

## MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM SINH LÝ, SINH HÓA VÀ KHẢ NĂNG SỬ DỤNG DẦU CỦA HAI CHỦNG VI KHUẨN KHỬ SUNPHAT KC-S1 VÀ KC-S2 PHÂN LẬP TỪ KHU THỬ NGHIỆM XỬ LÝ Ô NHIỄM DẦU NHÂN TẠO KHE CHÈ, TỈNH QUẢNG NINH

TRẦN NHU HOA, ĐẶNG THỊ CẨM HÀ

*Viện Công nghệ sinh học*

### I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vi khuẩn khử sunphat là một trong những nhóm vi khuẩn kỵ khí quan trọng tham gia vào chu trình vật chất. Quá trình khử sunphat là quá trình sinh học chủ yếu diễn ra trong các trầm tích ở biển, chiếm hơn 50% toàn bộ quá trình khoáng hóa các chất hữu cơ [5]. Vi khuẩn khử sunphat có mặt ở rất nhiều vỉa đá và đá phiến sét có chứa dầu, nên chúng đóng một vai trò kinh tế quan trọng trong rất nhiều lĩnh vực của công nghệ dầu. Từ lâu, người ta đã biết đến khả năng sử dụng dầu của các vi sinh vật trong điều kiện hiếu khí, nhưng phải từ cuối những năm 80 của thế kỷ trước, mới có những nghiên cứu về khả năng phân hủy dầu của vi khuẩn kỵ khí, trong đó đặc biệt là vi khuẩn khử sunphat [3, 8]. Tuy nhiên, số lượng chủng vi khuẩn phân lập được cho các nghiên cứu thì chưa nhiều do quá trình phát triển ở điều kiện kỵ khí của vi sinh vật diễn ra chậm chạp và những hạn chế về kỹ thuật trong quá trình phân lập chúng [8]. Thời gian gần đây, các nhà khoa học trên thế giới đã phân lập được một số chủng vi khuẩn khử sun phat có khả năng phân hủy hydrocacbon no và hydrocacbon thơm [1, 4, 9, 10]. Các phát hiện này mở ra một hướng nghiên cứu mới mẻ và thú vị về khả năng phân hủy các thành phần dầu ở điều kiện kỵ khí

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày một số kết quả nghiên cứu về đặc điểm sinh lý, sinh hóa và khả năng sử dụng dầu và các thành phần của dầu bởi hai chủng vi khuẩn khử sunphat KC-S1 và KC-S2 phân lập từ khu thử nghiệm xử lý ô nhiễm dầu ở môi trường biển Khe Chè, Cửa Lục, tỉnh Quảng Ninh.

Mẫu bùn cát được thu thập từ khu xử lý thử nghiệm ô nhiễm dầu nhân tạo Khe Chè để nghiên cứu sự biến động của các nhóm vi sinh vật kỵ khí tham gia vào quá trình làm sạch dầu. Hai chủng vi khuẩn khử sunphat KC-S1, KC-S2 được phân lập và làm sạch. Môi trường Posgate B, C (có cải tiến) được sử dụng để nuôi cấy vi khuẩn khử sunphat [2, 4].

Việc nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường lên hai chủng KC-S1 và KC-S2 đã được tiến hành, với nồng độ NaCl từ 0-30%, pH từ 5-11 và nhiệt độ ở 4°C, 20°C, 28°C, 37°C, 44°C và 55°C.

Để đánh giá khả năng sử dụng các cơ chất như nguồn cacbon và năng lượng duy nhất trên môi trường Posgate B có cải tiến với nồng độ NaCl 3%, các nguồn cơ chất lần lượt là axetat 10mM, benzoat 10 mM, butirrat 10 mM, izobutirat 10 mM, propionat 10 mM, succinat 10 mM, glucoza 5 mM, etanol 10 mM và glixerol 10 mM đã được sử dụng.

Để xác định mức sinh trưởng của các chủng vi sinh vật, đã sử dụng phương pháp đo độ đục OD của môi trường nuôi cấy trên máy số màu quang phổ tại bước sóng 500 nm.

Các phương pháp xác định khác: hình thái tế bào được quan sát dưới kính hiển vi điện tử JEM T8 của Nhật Bản với sự giúp đỡ của Viện Vệ sinh - Dịch tễ trung ương. Hỗn hợp dầu gồm dầu thô, dầu diesel (DO), dầu nhiên liệu (FO) lần lượt theo tỷ lệ 2:2:1 đã được sử dụng trong nghiên cứu khả năng sử dụng dầu của hai chủng KC-S1, KC-S2 và đánh giá bằng phương pháp trọng lượng và sắc ký khí (GS) với sự cộng tác của Viện Dầu khí Việt Nam.

## II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 1. Đặc điểm hình thái của hai chủng KC-S1 và KC-S2



Hình 1. Ảnh kính hiển vi điện tử của chủng KC-S1 (độ phóng đại 18.000)

Hai chủng KC-S1 và KC-S2 là vi khuẩn gram âm, tế bào của hai chủng này có dạng vibrio, kích thước của các tế bào từ 0,56-0,70 × 1,8-2,1 μm (hình 1, 2).

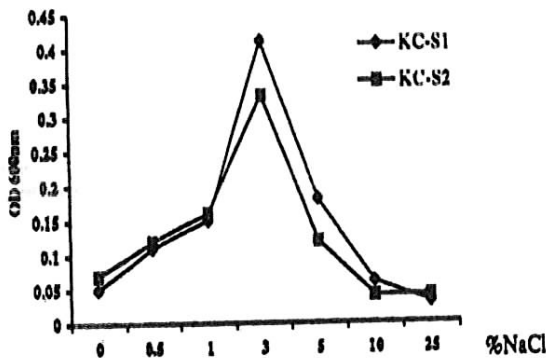


Hình 2. Ảnh kính hiển vi điện tử của chủng KC-S2 (độ phóng đại 18.000)

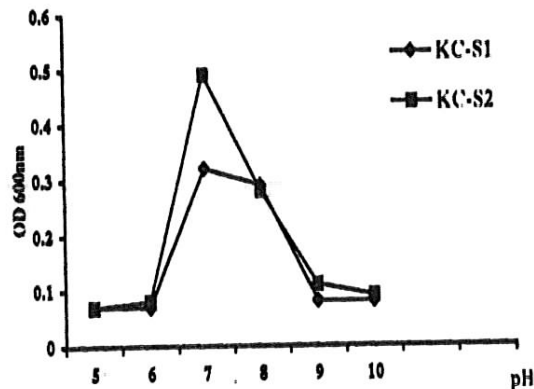
### 2. Đặc điểm sinh lý, sinh hóa của hai chủng KC-S1 và KC-S2

Cả hai chủng vi khuẩn đều có khả năng phát triển trong khoảng nhiệt độ 20-37°C, trong đó nhiệt độ tối ưu là 28-37°C. Không quan sát thấy sự phát triển ở 4°C, 44°C, 55°C. Hai chủng đều

có khả năng phát triển ở các nồng độ NaCl 0,5-5% (hình 3) và phát triển tối ưu ở NaCl 3%. Chúng không phát triển ở nồng độ NaCl 0% và lớn hơn 10%. Hai chủng KC-S1 và KC-S2 có khả năng phát triển trong khoảng pH hẹp từ 7-8,5 (hình 4).



Hình 3. Ảnh hưởng của NaCl lên sự phát triển của hai chủng KC-S1 và KC-S2



Hình 4. Ảnh hưởng của pH lên sự phát triển của hai chủng KC-S1 và KC-S2

Từ kết quả nghiên cứu khả năng sử dụng các nguồn hữu cơ khác nhau của hai chủng vi khuẩn, cả hai chủng thuộc nhóm vi khuẩn khử sunphat oxy hóa không hoàn toàn, đều sử dụng

lactat và benzoat. Tuy nhiên KC-S1 sử dụng propionat, succinat và glucoza. Trong khi đó KC-S2 có khả năng sử dụng izobutirat, etanol, glixêrol và không sử dụng propionat, succinat

và glucoza (bảng 1).

Bảng 1

Khả năng sử dụng các nguồn cơ chất hữu cơ của hai chủng KC-S1 và KC-S2

Cơ chất	KC-S1	KC-S2
Axetat	-	-
Lactat	+	+
Benzoat	+	+
Butirat	-	-
Izobutirat	-	+
Propionat	+	-
Sucxinat	+	-
Glucoza	+	-
Êtanol	-	+
Glixêrol	-	+

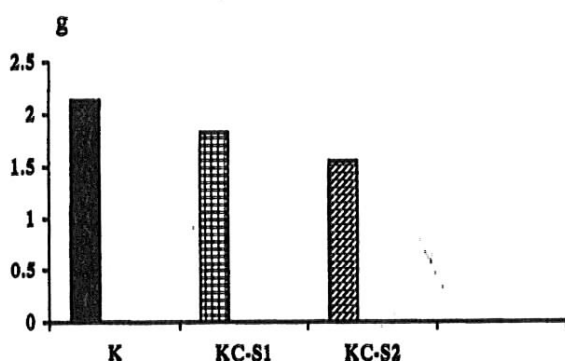
Ghi chú: + có phát triển, - không phát triển

### 3. Khả năng sử dụng dầu của hai chủng KC-S1 và KC-S2

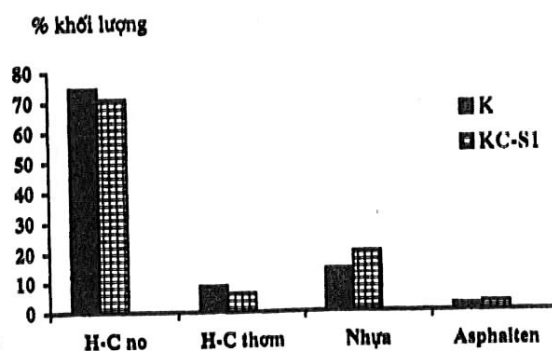
Sau 15 ngày nuôi cấy trong điều kiện kỵ khí, cả hai chủng đều có khả năng sử dụng dầu, trong đó chủng KC-S2 có khả năng sử dụng dầu mạnh hơn so với chủng KC-S1. Chủng KC-S2 có khả năng sử dụng 27,4% hàm lượng dầu tổng số, trong khi đó chủng KC-S1 có khả năng sử

dụng 14,5% hàm lượng dầu tổng số (hình 5). Đây là một trong những nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam về khả năng phân hủy dầu của vi khuẩn khử sunphat, chính vì vậy các kết quả về khả năng phân hủy dầu của hai chủng vi khuẩn KC-S1 và KC-S2 là những dẫn chứng quan trọng để giải thích tại sao hydrocacbon no và thơm bị loại bỏ không những ở điều kiện hiếu khí mà cả kỵ khí. Kết quả này cũng góp phần khẳng định sự thành công của việc sử dụng phương pháp phân hủy sinh học để làm sạch dầu ở điều kiện môi trường mở (môi trường biển).

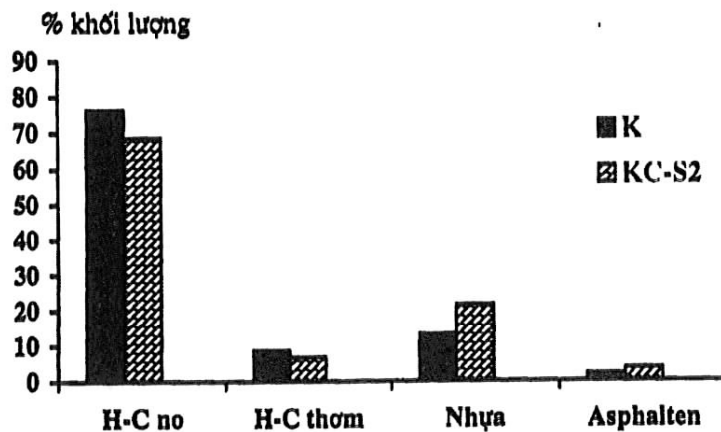
Chủng KC-S1 có khả năng sử dụng 4,8% hydrocacbon no, trong khi đó thì hàm lượng hydrocacbon thơm giảm đi nhiều hơn (30%). Trên thế giới gần đây, người ta đã phân lập được một số chủng vi khuẩn khử sunphat có khả năng phân hủy hydrocacbon thơm, như chủng *Desuljobacula toluolica* Tol2 và chủng PRTOL1 có thể sử dụng toluen, hai chủng oXyS1 và mXyS1 có khả năng phân hủy toluen và benzoat [9]. Đây là một kết quả rất quan trọng bởi vì hydrocacbon thơm là thành phần rất độc (hình 6). Từ các kết quả phân tích bằng sắc ký khí cho thấy chủng KC-S2 có khả năng sử dụng 10,4% lượng hydrocacbon no và 22% lượng hydrocacbon thơm. So sánh khả năng phân hủy dầu giữa hai chủng KC-S1 và KC-S2, ta nhận thấy chủng KC-S1 có khả năng sử dụng hydrocacbon thơm mạnh hơn so với chủng KC-S2, tuy nhiên chủng KC-S2 lại sử dụng thành phần hydrocacbon no mạnh hơn KC-S1 (hình 7).



Hình 5. Khả năng sử dụng dầu tổng số của hai chủng KC-S1 và KC-S2



Hình 6. Khả năng phân hủy từng thành phần dầu của chủng KC-S1



Hình 7. Khả năng phân hủy từng thành phần dầu của chủng KC-S2

Cả hai chủng KC-S1 và KC-S2 đều có khả năng sử dụng hydrocacbon no mạch dài từ C35 đến C40. Điều này rất có ý nghĩa trong việc xử lý ô nhiễm dầu và các sản phẩm dầu. Bởi vì sự phân hủy các n-parafin có trọng lượng phân tử cao bao giờ cũng khó khăn hơn so với các phân đoạn có trọng lượng phân tử thấp. Một số vi khuẩn khử sunphat mới được phân lập gần đây có khả năng phân hủy hydrocacbon no. Ví dụ như chủng Hxd3 có khả năng sử dụng alkan từ C12 đến C20 và chủng TD3 có khả năng sử dụng alkan từ C6 đến C16 và phát triển tốt nhất từ C8 đến C12 [6]. Còn các chủng được nghiên cứu trong bài báo này lại có khả năng sử dụng alkan có mạch dài hơn, cho nên kết quả phân loại định tên đến loài là rất quan trọng. Hiện tại, chúng tôi cũng đang tiến hành phân loại hai chủng vi khuẩn này bằng phương pháp phân tử, so sánh trình tự gen mã hóa 16S rARN. Kết quả sẽ được trình bày trong một công trình khác. Trong quá trình nghiên cứu, chúng tôi cũng nhận thấy các hệ số đặc trưng của dầu thay đổi, điều đó chứng tỏ rằng hai chủng vi khuẩn KC-S1 và KC-S2 thực sự tham gia vào quá trình phân hủy dầu ở khu xử lý thực nghiệm Khe Chè.

### III. KẾT LUẬN

Hai chủng vi khuẩn khử sunphat KC-S1 và KC-S2 phân lập được đều có khả năng sử dụng hỗn hợp dầu, trong đó chủng KC-S1 sử dụng 14,5% và chủng KC-S2 sử dụng 17,4% hàm lượng dầu tổng số. Cả hai chủng đều có khả năng phân hủy thành phần hydrocacbon no và

hydrocacbon thơm. Đây là một trong những công trình nghiên cứu đầu tiên về khả năng phân hủy dầu của vi khuẩn khử sunphat ở Việt Nam.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Coater J. D., R. T. Anderson and D. R. Loveley, 1996: Applied and Environmental Microbiology, 62: 1999-1101.
2. Dang P. N. et al., 1996: Anaerobe, 2: 385-392.
3. Helder J. et al., 1999: FEMS. Microbiol. Rev., 22: 459-473.
4. Levett P. N., 1991: Anaerobic Microbiology, Oxford University Press.
5. Odom J. M., R. Singleton Jr., 1993: The sulfate-reducing Bacteria: Contemporary Perspectives, Springer-Verlag.
6. Rabus R. et al., 1994: Nature, 372: 455-456.
7. So C. M and L. Y. Young, 1999: Applied and Environmental Microbiology, 65: 2969-2976.
8. Spormann A. and F. Widdel, 2000: Biodegradation, 11: 85-105.
9. Wilkes H. et al., 2000: Organic Geochemistry, 31: 105-115.
10. Widdel F. and R. Rabus, 2001: Current opinion in biotechnology, 12: 259-276.

**PHYSIOLOGICAL, BIOCHEMICAL PROPERTIES AND OIL DEGRADING  
CAPACITY OF TWO SULFATE - REDUCING BACTERIA STRAINS ISOLATED  
FROM THE OIL - CONTAMINATED TREATMENT TRIAL KHECHE ZONE,  
QUANGNINH PROVINCE**

TRAN NHU HOA, DANG THI CAM HA

**SUMMARY**

Two strains of sulfate reducing bacteria were isolated from the oil - contaminated treatment trial Kheche zone, Quangninh province and designed as KC-S1 and KC-S2. Their cells had vibrio form, with sizes 0.56-0.70  $\mu\text{m} \times 1.8-2.1 \mu\text{m}$ . They grew optimally at 28-37°C, NaCl 0.5-5.0% and pH 7.0-8.5. The KC-S1 and KC-S2 strains were able to degrade 14.5% and 27.4% of the oil mix (FO +DO + crude oil) respectively after 15 days of cultivation. The KC-S1 strain utilized 4.8% aliphatic hydrocarbon and 30% aromatic hydrocarbon. The KC-S2 strain utilized 10% aliphatic hydrocarbon and 22% aromatic hydrocarbon. Both strains were able to utilize n-long paraffin fractions from C35-C48.

*Ngày nhận bài: 12-6-2002*