



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

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

(11) 
2-0001942

(51)⁷ **A61K 36/00**

(13) **Y**

(21) 2-2015-00268

(22) 07.09.2015

(45) 25.01.2019 370

(43) 27.03.2017 348

(73) **VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC, VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG
NGHỆ VIỆT NAM (VN)**

Số 18 Hoàng Quốc Việt, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Lê Thị Nhi Công (VN), Cung Thị Ngọc Mai (VN), Đỗ Thị Liên (VN), Hoàng Phương
Hà (VN), Nghiêm Ngọc Minh (VN), Đinh Thị Thu Hằng (VN), Phí Quyết Tiến
(VN), Đỗ Thị Tố Uyên (VN)

(54) **QUY TRÌNH SẢN XUẤT CHẾ PHẨM VI SINH TẠO MÀNG SINH HỌC XỬ LÝ
NƯỚC BỊ NHIỄM DẦU VÀ CHẾ PHẨM VI SINH TẠO MÀNG SINH HỌC THU
ĐƯỢC BẰNG QUY TRÌNH NÀY**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh tạo màng
sinh học để xử lý nước bị nhiễm dầu, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

(a) nhân giống vi sinh vật; (b) thu sinh khối vi khuẩn; (c) thu sinh khối nấm men;

(d) thu dịch vi sinh gốc; (e) thu sản phẩm phối trộn; và thu chế phẩm vi sinh tạo

màng sinh học, trong đó khác biệt ở chỗ các chủng vi sinh được sử dụng bao

gồm mười chủng vi khuẩn *Azospirillum* sp. DG7, *Bacillus* sp. B8, *Bacillus* sp.

C2, *Microbacterium* sp. B15, *Paracoccus* sp. DG25, *Pseudomonas* sp. B6,

Ochrobactrum sp. DGP2, *Rhodococcus* sp. B2, *Rhodococcus* sp. BN5 và

Rhizobium sp. DG22, và 2 chủng nấm men *Candida* sp. TH1 và *Candida* sp.

TH4. Ngoài ra, giải pháp hữu ích còn đề cập đến chế phẩm vi sinh tạo màng sinh

học để xử lý nước bị nhiễm dầu thu được bằng quy trình này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực xử lý ô nhiễm môi trường bằng công nghệ sinh học, cụ thể là đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học xử lý nước bị nhiễm dầu và chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học thu được bằng quy trình này.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Hiện nay, trên thế giới ngành công nghiệp khai thác và chế biến dầu đang là ngành công nghiệp mang lại lợi ích kinh tế - xã hội rất lớn. Cùng với sự phát triển không ngừng, vấn đề ô nhiễm môi trường nước do dầu và các sản phẩm của nó gây ra đang ở mức báo động. Cụ thể là, nước nhiễm dầu có thể do hai nguyên nhân: từ khu vực kho chứa bao gồm các hoạt động như súc rửa, làm mát bồn chứa, vệ sinh máy móc và thiết bị làm rơi vãi xăng dầu xuống nguồn nước, nước mưa chảy tràn qua khu vực kho v.v. hoặc từ khu vực cảng tiếp nhận bao gồm các hoạt động như nước dẫn tàu, nước vệ sinh tàu, nước ống dẫn dầu (khi kéo từ biển lên boong), rò rỉ trên đường ống dẫn dầu từ tàu về kho chứa v.v.. Dầu thường có chứa hàng ngàn các phân tử khác nhau, nhưng phần lớn là các hydrocacbon no có số cacbon từ 2 đến 26 và các hydrocacbon thơm như hydrocacbon đa vòng, phenol, benzen, v.v.. Do đó, dầu thường có độc tính cao và tương đối bền vững trong môi trường nước. Độc tính và tác động của dầu đến hệ sinh thái nước không giống nhau mà phụ thuộc vào loại dầu (Yin và cộng sự, 2009). Để giải quyết vấn đề trên, các quy trình xử lý đã được áp dụng như cơ học, vật lý, hóa học, sinh học v.v.. Trong đó, quy trình sinh học là một trong những quy trình xử lý triệt để, thân thiện với môi trường và có chi phí thấp. Trong số các quy trình phân hủy sinh học, màng sinh học là một trong những quy trình xử lý dầu ô nhiễm hiệu quả, chi phí thấp, nên từ lâu đã được nhiều nước trên thế giới quan tâm nghiên cứu và ứng dụng.

Màng sinh học là một cấu trúc liên kết phức tạp của các tế bào và các sản phẩm của chúng, chẳng hạn như các polyme ngoại bào tạo thành các hạt lơ lửng trong môi trường nuôi cấy hoặc được gắn trên một bề mặt vật thể rắn (Morikawa và cộng sự,

2006; Perumbakkam và cộng sự, 2006). Các tế bào vi sinh vật trong màng sinh học có mật độ cao, liên kết với nhau một cách chặt chẽ, tạo thành một cấu trúc bền vững. Vì thế chúng có khả năng đồng hóa, trao đổi chất, phân hủy các hydrocacbon xảy ra nhanh và mạnh mẽ hơn tế bào ở dạng đơn lẻ. Mặt khác, khu hệ vi sinh vật trong màng sinh học 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).

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 hydrocacbon thơm như benzen, naphthalen, phenol, toluen, xylen, v.v., (Yamaga và cộng sự, 2010; Shimada và cộng sự, 2012; Meliani, Bensoltane, 2014). Kay và cộng sự (1991) đã chứng minh vai trò của màng sinh học 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 cacbon 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 màng sinh học 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.

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., có khả năng sử dụng hydrocacbon có trong dầu mỡ như phenol, benzen, v.v. làm nguồn cacbon và năng lượng. Do đó, các nhóm vi sinh vật này đã được ứng dụng trong xử lý nước nhiễm dầu.

Shimada và cộng sự (2012) đã sử dụng chủng vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* T102 phân lập từ các mẫu đất nhiễm dầu để tạo màng sinh học và chứng minh khả năng phân hủy tốt naphthalen của chủng này ở dạng tạo màng sinh học hơn ở dạng tế bào tự do. Chủng vi khuẩn *Acinetobacter calcoaceticus* P23 được phân lập từ khu hệ rễ bèo *Lemna aoukikusa* có khả năng tạo màng sinh học và phân hủy tốt phenol

(Yamaga và cộng sự, 2010). Hai chủng vi khuẩn thuộc chi *Vibrio* và *Acinetobacter* đã được phân lập từ các mẫu đất nhiễm dầu thô ở Vịnh Bohai, Trung Quốc (Lin và cộng sự, 2014). Hai chủng này có khả năng sinh trưởng tối ưu trên NaCl lên tới 70 g/lít với dải pH từ 5,6 – 8,6 và ở dạng tạo màng sinh học thì khả năng phân hủy các hydrocacbon no cao hơn 30 % so với tế bào ở dạng tự do. Một số chủng nấm mốc phân lập từ kho xăng cũng có khả năng phân hủy tốt các hợp chất hydrocacbon từ C₁₂-C₂₄. Đặc biệt, các loài *Hormoconis resiniae* và *Aspergillus fumigatus* phân lập từ các mẫu nhiễm dầu diesel cũng được ghi nhận khả năng sinh trưởng tốt của chúng trên nguồn cơ chất này. Hettige và Sheridan (1989) cũng chứng minh các loài *H. resiniae*, *Penicillium corylophilum* và *Paecilomyces variotii* sinh trưởng tốt trên dầu diesel 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.

Đặc biệt, màng sinh học do hỗn hợp các vi sinh vật tạo thành đã được xác định từ các mẫu lấy ở Bắc cực. Màng sinh học này có khả năng phân hủy lên tới 20 µg/ml pyren và 39 µg/ml phenanthren sau 60 ngày nuôi cấy. Bằng quy trình sinh học phân tử phân tích trình tự gen 16S rRNA đã xác định được 5 chi khác nhau, bao gồm: *Polaromonas*, *Sphingomonas*, *Alcaligenes*, *Caulobacter* và *Variovorax* có mặt trong màng sinh học. Bằng quy trình nuôi cấy vi sinh thông thường, 2 chủng vi khuẩn thuộc chi *Pseudomonas* có khả năng phân hủy pyren rất tốt đã được phân lập (Eriksson và cộng sự, 2002).

Các nghiên cứu cũng đã chứng minh rằng, dạng màng sinh học đa chủng thường chiếm ưu thế trong hầu hết các môi trường, còn màng sinh học đơn chủng thường được sử dụng trên các bộ phận cấy ghép giả trong cơ thể và là nguyên nhân gây nên các bệnh về nhiễm trùng. Sinh khối của màng sinh học đa chủng thường tốt hơn so với màng sinh học đơn chủng. Theo nghiên cứu của Burmolle và cộng sự, sinh khối màng sinh học đa chủng của 4 loài *Microbacterium phyllosphaerae*, *Shewanella japonica*, *Dokdonia donghaensis* và *Acinetobacter lwoffii* cao hơn 167 % so với các chủng đơn tương ứng (Burmolle và cộng sự, 2006). Tuy nhiên, hiện nay vẫn chưa có chế phẩm vi sinh đa chủng nào được dùng phổ biến và hữu hiệu trong việc xử lý nước bị nhiễm dầu ở Việt Nam cũng như trên thế giới.

Do đó, yêu cầu cấp bách được đặt ra là phải có quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học xử lý nước bị nhiễm dầu và chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học xử lý nước bị nhiễm dầu.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là nhằm giải quyết các tồn tại nêu trên. Theo đó, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học để xử lý nước bị nhiễm dầu và chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học thu được bằng quy trình này.

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học để xử lý nước bị nhiễm dầu, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

(a) Nhân giống vi sinh vật bằng cách lên men mười chủng vi khuẩn bao gồm: *Azospirillum* sp. DG7, *Bacillus* sp. B8, *Bacillus* sp. C2, *Microbacterium* sp. B15, *Paracoccus* sp. DG25, *Pseudomonas* sp. B6, *Ochrobactrum* sp. DGP2, *Rhodococcus* sp. B2, *Rhodococcus* sp. BN5 và *Rhizobium* sp. DG22, và 2 chủng nấm men *Candida* sp. TH1 và *Candida* sp. TH4 có số lưu giữ tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm và Công nghệ Việt Nam với số lưu giữ từ CNSHMT 01 đến CNSHMT 12, tương ứng trong môi trường lên men thể dịch thu được các dịch lên men vi khuẩn và dịch lên men nấm men;

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

(c) Thu sinh khối nấm men bằng cách ly tâm từng dịch lên men nấm men thu được từ bước a) riêng biệt với tốc độ 6000 vòng/phút ở nhiệt độ 4°C trong thời gian 10 phút, sau đó được rửa hai lần bằng nước cất đã khử trùng và phối trộn các sinh khối với tỷ lệ bằng nhau, bổ sung dung dịch muối sinh lý để thu được sinh khối nấm men có nồng độ 10^7 CFU/ml;

(d) Thu dịch vi sinh gốc bằng cách phối trộn sinh khối vi khuẩn thu được ở bước (b) với sinh khối nấm men thu được từ bước (c) theo tỷ lệ 5:1 (thể tích:thể tích) thu được dịch vi sinh gốc có nồng độ khoảng 10^7 CFU/ml;

(e) Thu sản phẩm phối trộn bằng cách phối trộn dịch vi sinh gốc, hỗn hợp môi trường LB:Hansen có tỷ lệ 4:1 (thể tích/thể tích) và cám gạo theo tỷ lệ tương ứng 1:10:20 (thể tích/thể tích/trọng lượng), sau khi trộn đều, thu được sản phẩm phối trộn; và

(f) Thu chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học bằng cách lên men sản phẩm phối trộn trong điều kiện nhiệt độ từ 28 đến 32°C, đảo trộn theo chu kỳ 6 giờ, thời gian lên men trong 48 giờ, sau đó sấy sản phẩm lên men ở nhiệt độ từ 40 đến 45°C trong thời gian từ 3 đến 4 giờ để thu được chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học có độ ẩm 15%.

Theo khía cạnh thứ hai, giải pháp hữu ích đề cập đến chế phẩm vi sinh vật tạo màng sinh học xử lý nước bị nhiễm dầu thu được từ quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học xử lý nước bị nhiễm dầu, trong đó chế phẩm này chứa các chủng vi khuẩn bao gồm *Azospirillum* sp. DG7, *Bacillus* sp. B8, *Bacillus* sp. C2, *Microbacterium* sp. B15, *Paracoccus* sp. DG25, *Pseudomonas* sp. B6, *Ochrobactrum* sp. DGP2, *Rhodococcus* sp. B2, *Rhodococcus* sp. BN5 và *Rhizobium* sp. DG22, và các chủng nấm men bao gồm *Candida* sp. TH1 và *Candida* sp. TH4 có số lưu giữ tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm và Công nghệ Việt Nam với số lưu giữ từ CNSHMT 01 đến CNSHMT 12.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ kèm theo

Fig.1 là hình thái khuẩn lạc của 10 chủng vi khuẩn, trong đó (A) là *Azospirillum* sp. DG7, (B) là *Bacillus* sp. B8, (C) là *Bacillus* sp. C2, (D) là *Microbacterium* sp. B15, (E) là *Paracoccus* sp. DG25, (F) là *Pseudomonas* sp. B6, (G) là *Ochrobactrum* sp. DGP2, (H) là *Rhodococcus* sp. B2, (I) là *Rhodococcus* sp. BN5, (J) là *Rhizobium* sp. DG22.

Fig.2 là hình thái 2 chủng nấm men, trong đó (A) là *Candida* sp. TH1 và (B) là *Candida* sp. TH4.

Fig.3 là cây phát sinh chủng loại của 10 chủng vi khuẩn.

Fig.4 là cây phát sinh chủng loại của 2 chủng nấm men.

Fig.5 là chế phẩm vi sinh theo giải pháp hữu ích.

Fig.6 là chế phẩm vi sinh theo giải pháp hữu ích ở độ phóng đại 5.000 lần.

Fig.7 là biểu đồ thể hiện hiệu suất phân hủy các thành phần hydrocacbon của chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học sau 14 ngày nuôi tĩnh. Trong đó, 1: anthracen; 2: benzen; 3: 4-(2-butenyl)-1,2-dimethyl-benzen; 4: (1,4-dimethylpent-2-enyl) benzen; 5: 1-methyl-4-(1-methyl-2-propenyl)-benzen, 6: heptadecan; 7: hexadecan; 8: hexacosan; 9: naphthalen; 10: 1,2,3,4-tetrahydro-6-methyl-naphthalen; 11: decahydro - 4,4,8,9,10-pentamethyl naphthalen; 12: phenanthren; 13: pyren.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích mô tả chi tiết các phương án cụ thể, tuy nhiên, các phương án này chỉ nhằm mục đích nhằm mô tả chi tiết giải pháp hữu ích chứ không nhằm mục đích hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học xử lý nước bị nhiễm dầu và chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học thu được bằng quy trình này.

Theo khía cạnh thứ nhất quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học xử lý nước bị nhiễm dầu.

Trong bước nhân giống vi sinh vật bằng cách lên men hai cấp, các chủng vi sinh được sử dụng bao gồm các chủng vi khuẩn: *Azospirillum* sp. DG7, *Bacillus* sp. B8, *Bacillus* sp. C2, *Microbacterium* sp. B15, *Paracoccus* sp. DG25, *Pseudomonas* sp. B6, *Ochrobactrum* sp. DGP2, *Rhodococcus* sp. B2, *Rhodococcus* sp. BN5 và *Rhizobium* sp. DG22, và 2 chủng nấm men *Candida* sp. TH1 và *Candida* sp. TH4, tương ứng trong môi trường lên men thể dịch thu được các dịch lên men vi khuẩn và dịch lên men nấm men.

Chủng vi khuẩn *Azospirillum* sp. DG7 là chủng thuần được phân lập từ mẫu đất nhiễm dầu lấy từ mẫu nước nhiễm dầu lấy tại Kho xăng dầu Đức Giang, Gia Lâm, Hà Nội. Mẫu sau khi thu thập được làm giàu trong môi trường khoáng Gost dịch sau 7 ngày nuôi lắc với tốc độ 200 vòng/phút ở 30°C với dầu diesel là nguồn cacbon và năng lượng duy nhất. Vi khuẩn được phân lập và tuyển chọn dựa trên khả năng phân hủy dầu diesel và khả năng tạo màng sinh học. Sau khi tuyển chọn, thu được chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy dầu diesel, phenol, anthracen, pyren vượt trội, chủng này

được ký hiệu là *Azospirillum* sp. DG7 và được lưu giữ tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm và Công nghệ Việt Nam với số lưu giữ là CNSHMT 01.

Để định danh chủng *Azospirillum* sp. DG7, tiến hành giải trình tự với cặp môi sử dụng bao gồm:

Môi xuôi (341f): 5'- CCTACGGGAGGCAGCAG-3'

Môi ngược (907r): 5'- CCGTCAATTCMTTTGAGTTT-3'

Kết quả giải trình tự thu được trình tự nêu trong SEQ IP NO.1, kết quả này được dùng để định danh loài bằng cách sử dụng chương trình BLAST (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>) để so sánh các đoạn gen 16S rARN trên ngân hàng gen. Kết quả cho thấy chủng *Azospirillum* sp. DG7 theo giải pháp hữu ích thuộc chi *Azospirillum* và đây là một biến chủng mới gần loài *largomobile* và đây được xác định là một chủng mới được đăng ký trên Genbank với mã số truy cập KJ608355.

Chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. B8 là chủng thuần được phân lập từ mẫu đất nhiễm dầu lấy tại Khu công nghiệp vừa và nhỏ Từ Liêm, Hà Nội. Mẫu sau khi thu thập được làm giàu trong môi trường khoáng Gost dịch sau 7 ngày nuôi lắc với tốc độ 200 vòng/phút ở 30°C với dầu diesel là nguồn cacbon và năng lượng duy nhất. Vi khuẩn được phân lập và tuyển chọn dựa trên khả năng phân hủy dầu diesel và khả năng tạo màng sinh học. Sau khi tuyển chọn, thu được chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy dầu diesel vượt trội, chủng này được ký hiệu là *Bacillus* sp. B8 và được lưu giữ tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm và Công nghệ Việt Nam với số lưu giữ là CNSHMT 02.

Để định danh chủng *Bacillus* sp. B8, tiến hành giải trình tự với cặp môi sử dụng bao gồm:

Môi xuôi (341f): 5'- CCTACGGGAGGCAGCAG-3'

Môi ngược (907r): 5'- CCGTCAATTCMTTTGAGTTT-3'

Kết quả giải trình tự thu được trình tự nêu trong SEQ IP NO.1, kết quả này được dùng để định danh loài bằng cách sử dụng chương trình BLAST (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>) để so sánh các đoạn gen 16S rARN trên ngân hàng gen. Kết quả cho thấy chủng *Bacillus* sp. B8 theo giải pháp hữu ích thuộc chi *Bacillus* là một biến chủng mới gần 2 loài *foraminis* và *flexus* và đây được xác định là một chủng mới được đăng ký trên Genbank với mã số truy cập JQ764732.

Chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. C2 là chủng thuần được phân lập từ mẫu đất nhiễm dầu lấy từ mẫu nước nhiễm dầu lấy tại bờ biển Hoàng Hóa, Thanh Hóa. Mẫu sau khi thu thập được làm giàu trong môi trường khoáng Gost dịch sau 7 ngày nuôi lắc với tốc độ 200 vòng/phút ở 30°C với từng nguồn cơ chất là phenol, dầu diesel, benzen là nguồn cacbon và năng lượng duy nhất. Vi khuẩn được phân lập và tuyển chọn dựa trên khả năng phân hủy những nguồn cơ chất này và khả năng tạo màng sinh học. Sau khi tuyển chọn, thu được chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy những nguồn cơ chất này vượt trội, chủng này được ký hiệu là *Bacillus* sp. C2 và được lưu giữ tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm và Công nghệ Việt Nam với số lưu giữ là CNSHMT 03.

Để định danh chủng *Bacillus* sp. C2, tiến hành giải trình tự với cặp môi sử dụng bao gồm:

Môi xuôi (341f): 5'- CCTACGGGAGGCAGCAG-3'

Môi ngược (907r): 5'- CCGTCAATTCMTTTGAGTTT-3'

Kết quả giải trình tự thu được trình tự nêu trong SEQ IP NO.1, kết quả này được dùng để định danh loài bằng cách sử dụng chương trình BLAST (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>) để so sánh các đoạn gen 16S rARN trên ngân hàng gen. Kết quả cho thấy chủng *Bacillus* sp. C2 theo giải pháp hữu ích thuộc chi *Bacillus* và đây là một biến chủng mới gần loài *altitudinis* và đây được xác định là một chủng mới được đăng ký trên Genbank với mã số truy cập JQ910954.

Chủng vi khuẩn *Microbacterium* sp. B15 là chủng thuần được phân lập từ mẫu đất nhiễm dầu lấy tại Khu công nghiệp vừa và nhỏ Từ Liêm, Hà Nội. Mẫu sau khi thu thập được làm giàu trong môi trường khoáng Gost dịch sau 7 ngày nuôi lắc với tốc độ 200 vòng/phút ở 30°C với dầu diesel là nguồn cacbon và năng lượng duy nhất. Vi khuẩn được phân lập và tuyển chọn dựa trên khả năng phân hủy dầu diesel và khả năng tạo màng sinh học. Sau khi tuyển chọn, thu được chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy dầu diesel vượt trội, chủng này được ký hiệu là *Microbacterium* sp. B15 và được lưu giữ tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm và Công nghệ Việt Nam với số lưu giữ là CNSHMT 04.

Để định danh chủng *Microbacterium* sp. B15, tiến hành giải trình tự với cặp môi sử dụng bao gồm:

Môi xuôi (341f): 5'- CCTACGGGAGGCAGCAG-3'

Môi ngược (907r): 5'- CCGTCAATTCMTTTGAGTTT-3'

Kết quả giải trình tự thu được trình tự nêu trong SEQ IP NO.1, kết quả này được dùng để định danh loài bằng cách sử dụng chương trình BLAST (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>) để so sánh các đoạn gen 16S rARN trên ngân hàng gen. Kết quả cho thấy chủng *Bacillus* sp. B8 theo giải pháp hữu ích thuộc chi *Microbacterium* và đây được xác định là một chủng mới được đăng ký trên Genbank với mã số truy cập JX073564.

Chủng vi khuẩn *Paracoccus* sp. DG25 là chủng thuần được phân lập từ mẫu đất nhiễm dầu lấy từ mẫu nước nhiễm dầu lấy tại kho xăng dầu Đức Giang, Gia Lâm, Hà Nội. Mẫu sau khi thu thập được làm giàu trong môi trường khoáng Gost dịch sau 7 ngày nuôi lắc với tốc độ 200 vòng/phút ở 30°C với hỗn hợp các hydrocacbon thơm đa vòng là nguồn cacbon và năng lượng duy nhất. Vi khuẩn được phân lập và tuyển chọn dựa trên khả năng phân hủy dầu diesel và khả năng tạo màng sinh học. Sau khi tuyển chọn, thu được chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy các hydrocacbon đa vòng vượt trội, chủng này được ký hiệu là *Paracoccus* sp. DG25 và được lưu giữ tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm và Công nghệ Việt Nam với số lưu giữ là CNSHMT 05.

Để định danh chủng *Paracoccus* sp. DG25, tiến hành giải trình tự với cặp môi sử dụng bao gồm:

Môi xuôi (341f): 5'- CCTACGGGAGGCAGCAG-3'

Môi ngược (907r): 5'- CCGTCAATTCMTTTGAGTTT-3'

Kết quả giải trình tự thu được trình tự nêu trong SEQ IP NO.1, kết quả này được dùng để định danh loài bằng cách sử dụng chương trình BLAST (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>) để so sánh các đoạn gen 16S rARN trên ngân hàng gen. Kết quả cho thấy chủng *Paracoccus* sp. DG25 theo giải pháp hữu ích thuộc chi *Paracoccus* và đây là một biến chủng mới gần loài *ferrooxidans* và đây được xác định là một chủng mới được đăng ký trên Genbank với mã số truy cập KJ608354.

Chủng vi khuẩn *Pseudomonas* sp. B6 là chủng thuần được phân lập từ mẫu nước nhiễm dầu lấy tại bờ biển Hoàng Hóa, Thanh Hóa. Mẫu sau khi thu thập được làm giàu trong môi trường khoáng Gost dịch sau 7 ngày nuôi lắc với tốc độ 200 vòng/phút ở 30°C với từng nguồn cơ chất là dầu diesel, dầu thô, pyren, naphtalen là nguồn cacbon và năng lượng duy nhất. Vi khuẩn được phân lập và tuyển chọn dựa trên khả năng phân hủy dầu diesel, dầu thô, pyren, naphtalen và khả năng tạo màng sinh học. Sau khi tuyển chọn, thu được chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy những hợp

chất ô nhiễm này vượt trội, chủng này được ký hiệu là *Pseudomonas* sp. B6 và được lưu giữ tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm và Công nghệ Việt Nam với số lưu giữ là CNSHMT 06.

Để định danh chủng *Pseudomonas* sp. B6, tiến hành giải trình tự với cặp môi sử dụng bao gồm:

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

Môi ngược (1492r): 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'

Kết quả giải trình tự thu được trình tự nêu trong SEQ IP NO.1, kết quả này được dùng để định danh loài bằng cách sử dụng chương trình BLAST (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>) để so sánh các đoạn gen 16S rARN trên ngân hàng gen. Kết quả cho thấy chủng *Pseudomonas* sp. B6 theo giải pháp hữu ích thuộc chi *Pseudomonas* là một biến chủng mới thuộc loài *aeruginosa* và đây được xác định là một chủng mới được đăng ký trên Genbank với mã số truy cập X06684.

Chủng vi khuẩn *Ochrobactrum* sp. DGP2 là chủng thuần được phân lập từ mẫu đất nhiễm dầu lấy từ mẫu nước nhiễm dầu lấy tại kho xăng dầu Đức Giang, Gia Lâm, Hà Nội. Mẫu sau khi thu thập được làm giàu trong môi trường khoáng Gost dịch sau 7 ngày nuôi lắc với tốc độ 200 vòng/phút ở 30°C với phenol là nguồn cacbon và năng lượng duy nhất. Vi khuẩn được phân lập và tuyển chọn dựa trên khả năng phân hủy phenol và khả năng tạo màng sinh học. Sau khi tuyển chọn, thu được chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy vượt trội, chủng này được ký hiệu là *Ochrobactrum* sp. DGP2 và được lưu giữ tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm và Công nghệ Việt Nam với số lưu giữ là CNSHMT 07.

Để định danh chủng *Ochrobactrum* sp. DGP2, tiến hành giải trình tự với cặp môi sử dụng bao gồm:

Môi xuôi (341f): 5'- CCTACGGGAGGCAGCAG-3'

Môi ngược (907r): 5'- CCGTCAATTCMTTGGAGTTT-3'

Kết quả giải trình tự thu được trình tự nêu trong SEQ IP NO.1, kết quả này được dùng để định danh loài bằng cách sử dụng chương trình BLAST (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>) để so sánh các đoạn gen 16S rARN trên ngân hàng gen. Kết quả cho thấy chủng *Ochrobactrum* sp. DGP2 theo giải pháp hữu ích thuộc chi *Ochrobactrum* và đây là một biến chủng mới gần loài *intermedium* và đây được xác định là một chủng mới được đăng ký trên Genbank với mã số truy cập AM114411.

Chủng vi khuẩn *Rhodococcus* sp. B2 là chủng thuần được phân lập từ mẫu đất nhiễm dầu lấy tại kho xăng Đỗ Xá, Hà Nội. Mẫu sau khi thu thập được làm giàu trong môi trường khoáng Gost dịch sau 7 ngày nuôi lắ với tốc độ 200 vòng/phút ở 30°C với dầu điezen là nguồn cacbon và năng lượng duy nhất. Vi khuẩn được phân lập và tuyển chọn dựa trên khả năng phân hủy dầu điezen và khả năng tạo màng sinh học. Sau khi tuyển chọn, thu được chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy dầu điezen (cần chỉ rõ bao nhiêu mg/ml) vượt trội, chủng này được ký hiệu là *Rhodococcus* sp. B2 và được lưu giữ tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm và Công nghệ Việt Nam với số lưu giữ là CNSHMT 08.

Để định danh chủng *Rhodococcus* sp. B2, tiến hành giải trình tự với cặp mồi sử dụng bao gồm:

Mồi xuôi (341f): 5'- CCTACGGGAGGCAGCAG-3'

Mồi ngược (907r): 5'- CCGTCAATTCMTTTGAGTTT-3'

Kết quả giải trình tự thu được trình tự nêu trong SEQ ID NO.1, kết quả này được dùng để định danh loài bằng cách sử dụng chương trình BLAST (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>) để so sánh các đoạn gen 16S rARN trên ngân hàng gen. Kết quả cho thấy chủng *Rhodococcus* sp. B2 theo giải pháp hữu ích thuộc chi *Rhodococcus* là một biến chủng mới thuộc loài *aetherivorans* và đây được xác định là một chủng mới được đăng ký trên Genbank với mã số truy cập JQ657804.

Chủng vi khuẩn *Rhodococcus* sp. BN5 là chủng thuần được phân lập từ mẫu đất nhiễm dầu lấy từ mẫu nước nhiễm dầu lấy tại bờ biển Hoàng Hóa, Thanh Hóa. Mẫu sau khi thu thập được làm giàu trong môi trường khoáng Gost dịch sau 7 ngày nuôi lắ với tốc độ 200 vòng/phút ở 30°C với phenol là nguồn cacbon và năng lượng duy nhất. Vi khuẩn được phân lập và tuyển chọn dựa trên khả năng phân hủy dầu điezen và khả năng tạo màng sinh học. Sau khi tuyển chọn, thu được chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy phenol vượt trội, chủng này được ký hiệu là *Rhodococcus* sp. BN5 và được lưu giữ tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm và Công nghệ Việt Nam với số lưu giữ là CNSHMT 09.

Để định danh chủng *Rhodococcus* sp. BN5, tiến hành giải trình tự với cặp mồi sử dụng bao gồm:

Mồi xuôi (341f): 5'- CCTACGGGAGGCAGCAG-3'

Môi ngược (907r): 5'- CCGTCAATTCMTTGGAGTTT-3'

Kết quả giải trình tự thu được trình tự nêu trong SEQ IP NO.1, kết quả này được dùng để định danh loài bằng cách sử dụng chương trình BLAST (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>) để so sánh các đoạn gen 16S rARN trên ngân hàng gen. Kết quả cho thấy chủng *Rhodococcus* sp. BN5 theo giải pháp hữu ích thuộc chi *Rhodococcus* và đây là một biến chủng mới gần loài *ruber* và đây được xác định là một chủng mới được đăng ký trên Genbank với mã số truy cập JQ073291.

Chủng vi khuẩn *Rhizobium* sp. DG22 là chủng thuần được phân lập từ mẫu đất nhiễm dầu lấy từ mẫu nước nhiễm dầu lấy tại bờ biển Hoàng Hóa, Thanh Hóa. Mẫu sau khi thu thập được làm giàu trong môi trường khoáng Gost dịch sau 7 ngày nuôi lắc với tốc độ 200 vòng/phút ở 30°C với hỗn hợp các hydrocacbon thơm đa vòng là nguồn cacbon và năng lượng duy nhất. Vi khuẩn được phân lập và tuyển chọn dựa trên khả năng phân hủy dầu diesel và khả năng tạo màng sinh học. Sau khi tuyển chọn, thu được chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy hỗn hợp các hydrocacbon đa vòng vượt trội, chủng này được ký hiệu là *Rhizobium* sp. DG22 và được lưu giữ tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm và Công nghệ Việt Nam với số lưu giữ là CNSHMT 10.

Để định danh chủng *Rhizobium* sp. DG22, tiến hành giải trình tự với cặp mồi sử dụng bao gồm:

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

Mồi ngược (1527r): 5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3'

Kết quả giải trình tự thu được trình tự nêu trong SEQ IP NO.1, kết quả này được dùng để định danh loài bằng cách sử dụng chương trình BLAST (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>) để so sánh các đoạn gen 16S rARN trên ngân hàng gen. Kết quả cho thấy chủng *Rhizobium* sp. DG22 theo giải pháp hữu ích thuộc chi *Rhizobium* và đây là một biến chủng mới gần loài *pusense* và đây được xác định là một chủng mới được đăng ký trên Genbank với mã số truy cập KJ748400.

Chủng nấm men *Candida* sp. TH1 là chủng thuần được phân lập từ được phân lập từ các mẫu đất nhiễm dầu lấy tại vùng ven biển Nghi Sơn, Thanh Hóa. Mẫu sau khi thu thập được làm giàu trong môi trường khoáng Gost dịch sau 7 ngày nuôi lắc với tốc độ 200 vòng/phút ở 30°C với dầu diesel là nguồn cacbon và năng lượng duy nhất. Nấm men được phân lập và tuyển chọn dựa trên khả năng phân hủy dầu diesel và khả năng tạo màng sinh học. Sau khi tuyển chọn, thu được ngoài dầu diesel, chủng nấm

men còn có khả năng phân hủy phenol, phenanthren vượt trội, chủng này được ký hiệu là *Candida* sp. TH1 và được lưu giữ tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm và Công nghệ Việt Nam với số lưu giữ là CNSHMT 11.

Để định danh chủng *Candida* sp. TH1, tiến hành giải trình tự với cặp môi sử dụng bao gồm:

Môi xuôi (ITS1): 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'

Môi ngược (ITS4): 5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

Kết quả giải trình tự thu được trình tự nêu trong SEQ IP NO.1, kết quả này được dùng để định danh loài bằng cách sử dụng chương trình BLAST (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>) để so sánh các đoạn gen ITS1-5,8S rARN-ITS2 trên ngân hàng gen. Kết quả cho thấy chủng *Candida* sp. TH1 theo giải pháp hữu ích thuộc chi *Candida* và đây là một biến chủng mới gần loài *viswanathii* và đây được xác định là một chủng mới được đăng ký trên Genbank với mã số truy cập JX129175.

Chủng nấm men *Candida* sp. TH4 là chủng thuần được phân lập từ được phân lập từ các mẫu đất nhiễm dầu lấy tại vùng ven biển Nghi Sơn, Thanh Hóa. Mẫu sau khi thu thập được làm giàu trong môi trường khoáng Gost dịch sau 7 ngày nuôi lắc với tốc độ 200 vòng/phút ở 30°C với dầu diesel là nguồn cacbon và năng lượng duy nhất. Nấm men được phân lập và tuyển chọn dựa trên khả năng phân hủy dầu diesel và khả năng tạo màng sinh học. Sau khi tuyển chọn, thu được ngoài dầu diesel, chủng nấm men còn có khả năng phân hủy phenol, phenanthren vượt trội, chủng này được ký hiệu là *Candida* sp. TH4 và được lưu giữ tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm và Công nghệ Việt Nam với số lưu giữ là CNSHMT 12.

Để định danh chủng *Candida* sp. TH4, tiến hành giải trình tự với cặp môi sử dụng bao gồm:

Môi xuôi (ITS1): 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'

Môi ngược (ITS4): 5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

Kết quả giải trình tự thu được trình tự nêu trong SEQ IP NO.1, kết quả này được dùng để định danh loài bằng cách sử dụng chương trình BLAST (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>) để so sánh các đoạn gen ITS1-5,8S rARN-ITS2 trên ngân hàng gen. Kết quả cho thấy chủng *Candida* sp. TH4 theo giải pháp hữu ích thuộc chi *Candida* và đây là một biến chủng mới gần loài *tropicalis* và đây được xác định là một chủng mới được đăng ký trên Genbank với mã số truy cập JX129176.

Hình thái khuẩn lạc của các chủng vi sinh vật được thể hiện trên Fig.1. Cây phát sinh chủng loại của các chủng 10 chủng vi khuẩn và 2 chủng nấm men này được thể hiện tương ứng trên Fig.2 và Fig.3.

Các quy trình, kỹ thuật nhân giống vi khuẩn và nấm men thuần chủng là đã biết và được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hiểu rõ và có thể áp dụng dễ dàng.

Lên men cấp 1: Các dịch chủng giống tươi sau khi được nhân từ những khuẩn lạc riêng rẽ qua đêm được cấy chuyển sang 12 bình tam giác thủy tinh 100 ml riêng rẽ chứa 9 ml một trong hai môi trường sau: Luria Bertani (LB) dùng cho vi khuẩn hoặc Hansen dùng cho nấm men với tỷ lệ dịch chủng giống tươi:môi trường là 1:9 (ml/ml) – nghĩa là cho 1 ml dịch chủng giống tươi vào 9 ml môi trường. Bình được lắc 180 vòng/phút ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 28 đến 30°C trong thời gian 24 giờ. Các thành phần môi trường có công thức như sau:

Thành phần môi trường LB nuôi cấy vi khuẩn (g/l): 10 g/l NaCl, 10g/l trypton, 5 g/l cao men, pH = 7-7,2.

Thành phần môi trường Hansen nuôi cấy nấm men (g/l): 3 g/l K₂HPO₄, 5 g/l NaCl, 1 g/l MgCl₂, 2 g/l MgSO₄, 50 g/l glucoza, 10 g/l pepton, pH = 5,5

Môi trường nuôi cấy thạch được bổ sung 10 % thạch agar.

Các thành phần môi trường được cân cẩn thận và được khử trùng ở 115°C trong 30 phút.

Lên men cấp 2: Dịch nuôi cấy sau khi lên men cấp 1 được cấy truyền sang các bình tam giác thủy tinh 500 ml chứa 90 ml một trong hai môi trường sau: Luria Bertani (LB) dùng cho vi khuẩn hoặc Hansen dùng cho nấm men với tỷ lệ dịch lên men cấp 1: môi trường là 1:9 (ml/ml) - nghĩa là cho 10 ml dịch lên men cấp 1 vào 90 ml môi trường. Bình được lắc 180 vòng/phút ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 28 đến 30°C trong thời gian 24 giờ.

Trong bước thu sinh khối vi khuẩn bằng cách ly tâm từng dịch lên men vi khuẩn thu được riêng biệt với tốc độ 4000 vòng/phút ở nhiệt độ 4 °C trong thời gian 10 phút, sau đó được rửa hai lần bằng nước cất đã khử trùng và phối trộn các sinh khối với tỷ lệ bằng nhau, bổ sung dung dịch muối sinh lý để thu được sinh khối vi khuẩn có nồng độ 10⁷ CFU/ml.

Trong bước thu sinh khô nấm men bằng cách ly tâm từng dịch lên men nấm men thu được riêng biệt với tốc độ 6000 vòng/phút ở nhiệt độ 4 °C trong thời gian 10 phút, sau đó được rửa hai lần bằng nước cất đã khử trùng và phối trộn các sinh khối với tỷ lệ bằng nhau, bổ sung dung dịch muối sinh lý để thu được sinh khối nấm men có nồng độ 10^7 CFU/ml.

Trong bước thu dịch vi sinh gốc bằng cách phối trộn sinh khối vi khuẩn với sinh khối nấm men theo 5:1 (thể tích:thể tích) thu được dịch vi sinh gốc có nồng độ 10^7 CFU/ml.

Trong bước thu sản phẩm phối trộn bằng cách phối trộn dịch vi sinh gốc, hỗn hợp môi trường LB:Hansen có tỷ lệ 4:1 (thể tích/thể tích) và cám gạo theo tỷ lệ tương ứng 1:10:20 (thể tích/thể tích/trọng lượng), sau khi trộn đều, thu được sản phẩm phối trộn.

Cám gạo được sử dụng làm cơ chất không những có vai trò gắn các vi sinh vật có khả năng phân hủy dầu và tạo màng sinh học cao mà còn là nguồn dinh dưỡng cho chúng để lên men xộp tạo chế phẩm sinh học. Cám gạo được khử trùng ước ở 121°C trong 30 phút để loại các nhóm vi sinh vật ngoại lai.

Trong bước thu chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học bằng cách lên men sản phẩm phối trộn trong điều kiện nhiệt độ từ 28 đến 32°C, đảo trộn theo chu kỳ 6 giờ, thời gian lên men trong 48 giờ, sau đó sấy sản phẩm lên men ở nhiệt độ từ 40 đến 45°C trong thời gian từ 3 đến 4 giờ để thu được chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học có độ ẩm 15%.

Chế phẩm này có dạng bột mịn, màu vàng nâu, kích cỡ hạt từ 0,1-0,3 mm, có mật độ vi sinh vật đạt $\geq 10^9$ CFU/g (ml), có năng lực phân hủy trên 95 % các thành phần C_xH_y trong dầu; khai thác ổn định trong thời gian ≥ 6 tháng; an toàn cho môi trường và đạt độ ẩm 15 %.

Chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học sẽ được đóng gói trong túi kềm và được kiểm định mật độ vi sinh vật cũng như khả năng phân hủy các thành phần hydrocacbon trong dầu sau 1 tuần, 2 tuần, 1 tháng, 3 tháng và 6 tháng.

Theo khía cạnh thứ hai, giải pháp hữu ích đề cập đến chế phẩm vi sinh vật tạo màng sinh học xử lý nước bị nhiễm dầu thu được từ quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học xử lý nước bị nhiễm dầu, trong đó chế phẩm này chứa các

chủng vi khuẩn bao gồm *Azospirillum* sp. DG7, *Bacillus* sp. B8, *Bacillus* sp. C2, *Microbacterium* sp. B15, *Paracoccus* sp. DG25, *Pseudomonas* sp. B6, *Ochrobactrum* sp. DGP2, *Rhodococcus* sp. B2, *Rhodococcus* sp. BN5 và *Rhizobium* sp. DG22, và các chủng nấm men bao gồm *Candida* sp. TH1 và *Candida* sp. TH4 có số lưu giữ tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm và Công nghệ Việt Nam với số lưu giữ từ CNSHMT 01 đến CNSHMT 12.

Cơ chế xử lý nước nhiễm dầu của chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học theo giải pháp hữu ích này được thể hiện như sau: khi bổ sung chế phẩm vào nước thải nhiễm dầu, các vi sinh vật tạo màng sinh học có trong chế phẩm đang ở trạng thái tĩnh sẽ nhanh chóng sinh trưởng và phát triển trên nguồn cơ chất là các nhóm hydrocacbon và tạo màng sinh học với nhau trên các bề mặt vật thể lỏng và rắn. Trong màng sinh học, các vi sinh vật có mật độ cao và liên kết với nhau thành một cấu trúc bền vững. Nhờ đó, chúng có khả năng hỗ trợ trao đổi chất và dễ dàng phân hủy các hợp chất hydrocacbon. Đồng thời, nhờ khả năng tạo màng sinh học nên chúng có khả năng chống chịu lại các điều kiện khắc nghiệt của môi trường nước nhiễm dầu tốt hơn ở dạng các tế bào đơn lẻ và hạn chế được sự cạnh tranh của các vi sinh vật khác.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Quy trình sản xuất 30 kg chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học dùng xử lý nước bị nhiễm dầu

Nhân giống 12 chủng vi sinh vật bằng cách lên men hai cấp các chủng này. Cụ thể là: mười chủng vi khuẩn *Azospirillum* sp. DG7, *Bacillus* sp. B8, *Bacillus* sp. C2, *Microbacterium* sp. B15, *Paracoccus* sp. DG25, *Pseudomonas* sp. B6, *Ochrobactrum* sp. DGP2, *Rhodococcus* sp. B2, *Rhodococcus* sp. BN5 và *Rhizobium* sp. DG22, 2 chủng nấm men *Candida* sp. TH1 và *Candida* sp. TH4.

Lên men cấp 1: lấy mỗi dịch chủng giống tươi với lượng 1ml sau khi được nhân từ những khuẩn lạc riêng rẽ qua đêm được cấy chuyển sang 12 bình tam giác thủy tinh 100 ml riêng rẽ chứa 9 ml một trong hai môi trường sau: Luria Bertani (LB) dùng cho vi khuẩn hoặc Hansen dùng cho nấm men. Bình được lắc 180 vòng/phút ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 24 giờ. Các thành phần môi trường có công thức như sau:

Thành phần môi trường LB nuôi cấy vi khuẩn (g/l): 10 g/l NaCl, 10g/l trypton, 5 g/l cao men, pH = 7.

Thành phần môi trường Hansen nuôi cấy nấm men (g/l): 3 g/l K_2HPO_4 , 5 g/l NaCl, 1 g/l $MgCl_2$, 2 g/l $MgSO_4$, 50 g/l glucoza, 10 g/l pepton, pH = 5,5.

Môi trường nuôi cấy thạch được bổ sung 10 % thạch agar.

Các thành phần môi trường được cân cẩn thận và được khử trùng ở $115^\circ C$ trong 30 phút.

Lên men cấp 2: lấy 10 ml dịch nuôi cấy sau khi lên men cấp 1 được cấy truyền sang các bình tam giác thủy tinh 500 ml chứa 90 ml một trong hai môi trường sau: Luria Bertani (LB) dùng cho vi khuẩn hoặc Hansen dùng cho nấm men. Bình được lắc 180 vòng/phút ở nhiệt độ $30^\circ C$ trong thời gian 24 giờ.

Các chủng vi khuẩn nuôi cấy riêng rẽ được ly tâm với tốc độ 4000 vòng/phút ở nhiệt độ $4^\circ C$ trong thời gian 10 phút để thu sinh khối vi khuẩn. Các chủng nấm men nuôi cấy riêng rẽ được ly tâm với tốc độ 6000 vòng/phút ở nhiệt độ $4^\circ C$ trong thời gian 10 phút để thu sinh khối nấm men. Sinh khối của vi khuẩn và nấm men thu được, sẽ được rửa hai lần bằng nước cất đã khử trùng. Bổ sung 100 ml dung dịch muối sinh lý vào các bình chứa sinh khối vi khuẩn và nấm men sau ly tâm và thu dịch này.

Thu 1 lít dịch chứa vi sinh có nồng độ khoảng 10^7 CFU/ml bằng cách phối trộn sinh khối vi khuẩn, sinh khối nấm men, và pha loãng để có nồng độ khoảng 10^7 CFU/ml.

Phối trộn 80 ml dịch của từng loại vi khuẩn ta có được 800 ml dịch của hỗn hợp 10 chủng vi khuẩn sử dụng làm chế phẩm và 100 ml dịch của từng loại nấm men ta có được 200 ml dịch của hỗn hợp 2 chủng nấm men, và pha loãng để có nồng độ khoảng 10^7 CFU/ml – gọi là dịch chứa vi sinh. Dịch thu được sẽ được pha loãng để thu dịch chứa vi sinh đạt nồng độ cuối cùng khoảng 10^7 CFU/ml. Dịch thu được sẽ được xác định mật độ vi sinh vật có trong hỗn hợp dịch sinh khối bằng cách đo OD_{600} .

Phối trộn 1 lít dịch chứa vi sinh có nồng độ khoảng 10^7 CFU/ml, 10 lít hỗn hợp môi trường và 20 kg cám gạo để thu sản phẩm phối trộn, trong đó hỗn hợp môi trường là 8 lít môi trường LB và 2 lít Hansen, thu được 31 kg sản phẩm phối trộn.

Phối trộn 1 lít dịch chứa vi sinh có nồng độ khoảng 10^7 CFU/ml, 10 lít hỗn hợp môi trường và 20 kg cám gạo để thu 31 kg sản phẩm phối trộn. Cám gạo được khử trùng ướt ở $121^\circ C$ trong 30 phút để loại các nhóm vi sinh vật ngoại lai.

Lên men 31 kg sản phẩm phối trộn trong tủ lên men có nhiệt độ 32°C, cách 6 giờ lại đảo trộn nhẹ hỗn hợp này, sau thời gian 48 giờ thu được 31 kg sản phẩm lên men. Tủ lên men có dung tích 5x1x1,5 (m), sử dụng khay inox với độ dày của cơ chất lên men 6 cm.

Sấy 31 kg sản phẩm lên men ở nhiệt độ 40°C trong thời gian 4 giờ để thu được 30 kg chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học có độ ẩm 15%.

Chế phẩm này có dạng bột mịn, màu vàng nâu, kích cỡ hạt từ 0,1-0,3 mm, có mật độ vi sinh vật đạt $\geq 10^9$ CFU/g (ml), có năng lực phân hủy trên 95 % các thành phần C_xH_y trong dầu; khai thác ổn định trong thời gian ≥ 6 tháng; an toàn cho môi trường và đạt độ ẩm 15 %.

Chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học sẽ được đóng gói trong túi kềm.

Ví dụ 2. Đánh giá khả năng tạo màng sinh học của chế phẩm vi sinh theo giải pháp hữu ích

Đánh giá khả năng tạo màng sinh học của chế phẩm vi sinh theo giải pháp hữu ích bằng cách hòa tan 10 g chế phẩm vi sinh trong 90 ml nước muối sinh lý, lắc với tốc độ 180 vòng/phút ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 1 giờ, sau đó ly tâm thu sinh khối và hòa sinh khối trong nước cất vô trùng thu hỗn dịch. Xác định mật độ tế bào của hỗn dịch này ở bước sóng 600 nm (OD) để pha loãng hỗn dịch đạt được OD = 0,3. Hút 1% hỗn dịch OD=0,3 vào falcon chứa 2,5 ml môi trường LB và 0,5 ml môi trường Hansen, thu mẫu 1, mẫu 2 và mẫu 3 sau 1, 2 và 3 ngày để tính ở nhiệt độ 30°C.

Đánh giá khả năng tạo màng sinh học của các mẫu theo quy trình của Morikawa và cộng sự (2006) bằng cách dùng pipet hút bỏ dịch ở các mẫu tránh không làm vỡ màng. Bơm 5 ml nước cất vào các mẫu chứa môi màng, hút ra nhẹ và lặp lại một lần nữa. Tiếp tục bơm 3 ml dung dịch tím tinh thể 0,1 % vào các mẫu này, để tĩnh trong thời gian 10 phút ở nhiệt độ phòng để cố định dung dịch tím tinh thể bám vào màng. Hút dịch tím tinh thể ra, rửa bằng nước cất hai lần. Bơm 3 ml axit axetic 33 % vào các mẫu và lắc đều. Đo OD của các mẫu ở bước sóng 590 nm. Chủng *A. calcoaceticus* P23 (Yamaga và cộng sự, 2010) được lấy từ bộ sưu tập chủng giống của Trường Đại học Hokkaido, Nhật Bản để sử dụng làm đối chứng dương. Kết quả thử nghiệm thu được thể hiện trong Bảng 1 dưới đây.

Bảng 1. Giá trị đo OD ở các mẫu

Mẫu	OD (bước sóng 590 nm)
Đối chứng dương	17,5 ± 1,2
Mẫu 1	35,2 ± 1,5
Mẫu 2	36,1 ± 1,4
Mẫu 3	35,7 ± 1,7

Kết quả ở Bảng 1 cho thấy, chế phẩm vi sinh thu được theo giải pháp hữu ích có khả năng tạo màng.

Ví dụ 3: Xử lý 50 lít nước bị nhiễm dầu mỡ bằng chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học theo giải pháp hữu ích

Nước thải nhiễm dầu được lấy tại kho xăng Đỗ Xá, Hà Nội được phân tích các chỉ tiêu như BOD, COD, SS, hàm lượng các thành phần hydrocacbon tại Viện Hóa Công nghiệp, Bộ Công Thương. Dựa trên kết quả thu được, các chỉ tiêu đã được trung hòa bằng cách sử dụng môi trường khoáng Gost để đưa về các giá trị đó về: pH=5,5-8; COD: 500-600 mg/l; BOD₅: 400-500 mg/l (BOD₅/COD > 0,5 và BOD₅ < 1000 mg/l); hàm lượng chất rắn lơ lửng (SS) < 50 mg/l; hàm lượng dầu tổng số 6000-7000 (mg/l), các kim loại nặng ≤ 2 mg/l; hàm lượng phenol và hợp chất chứa phenol < 140 mg/l; hàm lượng các muối cyanuar < 60 mg/l. Thành phần môi trường khoáng Gost bao gồm (NH₄)₂HPO₄ (3,5 g/l), KH₂PO₄ (0,5 g/l), MgSO₄ (0,5 g/l), MgCl₂ (1 g/l), NaCl (5 g/l), pH 7-7,2.

Thí nghiệm được thiết kế như sau:

Mẫu số 1: phối trộn 5 g chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học và 50 lít nước thải nhiễm dầu đã được xử lý như trên.

Mẫu số 2: chỉ sử dụng 50 lít nước thải nhiễm dầu đã được xử lý như trên, không bổ sung chế phẩm.

Sục khí ở mẫu số 1 và mẫu số 2 để hỗ trợ oxi cho các vi sinh vật có trong các mẫu có thể dễ dàng nhanh chóng sinh trưởng và phát triển trên các nguồn cơ chất là các thành phần hydrocacbon có trong nước thải nhiễm dầu. Sau 7 ngày, chuẩn bị hỗn hợp dung môi hữu cơ bao gồm 3 lít axeton và 9 lít etyl axetat. Mẫu số 1 và mẫu số 2 sẽ

được tách chiết với hơn hợp dung môi này, cụ thể là cho 3 lít hỗn hợp dung môi vào 1 lít mẫu để tách chiết. Quá trình tách chiết được thực hiện 3 lần. Dịch tách chiết được làm khan bằng Na_2SO_4 , lọc, cô quay dung môi dưới áp suất giảm đến khi còn 10 ml và được phân tích hàm lượng dầu trước và sau xử lý bằng phân tích sắc ký khí và phân tích dầu tổng số theo tiêu chuẩn TCVN 4582 – 88. Kết quả cho thấy, ở mẫu số 1 hơn 95 % hàm lượng dầu diesel đã được phân hủy sau 7 ngày với hàm lượng dầu diesel ban đầu là 6755 mg/l. Đồng thời, mẫu còn được dùng để phân tích các thành phần hydrocacbon thơm có trong nước thải nhiễm dầu trên cơ sở quy trình US EPA method 610. Dựa trên phần mềm excel, khả năng phân hủy của một số thành phần hydrocacbon thơm có trong nước thải nhiễm dầu đã được tính toán như anthracen, benzen, 4-(2-butenyl)-1,2-dimethyl-benzen, (1,4-Dimethylpent-2-enyl) benzen, 1-methyl-4-(1-methyl-2-propenyl)-benzen, heptadecane, hexadecane, hexacosan, naphthalen; 10: 1,2,3,4-tetrahydro-6-methyl-naphthalen, decahydro-4,4,8,9,10-pentamethyl naphthalen, phenanthren, pyren. Kết quả cho thấy các thành phần này ở mẫu số 1 đã bị phân hủy trên 95 % sau 7 ngày thử nghiệm. Trong khi đó, mẫu số 2 các thành phần này chỉ bị phân hủy từ 2-17 % sau 7 ngày thử nghiệm (Fig.7)

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình theo giải pháp hữu ích đã tạo được chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học và thử nghiệm có hiệu quả trong xử lý nước thải nhiễm dầu. Việc sử dụng hỗn hợp các chủng VSV bao gồm vi khuẩn và nấm men phân lập từ các kho bể chứa xăng dầu, các vùng ven biển bị nhiễm dầu 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 nhiễm dầu từ các kho, bể chứa dầu. Nước thải nhiễm dầu sau khi được xử lý bằng các chế phẩm màng sinh học đa chủng đã loại hơn 95 % các thành phần hydrocacbon có trong nước thải. Nước thải nhiễm dầu đầu ra đạt loại B QCVN24:2009/BTNMT.

Quy trình theo giải pháp hữu ích đơn giản, dễ thực hiện và phù hợp với các điều kiện thực tế, có thể ứng dụng trong các công nghệ xử lý dầu tại một số kho, bể chứa xăng dầu ở Việt Nam.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học để xử lý nước bị nhiễm dầu, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

(a) Nhân giống vi sinh vật bằng cách lên men mười chủng vi khuẩn bao gồm: *Azospirillum* sp. DG7, *Bacillus* sp. B8, *Bacillus* sp. C2, *Microbacterium* sp. B15, *Paracoccus* sp. DG25, *Pseudomonas* sp. B6, *Ochrobactrum* sp. DGP2, *Rhodococcus* sp. B2, *Rhodococcus* sp. BN5 và *Rhizobium* sp. DG22, và 2 chủng nấm men *Candida* sp. TH1 và *Candida* sp. TH4 có số lưu giữ tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm và Công nghệ Việt Nam với số lưu giữ từ CNSHMT 01 đến CNSHMT 12, tương ứng trong môi trường lên men thể dịch thu được các dịch lên men vi khuẩn và dịch lên men nấm men;

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

(c) Thu sinh khối nấm men bằng cách ly tâm từng dịch lên men nấm men thu được từ bước a) riêng biệt với tốc độ 6000 vòng/phút ở nhiệt độ 4°C trong thời gian 10 phút, sau đó được rửa hai lần bằng nước cất đã khử trùng và phối trộn các sinh khối với tỷ lệ bằng nhau, bổ sung dung dịch muối sinh lý để thu được sinh khối nấm men có nồng độ 10^7 CFU/ml;

(d) Thu dịch vi sinh gốc bằng cách phối trộn sinh khối vi khuẩn thu được ở bước (b) với sinh khối nấm men thu được từ bước (c) theo tỷ lệ 5:1 (thể tích:thể tích) thu được dịch vi sinh gốc có nồng độ khoảng 10^7 CFU/ml;

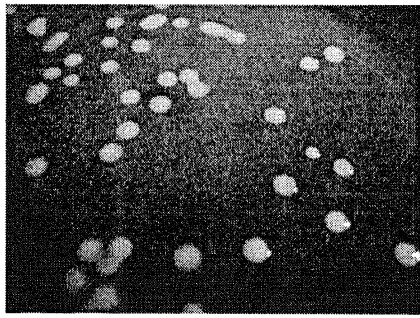
(e) Thu sản phẩm phối trộn bằng cách phối trộn dịch vi sinh gốc, hỗn hợp môi trường LB:Hansen có tỷ lệ 4:1 (thể tích/thể tích) và cám gạo theo tỷ lệ tương ứng 1:10:20 (thể tích/thể tích/trọng lượng), sau khi trộn đều, thu được sản phẩm phối trộn; và

(f) Thu chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học bằng cách lên men sản phẩm phối trộn trong điều kiện nhiệt độ từ 28 đến 32°C, đảo trộn theo chu kỳ 6 giờ, thời gian lên

men trong 48 giờ, sau đó sấy sản phẩm lên men ở nhiệt độ từ 40 đến 45°C trong thời gian từ 3 đến 4 giờ để thu được chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học có độ ẩm 15%.

2. Chế phẩm vi sinh vật tạo màng sinh học xử lý nước bị nhiễm dầu thu được từ quy trình theo điểm 1, trong đó chế phẩm này chứa các chủng vi khuẩn bao gồm *Azospirillum* sp. DG7, *Bacillus* sp. B8, *Bacillus* sp. C2, *Microbacterium* sp. B15, *Paracoccus* sp. DG25, *Pseudomonas* sp. B6, *Ochrobactrum* sp. DGP2, *Rhodococcus* sp. B2, *Rhodococcus* sp. BN5 và *Rhizobium* sp. DG22, và các chủng nấm men bao gồm *Candida* sp. TH1 và *Candida* sp. TH4 có số lưu giữ tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm và Công nghệ Việt Nam với số lưu giữ từ CNSHMT 01 đến CNSHMT 12.

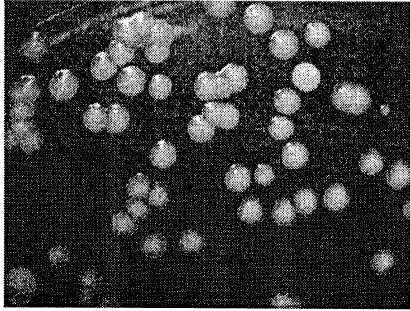
Fig.1



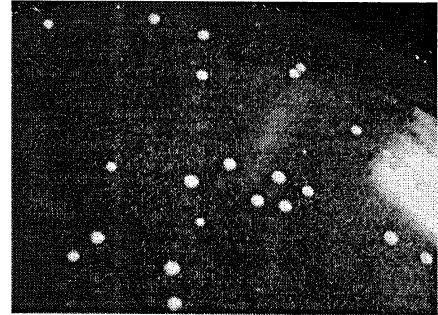
(A)



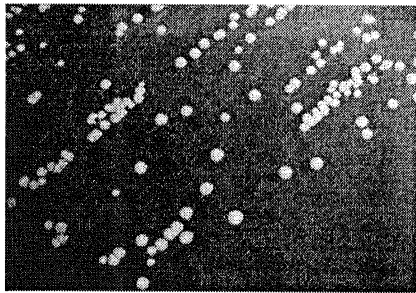
(B)



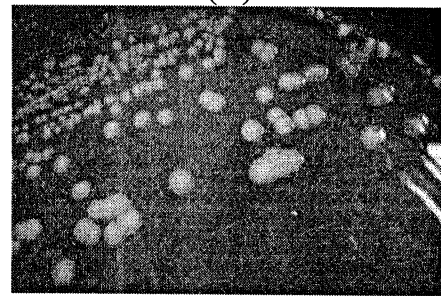
(C)



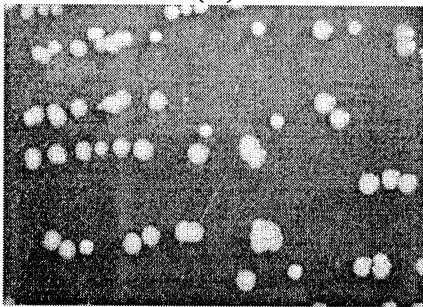
(D)



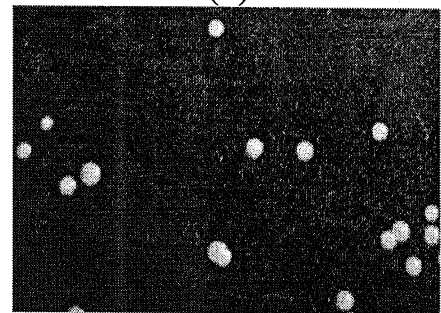
(E)



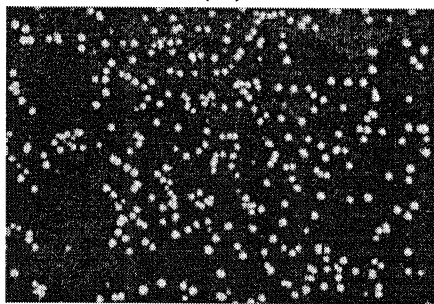
(F)



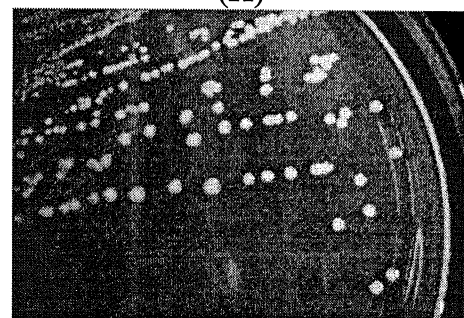
(G)



(H)

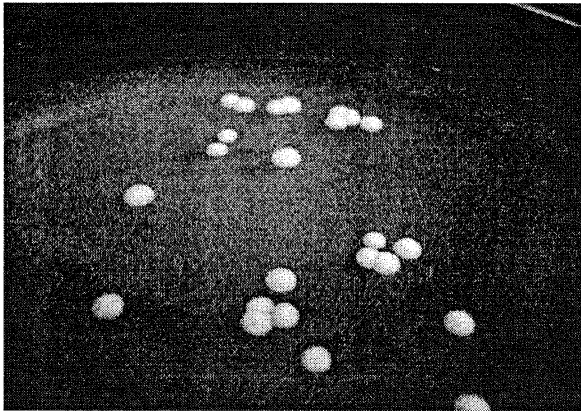


(I)

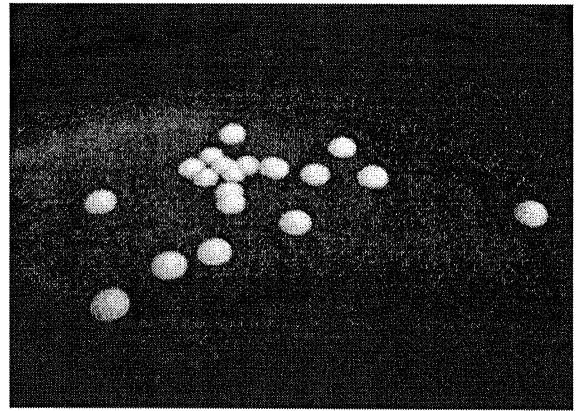


(J)

Fig.2



(A)



(B)

Fig.3

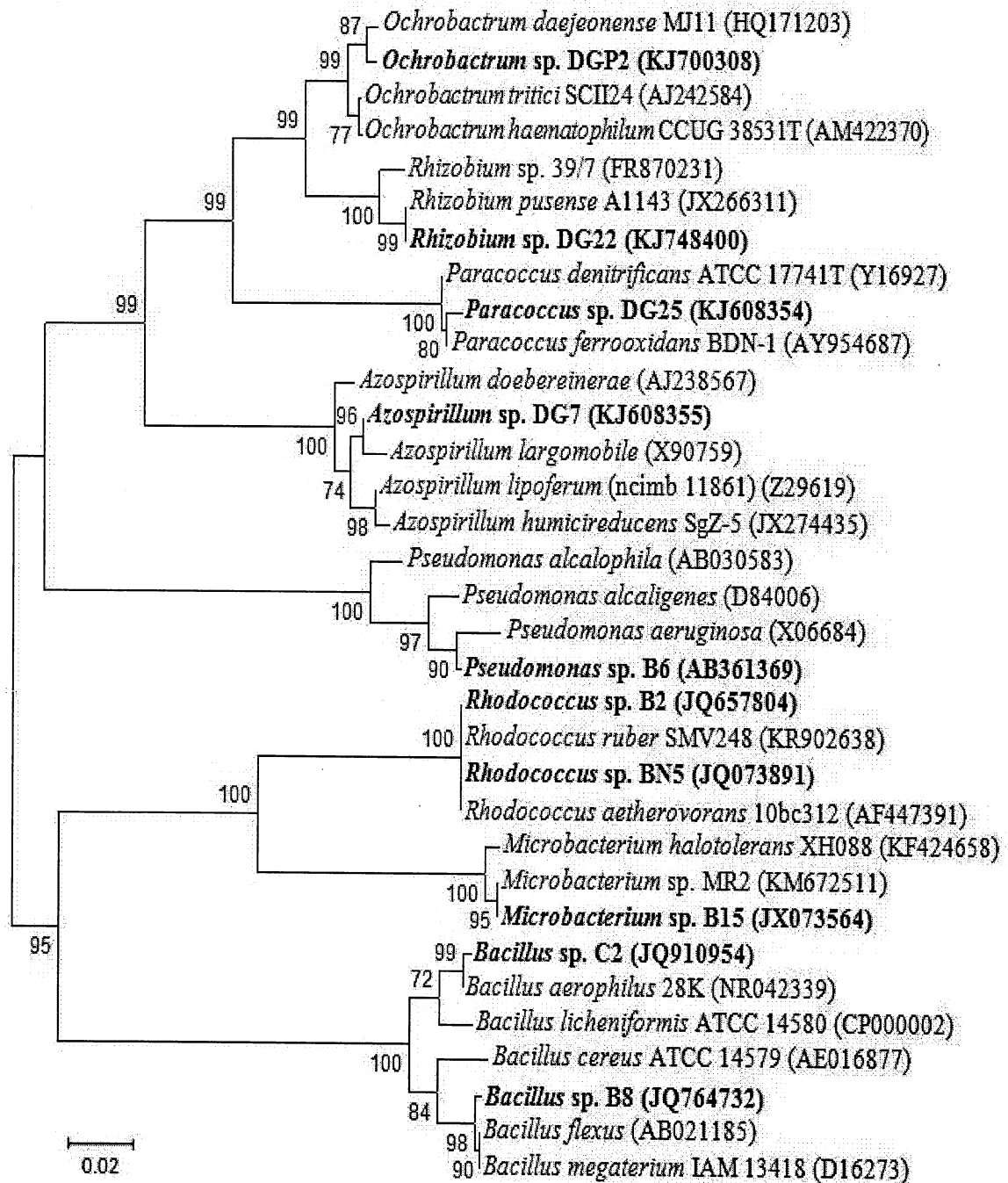
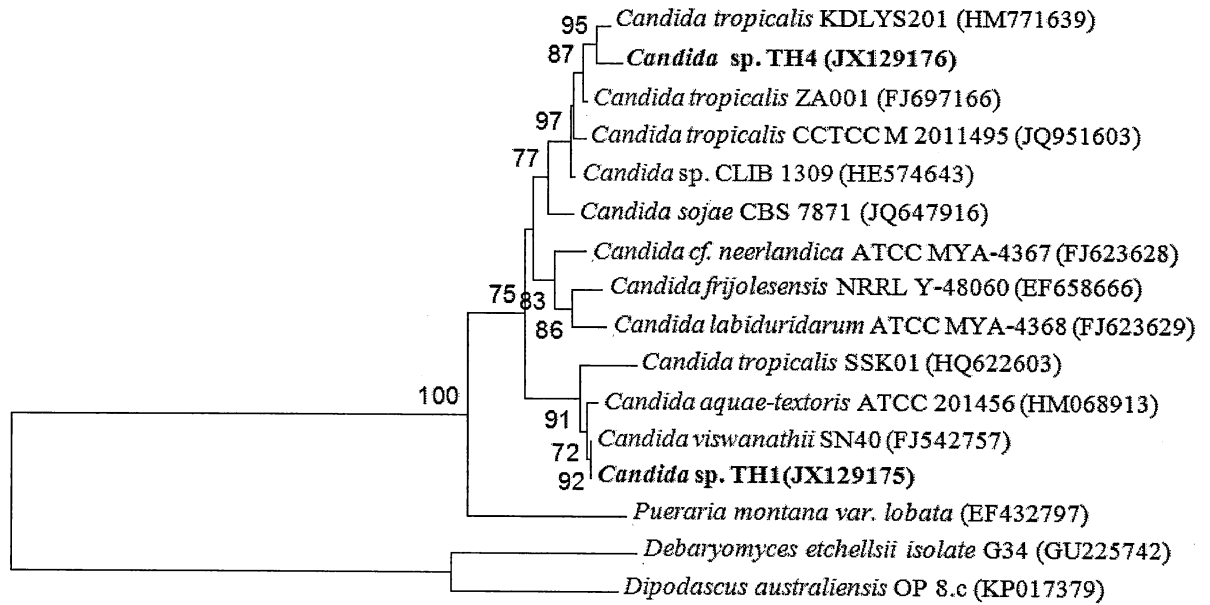


Fig.4



1942

Fig.5

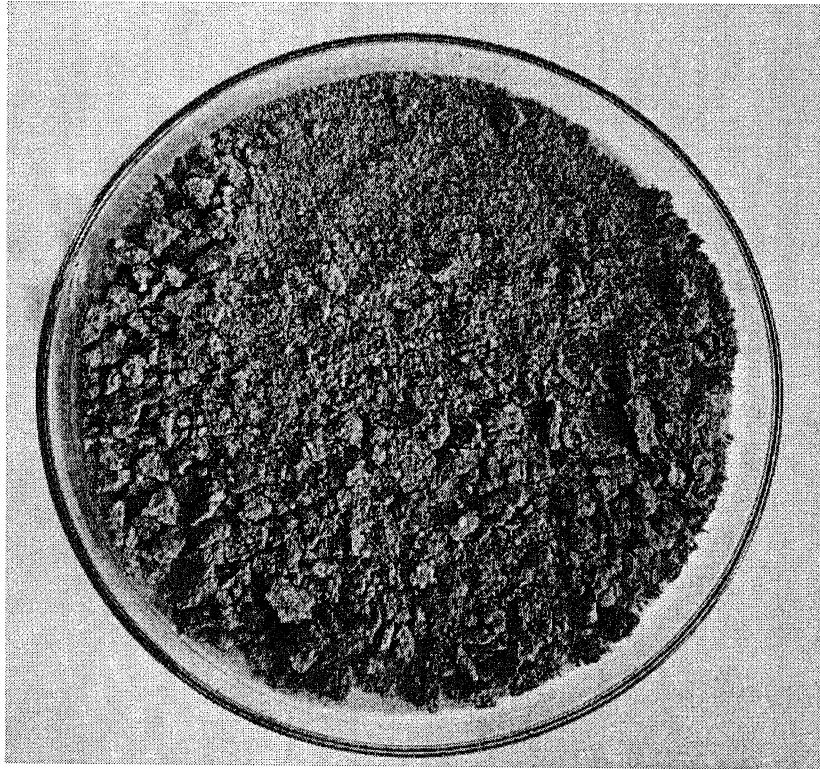


Fig.6

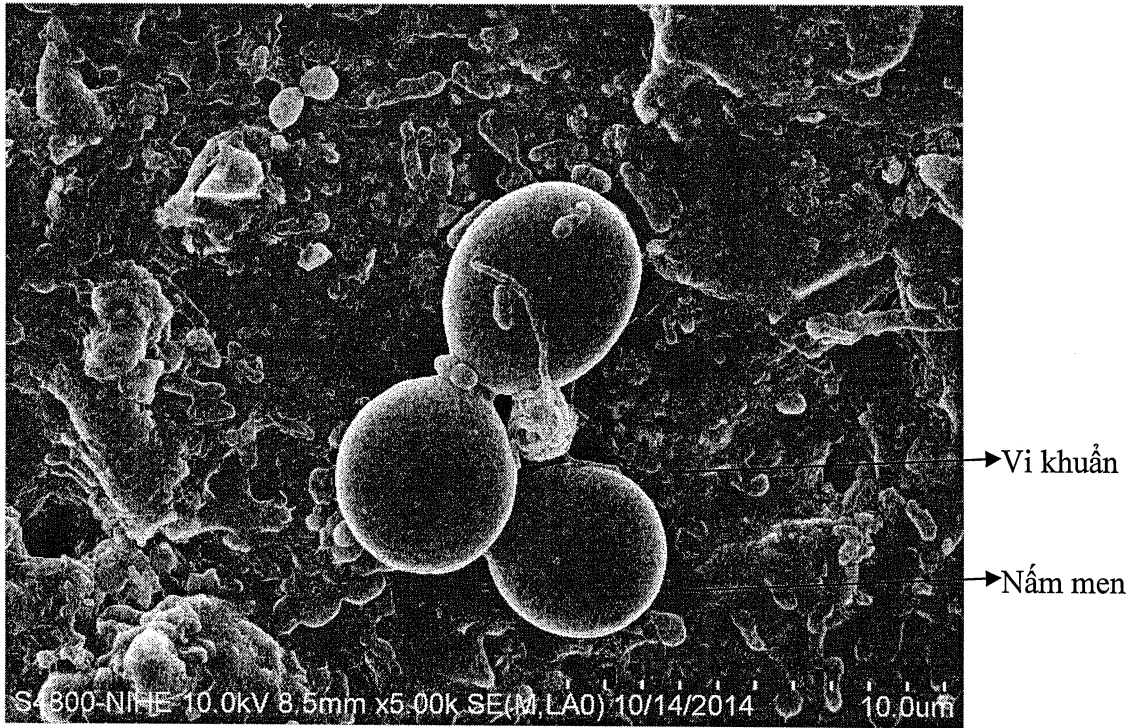
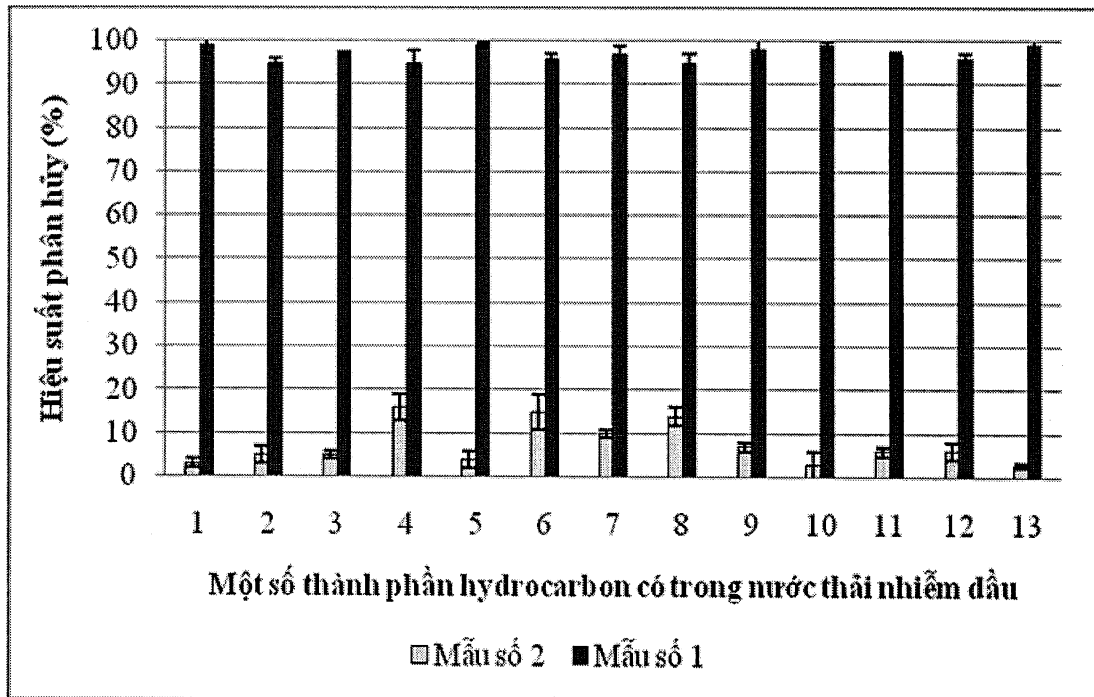


Fig.7



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Viện Công nghệ sinh học
 <120> Quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học xử lý nước bị nhiễm dầu và chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học thu được bằng quy trình này

<130>

<160> 12

<170>

<210> 1

<211> 537

<212> ADN

<213> *Azospirillum* sp. DG7

<220>

<223>

<220>

<400> 537

```

1   ttagttagtg cctgggcgca gcctgatcca gcaatgccgc gtgagtgatg aaggccttag
61  ggttgtaaag ctctttcgca cgcgacgatg atgacggtag cgtgagaaga agccccggct
121 aacttcgtgc cagcagccgc ggtaatacga agggggctag cgttgttcgg aattactggg
181 cgtaaagggc gcgtaggcgg cctgtttagt cagaagtgaa agccccgggc tcaacctggg
241 aatagctttt gatactggca ggcttgagtt ccggagagga tggtggaatt cccagtgtag
301 aggtgaaatt cgtagatatt gggaagaaca ccggtggcga aggcggccat ctggacggac
361 actgacgctg aggcgcgaaa gcgtggggag caaacaggat tagataccct ggtagtccac
421 gccgtaaacg atgaatgcta gacgtcgggg tgcattgact tcggtgtcgc cgctaacgca
481 ttaagcattc cgctgggga gtacggccgc aaggttaaaa ctaaaggaa ttgacgg

```

<210> 2

<211> 556

<212> ADN

<213> *Bacillus* sp. B8

<220>

<223>

<220>

<400> 556

```

1   tcctacggga ggcagcagta gggaaatcttc cgcaatggac gaaagtctga cggagcaacg
61  ccgcgtagt gatgaaggct ttcgggtcgt aaaactctgt tgtagggaa gaacaagtac
121 aagagtaacg tcttgactt tgacggtagc taaccagaaa gccacggcta actacgtgcc
181 agcagccgcg gtaatacgtg ggtggcaagc gttatccgga attattgggc gtaaagcgcg
241 cgcagggcgt tttttaagtc tgtagtgaaa gccacggct caaccgtgga gggtcattgg
301 aaactgggga acttgagtgc agaagagaaa agcgggaattc cacgtgtagc ggtgaaatgc
361 gtagagatgt ggaggaacac cagtggcgaa ggcggctttt tggtagtaa ctgacgctga
421 ggcgcgaaag cgtggggagc aaacaggatt agataccctg gtagtccacg ccgtaaacga
481 tgagtgctaa gtgttagagg gtttccgccc ttagtgctg cagctaacgc attaagcact
541 ccgcctgggg agtacg

```


<210> 3

<211> 1449

<212> ADN

<213> *Bacillus* sp. C2

<220>

<223>

<220>

<400> 1449

```

1      cgtgactata  catgcagtcg  agcggacaga  agggagcttg  ctcccggatg  ttagcggcgg
61     acgggtgagt  aacacgtggg  taacctgcct  gtaagactgg  gataactccg  ggaaaccgga
121    gctaataccg  gatagttcct  tgaaccgcat  ggttcaagga  tgaaagacgg  tttcggctgt
181    cacttacaga  tggacccgcg  gcgcattagc  tagttggtga  ggtaacggct  caccaaggcg
241    acgatgcgta  gccgacctga  gagggtgatc  ggccacactg  ggactgagac  acggcccaga
301    ctctacggg  aggcagcagt  agggaatctt  ccgcaatgga  cgaaagtctg  acggagcaac
361    gccgctgag  tgatgaaggt  tttcggatcg  taaagctctg  ttgtaggga  agaacaagtg
421    caagagtaac  tgcttgacc  ttgacggtac  ctaaccagaa  agccacggct  aactacgtgc
481    cagcagccgc  ggtaatacgt  aggtggcaag  cgttgtccgg  aattattggg  cgtaaagggc
541    tcgcaggcgg  tttcttaagt  ctgatgtgaa  agccccggc  tcaaccgggg  agggtcattg
601    gaaactggga  aacttgagtg  cagaagagga  gagtggaatt  ccacgtgtag  cggtgaaatg
661    cgtagagatg  tggaggaaca  ccagtggcga  aggcgactct  ctggtctgta  actgacgctg
721    aggagcgaaa  gcgtgggggg  cgaacaggat  tagataccct  ggtagtccac  gccgtaaacg
781    atgagtgcta  agtgtaggg  ggtttccgcc  ccttagtgct  gcagctaacg  cattaagcac
841    tccgcctggg  gactacggtc  gcaagactga  aactcaaagg  aattgacggg  ggcccgcaca
901    agcggtgagg  catgtggttt  aattcgaagc  aacgcgaaga  accttaccag  gtcttgacat
961    cctctgacaa  ccctagagat  agggctttcc  cttcggggac  agagtgacag  gtggtgcatg
1021   gttgtcgtca  gctcgtgtcg  tgagatggtg  ggttaagtcc  cgcaacgagc  gcaacccttg
1081   atcttagttg  ccagcattta  gttgggcact  ctaaggtgac  tgccggtgac  aaaccggagg
1141   aaggtagggg  tgacgtcaaa  tcatcatgcc  cttatgacc  tgggctacac  acgtgctaca
1201   atggacagaa  caaagggctg  cgagaccgca  aggttagcc  aatcccacaa  atctgttctc
1261   agttcggatc  gcagtctgca  actcgactgc  gtgaagctgg  aatcgctagt  aatcgcggat
1321   cagcatgccg  cgggtaatac  gttccccggc  cttgtacaca  ccgcccgtca  caccacgaga
1381   gtttgcaaca  cccgaagtcg  gtgaggtaac  ctttatggag  ccagccgcaa  gtaaggtggg
1441   caagcagca

```

<210> 4

<211> 544

<212> ADN

<213> *Microbacterium* sp. B15

<220>

<223>

<220>

<400> 544

```
1   actcctacgg ggggcagcag tggggaatat tgcacaatgg gcggaagcct gatgcagcaa
61  cgccgcgtga gggatgacgg cttcggggtt gtaaacctct ttagcagggg aagaagcgtg
121 agtgacggta cctgcagaaa aagcgccggc taactacgtg ccagcagccg cgtaatacgc
181 tagggcgcaa gcgttatccg gaattattgg gcgtaaagag ctcgtagggc gtttgtcgcg
241 tctgctgtga aatctggagg ctcaacctcc agcctgcagt gggtaggggc agactagagt
301 gcggtagggg agattggaat tcttgggtga gcggtggaat gcgcagatat caggaggaac
361 accgatggcg aaggcagatc tctgggccgt aactgacgct gaggagcgaa aggggtggga
421 gcaaacaggc ttagataccc tggtagtcca ccccgtaaac gttgggaact agttgtggg
481 gcctttccac ggtctccgtg acgcagctaa cgcattaagt tccccgectg gggagtacgg
541 ccgc
```

<210> 5

<211> 526

<212> ADN

<213> *Paracoccus* sp. DG25

<220>

<223>

<220>

<400> 526

```

1   atgggggcac cctgatctag ccatgccgcg tgagtgatga aggccctagg gttgtaaagc
61  tctttcagct gggaagataa tgactgtacc agcagaagaa gccccggcta actccgtgcc
121 agcagccgcg gtaatacgga gggggctagc gttgttcgga attactgggc gtaaagcgca
181 cgtaggcgga ccggaaagtt gggggtgaaa tcccggggct caacccgga actgccttca
241 aaactatcgg tctggagttc gagagaggtg agtggaaattc cgagtgtaga ggtgaaattc
301 gtagatattc ggaggagcac cagtggcgaa ggcggtcac tggctcgata ctgacgctga
361 ggtgcgaaag cgtggggagc aaacaggatt agataccctg gtagtccacg ccgtaaacga
421 tgaatgccag tcgtcgggca gcatgctggt cggtgacaca cctaacggat taagcattcc
481 gcctggggag tacggtcgca agattaaaac taaaaggaat tgacgg

```

<210> 6

<211> 490

<212> ADN

<213> *Pseudomonas* sp. B6

<220>

<223>

<220>

<400> 490

```

1   atcctggctc agattgaacg ctggcggcag gcctaacaca tgcaagtcga gcggatgagt
61  ggagcttgct ccatgattca gcggcggacg ggtgagtaat gcctaggaat ctgcctggta
121 gtgggggaca acgtttcgaa aggaacgcta ataccgcata cgtcctacgg gagaaagtgg
181 gggatcttcg gacctcacgc tatcagatga gcctaggtcg gattagctag ttggtgaggt
241 aaaggctcac caaggcgacg atccgtaact ggtctgagag gatgatcagt cactctggaa
301 ctgagacacg gtccagactc ctacgggagg cagcagtggg gaatattgga caatgggcga
361 aagcctgatc cagccatgcc gcgtgtgtga agaaggtctt cggattgtaa agcactttaa
421 gttgggagga agggcagtaa gttaatacct tgctgttttg acgttaccga cagaataagc
481 accggctaac

```

<210> 7

<211> 524

<212> ADN

<213> *Ochrobactrum* sp. DGP2

<220>

<223>

<220>

<400> 524

```

1   ggcgcagcct gatccagcca tgccgcgtga gtgatgaagg ccctaggggtt gtaaagctct
61  ttcaccggtg aagataatga cggtaaccgg agaagaagcc cgggctaact tcgtgccagc
121 agccgcggta atacgaaggg ggctagcggt gttcggattt actgggcgta aagcgcacgt
181 aggcgggcta ataagtcagg ggtgaaatcc cggggctcaa ccccggaact gcctttgata
241 ctgttagtct tgagtatggt agaggtgagt ggaattccga gtgtagaggt gaaattcgta
301 gatattcgga ggaacaccag tggcgaaggc ggctcactgg accattactg acgctgaggt
361 gcgaaagcgt ggggagcaaa caggattaga taccctggta gtccacgccg taaacgatga
421 atgtagccg ttggggaagt tactcttcgg tggcgcagct aacgcattaa acattccgcc
481 tggggagtac ggtcgcaaga ttaaaactca agggaattga cggg

```

<210> 8

<211> 565

<212> ADN

<213> *Rhodococcus* sp. B2

<220>

<223>

<220>

<400> 565

```

1   gactgagaca cggcccagac tcctacggga ggcagcagtg gggaaatattg cacaatgggc
61  gcaagcctga tgcagcgacg ccgcgtgagg gatgacggcc ttcggggttg aaacctcttt
121 cagtaccgac gaagcgcaag tgacggtagg tacagaagaa gcaccggcca actacgtgcc
181 agcagccgcg gtaatacgta ggggtgcgagc gttgtccgga attactgggc gtaaagagct
241 cgtaggcggt ttgtcgcgtc gtctgtgaaa acccgagct caactgcggg cttgcaggcg
301 atacgggcag acttgagtac tgcaggggag actggaattc ctggtgtagc ggtgaaatgc
361 gcagatatca ggaggaacac cggtggcgaa ggcgggtctc tgggcagtaa ctgacgctga
421 ggagcgaaag cgtgggtagc gaacaggatt agataccctg gtagtccacg ccgtaaacgg
481 tgggcgctag gtgtgggttt cttccacgg gatccgtgcc gtagctaacg cattaagcgc
541 cccgcctggg gactacggcc gcaag

```

<210> 9

<211> 527

<212> ADN

<213> *Rhodococcus* sp. BN5

<220>

<223>

<220>

<400> 527

```

1   tactcctacg gggagcagca gtggggaata ttgcacaatg ggcgcaagcc tgatgcagcg
61  acgccgcgtg agggatgacg gccttcgggt tgtaaacctc tttcagtacc gacgaagcgc
121 aagtgcggt aggtacagaa gaagcaccgg ccaactacgt gccagcagcc gcgtaatac
181 gtagggtgcg agcgttgtcc ggaattactg ggcgtaaaga gctcgtaggc ggtttgcgc
241 gtcgtctgtg aaaacccgca gctcaactgc gggcttgtag gcgatacggg cagacttgag
301 tactgcaggg gagactggaa ttctggtgt agcggtgaaa tgcgcagata tcaggaggaa
361 caccggtggc gaaggcgggt ctctgggcag taactgacgc tgaggagcga aagcgtgggt
421 agcgaacagg attagatacc ctggtagtcc acgccgtaaa cggtgggcgc taggtgtggg
481 tttccttcca cgggatccgt gccgtagcta acgcataagc gccccgc

```

<210> 10
 <211> 1443
 <212> ADN
 <213> *Rhizobium* sp. DG22
 <220>
 <223>

<220>

<400> 1443

```

1   gtgggggaaa attcggatgg aggcgctatt aactgcagt cgctctgtcc tcacgcgggg
61  agtggcagac gggttgagta acgcgtggga acataccctt tcctgcggaa tagctccggg
121 aaactggaat taataccgca tacgccctac gggggaaaga tttatcgggg aaggattggc
181 ccgcgttggg ttagctagtt ggtggggtaa aggcctacca aggcgacgat ccatagctgg
241 tctgagagga tgatcagcca cattgggact gagacacggc ccaaactcct acgggaggca
301 gcagtgggga atattggaca atgggcgcaa gcctgatcca gccatgccgc gtgagtgatg
361 aaggccttag ggttgtaaag ctctttcacc gatgaagata atgacggtag tccgagaaga
421 agccccggct aacttcgtgc cagcagccgc ggtaatacga agggggctag cgttgttcgg
481 aattactggg cgtaaagcgc acgtaggcgg atatttaagt caggggtgaa atcccgcagc
541 tcaactgcgg aactgccttt gatactgggt atcttgagta tgaagaggt aagtgaatt
601 ccgagtgtag aggtgaaatt cgtagatatt cggaggaaca ccagtggcga aggcggctta
661 ctggtccatt actgacgctg aggtgcgaaa gcgtggggag caaacaggat tagataccct
721 ggtagtccac gccgtaaacg atgaatgta gccgtcgggc agtatactgt tcggtggcgc
781 agctaacgca ttaaaccattc cgcctgggga gtacggtcgc aagattaaaa ctcaaaggaa
841 ttgacggggg cccgcacaag cggtgagca tgtggttaa ttcgaagcaa cgcgcagaac
901 cttaccagct cttgacattc ggggtatggg cattggagac gatgccttc agttaggctg
961 gccccagaac aggtgctgca tggctgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt
1021 cccgcaacga gcgcaaccct cgcccttagt tgccagcatt tagttgggca ctctaagggg
1081 actgccggtg ataagccgag aggaaggtgg ggatgacgtc aagtcctcat ggcccttacg
1141 ggctgggcta cacacgtgct acaatgggtg tgacagtggg cagcgagaca gcgatgctga
1201 gctaactctc aaaagccatc tcagttcgga ttgactctg caactcgagt gcatgaagtt
1261 ggaatcgcta gtaatcgag atcagcatgc tgcggtgaat acgttcccgg gccttgatac
1321 caccgcccgt cacaccatgg gagttggttt taccgaagg tagtgcgcta accgcaagga
1381 ggcagctaac cacggtaggg tcagcgtact ggggtgaagt cgtaacaagg tagccgagat
1441 tca

```


<210> 11

<211> 478

<212> ADN

<213> *Candida* sp. TH1

<220>

<223>

<220>

<400> 478

1 actgatttgc ttaattgcac cacatgtggt tttcctggac agctgctttg gcggggggac
61 tcgtttccgc cgccagaggt cacaactaaa ccaaactttt tattaccagt caaccatacg
121 ttttaatagt caaaactttc aacaacggat ctcttggttc tcgcatcgat gaagaacgca
181 gcgaaatgcg atacgtagta tgaattgcag atattcgtga atcatcgaat ctttgaacgc
241 acattgcgcc ctttggtatt ccaaagggca tgcttggttg agcgtcattt ctccctcaag
301 cccgcggggt tggtggtgag caatacgcca ggtttggttg aaagacgtac gtggagacta
361 tattagcgac ttaggttcta ccaaacgct tgtgcagtcg gccaccaca gcttttctaa
421 cttttgacct caatcaggta ggactaccg ctgacttagt ctaaacaga cgacgagc

<210> 12

<211> 450

<212> ADN

<213> *Candida* sp. TH4

<220>

<223>

<220>

<400> 450

```

1   gatttgctta attgcaccac atgtgttttt tattgacaat ttctttgggtg gcgggagcaa
61  tcctaccgcc agaggttata actaaaccaa actttttatt tacagtcaaa cttgatttat
121 tattacaata gtcaaaactt tcaacaacgg atctcttggt tctcgcacg atgaagaacg
181 cagcgaaatg cgatacgtaa tatgaattgc agatattcgt gaatcatcga atctttgaac
241 gcacattgcg ccctttggta ttccaaaggg catgcctggt tgagcgtcat ttctccctca
301 aacccccggg tttggtggtg agcaatcgc taggtttggt tgaaagaatt taccgggaaa
361 actaatttta agcaacttag gttatccaaa accttaattt ggctatgggc cccaatttt
421 atttcaaact ttaacctcaa atcaggtaga

```