Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, Tập 33, Số 2S (2017) 71-76

Hiệu suất phân hủy toluene của màng sinh học do hai chủng vi khuẩn tía quang hợp phân lập từ nước nhiễm dầu ở cảng Cầu Đá, Khánh Hòa tạo thành

Nguyễn Thị Minh Nguyệt[1,2,*], Đỗ Thị Liên[3], Cung Thị Ngọc Mai[3], Hoàng Phương Hà[2,3], Lê Thị Nhi Công[2,3]

[1]*Trường ĐHSP Hà Nội 2, Xuân Hoà, Phúc Yên, Vĩnh Phúc, Việt Nam*
[2]*Học viện Khoa học & Công nghệ, VAST, 18 Hoàng Quốc Việt, Hà Nội, Việt Nam*
[3]*Viện Công nghệ Sinh học, VAST, 18 Hoàng Quốc Việt, Hà Nội, Việt Nam*

Nhận ngày 16 tháng 8 năm 2017
Chỉnh sửa ngày 20 tháng 9 năm 2017; Chấp nhận đăng ngày 10 tháng 10 năm 2017

Tóm tắt: Toluene là một hợp chất hydrocarbon thơm có tính độc cao nhưng lại khó bị phân huỷ trong tự nhiên. Do đó, việc nghiên cứu các phương pháp xử lý ô nhiễm toluene đang trở thành vấn đề cấp bách. Trong số các phương pháp phân huỷ toluene, phương pháp xử lý sinh học bằng các chủng vi khuẩn tía quang hợp được các nhà khoa học trên thế giới và Việt Nam quan tâm nghiên cứu. Từ mẫu nước biển ô nhiễm tại Cảng Cầu Đá, Nha Trang, Khánh Hoà chúng tôi đã phân lập được 2 chủng vi khuẩn CCĐPy2, CCĐPy9 vừa có khả năng phân huỷ toluene vừa có khả năng tạo biofilm tốt. Khi nuôi trên môi trường DSMZ – 27 thạch, khuẩn lạc của chủng CCĐPy2 có nhân, lồi, tròn, bề mặt bóng, màu nâu vàng, d = 0,8 - 1,2 mm; khuẩn lạc của chủng CCĐPy9 hình tròn, màu hồng nhạt, có nhân, rìa trong, d = 1 - 2 mm. Hai chủng này sinh trưởng tốt ở 30^{o}C, pH 7 và nồng độ muối 1,5%. Biofilm do chủng CCĐPy2 và chủng CCĐPy9 tạo thànhcó khả năng phân huỷ được 96,1% và 97,2% toluene với nồng độ ban đầu là 150 mg/l. Hai chủng này có thể được sử dụng để xây dựng bộ sưu tập các chủng vi khuẩn tía quang hợp tạo màng sinh học phân huỷ toluene nói riêng và phân huỷ các hydrocarbon thơm trong dầu mỏ nói chung.

Từ khoá: Màng sinh học, phân hủy sinh học, phân huỷ toluene, vi khuẩn tía quang hợp.

1. Mở đầu

Toluene, benzene, ethylbenzene và xylene (TBEX) là các hợp chất hydrocarbon thơm đơn nhân có trong xăng, dầu mỏ (chiếm khoảng 2-8%). Với đặc tính dễ bay hơi, tan tốt trong nước và có chứa nhóm chức liên kết chặt chẽ ngoài vòng benzene do vậy rất khó bị phân huỷ và độc với con người, động vật cũng như sinh thái. Với đặc tính dễ bay hơi, những hợp chất hydrocarbon thơm đơn nhân có nhóm chức gắn với benzene khác nhau sẽ ảnh hưởng đến khả năng phân huỷ của vi sinh vật [1-2].

Trong các hợp chất hydrocarbon thơm trên, toluene là hợp chất hữu cơ có nhóm chức CH3 gắn với vòng benzene do vậy nó càng khó bị phân hủy trong tự nhiên. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng, toluene có ảnh hưởng nghiêm trọng

*Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-978669773.
Email: minhnguyet104@gmail.com
https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.4625

đến sức khoẻ con người như ảnh hưởng đến hệ thần kinh, thậm chí có thể gây tử vong khi bị tiếp xúc trực tiếp hoặc trong thời gian dài [3].

Do tính chất độc hại và cấu trúc khó phân huỷ trong tự nhiên nên việc phân huỷ toluene đã trở thành một vấn đề cấp bách cần được quan tâm. Hiện các biện pháp vật lý và hóa học xử lý tuy rất nhanh và có hiệu quả tức thời nhưng không các biện pháp này lại không xử lý toluene một cách triệt để được. Việc xử lý toluene theo phương pháp phân hủy sinh học đã và đang được nhiều nhà khoa học trên thế giới cũng như trong nước quan tâm. Phương pháp này có ưu điểm vượt trội như: an toàn với môi trường, đơn giản, xử lý triệt để, không gây ra hiện tượng ô nhiễm thứ cấp, chi phí đầu tư không quá lớn. Trong phân hủy sinh học thì công nghệ sử dụng màng sinh học (biofilm) do các vi sinh vật tạo ra hiện đang là phương pháp mới mẻ và cho hiệu quả cao. Biofilm là một tập hợp các vi sinh vật gắn trên một bề mặt của vật thể rắn hoặc bề mặt chất lỏng, tạo thành lớp màng bao phủ bề mặt đó. Các vi sinh vật trong biofilm liên kết với nhau một cách chặt chẽ, tạo thành một cấu trúc bền vững. Do mật độ các chủng vi sinh vật trong biofilm cao, hỗ trợ, và liên kết với nhau một cách chặt chẽ nên khả năng đồng hoá, trao đổi chất, phân hủy các hydrocarbon sẽ xảy ra nhanh hơn[4, 5]. Đặc biệt, trong khi biofilm được hình thành, nồng độ ô xi sẽ giảm đi đáng kể, là điều kiện lý tưởng cho các vi khuẩn tía quang hợp (VKTQH) có thể sinh trưởng và phát triển dễ dàng [6, 7].

Hiện nay trên thế giới đã có nhiều công bố về nhóm VKQHT có khả năng phân huỷ các hydrocarbon trong đó có toluene và chúng thuộc các chi như: *Rhodopseudomonas, Rhodospirillum, Blastochloris* [8, 9]. Tuy nhiên những công bố về các chủng VKQHT vừa có khả năng tạo biofilm tốt vừa có khả năng phân hủy các hợp chất vòng thơm vẫn còn nhiều hạn chế. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sẽ tập trung vào nghiên cứu về hiệu suất phân hủy toluene do biofilm của các chủng VKQHT tạo thành để có thể ứng dụng nhóm vi khuẩn này để xử lý các nguồn ô nhiễm.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Các mẫu nhiễm dầu thu thập tại Cảng Cầu Đá, Nha Trang, Khánh Hoà.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập

Vi khuẩn tía quang hợp được phân lập và làm sạch theo phương pháp Winogradsky trên môi trường DSMZ-27 cải tiến (là môi trường DSMZ có bổ sung toluene thay cho nguồn carbon là acetate) [10].

2.2.2. Đánh giá khả năng tạo màng của các chủng VKTQH

Tiến hành theo phương pháp của O'Toole và Kolter; Morikawa và cộng sự [5,11].

2.2.3. Đánh giá khả năng sinh trưởng và nghiên cứu đặc điểm của VKTQH

Sinh trưởng của các chủng VKTQH được đánh giá bằng cách quan sát độ lớn khuẩn lạc khi mọc trên đĩa thạch và xác đinh độ hấp thụ của dịch huyền phù tế bào khi được nuôi cấy trên môi trường DSMZ-27 cải tiến có bổ sung 50 ppm toluene tại bước sóng 800 nm (OD_{800}). Đặc điểm hình thái khuẩn lạc của các chủng VKTQH được quan sát trên môi trường DSMZ-27 cải tiến thạch.

2.2.4. Nghiên cứu ảnh hưởng của một số điều kiện đến sự sinh trưởng của các chủng VKTQH lựa chọn

Các giá trị nhiệt độ 15; 30 và 45^{o}C; pH từ 4 - 9 và nồng độ muối từ 0 - 4% được sử dụng để đánh giá khả năng sinh trưởng của chủng VKTQH được lựa chọn.

Tất cả các thí nghiệm đều được thực hiện trong điều kiện kỵ khí sáng với cường độ ánh sáng là 3000-5000 lux.

2.2.5. Đánh giá khả năng phân hủy toluene của chủng VKTQH đại diện

Các chủng VKTQH sau khi được tạo biofilm được nuôi trong môi trường DSMZ-27

cải tiến, với các nồng độ: 0 mg/l, 50 mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l, 200 mg/l tại các điều kiện mà chúng sinh trưởng tốt nhất (đã nghiên cứu ở trên). Dựa trên sự thay đổi màu sắc của dịch nuôi cấy và giá trị OD_{800} để xác định nồng độ cơ chất mà vi khuẩn sinh trưởng tốt nhất. Khả năng phân hủy cơ chất tại nồng độ đó được phân tích tại Viện Công nghệ mới – Viện Khoa học và Công nghệ quân sự.

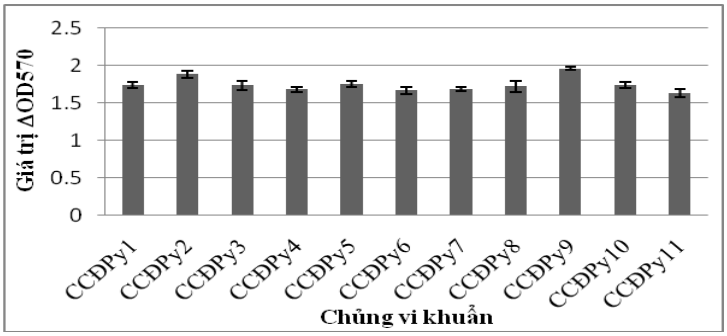
3. Kết quả và thảo luận

3.1. Phân lập, tuyển chọn và đánh giá khả năng tạo biofilm các chủng VKTQH

Bằng phương pháp làm giàu và phân lập, chúng tôi đã phân lập được 11 chủng VKTQH từ các mẫu nước nhiễm dầu tại Cảng Cầu Đá, Khánh Hòa. Khi sử dụng 11 chủng VKTQH này nuôi cấy trên môi trường DSMZ-27 cải tiến với nguồn carbon là toluene thì sau 7 ngày cho thấy, tất cả các chủng vi này đều có khả năng sinh trưởng (thể hiện ở sự đổi màu của dịch nuôi cấy chuyển sang màu đỏ, Hình 1).

Với mục tiêu tuyển chọn được các chủng VKTQH vừa có khả năng sinh trưởng trên môi trường chứa cơ chất toluene, vừa có khả năng tạo biofilm tốt. Do vậy, cả 11 chủng VKTQH được chúng tôi đánh giá khả năng tạo biofilm. Dựa vào giá trị ΔOD_{800} cho thấy, trong 11 chủng VKTQH phân lập được 2 chủng CCĐPy2 và CCĐPy9 có khả năng tạo biofilm tốt hơn các chủng còn lại do đó được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo (Hình 2).

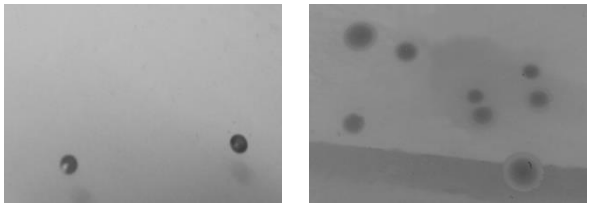
Hình 1. Khả năng sinh trưởng của các chủng VKTQH trong môi trường DSMZ – 27 cải tiến có bổ sung 50 mg/l toluene sau 7 ngày nuôi cấy.



Hình 2. Khả năng tạo biofilm của các chủng VKTQH phân lập được sau 7 ngày.

3.2. Đặc điểm và hình thái khuẩn lạc của các chủng lựa chọn

Khi nuôi trên môi trường DSMZ-27 thạch, khuẩn lạc của chủng CCĐPy2 tròn, lồi, có nhân, bề mặt bóng, màu nâu vàng, d: 0,8-1,2 mm; khuẩn lạc của chủng CCĐPy9 tròn, dẹt, có rìa trắng trong, màu hồng nhạt, có nhân, d: 1-2 mm (Hình 3).



(A) (B)

Hình 3. Hình thái khuẩn lạc củachủng CCĐPy2 (A) và CCĐPy9 (B).

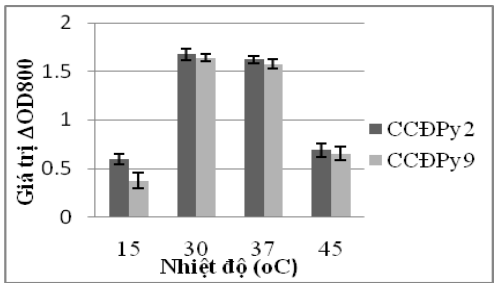
3.3. Ảnh hưởng của một số điều kiện đến sự phát triển của chủng CCĐPy2, CCĐPy9

3.3.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ

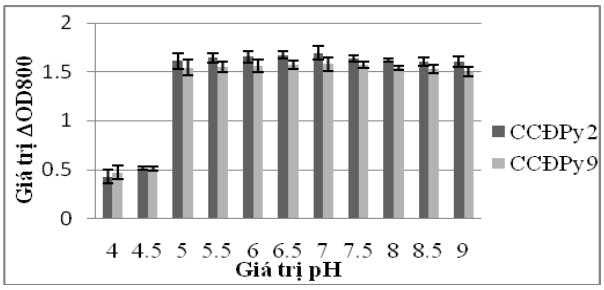
Nhiệt độ có ảnh hưởng khá lớn tới sinh trưởng của vi khuẩn. Theo một số nghiên cứu thì nhiệt độ thích hợp cho vi khuẩn phát triển nằm trong khoảng 30 – 37^{o}C. Vì vậy, chúng tôi tiến hành khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng sinh trưởng của 2 chủng CCĐPy2, CCĐPy9 ở 15, 30, 37, 45^{o}C (Hình 4). Kết quả cho thấy, cả 2 chủng CCĐPy2 và CCĐPy9 đều có khả năng sinh trưởng ở các nhiệt độ thử nghiệm. Tuy nhiên, trong dải nhiệt độ từ 30-37^{o}C các chủng này có khả năng sinh trưởng tốt hơn hẳn và sau 45^{o}C thì khả năng sinh trưởng giảm dần.

3.3.2. Ảnh hưởng của pH

Bên cạnh nhiệt độ thì khả năng sinh trưởng của các chủng vi khuẩn cũng chịu tác động khá lớn bởi sự thay đổi pH. Các nghiên cứu cũng chỉ ra rằng pH thích hợp của vi khuẩn thường là pH trung tính [2, 3]. Do đó, chúng tôi tiến hành khảo sát ảnh hưởng của pH đến sinh trưởng của 2 chủng CCĐPy2, CCĐPy9 với dải pH thay đổi từ 4-9 (Hình 5). Kết quả cho thấy, cả 2 chủng CCĐPy2, CCĐPy9 đều sinh trưởng tốt trong dải pH từ 5-9 và sinh trưởng tốt nhất tại pH 7.



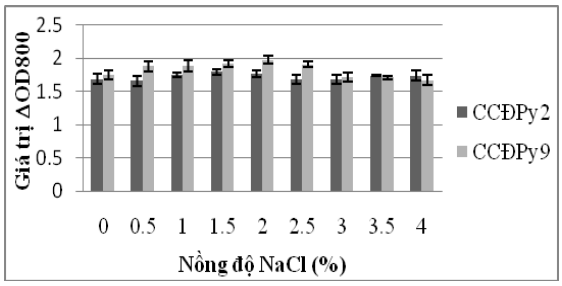
Hình 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự sinh trưởng của chủng CCĐPy2 và CCĐPy9.



Hình 5. Ảnh hưởng của pH đến sự sinh trưởng của chủng CCĐPy2 và CCĐPy9.

3.3.3. Ảnh hưởng của nồng độ muối NaCl

Chủng CCĐPy2 và CCĐPy9 được phân lập từ cảng Cầu Đá, Khánh Hoà trong điều kiện nước mặn, do vậy, nồng độ NaCl cũng là yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng của chúng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã lựa chọn cácnồng độ NaCl là 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4% để nghiên cứu khả năng sinh trưởng của 2 chủng vi khuẩn này (Hình 6).



Hình 6. Ảnh hưởng của nồng độ NaCl đến sự sinh trưởng của 2 chủng CCĐPy2 và CCĐPy9

Từ hình 6 cho thấy, cả 2 chủng CCĐPy2 và CCĐPy9 đều có khả năng sinh trưởng tốt nhất ở nồng độ muối NaCl 1-2% và tốt nhất là 1,5%.

Như vậy, chúng tôi đã tìm được điều kiện sinh trưởng cho khả năng của 2 chủng CCĐPy2 và CCĐPy9 là nhiệt độ 30-37^{o}C, pH 7 và nồng độ muối NaCl 1,5%. Kết quả này cũng hoàn toàn phù hợp với nghiên cứu của Đỗ Thị Liên và *cs.*, 2008 khi nghiên cứu về chủng VKTQH thuộc chi *Rhodobacter* có khả năng loại bỏ toluene phân lập từ vùng ven biển Quảng Ninh [10].

3.4. Đánh giá khả năng phân huỷ toluene của các chủng VKTQH

Hai chủng CCĐPy2 và CCĐPy9 tạo được biofilm. Sau 7 ngày, biofilm do từng chủng vi khuẩn này tạo thành được nuôi cấy trong môi trường DSMZ-27 dịch cải tiến ở các điều kiện mà 2 chủng vi khuẩn này sinh trưởng tốt nhất với nguồn cơ chất là toluene ở các nồng độ: 50 mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l, 200 mg/l. Sau 7 ngày, so với mẫu đối chứng không có vi sinh vật, trong các bình nuôi cấy ở các nồng độ khác nhau, bằng cảm quan chúng tôi nhận thấy bình nuôi cấy ở nồng độ 150 mg/l chuyển màu đậm nhất và lượng sinh khối tạo ra cũng nhiều nhất, giá trị ΔOD_{800} đạt được cao nhất. Do vậy, nồng độ 150 mg/l được sử dụng để phân tích hiệu suất phân huỷ toluene của chủng CCĐPy2 và CCĐPy9. Sau khi phân tích tại Viện Khoa học mới thuộc Viện Khoa học và Công nghệ quân sự chúng tôi đã tính toán được hiệu suất phân hủy toluene do biofilm của từng chủng vi khuẩn tạo thành (Bảng 1).

Bảng 1. Hiệu suất phân huỷ toluene của chủng CCĐPy2 và CCĐPy9

Chủng vi khuẩn	Nồng độ ban đầu (mg/l)	Nồng độ còn lại (mg/l)	Hiệu suất phân huỷ (%)
CCĐPy2	150	5,85	96,1
CCĐPy9	150	4,18	97,2

Số liệu ở Bảng 1 cho thấy, 2 chủng CCĐPy2 và CCĐPy9 có khả năng phân huỷ toluene cao trên 96%. Hiện nay trên thế giới đã có nhiều tác giả nghiên cứu về khả năng phân huỷ toluene, tuy nhiên, chưa có nhiều công bố về các chủng VKQHT vừa có khả năng tạo biofilm vừa có khả năng phân huỷ toluene [12], [13]. Năm 2011, Men và Cheng đã công bố về chủng vi khuẩn thuộc chi *Pseudomonas* có khả năng phân hủy 92,5% toluene sau 24 giờ nuôi cấy với hàm lượng ban đầu là 6,17 mg/l. So sánh với các kết quả trên thì kết quả chúng tôi thu được là khá cao. Kết quả này góp phần làm đa dạng thêm về vai trò của nhóm VKQHT trong xử lý sulfide cũng như các hydrocarbon thơm khác và mở ra hướng ứng dụng mới về ứng dụng nhóm vi khuẩn này trong xử lý ô nhiễm những hợp chất này tại các vị trí ô nhiễm tương tự.

4. Kết luận

Trong 11 chủng VKTQH phân lập được tại nước ô nhiễm dầu Cảng Cầu Đá, Nha Trang, Khánh Hòa có 2 chủng CCĐPy2 và CCĐPy9 vừa có khả năng tạo biofilm, vừa có khả năng sinh trưởng trên nguồn cơ chất toluene. Khuẩn lạc của chủng CCĐPy2 màu nâu vàng, hình tròn, có nhân, lồi, bề mặt bóng, d: 0,8 – 1,2mm; khuẩn lạc của chủng CCĐPy9 hình tròn, màu hồng nhạt, có nhân, rìa trong, d: 1 - 2 mm. Hai chủng này phát triển tốt ở 30-37^{o}C, pH 7 nồng độ muối 1,5%. Cả 2 chủng vi khuẩn đều có khả năng sinh trưởng trên nguồn cơ chất toluene tới 200 mg/l và có khả năng phân huỷ 96,1% và 97,2% toluene với nồng độ ban đầu là 150 mg/l.

Lời cảm ơn

Công trình được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài do Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ quốc gia (NAFOSTED) cấp, mã số 106-NN.04-2015.45 và sử dụng trang thiết bị tại Phòng CNSH môi trường, Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học.

Tài liệu tham khảo

[1] Đinh Thị Ngọ, Giáo trình Hóa học dầu mỏ và khí, NXB KH và KT, Hà Nội, 2008.

[2] Nguyễn Xuân Thành và cộng sự, Giáo trình vi sinh vật học công nghiệp, Nhà xuất bản giáo dục, Hà Nội, 2006.

[3] Spormann AM, Widdel F, Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria, Biodegradation 11(2000) 85.

[4] Morikawa M, Kagihiro S, Haruki M, Takano K, Branda S, Kolter R, Kanaya S, Biofilm formation by a *Bacillus subtilis* strain that produces gamma-polyglutamate, Microbiology 152 (2006) 2801.

[5] O'Toole GA, Heidi KB, Kolter R, Biofilm formation as microbial development, Annual Review of Microbiology 54 (2000) 49.

[6] Wright, GE, Madigan, MT, Photocatabolism of aromatic compounds by the phototrophic purple bacterium *Rhodomicrobium vanniella*. Applied and Environmental Microbiology 57 (1991) 2069.

[7] Harwood JG, Advances in Photosynthesis and Respiration, Kluwer Academic Publishers, Springer, The Netherland, 2009.

[8] Proctomr H, Schier S, Decomposition of benzoate by a photosynthetic bacterium, Journal of Biochemistry 76 (1960) 33.

[9] Zengler K, Heider J, Roselló-Mora R, Widdel F, Phototrophic utilization of toluene under anoxic conditions by a new strain of Blastochloris sulfoviridis. Archive of Microbiology 172 (1999) 204.

[10] Đỗ Thị Liên, Đỗ Thị Tố Uyên, Trần Văn Nhị, Đặc điểm sinh học của một số chủng vi khuẩn quang hợp tía thuộc chi *Rhodobacter* có khả năng loại bỏ sulfide phân lập từ vùng ven biển Quảng Ninh, Tạp chí Công nghệ Sinh học 6 4 (2008) 471.

[11] O'Toole GA, Kolter R, The initiation of biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. Molecular Microbiology 28 (1998) 449.

[12] Aburto A, Peimbert M, Degradation of a benzene–toluene mixtureby hydrocarbon-adapted bacterial communities, Annals of Microbiology 61 (2010) 553.

[13] Men J, Cheng F, Biodegradation and growth characteristics of a toluene degrading strain, African Journal of Biotechnology 10(61) (2011) 13299.

Toluene Degradation of Biofilm Formed by Photosynthetic Purple Bacteria Isolated from Oil Polluted Water Samples Taken at Cau Da Port, Khanh Hoa

Nguyen Thi Minh Nguyet[1,2], Do Thi Lien[3], Cung Thi Ngoc Mai[3], Hoang Phuong Ha[2,3], Le Thi Nhi Cong[2,3]

[1]*Hanoi Pedagogical University Number 2, Xuan Hoa, Phuc Yen, Vinh Phuc, Vietnam*

[2]*Graduate university of Science and Technology, VAST, 18 Hoang Quoc Viet, Hanoi, Vietnam*

[3]*Institute of Biotechnology, VAST, 18 Hoang Quoc Viet, Hanoi, Vietnam*

Abstract: Toluene is one of the mosttoxic and difficultly degradable aromatic hydrocarbon compounds in nature. Hence, study on approaches to remove toluene is necessary and in hurry. Among methods to degrade toluene, biodegradationby biofilm-forming photosynthetic bacteria is widely carried out. Two photosynthetic bacterial strains, CCĐPy2 and CCĐPy9, which could well degrade toluene and highly form biofilm were isolated from oil polluted water samples at Cau Da Port, Khanh Hoa province. The colonies of strain CCĐPy2 have round, glossy surface, nucleus, convex, yellowish brown, diameterfrom 0.8 to 1.2 mm; and CCĐPy9 colonies have round, pinkish in color, with sharp edges, diameter from 1 to 2 mm when they were cultured on DSMZ-27 solid medium. The two strains grow well at 30-37^{o}C, pH 7 and NaCl concentrationof 1.5%. The strain of CCĐPy2 and CCĐPy9 degraded 96.1% and 97.2% toluene with initial concentration of 150 mg/l after 7 day-incubation, respectively. These strains could be contributed to a collection of biofilm-forming photosynthetic bacteria which have capacity of not only toluene degradation but alsoother recalcitrant hydrocarbon removal.

Keywords: Biofilm, biodegradation, toluene degradation, photosynthetic purple bacteria.