi sinh vật sinh trưởng trên môi trường bán lỏng đều có khả năng tạo ra màng sinh học. Khu hệ vi sinh vật trong biofilm có khả năng chống chịu các điều kiện khắc nghiệt của môi trường tốt hơn, hỗ trợ trao đổi chất tốt hơn và hạn chế sự cạnh tranh của các vi sinh vật khác (O'Toole và cộng sự, 2000).

Sự hình thành biofilm

Một quá trình hình thành điển hình của biofilm có thể được tóm tắt thành ba giai đoạn chính: Giai đoạn đầu là giai đoạn gắn, bị ảnh hưởng nhiều bởi các đặc tính bề mặt và tỷ lệ các vi sinh vật được vận chuyển đến bề mặt. Hai giai đoạn sau là sự tăng sinh và tăng trưởng, bị ảnh hưởng bởi các yếu tố vận chuyển và sự khuếch tán chất dinh dưỡng, lực cắt bề mặt của dòng chảy và tốc độ tăng trưởng của vi sinh vật. Biofilm sẽ bị phân giải khi việc sản xuất các polyme ngoại bào bị hạn chế do hậu quả của đột biến (Cheng và cộng sự, 2010).

Vi sinh vật bám vào bề mặt giá thể theo nhiều cách khác nhau. Một số vi sinh vật tự bản thân nó đã có tính kết dính nhờ lipo-polisaccarit 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 ở vi khuẩn. Các vi sinh vật 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 *Pseudomonas aeruginosa* gặp một mặt kính, nó sẽ kích hoạt ngay một gen cần để tổng hợp polisaccarit, khi vi khuẩn đã gắn vào bề mặt, chúng phân chia và liên tục sản xuất nhiều polisaccarit để tạo nên màng sinh học hoàn chỉnh (Barken và cộng sự, 2008).

Thành phần của biofilm

Một biofilm trong tự nhiên gồm 2 thành phần chính: Thành phần tế bào (tập hợp các tế bào của một hay nhiều loài vi sinh vật khác nhau, bám dính trên bề mặt nhất định) và mạng lưới các hợp chất ngoại bào (extracellular polymeric substances - EPS) bao quanh các tế bào, tạo nên cấu trúc đặc trưng cho biofilm. Trong đó, khối lượng tế bào vi sinh vật chiếm 2 - 5% tổng khối lượng biofilm, 3 - 6% là các EPS và ion, còn lại là nước (Andersson và cộng sự,

2009). Một tế bào riêng lẻ có thể tạo ra vài thành phần ngoại bào khác nhau tùy thuộc vào điều kiện môi trường, đặc tính của từng loài vi khuẩn cũng như cách thức hình thành biofilm của loài đó.

Thành phần mạng lưới các hợp chất ngoại bào (EPS)

Thành phần EPS rất đa dạng tùy loài vi sinh vật, dạng biofilm và điều kiện hình thành. Nhưng về cơ bản đều bao gồm các thành phần chính sau: 3 - 37% là protein, 9 - 50% là axit nucleic, 3 - 21% là carbonhydrat. Các hợp chất này thay đổi theo không gian và thời gian tồn tại của biofilm. Về cơ bản biofilm càng dày và thời gian tồn tại càng lâu thì có hàm lượng EPS càng nhiều, thông thường một EPS có độ dày từ 0,2 đến 1µm, ở một số loài vi khuẩn độ dày của lớp EPS không vượt quá 10 đến 30µm. Mật độ tế bào tập trung cao nhất ở lớp đỉnh của biofilm và giảm dần theo độ sâu nhưng thành phần EPS lại phong phú hơn ở vùng phía trong biofilm. Thành phần EPS trong hầu hết các biofilm cũng khác biệt so với các vi sinh vật ở dạng sống tự do. Những thành phần chính trong một biofilm bao gồm polisaccarit, protein và ADN (Bảng 1.1) (Dolan, 2002).

Bảng 1. Vai trò của EPS trong biofilm (Dolan, 2002)

Tác động	Thành phần	Vai trò
Kiến tạo	Polisaccarit, amyloit	Cấu tạo nên cấu trúc biofilm
Hoạt hóa	Enzym ngoại bào	Phân hủy chất hữu cơ
Hoạt hóa bề mặt	Axit ampiphilic	Tương tác giữa các bề mặt
Truyền tin	Lectin, axit nucleic	Truyền tin giữa các tế bào
Chất dinh dưỡng	Nhiều loại polyme	Nguồn cung cấp C, N, P

Polysaccarit là thành phần quan trọng nhất để tạo nên cấu trúc hoàn chỉnh của biofilm. Các polisaccarit rất đa dạng về thành phần, đặc tính sinh lý sinh hóa thông qua các dạng liên kết glicosidic (β - 1,4, β -1,3 hay α - 1,6) giữa các phân tử hay do sự khác nhau của các đơn vị monome. Polisaccarit có thể là các đồng phân tử cấu tạo bởi 2 đến 4 dạng đơn phân khác nhau như alginat, emulsan, gellen. Các monosaccharit trong biofilm là D-glucosa, D-galactosa, D-manoza, L-fructosa. Nhóm axit uronic như axit D-glucuronic, axit D-galacturonic. Thành phần các đường đơn có ảnh hưởng đến đặc tính của cả mạng lưới biofilm (Burdman, 2000).

Ứng dụng màng sinh học trong xử lý nước ô nhiễm dầu

Hiện nay, trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu về các chủng vi sinh vật tạo màng sinh học nhằm ứng dụng trong xử lý các hydrocarbon thơm như benzen, naphtalen, phenol, toluen, xylen, v.v. (Meliani và Bensoltane, 2014; Shimada và cộng sự, 2012; Yamaga và cộng sự, 2010). Ứng dụng biofilm trong phân hủy các hợp chất hữu cơ đã được nghiên cứu từ năm 1989 (Hettige và Sheridan, 1989). Hettige và Sheridan (1989) cũng chứng minh các loài *Hormoconis resinae*, *Penicillium corylophilum* và *Paecilomyces variotii* sinh trưởng tốt trên dầu diezen và có khả năng tạo màng sinh học rất tốt. Các loài này đã được ứng dụng trong các hệ thống màng sinh học ở các kho xăng dầu. Kay và cộng sự (1991) đã chứng minh vai trò

của biofilm do các chủng vi khuẩn tạo thành trong việc phân hủy các polyme polyurethan. Các chủng vi khuẩn này đã sử dụng polyurethan làm nguồn carbon và năng lượng cho quá trình sinh trưởng và phát triển của chúng. Những thay đổi trong tương tác vật lý của polyurethan đã được xác định và sự đứt gãy liên kết của hợp chất này được quan sát dưới kính hiển vi quang học. Kim và Kim (1998) đã công bố các vi khuẩn trong biofilm có thể dễ dàng sử dụng polyeste polyurethan làm nguồn năng lượng nhờ enzym esteraza có chức năng phân cắt các gốc alkyl của những hợp chất này.

Ngoài ra, việc sử dụng kết hợp giữa trấu và cám lúa mỳ làm giá thể đã xử lý thành công nước ô nhiễm dichlorophenol và pentachlorophenol bởi nấm *Coriolus versicolor* với nồng độ ban đầu 50mg/l cho hiệu suất loại bỏ lần lượt là 75-80% và 100% sau 24 giờ nuôi cấy (Ullah và cộng sự, 2000). Viggiani và cộng sự (2006) đã công bố chủng *Pseudomonas stutzeri* OX1 có khả năng tạo màng tốt sau khi được tối ưu các điều kiện trên nhiều loại vật liệu mang dạng rắn như đất cát, đá và carbon hoạt tính chuyển hóa 95% phenol với hàm lượng ban đầu là 600mg/l theo con đường *meta*.

El-Masry và cộng sự (2004) đã chứng minh 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 mỡ. Các nhóm vi sinh vật này thường là *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Neurospora*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Trametes*, v.v. (Sigh và cộng sự, 2006). Chúng có khả năng sử dụng rất tốt các hydrocarbon có trong dầu mỡ như phenol, benzen, v.v. làm nguồn carbon và năng lượng. Do đó, chúng đã được ứng dụng trong xử lý nước ô nhiễm dầu.

Dầu mỡ và tác động của các hợp chất hydrocarbon thơm có trong dầu mỡ

Ô nhiễm môi trường do dầu mỡ và các sản phẩm dầu mỡ đang là vấn đề mang tính toàn cầu, nhất là những nước có nền công nghiệp dầu khí phát triển. Cả ba quá trình khai thác, chế biến sản xuất và vận chuyển phân phối tiêu thụ dầu mỡ đều có nguy cơ ô nhiễm dầu, gây tác động trực tiếp đến các hệ sinh thái tự nhiên, đời sống kinh tế xã hội của cả cộng đồng.

Chất thải từ dầu mỡ là các loại chất nguy hiểm nghiêm trọng khi chúng xâm nhập vào môi trường nước bởi chúng rất độc đối với các sinh vật sống dưới nước và có thể phá hủy toàn bộ hệ sinh thái của các khu vực bị ô nhiễm dầu (Nguyễn Bá Diễn, 2008). Có rất nhiều nguyên nhân dẫn đến việc dầu phát tán ra ngoài môi trường, đặc biệt là môi trường biển, đầu tiên phải kể đến việc tàu chở dầu gặp sự cố hoặc do cố ý súc xả trái phép, rò rỉ ống dẫn dầu, súc rửa bể chứa dầu tại các kho bãi, do thăm dò và khai thác túi dầu bị rách do địa chấn, hoặc cũng có thể là do các nhà máy xí nghiệp tiêu thụ một lượng dầu rất lớn sau đó xả thải ra biển mà không qua hệ thống xử lý. Tại các giàn khoan dầu trên biển, nước thải ô nhiễm dầu phát sinh từ việc rửa sàn tàu, thiết bị máy móc và các khu vực vệ sinh thiết bị, nước rửa khoang chứa dầu, v.v. Các máy móc phục vụ mục đích khai thác dầu không đảm bảo cũng làm tăng nguy cơ rò rỉ dầu ra ngoài môi trường. Ô nhiễm dầu làm thay đổi tính chất lý hóa của môi trường nước, làm tăng độ nhớt của nước do đặc tính của dầu có độ nhớt cao. Từ đó làm ảnh

hưởng đến quá trình di chuyển của các phân tử, nguyên tố trong nước. Các lớp dầu khi phát tán ra ngoài môi trường nếu dày hơn 0,1 mm có thể cản trở đáng kể sự trao đổi khí của nước biển làm giảm nồng độ oxy hòa tan, biến đổi pH, phát sinh khí độc như: SO_x , NO_x , v.v. từ đó gây cản trở một số phản ứng hóa học, làm biến đổi các thành phần hóa học trong nước (Atlas, 1995), thậm chí có thể làm mất khả năng tự làm sạch của nước. Đặc biệt, dầu có khả năng phân tán rất nhanh và mạnh trong môi trường nước, do vậy chỉ một sự cố tràn dầu xảy ra mà không xử lý kịp thời nó có thể ảnh hưởng nghiêm trọng đến một diện tích rất rộng. Việc ô nhiễm dầu dẫn đến hàm lượng độc tố trong sinh vật biển tăng đáng kể, làm rối loạn các chức năng sinh lý như hô hấp, phát triển, sinh sản sinh hóa, v.v. và có thể dẫn tới tử vong. Khi hàm lượng các độc tố hữu cơ như chất hoạt hóa bề mặt đạt 5 mg/l trong nước gây tử vong hàng loạt các động vật không xương sống như: *Capitella capitata*, *Scolecis fuliginosa* (Atlas, 1981). Do đó, ô nhiễm môi trường nước biển sẽ làm suy thoái hệ sinh thái và cảnh quan, giảm năng suất và đa dạng sinh học, tài nguyên sinh vật biển, ven bờ (rừng ngập mặn, đất ngập nước, cỏ biển, san hô, sinh vật phù du, sinh vật bám đáy), tài nguyên du lịch, v.v.

Đặc biệt, nước có nhiễm dầu tại các vùng vịnh, đầm phá ven biển gây tác động nghiêm trọng đến môi trường. Do dầu bám vào rễ cây gây cản trở quá trình trao đổi chất và hấp thu các chất dinh dưỡng dẫn đến làm chậm quá trình sinh trưởng và phát triển của các loài thực vật. Đồng thời nước nhiễm dầu cũng gây tác động mạnh đến các loại thủy sản nuôi tại khu vực này tương tự như đối với hệ sinh thái ở biển (Nguyễn Bá Diễn, 2008). Thông qua đó, ô nhiễm môi trường nước biển ảnh hưởng tới sức khỏe con người (qua chuỗi thức ăn bị nhiễm độc, qua nước tắm, v.v.) và cản trở các hoạt động nhân sinh, đặc biệt là nuôi trồng, đánh bắt thủy sản và du lịch, v.v.

Hơn nữa, dầu có cấu tạo từ các thành phần gồm nhiều hydrocarbon thơm tạo thành nên khi xâm nhập vào môi trường nước, những hydrocarbon thơm này có thể hòa tan vào nước làm tăng tính độc trong nước, hủy hoại môi trường gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến đời sống sinh vật. Theo nghiên cứu về các hợp chất hydrocarbon thơm, người ta lại càng có thể khẳng định tính độc của nó đến sinh vật, thậm chí nhiều hợp chất trong số này có thể gây đột biến, quái thai. Trong môi trường nước, người ta ước tính có khoảng 99200 tấn hợp chất đa vòng thơm (PAH) thâm nhập vào đại dương mỗi tháng. Có tới trên 80% lượng nước thải trên thế giới không được thu gom xử lý, ở những nước kém phát triển tỷ lệ này lên tới hơn 95% (UN Water 2014). Theo tính toán có khoảng 0,02 – 0,1mg/l phenol, 0,5 – 2,5mg/l PAH cùng một số hydrocarbon thơm khác có mặt trong các loại nước thải. Không chỉ tồn tại trong môi trường nước tự nhiên, hydrocarbon thơm còn được tìm thấy trong nhiều mẫu nước uống. Trong một nghiên cứu nước uống của Tehran, thủ đô của Iran, nồng độ PAH đơn lẻ được phát hiện theo từng chất là 2,01 – 38,96mg/l và nồng độ PAH tổng số là 32,45 – 733,1mg/l. Đây là giá trị tương đối cao so với các giá trị được ghi nhận ở các khu vực khác trên thế giới (Atlas, 1995). Piren là một trong những PAH đã được phát hiện từ các mẫu của nhà máy xử lý nước thải Bekkelaget ở Oslo (Na Uy): trong giai đoạn năm 1979 (mùa mưa là 168 ng/l còn mùa khô

là 189ng/l) đến năm 1980 (mùa mưa là 110ng/l còn mùa khô là 248ng/l). Ngoài ra, piren cũng đã được phát hiện trong các mẫu trầm tích ở quanh vịnh khu vực Puget Sound (Washington), với nồng độ trung bình là 3775 μ g/kg trọng lượng khô (Atlas, 1995). Tại Việt Nam năm 2003, nồng độ bụi tại Thượng Đình, Bách Khoa, Chương Dương lần lượt là 3,96ng/m³; 4,24ng/m³; 10,53ng/m³. Năm 2007, nồng độ piren trung bình tại 9 điểm trong nội thành Hà Nội là 14 – 36ng/l (Nguyễn Bá Hữu và cộng sự, 2007).

Nước nhiễm dầu nếu không được xử lý kịp thời khi để lan vào môi trường đất hoặc sự cố tràn dầu xảy ra trên đất liền sẽ gây hậu quả rất nghiêm trọng. Qua thời gian dầu sẽ ngấm xuống đất phía dưới không thể tự phân hủy được gây nhiễm độc cho môi trường đất. Từ đó gây ảnh hưởng đến quá trình vận chuyển các chất dinh dưỡng trong đất và quá trình sinh trưởng, phát triển của các sinh vật trong đất cũng như thực vật. Chiều cao của cây ở đất nhiễm dầu chỉ bằng từ 20 – 30% chiều cao cực đại của cây trên đất không bị nhiễm dầu (Atlas, 1995). Đất bị nhiễm dầu làm cho các sinh vật khó phát triển, cản trở quá trình hô hấp và trao đổi chất của chúng với môi trường. Vấn đề ô nhiễm dầu ở môi trường đất hay xảy ra ở các vịnh ven sông, biển và nơi xảy ra sự cố tràn dầu trên đất liền.

Đối với môi trường khí, các thành phần hydrocarbon nhẹ, lưu huỳnh, nitơ, v.v. trong dầu khi gặp ánh sáng, nhiệt độ bốc hơi lên sẽ gây ô nhiễm mùi, làm gia tăng thành phần khí nhà kính và các khí gây ô nhiễm môi trường không khí. Các động cơ sử dụng nhiên liệu từ dầu, trong quá trình sử dụng không thể chuyển hóa hết 100% do vậy dễ phát sinh khí thải VOC, CO_x, SO_x, v.v. gây ô nhiễm môi trường khí.

Co-enzym Q10

Co-enzym Q10 (CoQ10) là một hợp chất tan trong dầu, có bản chất giống vitamin và về mặt cấu tạo hóa học CoQ10 là một iso-pronit gồm 10 nối bên (Tian và cộng sự, 2010). Đây là một thành phần quan trọng và cần thiết trong hệ thống dẫn truyền điện tử trên màng sinh chất của sinh vật nhân sơ và có mặt trên màng trong ty thể của các sinh vật nhân chuẩn có vai trò là chất cho và nhận điện tử giữa phức hệ I/II và phức hệ III. CoQ10 có vai trò rất quan trọng trong rất nhiều phản ứng sinh hóa trong cơ thể con người, là chất chống oxy hóa, chống các gốc tự do cực mạnh trong các phản ứng trao đổi chất. Các nghiên cứu trên thế giới đã chỉ ra rằng, CoQ10 có vai trò rất quan trọng trong điều trị các bệnh về tim mạch, Parkinson, đặc biệt chúng còn có tác dụng phòng chống giảm cân cho các bệnh nhân mắc hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải (HIV/AIDS). Cũng giống như vitamin, CoQ10 là thành phần cần thiết có trong thực phẩm để điều trị bệnh. Tất cả các mô hoạt hóa cho quá trình trao đổi chất rất nhạy cảm với sự thiếu hụt CoQ10. Bên cạnh đó, người ta còn thấy rằng ngoài tuổi 20, hàm lượng CoQ10 ở con người được tạo ra ngày một giảm sút. Do vậy, CoQ10 là “thực phẩm tối cấp thiết” để duy trì tuổi trẻ. Ngày nay, CoQ10 đã được thương mại hóa thành thực phẩm chức năng tại Mỹ và Nhật Bản. Đồng thời, CoQ10 cũng có mặt trong nhiều sản phẩm làm đẹp chống lão hóa, chống ung thư da của nhiều hãng mỹ phẩm trên thế giới như Shiseido (Nhật Bản), Nivea (Đức), L'Oréal (Pháp), v.v. (Yen và Chiu, 2007).

Các nhà nghiên cứu đã đưa ra 3 phương pháp để tách chiết CoQ10, bao gồm: tách chiết từ các mô của động vật và thực vật; sinh tổng hợp hóa học; và lên men từ vi sinh vật (Kumar và cộng sự, 2011). Trong số các phương pháp này, lên men từ vi sinh vật được xem là có hiệu quả thương mại và sản phẩm CoQ10 được tạo thành an toàn cho con người nhất, đồng thời, giá thành lại rẻ nhất. Rất nhiều vi sinh vật có khả năng sinh CoQ10 như vi khuẩn (*Agrobacterium tumefaciens*, *Paracoccus denitrificans*, *Rhodobacter sphaeroides*, v.v.), nấm mốc (*Neurospora*, *Aspergillus*, v.v.), nấm men (*Candida*, *Rhodotorula*, *Saitoella*, v.v.). Chủng *A. tumefaciens* AU-55 sau khi được gây đột biến tạo ra 18mg/l CoQ10 sau 58 giờ nuôi cấy (Yoshida và cộng sự, 1998). Người ta thấy rằng, các chủng vi khuẩn tía tự nhiên (chưa gây đột biến) đã được chứng minh là những “nhà máy” “siêu” sản xuất CoQ10, đặc biệt trong số đó, chi *Rhodospirillum rubrum* được xem là có khả năng tạo ra hàm lượng CoQ10 cao nhất. Tuy nhiên, chủng *R. sphaeroides* KY-4113 đột biến đã được chứng minh có khả năng tạo ra 350mg/l CoQ10 trong điều kiện nuôi cấy hạn chế oxi. Chủng đột biến này có hiệu suất cao hơn chủng đột biến 3,6 lần (Yoshida và cộng sự, 1998). Hiện nay, sản xuất CoQ10 từ vi khuẩn nhất là từ vi khuẩn tía quang hợp đã được xem là xu hướng của nhiều nước trên thế giới nhằm đáp ứng nhu cầu về CoQ10 trong lĩnh vực y dược học. So với các nhóm vi sinh vật khác, vi khuẩn tía quang hợp được chú trọng hơn cả bởi ubiquinon là một thành phần không thể thiếu trong bộ máy quang hợp của chúng, đây là nơi thu nhận năng lượng từ ánh sáng thông qua hệ thống “anten” bacterioclorophin để tạo ATP, do đó quá trình sinh trưởng tạo sinh khối trong điều kiện quang hợp tỷ lệ thuận với hàm lượng ubiquinon (Lamichhane, 2012). Hơn nữa, vi khuẩn tía quang hợp có thể sử dụng các nguồn cơ chất C hữu cơ đơn giản và sử dụng năng lượng ánh sáng mặt trời để tạo sinh khối lớn ngay cả khi cường độ chiếu sáng thấp (3-5000 lux), nhờ vậy có thể thuận lợi cho quá trình sản xuất CoQ10.

Vi khuẩn tía quang hợp

Vi khuẩn tía quang hợp thuộc nhóm Proteobacteria và là nhóm vi khuẩn thủy sinh có khả năng sinh trưởng trong điều kiện kỵ khí bằng cách quang hợp nhưng không thải oxi như những đối tượng quang dưỡng khác. Khi được chiếu sáng, rất nhiều loài trong nhóm này có khả năng sinh trưởng quang tự dưỡng với CO₂ làm nguồn carbon hoặc sinh trưởng quang dị dưỡng với các chất hữu cơ làm nguồn carbon. Nhóm vi khuẩn này được phân bố rất rộng rãi trong tự nhiên, ngay cả những nơi có điều kiện khắc nghiệt như ở Nam Cực hay suối nước nóng, suối lưu huỳnh do chúng có các kiểu trao đổi chất rất linh hoạt trong các điều kiện sống trong môi trường khác nhau. Vi khuẩn tía quang hợp có sắc tố quang hợp là bacterioclorophin và carotenoit được định vị trên màng quang hợp – là phần nằm bên trong tế bào và tiếp nối với màng tế bào, quá trình quang hợp có bacterioclorophin không sản sinh ra oxi. Những năm gần đây nhóm vi khuẩn tía quang hợp có nhiều triển vọng ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau nhờ vào khả năng đặc biệt về trao đổi carbon và cố định nitơ phân tử (Scher và Proctor, 1960; Khanna và cộng sự, 1990; Imhoff, 1995; Ramana và cộng sự, 2012).

Vi khuẩn tía quang hợp là các tế bào Gram âm, đơn bào và chúng thường có các dạng

hình cầu, xoắn, gậy, phẩy. Ngoài ra, chúng cũng có thể tồn tại ở trạng thái chuỗi trong những điều kiện môi trường đặc biệt. Kích thước của các tế bào thường từ 0,3 – 6µm. Đa số các loài vi khuẩn tía quang hợp đều sinh sản bằng cách nhân đôi, một số loài có tế bào dinh dưỡng dạng phân cực thường sinh sản bằng cách nảy chồi. Khi sinh trưởng trong điều kiện quang hợp, dịch huyền phù tế bào thường có màu tía, đỏ, nâu, xanh. Sự khác nhau về màu sắc là do sự có mặt của các sắc tố quang hợp với khả năng hấp thụ ánh sáng ở các bước sóng khác nhau. vi khuẩn tía quang hợp bao gồm hai nhóm chính đó là: vi khuẩn tía quang hợp lưu huỳnh (là những vi khuẩn tía có khả năng hình thành giọt “S” bên trong tế bào) và vi khuẩn tía quang hợp không lưu huỳnh (là những vi khuẩn tía không có khả năng hình thành giọt “S” bên trong tế bào). Đây cũng là đặc điểm quan trọng để phân biệt hai nhóm vi khuẩn tía quang hợp này (Imhoff, 1995).

Hiện nay có hơn 25 chi vi khuẩn tía quang hợp lưu huỳnh đã được ghi nhận và được chia làm hai họ là Chromatiaceae (có giọt “S” lưu bên trong tế bào) và Ectothiorhodospiraceae (giọt “S” bên ngoài tế bào). Do cấu tạo và đặc tính của tế bào có chứa “S” nên họ Chromatiaceae có khả năng sinh trưởng với lưu huỳnh và các hợp chất khử lưu huỳnh. Ngoài ra, chúng còn có thể sử dụng các hợp chất hữu cơ chứa lưu huỳnh để làm nguồn cho điện tử trong quá trình quang hợp, quá trình oxi hóa này dẫn đến sự hình thành các hạt tiểu cầu của các nguyên tố lưu huỳnh lắng bên trong tế bào của chúng và sản phẩm cuối cùng được tạo ra là sunphat. Khác với họ Chromatiaceae thì họ Ectothiorhodospiraceae lại có giọt “S” nằm bên ngoài tế bào, chúng có khả năng sinh trưởng đồng thời theo cả hai kiểu là quang tự dưỡng và quang dị dưỡng. Khi được tiếp xúc với ánh sáng, giọt “S” được hình thành bên ngoài tế bào và nó được oxi hóa thành sunphua. Sinh trưởng của chúng phụ thuộc vào môi trường có nồng độ muối và độ pH thích hợp (Imhoff, 1995; Gibson và Harwood, 1995).

Nhóm vi khuẩn tía quang hợp không lưu huỳnh gồm họ Rhodospirillaceae có khoảng 20 chi và 37 loài và vi khuẩn tía hiếu khí. Ở điều kiện kỵ khí, tất cả các loài đều sinh trưởng theo kiểu không tích lũy “S” trong tế bào mà giải phóng vào môi trường và được oxi hóa đến sunphat. Chúng có thể sinh trưởng theo kiểu quang tự dưỡng CO₂ với phân tử hydro hoặc một số hợp chất khử của lưu huỳnh như sunphua, thio-sunphua. Còn ở trong điều kiện hiếu khí-tối hay vi hiếu khí-tối, nhiều loài có thể sinh trưởng hóa dị dưỡng và một số loài có thể sinh trưởng hóa tự dưỡng. Ví dụ như loài *Rhodobacter (Rb.) capsulatus* có thể sinh trưởng quang tự dưỡng với nguồn C là CO₂ hoặc các hợp chất hữu cơ, đồng thời có thể sinh trưởng trong tối nhờ quá trình hô hấp, lên men. Bởi vậy, vi khuẩn tía quang hợp là những loài có các kiểu sinh trưởng rất linh hoạt, nơi sống ưa thích của chúng là các thủy vực có hàm lượng chất hữu cơ cao và hàm lượng oxi hòa tan thấp (Imhoff, 1995; Gibson và Harwood, 1995).

Như vậy, có thể thấy, nhóm vi khuẩn tía quang hợp có vai trò rất quan trọng trong việc phân hủy và chuyển hóa các hợp chất hydrocarbon. Trên thế giới, Scher và Proctor (năm 1960) lần đầu tiên đã phát hiện ra khả năng sử dụng axit benzoic là nguồn C duy nhất ở loài *Rhodopseudomonas (R.) palustris* trong điều kiện kỵ khí ngoài sáng. Khả năng chuyển hóa

axit benzoic ở *R. palustris*, *Rhodospirillum* (Rs.) *fulvum*, *Rhodocyclus* (Rc.) *purpureus* là đặc tính đặc trưng để phân biệt chúng với các loài khác trong cùng một chi. Khả năng quang chuyển hóa hợp chất thơm cũng được phát hiện ở một số loài khác như *Rc. gelatinosus*, *Rhodomicrobium* (Rm.) *vannielli*, *Rb. capsulatus*, *Rb. phaeoides*, *Rs. rubrum*, *Rhodoblastus* (Rbl.) *acidopphilus* (trước đây gọi là *R. acidophila*) và *Rb. blastica*. Tuy nhiên, những nghiên cứu về quá trình quang chuyển hóa các hợp chất thơm chỉ được tiến hành ở *R. palustris* và loài này đã được sử dụng như mô hình nghiên cứu quá trình chuyển hóa các hợp chất thơm trong điều kiện kỵ khí (Harwood và Gibson, 1988; Gibson và Harwood, 1995; Oda và cộng sự, 2005; Harwood, 2009; McKinlay và Harwood, 2010; Ramana và cộng sự, 2012).

Chi Rhodopseudomonas và những đặc tính của nó

Trong tự nhiên, vi khuẩn tía quang hợp là nhóm vi khuẩn có khả năng phân hủy nhiều hợp chất hydrocarbon thơm có cấu trúc khác nhau trong điều kiện kỵ khí ngoài sáng (Sikdar và Irvine, 1997; Gottschal, 1994). Trong số các chi vi khuẩn tía quang hợp, chi *Rhodopseudomonas* được xem là chi có khả năng sử dụng các nguồn carbon linh hoạt nhất (Mutharasaiah và cs., 2010). Chi này có khả năng phân hủy nhiều loại hợp chất hydrocarbon thơm trong cả điều kiện hiếu khí và kỵ khí. Chi *Rhodopseudomonas* thuộc họ Rhodospirillaceae và là nhóm vi khuẩn tía quang hợp không lưu huỳnh. Năm 1988, Harwood và Gibson đã công bố 4 chủng *R. palustris* CGA001, CGC023, CGD052 và CGA033 có khả năng phân hủy và chuyển hóa nhiều hợp chất hydrocarbon thơm chứa vòng phenol và các nhóm hydroxy khi nuôi cấy ở điều kiện có oxi và không có oxi. Chủng *R. palustris* WS17 và DCP3 được chứng minh là có thể quang chuyển hóa 3-chlorobenzoat và sử dụng hợp chất này như nguồn carbon duy nhất. Chi *Rhodopseudomonas* được chứng minh là có thể sinh trưởng tốt trên các nguồn hợp chất hydrocarbon thơm có chứa nhóm halogen khác như 2-chlorobenzoat, 4-chlorobenzoat hoặc 3,5-dichlorobenzoat (Kamal và Wyndham, 1990; Van der Woude và cs., 1994). Năm 2002, Oda và cộng sự đã công bố một số loài vi khuẩn tía quang hợp có khả năng phân hủy axit benzoic trong đó có loài *R. palustris* (Oda và cộng sự, 2002). Năm 2004, Larimer và cộng sự đã công bố toàn bộ hệ gen của loài *R. palustris* và khẳng định loài này có khả năng phân hủy và chuyển hóa các hợp chất hydrocarbon thơm (Larimer và cộng sự, 2004). Harwood (2009) đã chứng minh chi *Rhodopseudomonas* có khả năng phân hủy và chuyển hóa nhiều hợp chất hydrocarbon thơm như các hợp chất axit chlorobenzoic và toluen. Tác giả đã tách chiết được enzym benzoyl-CoA-reductaza tham gia vào quá trình phân cắt vòng benzen của các hợp chất hydrocarbon thơm (Harwood, 2009). Tuy nhiên cho tới nay, chưa có nhiều công bố về khả năng tạo màng sinh học của vi khuẩn tía quang hợp nói chung và chi *Rhodopseudomonas* nói riêng. Năm 2016, Venkidusamy và Megharaj đã công bố chủng *R. palustris* RP2 phân lập tạo màng sinh học trên cực âm của hệ thống xử lý hóa lý vi sinh vật. Chủng này vừa có khả năng tạo màng vừa có khả năng phân hủy dầu diezen với hiệu suất phân hủy là 47,2±2,7%, hàm lượng dầu ban đầu là 80mg/l.

Ngoài khả năng phân hủy và chuyển hóa các hợp chất hydrocarbon có trong dầu mỏ, chi *Rhodopseudomonas* còn được biết đến với khả năng tích lũy CoQ10. Sakato và cộng sự (1992) đã công bố loài *Rb. sphaeroides* có khả năng tích lũy CoQ10 trong điều kiện nuôi cấy vi hiếu khí tối. Năm 1998, Yoshida và cộng sự đã chứng minh chủng *Rb. sphaeroides* KY-4113 có khả năng tạo ra 350mg/l CoQ10 trong điều kiện nuôi cấy hạn chế oxy. Lượng CoQ10 tạo thành chiếm 8,7mg/g sinh khối khô của tế bào vi khuẩn. Wu và cộng sự (2003) đã cho thấy, trong điều kiện nuôi cấy trong bình lên men 7 lít hiếu khí có kiểm soát với nồng độ oxy hòa tan là 40% thì chi *Rhodopseudomonas* có thể tạo ra tối đa là 32,1mg/l. Yen và Chiu (2007) đã chứng minh được loài *Rb. sphaeroides* có khả năng tăng hiệu suất sinh tổng hợp CoQ10 trong điều kiện nuôi cấy hiếu khí - tối. Năm 2008, Jiang và Yu đã công bố hiệu suất tích lũy CoQ10 của chủng *R. palustris* J001 tăng lên khi nồng độ oxy hòa tan trong hai pha của quá trình lên men lần lượt là 45% cho pha đầu và 15% cho pha sau. So với lên men 1 pha thì quá trình lên men hai pha này đã làm tăng đáng kể lượng CoQ10 – đạt 89,1mg/l (tăng 585%). Như vậy, có thể thấy rằng chi *Rhodopseudomonas* là một trong số các chi vi khuẩn tía quang hợp có khả năng tích lũy CoQ10 cao và có thể ứng dụng trong tách chiết hợp chất này để làm thực phẩm chức năng hoặc chất chống oxy hóa.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn tía quang hợp *Rhodopseudomonas* sp. PL1 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 1270 bp (SEQ ID NO: 1) và được đăng ký trên GenBank với mã số MH430894, và có các đặc tính sau:

có khả năng tạo màng sinh học khi được nuôi cấy trong môi trường DSMZ-27, điều kiện nuôi cấy ở pH 4,5-9, nồng độ muối NaCl 0-40‰, cường độ chiếu sáng 4800 lux, nhiệt độ 26-28°C, giá trị OD ở bước sóng 570 nm lên tới 28,67±0,17;

có khả năng phân hủy dầu diezen là 70,64% tương ứng với nồng độ ban đầu là 50000mg/l,

có khả năng phân hủy phenol là 98,1%; piren 99,5%; naphtalen 96,4%; và toluen là 98% với nồng độ ban đầu của từng hợp chất này là 250ppm; và

tích lũy Co-enzym Q10 với hàm lượng 45 mg/lít.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1. thể hiện hình thái khuẩn lạc của chủng vi khuẩn tía quang hợp PLC1.

Fig. 2. thể hiện hình thái tế bào của chủng PLC1 được nuôi cấy trên môi trường DSMZ-27 thạch dưới kính hiển vi điện tử với độ phóng đại 30000 lần.

Fig. 3. thể hiện phổ hấp thụ dịch huyền phù tế bào nguyên chủng PLC1.

Fig. 4 thể hiện sản phẩm PCR nhân lên từ ADN tổng số của chủng PLC1 bởi cặp mồi 27F/1527R thông qua điện di trên gel agarosa 1%. 1-PLC1; 2- LC5; 3-FO2; M-marker 1kb; (-) đối chứng âm không có vi sinh vật.

Fig. 5. thể hiện cây phát sinh chủng loài của chủng vi khuẩn PLC1.

Fig. 6. thể hiện khả năng tạo màng sinh học bởi chủng PLC1. (C): Đối chứng âm, không có vi khuẩn; (P23): đối chứng dương, là chủng có khả năng tạo màng sinh học (Yamaga và cs., 2010)

Fig. 7 thể hiện ảnh hưởng của muối đến khả năng tạo màng sinh học của chủng PLC1.

Fig. 8. thể hiện ảnh hưởng của pH đến khả năng tạo màng sinh học của chủng PLC1.

Fig. 9. thể hiện ảnh hưởng của ánh sáng đến khả năng tạo màng sinh học của chủng PLC1.

Fig. 10. thể hiện ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng tạo màng sinh học của chủng PLC1.

Fig. 11. thể hiện khả năng sinh trưởng trên nguồn cơ chất dầu diezen của chủng PLC1.

Fig. 12. thể hiện kết quả sắc kí bản mỏng (TLC) của Co-enzym Q10 do chủng PLC1 tích lũy.

Fig. 13. thể hiện sắc kí đồ của Co-enzym Q10 do chủng PLC1 tích lũy.

Fig. 14. thể hiện hình ảnh phổ UV của Co-enzym Q10 do chủng PLC1 tích lũy.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn tía quang hợp *Rhodopseudomonas* sp. PLC1 thuần khiết về mặt sinh học phân lập từ mẫu đất nhiễm dầu lấy tại Nha Trang, Khánh Hòa, Việt Nam.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn tía quang hợp *Rhodopseudomonas* sp. PLC1 được nuôi cấy để tạo màng sinh học. Sáng chế cũng đề cập tới khả năng phân hủy phenol, piren, naphtalen, toluen và phân hủy dầu diezen của chủng PLC1. Đồng thời, sáng chế cũng đề cập tới khả năng sinh tổng hợp CoQ10 của chủng PLC1.

A. Phân lập và định danh chủng vi khuẩn tía quang hợp *Rhodopseudomonas* sp. PLC1

Mẫu đất nhiễm dầu thu được từ Nha Trang, Khánh Hòa 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 đặc hiệu DSMZ-27 có cải tiến bằng cách thay thế nguồn carbon là axetat và succinat bằng các nguồn hydrocarbon khác nhau như dầu diezen, phenol, naphtalen, v.v. Môi trường DSMZ-27 cải tiến được dùng trong quá trình phân lập được đề cập ở đây là môi trường có thành phần như sau:

- Cao men	: 0,3 g/L;	- KH ₂ PO ₄	: 0,5 g/l;
- K ₂ HPO ₄	: 1 g/l;	- MgSO ₄ .7H ₂ O	: 0,4 g/l;
-Vi lượng SL ₆	: 1 ml/l;	- CaCl ₂ .2 H ₂ O	: 0,05 g/l;
- Nước cất	: tới 1000 ml;	- NH ₄ Cl	: 0,4 g/l;
- NaCl	: 20 g/l;	-Dung dịch vitamin B ₁₂	: 0,4 ml/l;
- Aga	: 20 g/l;	- pH	: 6,8;
- Dung dịch vi lượng SL ₆ có các thành phần sau:			
HCl (25%)	: 6,5 ml;	FeCl ₂ .4H ₂ O	: 1,5 g
H ₃ BO ₃	: 0,3 g;	MnCl ₂ .2H ₂ O	: 0,03 g
CoCl ₂ .6H ₂ O	: 0,2 g;	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	: 0,1 g
CuCl ₂ .2H ₂ O	: 17 mg;	NiCl ₂ .6H ₂ O	: 24 mg
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	: 36 mg;	H ₂ O	: 993 ml

- Dung dịch vitamin B₁₂: 10 mg trong 100 ml nước được khử trùng bằng màng lọc và bổ sung vào môi trường trước khi sử dụng.

Môi trường DSMZ-27 khử trùng ở 121°C trong 30 phút.

Kết quả đã phân lập được chủng vi khuẩn tía quang hợp PLC1. Phân loại sơ bộ chủng vi khuẩn PLC1 dựa vào hình thái khuẩn lạc và hình thái tế bào của chủng vi khuẩn này trên môi trường nuôi cấy dạng thạch (Fig. 1). Mô tả chi tiết hình thái khuẩn lạc và tế bào của chủng PLC1 như sau: khuẩn lạc có hình tròn, bề mặt lồi, trơn, bóng, màu đỏ tía, rìa trong, d = 1-2,5 mm. Dịch huyền phù tế bào có màu đỏ tía. Tế bào của chủng có dạng hình que, sinh sản bằng cách nảy chồi, không quan sát thấy giọt lưu huỳnh tích lũy trong tế bào. Hình thái tế bào thể hiện trên Fig 2. Dựa vào các đặc điểm về khuẩn lạc, dịch huyền phù, hình thái tế bào có thể xếp chủng này vào chi *Rhodopseudomonas*.

Đặc trưng cơ bản nhất để phân biệt vi khuẩn tía quang hợp với các vi sinh vật quang dưỡng khác là khả năng tổng hợp các loại bacterioclorophin (Bchl) khi được chiếu sáng. Chủng PLC1 được nuôi cấy trên môi trường DSMZ-27 dịch thể. Sau 4 ngày nuôi cấy, chủng PLC1 đạt tới giữa pha sinh trưởng (pha log). Dịch huyền phù tế bào được tiến hành đo phổ hấp thụ trên máy quang phổ thể hiện trên Fig. 3. Kết quả cho thấy, phổ hấp thụ của dịch huyền phù tế bào của chủng PLC1 có cực đại hấp thụ bước sóng 807, 865 - 880nm. Cực đại hấp thụ dịch huyền phù tế bào của chủng PLC1 nằm trong vùng 800 - 900nm là đặc trưng phổ hấp thụ của bacterioclorophin a trong tế bào nguyên (Plennig & Trueper, 1992).

Để sơ bộ phân loại chủng PLC1 chúng tôi còn đánh giá khả năng sinh trưởng trên một số nguồn carbon được sử dụng mang tính chất đặc trưng cho loài có vai trò để phân loại vi khuẩn. Để xác định khả năng sử dụng một số nguồn carbon cho sinh trưởng, chủng PLC1 được nuôi cấy trong môi trường DSMZ-27 dịch thể và trên đĩa thạch, trong đó axetat được lần lượt thay thế bằng một số nguồn carbon khác với cùng nồng độ 1 g/l, thí nghiệm được tiến hành ở điều kiện kỵ khí - sáng. Khả năng sinh trưởng của chủng được ghi nhận sau 5 ngày nuôi cấy và so sánh với một số loài thuộc chi *Rhodopseudomonas* (Kumar và cộng sự, 2013). Trên Bảng 2 trình bày kết quả so sánh khả năng sử dụng các nguồn carbon khác nhau của chủng PLC1 với một số loài thuộc chi *Rhodopseudomonas*.

Kết quả trên Bảng 2 cho thấy, PLC1 có tế bào hình que với chiều rộng từ 0,5-0,6µm, chiều dài từ 1,7-1,8µm; sinh trưởng bằng cách nảy chồi trực tiếp từ tế bào mẹ; màu sắc dịch nuôi cấy có màu đỏ tía. Có khả năng sinh trưởng ở dải pH từ 4,5-9,0 và tối ưu ở 4,5-5,5. Chủng PLC1 thuộc nhóm ưa nhiệt, sinh trưởng tối ưu ở 26-28°C và giải nhiệt độ sinh trưởng là từ 14-45°C. PLC1 có thể sinh trưởng trong môi trường với nồng độ NaCl từ 0-4%. Chủng này có khả năng sinh trưởng trên môi trường có chứa axetat, focmat, succinat, xitrat, glycerol, glucoza, metanol, etanol và benzoat. Chúng không sinh trưởng được trên môi trường chứa glutamat, malat, socbitol, propanol và tactat. Khả năng sử dụng nguồn acetat, succinat của chủng PLC1 cũng tương tự như các loài thuộc chi *Rhodopseudomonas*. Trong số các loài

thuộc chi này, có hai loài là *R. palustris*, *R. rhenobacensis* và một số chủng thuộc loài *R. acidophila* có khả năng sử dụng fomat làm nguồn C cho sinh trưởng. Tuy nhiên, loài *R. acidophila* sinh trưởng tốt trên môi trường axit (Kumar và cộng sự, 2013) và *R. rhenobacensis* có khả năng sử dụng tactat làm nguồn carbon (Hougardy *et al.*, 2000). Đặc biệt chủng PLC1 có khả năng sinh trưởng trên môi trường chứa nguồn carbon là benzoat. Theo một số nghiên cứu cho thấy trong số các loài thuộc chi *Rhodopseudomonas* chỉ có loài *R. harwoodiae* có khả năng sinh trưởng hiếu khí tối, và sinh trưởng trên các nguồn carbon benzoat, succinat, ... (Ramada và cộng sự, 2012). Đồng thời, chủng PLC1 có nhiều điểm tương đồng về các đặc tính sinh lý sinh hóa khác với loài *R. harwoodiae*.

Bảng 2. So sánh khả năng sử dụng một số nguồn C của chủng PLC1 với một số loài thuộc chi Rhodopseudomonas (Ramada và cộng sự, 2012; Kumar và cộng sự, 2013)

Đặc điểm	PLC1	<i>R. harwoodiae</i>	<i>R. parapalustris</i>	<i>R. pseudopalustris</i>	<i>R. palustris</i>	<i>R. faecalis</i>	<i>R. rhennobacensis</i>
Nguồn phân lập	Bùn nhiễm dầu	Trầm tích nước mặn	Đất	Đất, nước ao hồ	Đất, bùn, nước ao hồ	Phân gà	Ao phú dưỡng
Hình dạng tế bào	Hình que	Hình que	Hình que	Hình que	Hình que, đầu tròn	vibrios	Hình que
Chiều tế rộng bào (µm)	0,5- 0,6	0,8 -1,0	0,8 -1,2	0,5-1,0	0,4-1,0	0,6- 0,8	0,4-0,6
Chiều dài tế bào (µm)	1,7-1,8	2,0-3,5	2,0-4,0	2,0-6,0	1,5-3,0	1,0- 2,0	1,5-2,0
Hình thức nảy chồi	Trực tiếp	Trực tiếp	Phân nhánh	Phân nhánh	Trực tiếp	Phân nhánh	Phân nhánh
Màu sắc dịch nuôi cấy	Đỏ tía	Đỏ nâu	Đỏ nâu	Đỏ nâu	Đỏ nâu	Đỏ	Đỏ
pH cho sinh trưởng: - Tối ưu - Dải pH	4,5- 5,5 4,5- 9,0	6,0- 7,5 5,0 -9,0	6,5 -7,0 6,0 -9,0	6,0- 8,0 7,0	6,5 -8,5 6,0 -9,0	7,0 6,5- 7,0	5,5 5,0- 7,0
Nhiệt độ cho sinh trưởng: - Tối ưu - Dải nhiệt độ	26 – 28 14 - 45	30 25-40	30 15 - 35	30 20 -35	30 25- 40	30 25 -35	30 25 -35
Sinh trưởng hiếu khí tối	+	+	+	+	+	-	+
Sinh trưởng hóa tự dưỡng với chất cho điện tử là	-	-	-	-	H ₂ , thiosulfat, sulfat	H ₂ , NaHCO ₃	-
Nhân tố sinh trưởng		PABA	Thiamin, PABA	PABA	PABA	Thiamin	PABA
Nguồn carbon cho sinh trưởng							
Axetat	+	-	+	-	-	+	-
Succinat	+	+	+	+	+	+	+
Focmat	+/-	-	-	+	-	-	+

Tactat	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Xitrat	+	KXD	KXD	KXD	KXD	KXD	KXD	KXD	KXD
Glycerol	+	+/-	+	+	+	+	-	+	+
D-Glucoza	+/-	-	+/-	+	+	+	+	-	-
Metanol	+	KXD	KXD	KXD	KXD	KXD	KXD	KXD	KXD
Etanol	-	-	-	+	+	+	-	+	+
Benzoat	+	+	-	+	+	+	-	-	-
Glutamat	-	-	-	+	+	+	-	-	-
Malat	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Socbitol	-	-	+	+	+	+	NA	-	-
Propanol	-	-	-	+	+	+	NA	-	-
Sinh trưởng quang tự dưỡng	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(KXD: Không xác định; (+), sinh trưởng tốt; (+/-), sinh trưởng yếu; (-), không sinh trưởng)

Từ các điểm về hình thái tế bào, sắc tố quang hợp và các đặc điểm sử dụng nguồn carbon cho sinh trưởng, dựa vào khóa phân loại của Bergey năm 2012, 2013, chủng PLC1 có thể được xếp vào chi *Rhodopseudomonas* (Ramada và cộng sự, 2012; Kumar và cộng sự, 2013).

Thực hiện phân loại chủng vi khuẩn bằng cách xác định trình tự đoạn gen 16S rARN với cặp mồi xuôi 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3' và mồi ngược 5'-ACGGCTACCTTGTACGACT -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 PLC1 (Fig. 4) đã được xác định trình tự có kích thước 1270 nucleotit và có mức độ tương đồng 99% với trình tự tương ứng của chủng *Rhodopseudomonas harwoodiae* JA531T (mã số FN813512). Trình tự đoạn gen của chủng PLC1 đã được đăng ký trên Genbank với mã số MH430894. Mối quan hệ phát sinh chủng loài của chủng PLC1 với một số chủng vi khuẩn đã được xây dựng và thể hiện trên Fig. 5.

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 PLC1 thuộc chi *Rhodopseudomonas* và được đặt tên là *Rhodopseudomonas* sp. PLC1.

Tên chủng “PLC1”, trong phạm vi bản mô tả này, vẫn được sử dụng để chỉ chủng *Rhodopseudomonas* sp. PLC1 vừa được định tên trên đây.

Chủng *Rhodopseudomonas* sp. PLC1 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.

B. Phân tích khả năng tạo màng sinh học của chủng *Rhodopseudomonas* sp. PLC1

Chủng PLC1 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 PLC1 được nuôi cấy trên môi trường DSMZ-27 và bổ sung một số nhân tố có khả năng sẽ ảnh hưởng đến khả năng tạo màng sinh học bởi chủng PLC1. Môi trường DSMZ-27 có thành phần như đã nêu ở trên.

Khả năng tạo màng của chủng PLC1 được xác định như sau: nuôi cấy chủng PLC1 trên môi trường DSMZ-27, sau 3 ngày nuôi cấy trong điều kiện kỵ khí - sáng, đem ly tâm loại dịch thu sinh khối (ly tâm ở 5000 vòng/phút, 4 °C trong 10 phút và rửa bằng nước cất vô trùng 2 lần với thể tích tương ứng và loại bỏ hoàn toàn môi trường nuôi cấy. Bổ sung nước cất vô trùng sau lần ly tâm cuối cùng và đánh tan sinh khối. Tiến hành pha loãng tới hạn và đo OD ở bước sóng 800 nm, pha loãng dịch sinh khối bằng nước cất để đạt OD là 0,3. Bổ sung 10 µl dịch này vào các eppendorf 1,5 ml chứa 990 µl môi trường DSMZ- 27. Tiến hành đánh giá khả năng tạo màng của chủng PLC1 sau 3 – 5 ngày nuôi cấy. Kết quả được thể hiện trong Fig. 6.

Đánh giá khả năng tạo màng bằng cách dùng pipetman hút nhẹ dịch nuôi cấy (không làm vỡ màng), rửa bằng 1 ml nước cất vô trùng rồi hút ra lặp lại lần nữa. Thành phần và thể tích các chất trong phản ứng xác định khả năng tạo màng như sau:

Thành phần phản ứng	Mẫu đối chứng (ml)	Mẫu thí nghiệm (ml)
Tím tinh thể 0,1% (để 10 phút)	1	1
Rửa với nước cất vô trùng (2 lần)	1	1
Axit axetic (33%)	1	1

Dung dịch thu được đảo trộn, pha loãng và đo ở bước sóng 570 nm.

Tiến hành đánh giá ảnh hưởng của một số nhân tố như pH, nhiệt độ, nồng độ muối để từ đó xác định được các điều kiện thích hợp cho việc sinh tổng hợp màng của chủng PLC1 theo sáng chế.

Chủng PLC1 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 chủng. Thí nghiệm được tiến hành dưới điều kiện kỵ khí, có chiếu sáng. Sau 5 ngày nuôi cấy khả năng tạo màng ở các nồng độ muối khác nhau được trình bày ở Bảng 3 và Fig 7.

Bảng 3: Ảnh hưởng của nồng độ NaCl đến khả năng tạo màng của các chủng PLC1

Nồng độ muối (‰)	0	5	10	15	20	25	30	35	40
Giá trị OD ₅₇₀	27,65 ±0,2	28,2± 0,1	29,10± 0,2	28,01 ±0,1	27,23± 0,2	27,5± 0,1	28,16± 0,2	28,26± 0,3	27,9± 0,1

Kết quả ở Bảng 3 cho thấy, chủng PLC1 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 khảo sát pH thích hợp cho sự tạo màng sinh học của chủng PLC1 chúng tôi đã tiến hành nuôi cấy trong môi trường DSMZ-27 với pH khác nhau từ 4-9, dưới điều kiện kỵ khí có chiếu sáng, thí nghiệm được tiến hành lặp lại ba lần, sau 5 ngày nuôi cấy, tiến hành đánh giá khả năng tạo biofilm của chủng PLC1, kết quả được trình bày trên Bảng 4 và Fig. 8.

Bảng 4: Ảnh hưởng của pH đến khả năng tạo màng của chủng PLC1

pH	4	4,5	5	5,5	6	6,5	7	7,5	8	8,5	9
OD ₅₇₀	6,5± 0,12	27,33± 0,15	27,00± 0,19	26,8± 0,20	26,66± 0,17	26,65± 0,13	26,00± 0,19	26,30± 0,18	26,16± 0,20	26,50± 0,15	25,8± 0,11

Kết quả từ Bảng 4 cho thấy: chủng PLC1 có khả năng tạo màng tốt từ pH 4,5-9. Với kết quả thu được chúng tôi có thể ứng dụng chủng PLC1 để tạo màng xử lý ô nhiễm dầu trong điều kiện pH từ 4,5 đến 9 mà không phải điều chỉnh pH của môi trường.

Ánh sáng là một trong những yếu tố quan trọng đối với nhóm sinh vật quang hợp trong đó có nhóm vi khuẩn tía quang hợp. Để xác định nhu cầu ánh sáng để chủng PLC1 sinh trưởng và tạo màng, chúng tôi tiến hành thí nghiệm nuôi chủng PLC1 trên môi trường DSMZ- 27 ở các cường độ sáng khác nhau từ 0 – 6000lux. Sau 5 ngày nuôi cấy khả năng tạo màng ở các cường độ sáng khác nhau được trình bày trên Bảng 5 và Fig. 9.

Bảng 5. Khả năng tạo màng của các chủng PLC1 ở các điều kiện ánh sáng khác nhau

Cường độ chiếu sáng (lux)	6000	4800	3600	2400	1200	0
OD ₅₇₀	27,83±0,2	28,0±0,1	27,66±0,2	27,56±0,2	27,1±0,26	10,8±0,2

Kết quả cho thấy các chủng PLC1 có khả năng tạo màng tốt khi được chiếu sáng ở khoảng cường độ từ 1200 – 6000lux trong đó, có khả năng tạo màng cao nhất ở cường độ sáng 4800 lux. Ở điều kiện không có chiếu sáng, chủng PLC1 vẫn có khả năng tạo màng nhưng kém hơn nhiều khi có chiếu sáng. Như vậy, chủng PLC1 có nhu cầu được chiếu sáng để sinh trưởng, quang hợp và tạo màng nhưng ở mức độ không cao (1200 – 6000lux). Do vậy, có thể ứng dụng chủng PLC1 để xử lý ô nhiễm dầu ngay cả ở những nơi có cường độ chiếu sáng thấp.

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 14-16°C, 26-28°C, 40-45°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 PLC1. 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 6 và Fig. 10.

Bảng 6. Khả năng tạo màng của chủng PLC1 ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau

Khoảng nhiệt độ (°C)	14 – 16	26 - 28	40 - 45	Đối chứng
OD ₅₇₀	27,26±0,20	27,67±0,17	27,03±0,25	19,1±0,20

Từ kết quả trên Bảng 6 cho thấy chủng PLC1 có khả năng tạo màng ở phổ nhiệt độ khá rộng từ 14 – 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 PLC1 có khả năng tạo màng tốt ở các khoảng nhiệt độ thấp 14 – 16°C (nhiệt độ trung bình mùa đông) và nhiệt độ cao 40 - 45 °C (nhiệt độ trung bình mùa hè). Như vậy, chủng PLC1 có thể ứng dụng để tạo màng xử lý ô nhiễm dầu ở cả mùa đông và mùa hè. Đồng thời, kết quả tạo màng sinh học của chủng PLC1 cao hơn rất nhiều so với chủng đối chứng dương là chủng *Acinetobacter calcoaceticus* P23 - chỉ đạt 19,1±0,20 (Yamada và cộng sự, 2010).

C. Phân tích khả năng phân hủy dầu diezen và một số hợp chất vòng thơm của chủng PLC1

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 *Rhodopseudomonas* sp. PLC1 có khả năng tạo màng sinh học với nồng độ màu ban đầu là 1, 3, 5, 7, 9 và 10% tương đương với 5000, 15000, 25000, 35000, 45000 và 50000 ppm.

Chủng vi khuẩn sau khi phân lập được nhân giống trong các lọ hình trụ thể tích 10 - 100 ml. Môi trường sử dụng trong quá trình nhân giống này là DSMZ-27 cải tiến, trong đó nguồn carbon được thay thế bằng nguồn dầu diezen có thành phần như sau:

KH₂PO₄ : 0,5 g/l; - MgSO₄.7H₂O : 0,4 g/l;

K_2HPO_4	: 1 g/l;	- $CaCl_2.2 H_2O$	: 0,05 g/l;
Cao men	: 0,3 g/L;	- NH_4Cl	: 0,4 g/l ;
Vi lượng SL_6	: 1 ml/l;	-Dung dịch vitamin B_{12}	: 0,4 ml/l;
$NaCl$	: 20 g/l;	-pH	: 6,8;
Vi lượng SL_6	: 1 ml/l;	-Nước cất	:tối 1000ml;
Dầu diezen	: 1, 3, 5, 7, 9, 10%		

- Dung dịch vi lượng SL_6 có các thành phần sau:

HCl (25%)	: 6,5 ml;	$FeCl_2.4H_2O$	:1,5 g
H_3BO_3	: 0,3 g;	$MnCl_2.2H_2O$	:0,03 g
$CoCl_2.6H_2O$	: 0,2 g;	$ZnSO_4. 7H_2O$	:0,1 g
$CuCl_2.2H_2O$	: 17 mg;	$NiCl_2.6H_2O$	:24 mg
$Na_2MoO_4.2H_2O$	: 36 mg;	H_2O	:993 ml

Môi trường DSMZ-27 cải tiến được khử trùng ở $121^\circ C$ 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 10^9 CFU/ml) tiến hành nuôi ở điều kiện kỵ khí, chiếu sáng bằng đèn sợi đốt, nhiệt độ nằm trong khoảng $28 \pm 2^\circ C$, trong thời gian 14 ngày. Kết quả được trình bày trên Bảng 7.

Kết quả cho thấy: *Rhodopseudomonas* sp. PLC1 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 *Rhodopseudomonas* sp. PLC1 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 PLC1 chúng tôi lựa chọn nồng độ 10% đã gửi mẫu đi phân tích khả năng phân hủy dầu diezen PLC1 bằng phương pháp phân tích khối lượng ở Viện Hóa công nghiệp, Bộ Công thương. Kết quả cho thấy sau 14 ngày nuôi cấy, màng sinh học do chủng *Rhodopseudomonas* sp. PLC1 tạo thành đã có khả năng xử lý là 70,64% tương ứng với nồng độ ban đầu là 50000mg/l.

2. Phân tích khả năng phân hủy phenol

Đối với nguồn các hợp chất hydrocarbon thơm như phenol, để đánh giá khả năng phân hủy phenol của màng sinh học bởi chủng *Rhodopseudomonas* sp. PLC1 các tác giả tiến hành thí nghiệm trên môi trường DSMZ -27 cải tiến, với nồng độ phenol ban đầu 50, 100, 150, 200, 250, 300ppm.

Lượng giống ban đầu được cấp vào môi trường là 10% (mật độ tế bào trong các bình nuôi giống đạt mật độ khoảng 10^9 CFU/ml) tiến hành nuôi ở điều kiện kỵ khí, chiếu sáng bằng đèn sợi đốt, nhiệt độ nằm trong khoảng $28 \pm 2^\circ C$, trong thời gian 14 ngày. Kết quả được trình bày trên Bảng 7.

Kết quả thu được cho thấy chủng *Rhodopseudomonas* sp. PLC1 có khả năng sinh trưởng khá tốt trên dải nồng độ phenol từ 50 – 250 ppm, Tuy nhiên, khi nồng độ càng cao sinh trưởng của chủng *Rhodopseudomonas* sp. PLC1 giảm đi, ở nồng độ 300 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 PLC1, nồng độ 250 ppm được lựa chọn để phân tích khả năng phân hủy phenol. Kết quả cho thấy sau 14 ngày nuôi cấy, màng sinh học do chủng *Rhodopseudomonas* sp. PLC1 tạo thành đã có khả năng xử lý là 98,1 %.

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 *Rhodopseudomonas* sp. PLC1, chúng tôi tiến hành thí nghiệm trên môi trường DSMZ-27 cải tiến, với nồng độ piren ban đầu 50, 100, 150, 200, 250, 300 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 10^9 CFU/ml) tiến hành nuôi ở điều kiện kỵ khí, chiếu sáng bằng đèn sợi đốt, nhiệt độ nằm trong khoảng $28 \pm 2^\circ\text{C}$, trong thời gian 14 ngày. Kết quả được trình bày trên Bảng 7.

Kết quả thu được cho thấy chủng *Rhodopseudomonas* sp. PLC1 có khả năng sinh trưởng khá tốt trên dải nồng độ piren từ 50 – 250 ppm. Tuy nhiên, ở nồng độ càng cao thì sinh trưởng càng giảm và đến nồng độ 300 ppm chủng này sinh trưởng kém hơn. Để đánh giá chính xác về khả năng phân hủy piren của màng sinh học chủng *Rhodopseudomonas* sp. PLC1, chúng tôi lựa chọn nồng độ 250 ppm để phân tích khả năng phân hủy piren. Kết quả cho thấy sau 14 ngày nuôi cấy, màng sinh học do chủng *Rhodopseudomonas* sp. PLC1 tạo thành đã có khả năng xử lý là 99,5 %.

4. Phân tích khả năng phân hủy naphtalen

Đối với nguồn naphtalen, để đánh giá khả năng phân hủy naphtalen bởi chủng *Rhodopseudomonas* sp. PLC1 có khả năng tạo màng sinh học với nồng độ màu ban đầu 50, 100, 150, 200, 250 và 300ppm.

Lượng giống ban đầu được cấp vào môi trường là 10% (mật độ tế bào trong các bình nuôi giống đạt mật độ khoảng 10^9 CFU/ml) tiến hành nuôi ở điều kiện kỵ khí, chiếu sáng bằng đèn sợi đốt, nhiệt độ nằm trong khoảng $28 \pm 2^\circ\text{C}$, trong thời gian 14 ngày. Kết quả được trình bày trên Bảng 7.

Kết quả thu được cho thấy chủng *Rhodopseudomonas* sp. PLC1 có khả năng sinh trưởng khá tốt trên dải nồng độ naphtalen từ 50 – 250ppm. Để đánh giá chính xác về khả năng phân hủy naphtalen của màng sinh học chủng *Rhodopseudomonas* sp. PLC1, chúng tôi lựa chọn nồng độ 250ppm để phân tích khả năng phân hủy naphtalen. Kết quả cho thấy sau 14 ngày nuôi cấy, màng sinh học do chủng *Rhodopseudomonas* sp. PLC1 tạo thành đã có khả năng xử lý là 96,4%.

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 *Rhodopseudomonas* sp. PLC1, chúng tôi tiến hành thí nghiệm trên môi trường DSMZ-27 cải tiến, với nồng độ toluen ban đầu 50, 100, 150, 200, 250, 300ppm.

Lượng giống ban đầu được cấy vào môi trường là 10% (mật độ tế bào trong các bình nuôi giống đạt mật độ khoảng 10^9 CFU/ml) tiến hành nuôi ở điều kiện kỵ khí, chiếu sáng bằng đèn sợi đốt, nhiệt độ nằm trong khoảng $28 \pm 2^\circ\text{C}$, trong thời gian 14 ngày. Kết quả được trình bày trên Bảng 7.

Kết quả thu được cho thấy chủng *Rhodopseudomonas* sp. PLC1 có khả năng sinh trưởng khá tốt trên dải nồng độ toluen từ 50 – 250ppm. Để đánh giá chính xác về khả năng phân hủy toluen của màng sinh học chủng *Rhodopseudomonas* sp. PLC1, chúng tôi lựa chọn nồng độ 250ppm để phân tích. Kết quả cho thấy sau 14 ngày nuôi cấy, màng sinh học do chủng *Rhodopseudomonas* sp. PLC1 tạo thành đã có khả năng xử lý là 98%.

Bảng 7. Khả năng sinh trưởng của chủng PLC1 trên các nồng độ dầu diesel 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	1,38 $\pm$ 0,10	50	1,18 $\pm$ 0,10	50	1,11 $\pm$ 0,06	50	1,39 $\pm$ 0,05	50	1,44 $\pm$ 0,06
3	1,30 $\pm$ 0,12	100	1,16 $\pm$ 0,13	100	1,11 $\pm$ 0,04	100	1,25 $\pm$ 0,04	100	1,4 $\pm$ 0,05
5	1,32 $\pm$ 0,09	150	1,13 $\pm$ 0,14	150	1,00 $\pm$ 0,07	150	1,18 $\pm$ 0,06	150	1,25 $\pm$ 0,04
7	1,28 $\pm$ 0,11	200	1,07 $\pm$ 0,15	200	0,99 $\pm$ 0,04	200	1,14 $\pm$ 0,05	200	1,19 $\pm$ 0,05
9	1,28 $\pm$ 0,08	250	1,05 $\pm$ 0,13	250	0,92 $\pm$ 0,05	250	1,11 $\pm$ 0,07	250	1,16 $\pm$ 0,03
10	1,22 $\pm$ 0,11	300	0,32 $\pm$ 0,15	300	0,35 $\pm$ 0,02	300	0,39 $\pm$ 0,05	300	0,42 $\pm$ 0,02

D. Phân tích khả năng tích lũy Co-enzym Q10

Chủng PLC1 sau khi phân lập được tiến hành xác định khả năng tích lũy Co-enzym Q10 của nó theo phương pháp của Paterson và Buddie (1991).

Chủng PLC1 được nuôi cấy trên môi trường DSMZ-27. Môi trường DSMZ -27 có thành phần như đã mô tả phía trên.

Khả năng tích lũy Co-enzym Q10 của chủng PLC1 được xác định như sau: nuôi cấy chủng PLC1 trên môi trường DSMZ- 27, sau 5 ngày nuôi cấy trong điều kiện kỵ khí, sáng, đem ly tâm loại dịch thu sinh khối tươi (ly tâm ở 8000 vòng/phút, 4°C trong 10 phút). Co-enzym Q10 được tiến hành chiết xuất theo phương pháp của Paterson và Buddie (1991), hỗn hợp dung môi chiết là metanol: *n* –hexan với tỉ lệ là 3:2 (v/v). Sinh khối tươi của chủng PLC1 thu được sau khi ly tâm bổ sung dung môi chiết là metanol: *n* –hexan với tỉ lệ là 3:2 (v/v), lắc nhẹ trong 20 – 30 phút để phá vỡ màng tế bào và hòa tan tối đa Co-enzym Q10. Tiến hành ly tâm ở 8000 vòng/phút, 4°C trong 10 phút thu dịch pha trên và loại bỏ xác tế bào. Dịch trên thu được quay cô chân không ở 60°C đến khi tạo cặn (gọi là cặn thô). Cặn thô được hòa tan vào dung môi *n*–hexan được gọi là dịch thô chứa Co-enzym Q10. Dịch thô thu được từ sinh khối

chủng PLC1 được xác định Co-enzym Q10 bằng phương pháp sắc kí bản mỏng tráng silicagel 60 F₂₅₄ (TLC) pha thường với hệ dung môi n-hexan : etyl ete với tỉ lệ là 4:1 (v/v). Kết quả được thể hiện Fig 12.

Trên sắc kí đồ của tấm sắc kí bản mỏng, dựa vào vị trí vạch và màu sắc của chất chuẩn Co-enzym Q10 có thể thấy hợp chất Co-enzym Q10 chứa trong dịch chiết vi khuẩn chủng PLC1 đã được cô lập.

Để xác định hàm lượng Co-enzym Q10 có trong dịch chiết của chủng PLC1, dịch chiết thô của chủng đã tiến hành định lượng Co-enzym Q10 bằng phương pháp sắc kí lỏng cao áp (HPLC). Thiết bị HPLC có các thông số kỹ thuật như sau: Model Agilent 1100, sử dụng detector chuỗi (DAD) dải đo 190 -1100 nm do hãng Agilent (Mỹ) sản xuất; Cột Zobrax Hypersil C₁₈ (200 x 4 mm); Tỷ lệ pha động hexan : acetone = 90: 10 (v/v); Tốc độ dòng: 0,5 ml/phút; Áp suất: 250 bar. Cách tiến hành: Sau khi đặt xong các thông số cần thiết, tiến hành rửa bom, rửa cột, chạy đường nền và áp suất ổn định 30 ÷ 45 phút. Lọc mẫu trước khi đo bằng micro filter 2-3 lần, lượng mẫu tối thiểu đạt 0,5ml. Dùng micropipet lấy 5 ml dung dịch phân tích đưa vào buồng mẫu. Máy sẽ tự động ghi các thông số: Thời gian lưu (RT), chiều cao phổ và tính diện tích cũng như thành phần phần trăm (%) của từng cấu tử trong hỗn hợp. Sau khi đo xong mẫu để thiết bị chạy đường nền 10 phút trước khi bơm mẫu tiếp theo.

Kết quả phân tích định lượng hợp chất Co-enzym Q10 thô từ dịch chiết của chủng PLC1 được thể hiện trên sắc kí đồ Fig 13 và Fig. 14. Dựa vào sự tương quan tuyến tính của diện tích phổ và nồng độ chất chuẩn Co-enzym Q10, hàm lượng Co-enzym Q10 có trong dịch chiết vi khuẩn tía quang hợp chủng PLC1 là 45 mg/lít.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Phân lập và định danh chủng vi khuẩn PLC1

Mẫu đất nhiễm dầu được thu từ Nha Trang, Khánh Hòa, Việt Nam.và được cho vào trong túi ni lông kín chuyển về phòng thí nghiệm và phân lập được tiến hành sau 48 giờ thu thập mẫu. Từ mẫu đất nhiễm dầu thu được, thực hiện làm giàu 3 lần và phân lập các chủng vi khuẩn tía quang hợp trên đĩa thạch chứa môi trường đặc hiệu DSMZ-27 cải tiến. Các khuẩn lạc được tách và làm sạch, thu được chủng vi khuẩn PLC1 có hình thái khuẩn lạc cũng như hình thái tế bào như được thể hiện trong Fig. 1 và Fig. 2.

Dựa vào hình thái khuẩn lạc và hình thái tế bào của chủng vi khuẩn thu được trên môi trường nuôi cấy dạng thạch, chủng vi khuẩn PLC1 có thể được xếp vào chi *Rhodospseudomonas* (Bergey, 1989, 2001).

Thực hiện phân loại chủng vi khuẩn PLC1 bằng cách xác định trình tự đoạn gen 16S rARN với cặp mồi 27F/1527R ADN tổng số của chủng vi khuẩn PLC1 được thu như sau:

- Nuôi cấy thu sinh khối vi khuẩn trong môi trường DSMZ-27 ở điều kiện kỵ khí và đặt dưới ánh sáng đèn sợi đốt khoảng 3 - 4 ngày đến khi OD₈₀₀ đạt 0,8 - 1 thì ADN của chúng

được tách chiết theo quy trình sau: i) hút dịch nuôi cấy vào các ống eppendorf 1,5 ml, tế bào được thu lại bằng cách ly tâm 10000 v/ph trong 5 phút. ii) bổ sung 576 μ l dung dịch đệm TE, để trên đá và lắc đều cho tan hết tế bào; iii) bổ sung 30 μ l SDS 10%, lắc nhẹ và để ở nhiệt độ phòng; iv) bổ sung 3 μ l enzym proteinaza K (10 mg/ml), ủ mẫu ở 37°C trong 1 giờ; v) bổ sung 180 μ l NaCl 5M lắc nhẹ, ủ mẫu ở 65°C trong 10 phút. Chú ý: đảo nhẹ nhàng để tránh đứt gãy ADN; vi) protein được loại bỏ bằng một thể tích chloroform/isoamylalcohol 24:1 (v/v), ly tâm 12000 v/ph trong 10 phút, thu dịch nổi và chuyển sang ống eppendorf mới; vii) protein được loại bỏ tiếp bằng phenol/chloroform/isoamylalcohol theo tỷ lệ 25:24:1 (v/v), ly tâm 12000 v/ph trong 10 phút, thu dịch nổi và chuyển sang ống eppendorf mới; viii) ADN được rửa bằng hai lần thể tích ethanol 100 % ở 4°C trong 20 phút, ly tâm 12000 v/ph ở 4°C, phần tủa là ADN genom được thu lại, tủa được rửa lại bằng ethanol 70% ly tâm 12000 v/ph ở 4°C trong 15 phút và được làm khô bằng máy hút chân không Mi-vac 110 V, sau đó hòa tan ADN trong 25 μ l đệm TE 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 (White và cộng sự, 1990).

Mồi xuôi 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3' và mồi ngược 5'-ACGGCTACCTTGTTACGACT -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 (μ l):

Đệm Taq 10X:	2,5 μ l	Taq-polymeraza (5 U/ μ l):	0,25 μ l
MgSO ₄ (25 mM):	2,5 μ l	ADN khuôn:	2,0 μ l
dNTP (2,5 mM):	2,0 μ l	H ₂ O khử ion:	13,75 μ l
Mồi xuôi 10 μ M:	1,0 μ l	Tổng thể tích:	25 μ l
Mồi ngược 10 μ M:	1,0 μ l		

Chu trình nhiệt:

- Bước 1: 95°C (5 phút)
- Bước 2: 95°C (50 s)
- Bước 3: 58°C (45 s)
- 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 PLC1 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 và được thể hiện trên Fig. 4.

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 PLC1.

Trình tự gen 16S rARN của chủng PLC1 có kích thước 1270 nucleotit với trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 1 và được đăng ký trên GenBank với mã số truy cập MH430894.

Trình tự gen của chủng PLC1 có có mức độ tương đồng 99% với trình tự tương ứng của các chủng *Rhodopseudomonas harwoodiae* JA531T (mã số FN813512), và tương đồng xa hơn (86 %) so với chủng *Rhodovulum sulfidophilum* DSM1374 (D16423). Mối quan hệ phát sinh chủng loài của chủng PLC1 với một số chủng vi khuẩn đã được xây dựng và kết quả được thể hiện ở Fig. 5.

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 PLC1 thuộc chi *Rhodopseudomonas* và được đặt tên là *Rhodopseudomonas* sp. PLC1.

Chủng vi khuẩn PLC1 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.

Ví dụ 2. Tác động của nồng độ muối lên khả năng tạo màng của chủng PLC1

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 PLC1.

Kết quả được thể hiện ở Fig. 7.

Kết quả cho thấy, chủng PLC1 có khả năng tạo màng khá tốt từ nồng độ 0 đến 40‰.

Ví dụ 3. Tác động của pH lên khả năng tạo màng của chủng PLC1

Khả năng tạo màng của chủng vi khuẩn PLC1 trên môi trường DSMZ - 27 (thành phần môi trường DSMZ - 27) có pH được thay đổi giá trị từ 4 đến 9 đã được khảo sát. Sau 5 ngày nuôi cấy, PLC1 tạo màng sinh học trong môi trường có pH khác nhau. Chủng vi khuẩn này có hoạt tính tạo màng cao ở pH 4,5 đến pH 9. Ở các pH 4 khả năng tạo màng của chủng PLC1 rất thấp chỉ đạt từ $0,39 \pm 0,12$ và hầu như không có khả năng tạo màng sau 3-5 ngày nuôi cấy.

Kết quả được thể hiện trên Fig. 8.

Như vậy, pH 4,5 đến pH 9 phù hợp cho khả năng tạo màng cao ở chủng PLC1.

Ví dụ 4. Tác động của nhiệt độ lên khả năng tạo màng của chủng PLC1

Dải nhiệt độ 14 - 16, 26 - 28, 40 - 45°C đã được sử dụng để đánh giá ảnh hưởng của chúng lên khả năng tạo màng bởi chủng PLC1 trong 5 ngày nuôi cấy.

Kết quả được thể hiện trên Fig. 10.

Kết quả cho thấy, chủng PLC1 có khả năng tạo màng ở phổ nhiệt độ khá rộng từ 14 – 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 PLC1 có khả năng tạo màng tốt ở các khoảng nhiệt độ thấp 14 – 16°C (nhiệt độ trung bình mùa đông) và nhiệt độ cao 40-45°C (nhiệt độ trung bình mùa hè).

Ví dụ 5. Khả năng xử lý dầu diezen của chủng PLC1

Dầu diezen ở các dải nồng độ khác nhau từ 1-10% tương đương với 5000, 15000, 25000, 35000 và 50000ppm đã được sử dụng để đánh giá khả năng sinh trưởng và phân hủy của màng sinh học chủng PLC1 trong 14 ngày. Kết quả được thể hiện ở Bảng 5.

Kết quả cho thấy: *Rhodopseudomonas* sp. PLC1 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 *Rhodopseudomonas* sp. PLC1 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 14 ngày nuôi cấy, màng sinh học do chủng *Rhodopseudomonas* sp. PLC1 tạo thành đã có khả năng xử lý là 70,64% tương ứng với nồng độ ban đầu là 50.000mg/l.

Ví dụ 6. Khả năng phân hủy phenol của chủng PLC1

Phenol ở các dải nồng độ khác nhau từ 50 – 300ppm đã được sử dụng để đánh giá khả năng sinh trưởng và phân hủy của màng sinh học chủng PLC1 trong 14 ngày. Kết quả được thể hiện ở Bảng 5.

Kết quả thu được cho thấy chủng *Rhodopseudomonas* sp. PLC1 có khả năng sinh trưởng khá tốt trên dải nồng độ phenol từ 50 – 250ppm, chúng tôi lựa chọn nồng độ 250ppm để phân tích khả năng phân hủy phenol của màng sinh học chủng PLC1. Kết quả cho thấy sau 14 ngày nuôi cấy, màng sinh học do chủng *Rhodopseudomonas* sp. PLC1 tạo thành đã có khả năng xử lý là 98,1%.

Ví dụ 7. Khả năng phân hủy piren của chủng PLC1

Piren ở các dải nồng độ khác nhau từ 50 – 300 ppm đã được sử dụng để đánh giá khả năng sinh trưởng và phân hủy của màng sinh học chủng PLC1 trong 14 ngày. Kết quả được thể hiện ở Bảng 5.

Kết quả thu được cho thấy chủng *Rhodopseudomonas* sp. PLC1 có khả năng sinh trưởng khá tốt trên dải nồng độ piren từ 50 – 250ppm. Tuy nhiên, ở nồng độ càng cao thì sinh trưởng càng giảm và đến nồng 300ppm chủng này sinh trưởng kém hơn. Nồng độ 250ppm được lựa chọn để phân tích khả năng phân hủy piren của màng sinh học bởi chủng PLC1. Kết quả cho thấy sau 14 ngày nuôi cấy, màng sinh học do chủng *Rhodopseudomonas* sp. PLC1 tạo thành đã có khả năng xử lý là 99,5% .

Ví dụ 8. Khả năng phân hủy naphtalen của chủng PLC1

Naphtalen ở các dải nồng độ khác nhau từ 50 – 300 ppm đã được sử dụng để đánh giá khả năng sinh trưởng và phân hủy của màng sinh học chủng PLC1 trong 14 ngày. Kết quả được thể hiện ở Bảng 5.

Kết quả thu được cho thấy chủng *Rhodopseudomonas* sp. PLC1 có khả năng sinh trưởng khá tốt trên dải nồng độ naphtalen từ 50 – 250ppm. Để đánh giá chính xác về khả năng phân hủy naphtalen của màng sinh học chủng *Rhodopseudomonas* sp. PLC1, chúng tôi lựa chọn nồng độ 250ppm để phân tích khả năng phân hủy naphtalen. Kết quả cho thấy sau 14 ngày nuôi cấy, màng sinh học do chủng *Rhodopseudomonas* sp. PLC1 tạo thành đã có khả năng xử lý là 96,4% .

Ví dụ 9. Khả năng phân hủy toluen của chủng PLC1

Toluen ở các dải nồng độ khác nhau từ 50 – 300 ppm đã được sử dụng để đánh giá khả năng sinh trưởng và phân hủy của màng sinh học chủng PLC1 trong 14 ngày. Kết quả được thể hiện ở Bảng 5.

Kết quả thu được cho thấy chủng *Rhodopseudomonas* sp. PLC1 có khả năng sinh trưởng khá tốt trên dải nồng độ toluen từ 50 – 250 ppm. Để đánh giá chính xác về khả năng phân hủy toluen của màng sinh học chủng *Rhodopseudomonas* sp. PLC1, chúng tôi lựa chọn nồng độ 250 ppm để phân tích khả năng phân hủy toluen. Kết quả cho thấy sau 14 ngày nuôi cấy, màng sinh học do chủng *Rhodopseudomonas* sp. PLC1 tạo thành đã có khả năng xử lý là 98 %

Ví dụ 10. Khả năng tích lũy Co-enzym Q10 của chủng PLC1

Khả năng tích lũy Co-enzym Q10 của chủng PLC1 được xác định như sau: nuôi cấy chủng PLC1 trên môi trường DSMZ-27, sau 5 ngày nuôi cấy trong điều kiện kỵ khí, sáng, đem ly tâm loại dịch thu sinh khối tươi (ly tâm ở 8000 vòng/phút, 4°C trong 10 phút). Co-enzym Q10 được tiến hành chiết xuất theo phương pháp của Paterson và Buddie (1991). Trên sắc ký đồ của tấm sắc ký bản mỏng, dựa vào vị trí vạch và màu sắc của chất chuẩn Co-enzym Q10 có thể thấy hợp chất Co-enzym Q10 chứa trong dịch chiết vi khuẩn chủng PLC1 đã được cô lập.

Để xác định hàm lượng Co-enzym Q10 có trong dịch chiết của chủng PLC1, dịch chiết thô của chủng đã tiến hành định lượng Co-enzym Q10 bằng phương pháp sắc ký lỏng cao áp (HPLC). Kết quả phân tích định lượng hợp chất Co-enzym Q10 thô từ dịch chiết của chủng PLC1 được thể hiện trên sắc ký đồ Fig 13 và Fig. 14. Dựa vào sự tương quan tuyến tính của diện tích phổ và nồng độ chất chuẩn Co-enzym Q10, hàm lượng Co-enzym Q10 có trong dịch chiết vi khuẩn tía quang hợp chủng PLC1 là 45 mg/lít.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn *Rhodopseudomonas* sp. PLC1 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 nồng độ muối NaCl từ 0 đến 40 ‰, pH từ 4,5 – 9, ánh sáng với cường độ

từ 1200 – 6000 lux và nhiệt độ từ 14 – 45 °C. Như vậy, chủng PLC1 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 đến 14 ngày thí nghiệm, màng sinh học do chủng này tạo thành có khả năng phân hủy 70,64 % hàm lượng dầu diezen với nồng độ ban đầu là 50000 mg/l; phân hủy 98,1 % phenol với nồng độ ban đầu là 250 ppm; phân hủy 99,5 % piren với nồng độ ban đầu là 250 ppm; phân hủy 96,4 % naphtalen với nồng độ ban đầu là 250 ppm và phân hủy được 98 % toluene với nồng độ ban đầu là 250 ppm. Kết quả cho thấy chủng PLC1 này có khả năng xử lý các thành phần hydrocarbon có trong dầu mỏ và nước nhiễm dầu là rất hiệu quả. Việc sử dụng chủng *Rhodopseudomonas* sp. PLC1 phân lập từ vùng ven biển bị nhiễm dầu Nha Trang, Khánh Hòa 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.

Bên cạnh đó, chủng *Rhodopseudomonas* sp. PLC1 thuần khiết có khả năng tích lũy Co-enzym Q10 với hàm lượng tương đối lớn (45 mg/l). CoQ10 này có thể được tách chiết và sử dụng làm chất chống oxy hóa hoặc ứng dụng trong sản xuất thực phẩm chức năng.

Yêu cầu bảo hộ

1. Chúng vi khuẩn *Rhodopseudomonas* sp. PLC1 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 1270 bp và được đăng ký trên GenBank với mã số MH430894, và có các đặc tính sau:

có khả năng tạo màng sinh học khi được nuôi cấy trong môi trường DSMZ-27, điều kiện nuôi cấy ở pH 4,5-9, nồng độ muối NaCl 0-40‰, cường độ chiếu sáng 4800 lux, nhiệt độ 26-28°C, giá trị OD ở bước sóng 570 nm là $28,67 \pm 0,17$;

có khả năng phân hủy dầu diezen là 70,64% tương ứng với nồng độ ban đầu là 5 g/l,

có khả năng phân hủy phenol là 98,1%; piren 99,5%; naphtalen 96,4%; và toluen là 98% với nồng độ ban đầu của từng hợp chất này là 250ppm; và

tích lũy Co-enzym Q10 với hàm lượng 45 mg/lít.



Fig. 1

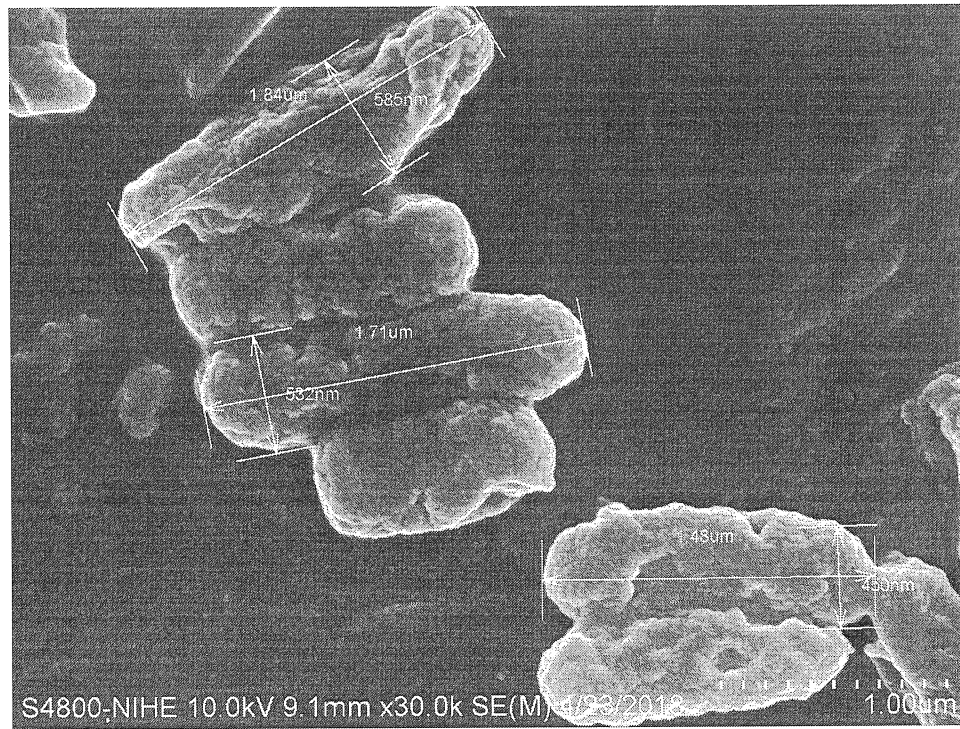


Fig. 2

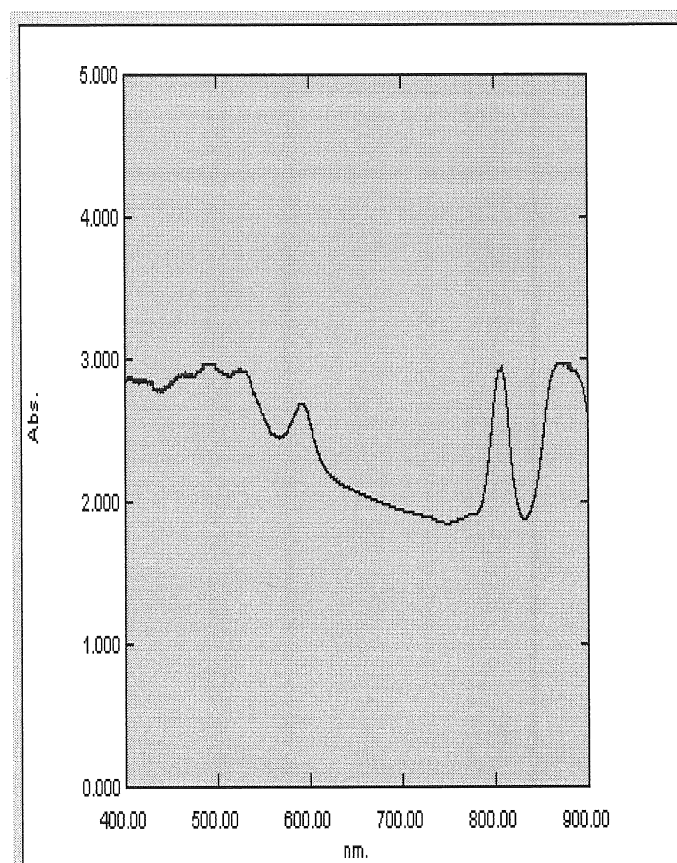


Fig 3

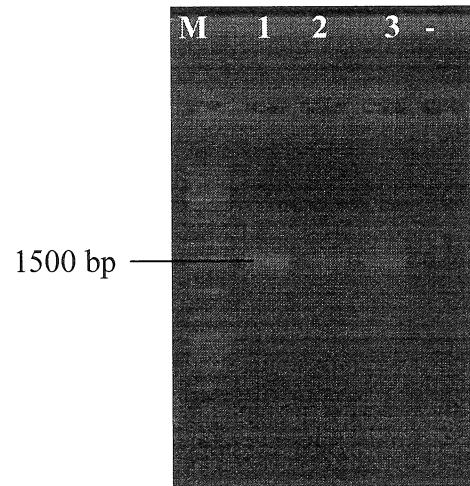


Fig. 4

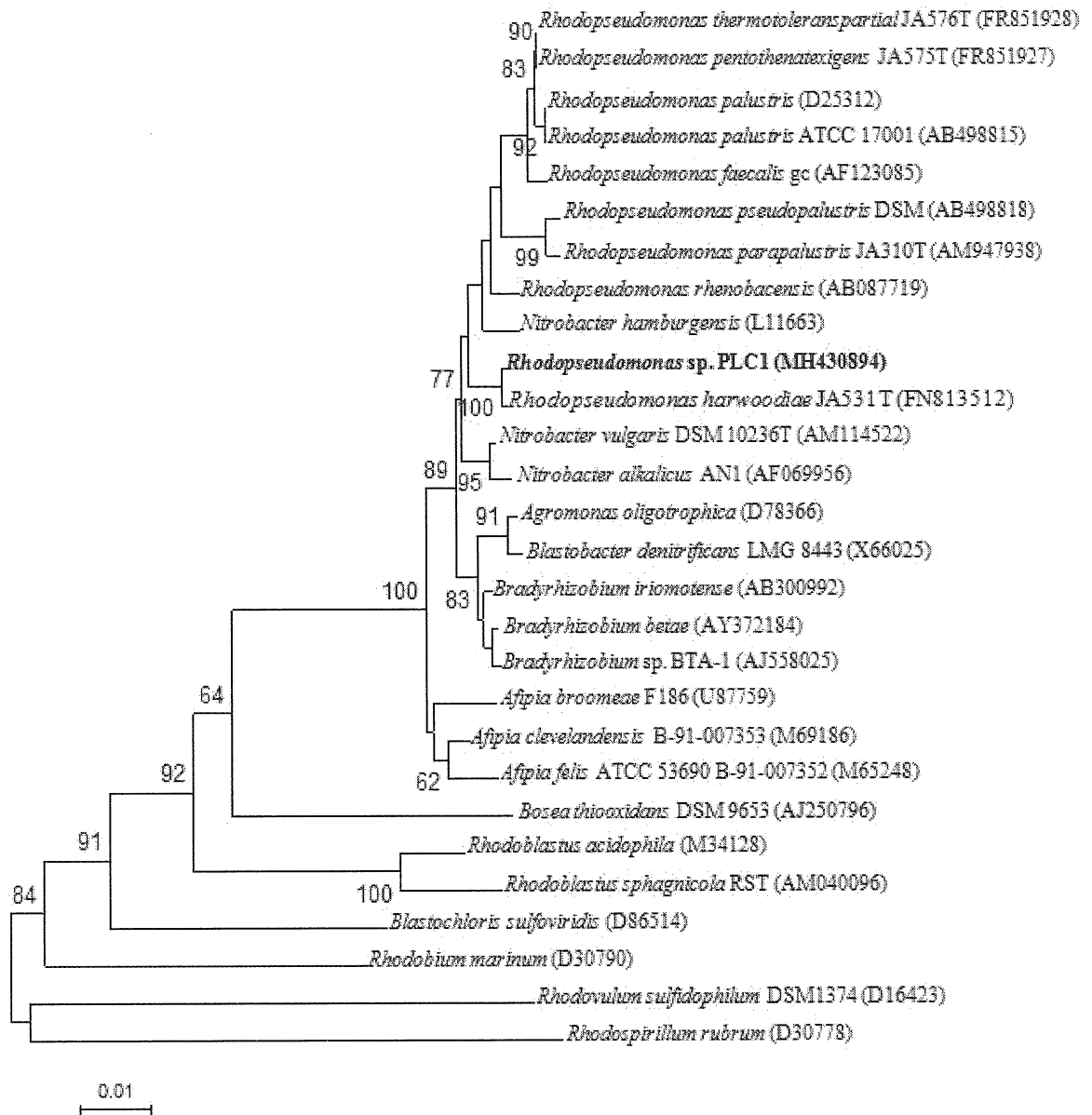


Fig. 5

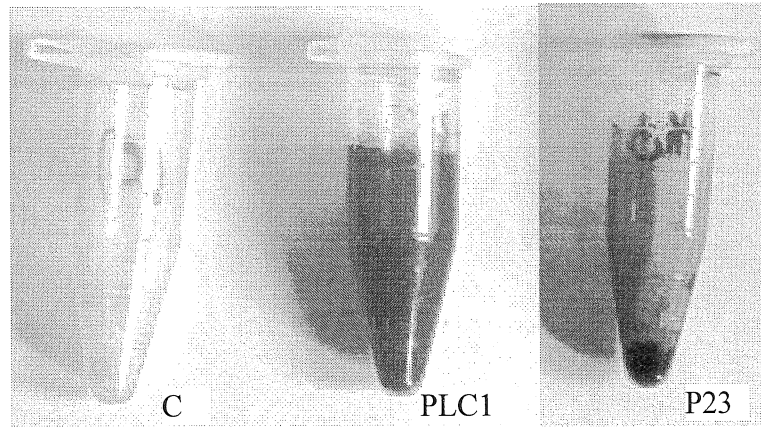


Fig. 6

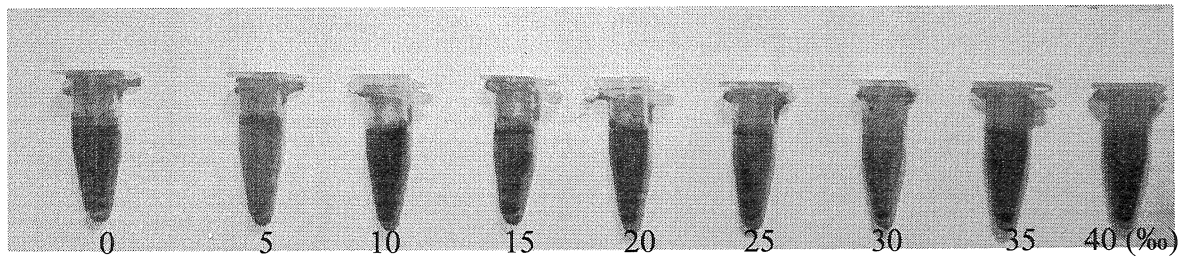


Fig.7

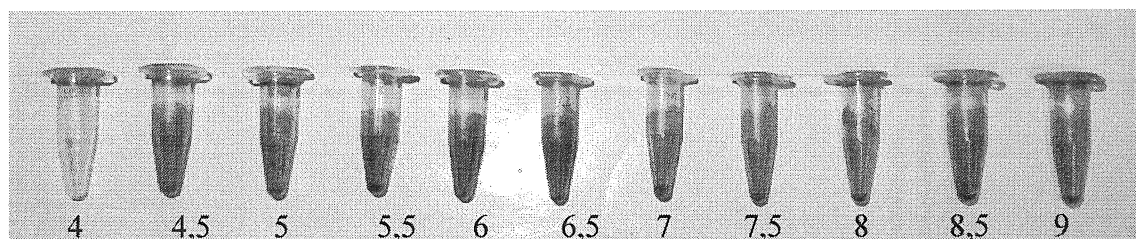


Fig.8

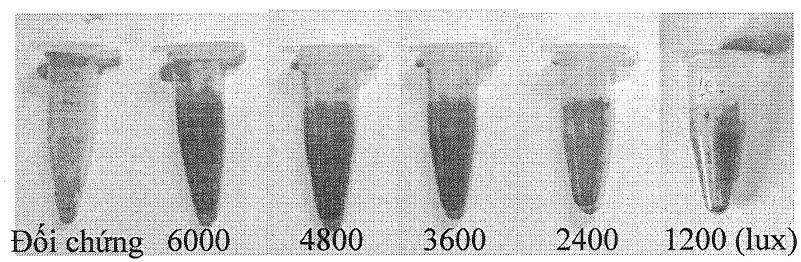


Fig.9

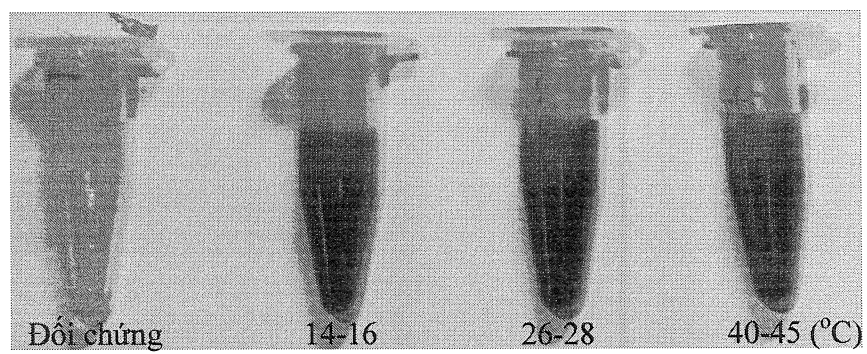


Fig. 10

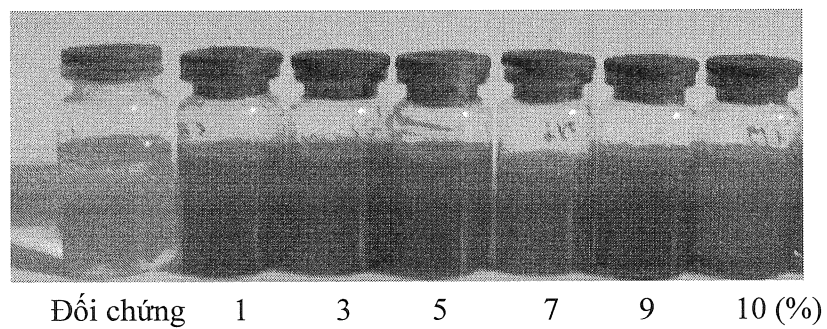


Fig. 11

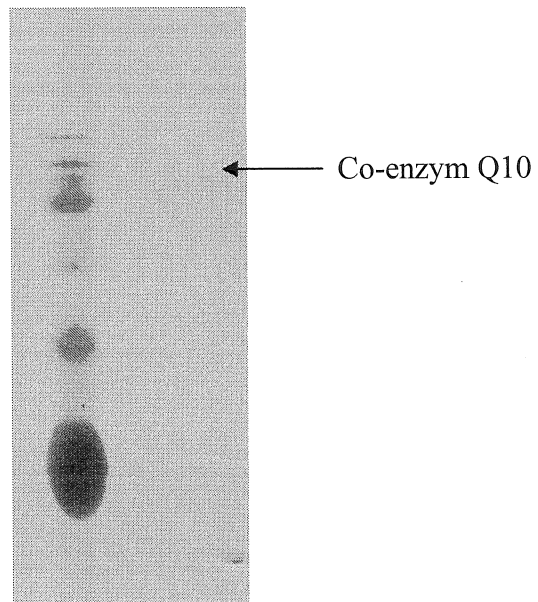


Fig. 12

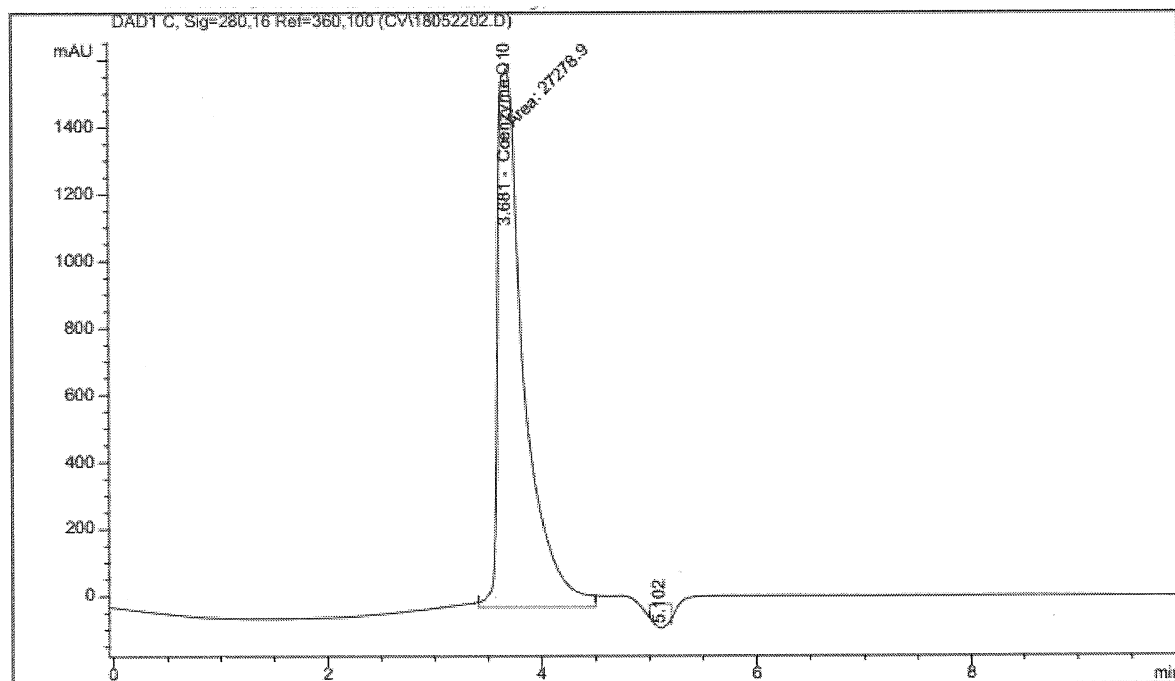


Fig. 13

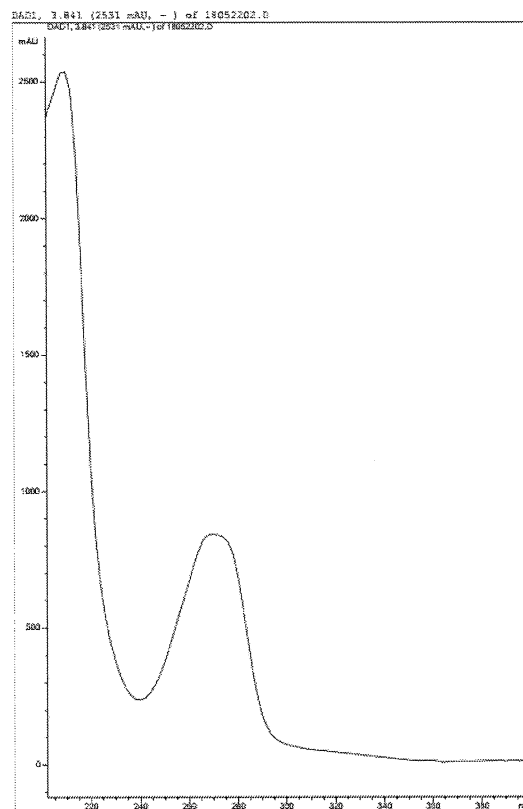


Fig. 14

DANH MỤC TRÌNH TỰ

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

<120> **Chủng vi khuẩn tía quang hợp Rhodopseudomonas sp. PLC1 thuần khiết về mặt sinh học có khả năng tạo màng sinh học, phân hủy dầu diezen và tích lũy Co-enzym Q10**

<160> 1

<210> 1

<211> 1270

<212> ADN

<213> **Rhodopseudomonas sp.**

<400> 1

cagtggcaga cgggtgtatag agtaacgcgt gggaacgtac cttttggttc ggaacaacac 60
 agggaaactt gtgctaatac cggataagcc cttacgggga aagatttata gccgaaagat 120
 cggcccgcgt ctgattagct agttggtgag gtaatggctc accaaggcga cgatcagtag 180
 ctggtctgag aggatgatca gccacattgg gactgagaca cggcccaaac tcctacggga 240
 ggcagcagtg gggaatattg gacaatgggg gcaaccctga tccagccatg ccgcgtgagt 300
 gatgaaggcc ctagggttgt aaagctcttt tgtgcgggaa gataatgacg gtaccgcaag 360
 aataagcccc ggctaacttc gtgccagcag ccgcggtaat acgaaggggg ctagcgttgc 420
 tcggaatcac tgggcgtaaa ggggtgcgtag gcgggtttct aagtcagagg tgaaagcctg 480
 gagctcaact ccagaactgc ctttgatact ggaagtcttg agttcgggag aggtgagtg 540
 aactgcgagt gtagaggatga aattcgtaga tattcgcaag aacaccagtg gcgaaggcgg 600
 ctactggcc cgatactgac gctgaggcac gaaagcgtgg ggagcaaaca ggattagata 660
 ccctggtagt acacgccgta aacgatgaat gccagccgtt agtgggttta ctactagtg 720
 gcgcagctaa cgctttaagc attccgcctg gggagtacgg tcgcaagatt aaaactcaaa 780
 ggaattgacg ggggcccgcga caagcgggtg agcatgtggt ttaattcgac gcaacgcgca 840
 gaaccttacc agcccttgac atgtccagga ccggtcgcag agacgtgacc ttctcttcgg 900
 agcctggagc acaggtgctg catggctgtc gtcagctcgt gtcgtgagat gttgggttaa 960
 gtcccgcac gagcgcaacc cccgtcctta gttgctacca tttagttgag cactctaagg 1020

25759

agactgccgg tgataagccg cgaggaaggt ggggatgacg tcaagtcctc atggccctta 1080
cgggctgggc tacacacgtg ctacaatggc ggtgacaatg ggaagctaag gggcgaccct 1140
tcgcaaattc caaaaagccg tctcagttcg gattgggctc tgcaactcga gcccatgaag 1200
ttggaatcgc tagtaatcgt ggatcagcat gccacggtga atacgttccc gggccttgta 1260
cacaccgccc 1270