VI KHUẨN TẠO CHẤT HOẠT HÓA BỀ MẶT SINH HỌC PHÂN LẬP TỪ BIỂN NHA TRANG

LẠI THÚY HIỀN
Viện Công nghệ sinh học
DƯƠNG VĂN THẮNG
Viện Hải dương học Nha Trang
TRẦN CẨM VÂN
Trường đại học Khoa học tự nhiên, ĐHQGHN
DOÃN THÁI HÒA
Trường đại học Bách Khoa Hà Nội

Từ nhiều năm nay các chất hoạt hóa bề mặt sinh học được ứng dụng rộng rãi trong các lĩnh vực công nghiệp, nông nghiệp, khai thác mỏ, thuộc da, thu hồi dầu, công nghệ hóa học với chức năng là nhân tố làm ướt, tạo bọt, tạo nhũ, hoạt động bề mặt [2, 3, 5]. Hiện nay các chất hoạt hóa bề mặt (HHBM) được tạo ra từ các chủng vi sinh vật được đặc biệt quan tâm. Vì các chất này có chứa cả hai nhóm chức ưa nước và ưa dầu trong cùng một phân tử. Những đặc tính này cho phép các phân tử tập trung lại và tác động bề mặt tương hỗ với nhau làm giảm sức căng bề mặt của pha nước và pha dầu. Bên cạnh ưu điểm có cấu trúc lưỡng cực, các chất HHBM từ vi sinh vật còn có ưu điểm là rất dễ dàng tạo ra từ nguồn cơ chất rẻ tiền và có thể tận dụng những phế thải của ngành công nghiệp chế biến nông sản [1, 9]. Chính nhờ có cấu trúc lưỡng cực này mà các chất HHBM thu nhận từ vi sinh vật đang được ứng dụng nhiều nhất trong việc tăng cường khả năng thu hồi dầu của quá trình khai thác dầu thứ cấp và tăng cường khả năng phân hủy dầu mỏ, kiểm soát ô nhiễm môi trường do dầu mỏ gây ra. Theo Oschner [7] các chất HHBM tốt nhất hiện nay là glycolipit, lipit trung tính và phân cực, aminoaxit có hoạt tính bề mặt và hỗn hợp polisaccarit-lipit. Trong tất cả các dạng khác nhau của các chất HHBM thì glicolipit là thành phần được nghiên cứu chủ yếu. Bởi vì trong thành phần của glicolipit có rhamnolipit- một nhân tố quan trọng của quá trình nhũ hóa, tạo bọt giữa hai pha dầu và nước. Chất HHBM tạo ra từ *Pseudomonas aeruginosa* có khả năng làm giảm sức căng bề mặt từ 28,6 xuống 4 N/m. Còn glicolipit do vi khuẩn biển sinh ra có thể làm giảm sức căng bề mặt của nước từ 72 xuống 29N/m [8].

Ở Việt Nam, các chất hoạt hóa bề mặt từ vi sinh vật còn rất ít được quan tâm, nhưng nhu cầu sử dụng nó thì ngày càng nhiều nhất là trong việc tăng cường thu hồi dầu và kiểm soát ô nhiễm môi trường do dầu mỏ. Vừa qua, trong quá trình thử nghiệm làm sạch ô nhiễm dầu ở bãi biển Nha Trang chúng tôi đã phân lập được một số chủng vi khuẩn có khả năng tạo chất HHBM. Dưới đây là một số kết quả nghiên cứu về các chủng này.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

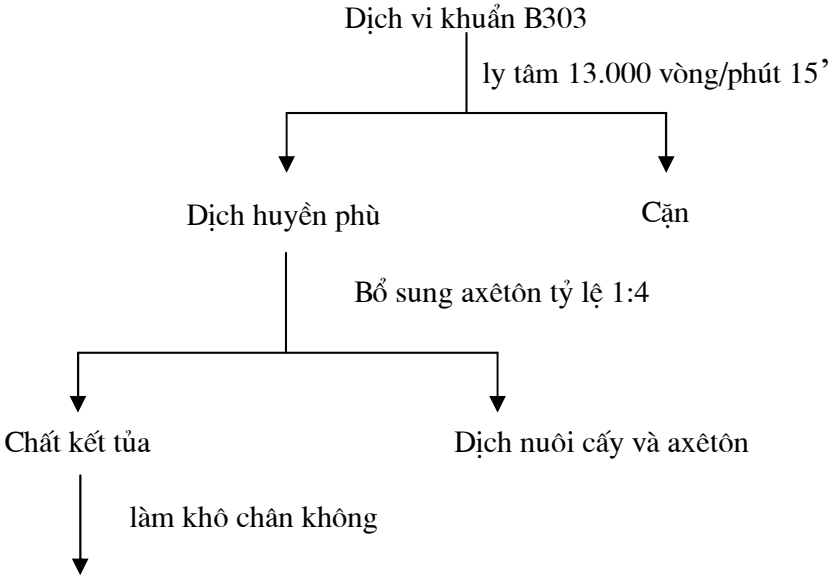
Mẫu cát và nước biển lấy từ bãi biển Nha Trang, tỉnh Khánh Hòa.

Phân lập vi khuẩn trên môi trường khoáng Gost 9052-88, xác định số lượng trên môi trường hiếu khí tổng số của Zobell.

Công trình được sự hỗ trợ kinh phí của Chương trình nghiên cứu cơ bản.

Nuôi vi khuẩn tạo chất HHBM trên môi trường muối khoáng theo Gost 9052-88 có bổ sung nước biển, vi lượng và 5% dầu DO hoặc dầu oliu làm nguồn cacbon. Điều kiện nuôi cấy là pH = 7,4, nhiệt độ 30^{0}C, tốc độ lắc: 180 vòng/phút.

Phương pháp tách chiết chất HHBM được tiến hành theo Pruthi có cải tiến [10]. Dịch vi khuẩn sau 72 giờ nuôi lắc được dùng để tách chiết chất HHBM sinh học.



Phương pháp xác định chỉ số nhũ hóa (E24) của chất HHBM trong dịch nuôi cấy được tiến hành theo Iqbal [4]:

- Dịch nuôi cấy 72 giờ được li tâm để loại tế bào vi khuẩn,

- Bổ sung 1ml xylen vào 1ml dịch nuôi cấy đã loại tế bào,

- Trộn đều bằng voltex ở tốc độ cao,

- Sau 24 giờ chỉ số nhũ hóa E24 được tính như sau:

$$E24 = \frac{\text{chiều cao cột nhũ hóa}}{\text{chiều cao tổng số}} \times 100$$

Đánh giá khả năng phân hủy dầu thô và nhiên liệu của các chủng vi khuẩn. Vi khuẩn được nuôi lắc ở 180 v/ph, 30^{o}C trên môi trường muối khoáng có bổ sung 5% dầu thô hoặc nhiên liệu như nguồn cacbon. Quan sát sự thay đổi màu sắc của môi trường nuôi cấy và trạng thái của dầu sau 7 ngày nuôi cấy. Xác định số lượng vi khuẩn trước và sau khi nuôi cấy với dầu thô (nhiên liệu) trong cả hai trường hợp có bổ sung và không bổ sung chất HHBM. Qua đó đánh giá khả năng phân hủy hydrocacbon của vi khuẩn và ảnh hưởng của chất HHBM sinh học lên qúa trình phân hủy đó.

Phân tích thành phần hóa học của dầu thô và nhiên liệu bằng phương pháp cân trọng lượng và sắc kí khí trên máy HP 6890, sử dụng cột mao quản HP-1 methyl-siloxan.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Kết quả phân lập vi khuẩn tạo chất HHBM

Từ các mẫu cát biển nhiễm dầu ở Nha Trang, đã phân lập được 5 chủng vi khuẩn có khả năng tạo chất HHBM sinh học. Chúng đều thuộc nhóm vi khuẩn Gram âm. Dựa vào kit chuẩn API 20NE một số chủng đã được định tên, trong đó chủng B303 thuộc loài *Pseudomonas aeruginosa*. Chủng này có khả năng tạo chất HHBM tốt nhất trong các chủng nghiên cứu.

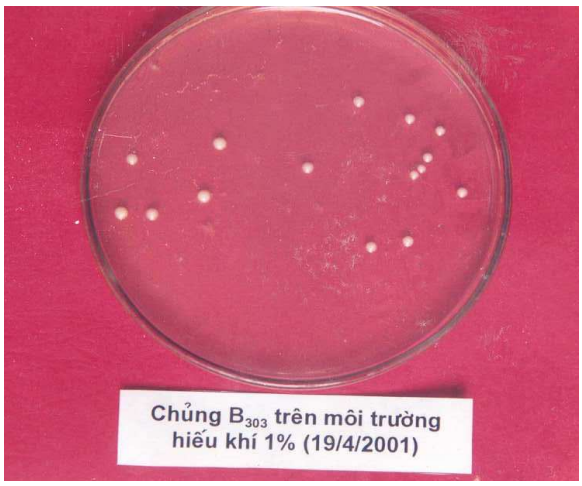
Hoạt tính tạo chất HHBM của chủng B303 được đánh giá bằng khả năng nhũ hóa của sản phẩm sau 24 giờ bổ sung xylen vào dịch nuôi cấy. Kết quả được trình bày ở bảng 1 và các hình 1, 2. Hai chủng B303 và B302 phát triển tốt

Bảng 1

Sự phát triển của vi khuẩn trên môi trường có dầu oliu

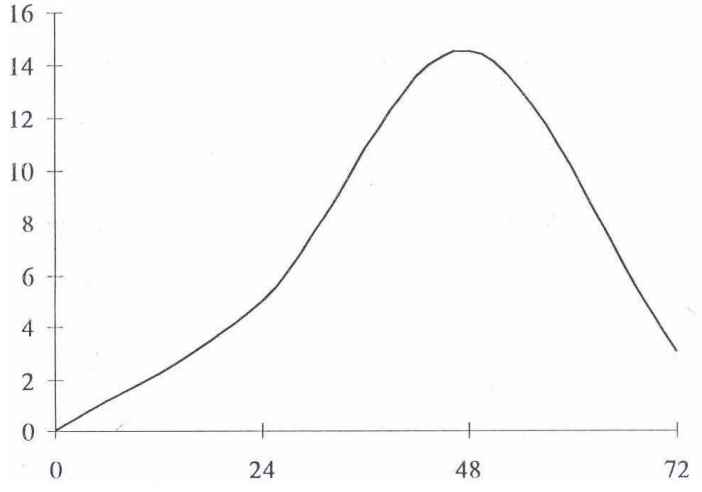
Ký hiệu chủng	Bắt đầu nuôi cấy (tế bào / ml)	Sau 72 giờ nuôi cấy (tế bào / ml)
A301	$1{,}8 \times 10^7$	$4{,}0 \times 10^9$
B301	$4{,}8 \times 10^7$	$2{,}6 \times 10^7$
B302	$3{,}9 \times 10^7$	$1{,}5 \times 10^{11}$
B303	$2{,}5 \times 10^7$	$3{,}4 \times 10^{11}$
C301	$4{,}0 \times 10^7$	$5{,}0 \times 10^9$

trên dầu oliu để tạo chất HHBM, số lượng tế bào tăng 10000 lần sau 72 giờ nuôi cấy. Đồ thị trên hình 3 chứng tỏ chất HHBM được tạo ra bởi chủng B303 có khả năng nhũ hóa mạnh nhất sau 48 giờ nuôi cấy. Sau 48 giờ nuôi cấy thì hoạt tính nhũ hóa của sản phẩm thu được bị giảm dần. Chỉ số nhũ hóa cực đại đạt tới 72,5%. Kết quả này cũng trùng với nghiên cứu của Robert đã công bố năm 1989 [25]. Chất HHBM B303 được làm sạch và cân trọng lượng khô, kết quả thu được cao nhất đạt 2,7 g/l.



Hình 1. Hình thái khuẩn lạc của chủng B303

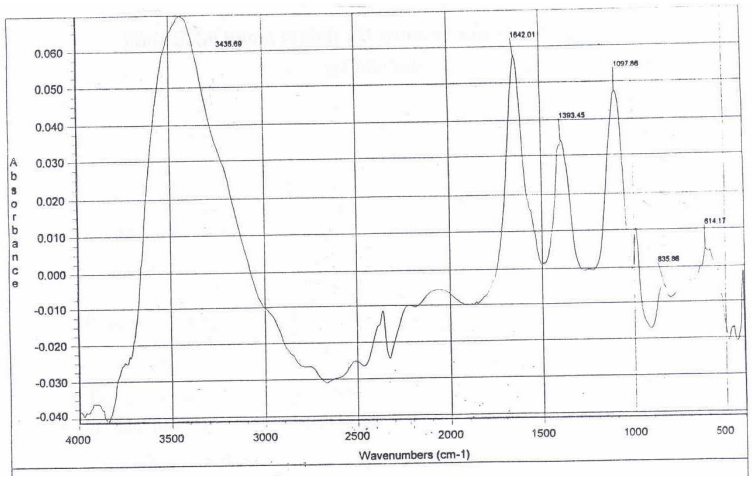
Hình 2. Sự phát triển trên dầu oliu và khả năng nhũ hóa của chủng B303



Hình 3. Sự biến thiên của cột nhũ hóa theo thời gian

2. Phân tích thành phần của chất HHBM B303

Cấu trúc phân tử của chất HHBM B303 được nghiên cứu bằng phương pháp phân tích phổ hồng ngoại (hình 4). Kết quả thu được biểu diễn trên hình 4 cho thấy trong cấu trúc phân tử của chất HHBM B303 có chứa các nhóm chức -OH, C=O, CH_2. Các nhóm chức này đều có mặt trong thành phần của chất HHBM sinh học đã được cơ quan bảo vệ môi trường của Mỹ công bố. Trong các nhóm chức nói trên thì nhóm -OH và C=O đóng vai trò là tác nhân ưa nước.



Hình 4. Phổ hồng ngoại của chất hoạt hóa bề mặt B303

3. Nghiên cứu tăng cường khả năng phân hủy dầu thô bằng chất HHBM sinh học

a) Ảnh hưởng của chất HHBM lên sự phát triển của vi sinh vật

Mẫu cát lấy từ bãi biển Nha Trang và chủng vi khuẩn *Pseudomonas* sp. từ phòng thí nghiệm vi sinh vật dầu mỏ được nuôi lắc trên môi trường khoáng với dầu thô là nguồn cacbon duy nhất. Số lượng vi sinh vật trước và sau khi bổ sung thêm chất HHBM được trình bày trong bảng 2.

Bảng 2

Số lượng vi sinh vật trước và sau khi bổ sung chất HHBM (CFU/ml)

Mẫu	Thời gian	Bổ sung chất HHBM (ml)			
		0	1	2	3
Mẫu cát	Trước TN	10^3	10^3	10^3	10^3
	Sau TN	$1,2 \times 10^7$	$5,7 \times 10^8$	$1,2 \times 10^9$	$1,8 \times 10^9$
Pseudomonas sp.	Trước TN	$2,0 \times 10^3$			$2,0 \times 10^3$
	Sau TN	$3,2 \times 10^9$			$1,3 \times 10^{11}$

Ghi chú: TN: thí nghiệm

Từ số liệu trên bảng 2 thấy rằng, vi sinh vật trong các mẫu cát đã sử dụng tốt dầu thô. Số lượng tế bào tăng từ 10^3-10^7 tế bào/ml trong các mẫu thí nghiệm lắc với 1 gam cát. Trong các mẫu cát khác có bổ sung chất HHBM sinh học, số lượng tế bào tăng khá mạnh. Đối với mẫu cát có bổ sung 2 đến 3 ml chất HHBM, số lượng tế bào lên tới 10^9 tế bào/ml. Thí nghiệm đối với chủng *Pseudomonas*. sp cũng chứng tỏ chủng này có khả năng sử dụng dầu thô rất tốt. Số

lượng tế bào tăng từ 2×10^3 tế bào / ml đến 3,2 $\times 10^9$ tế bào / ml. Khi bổ sung thêm chất HHBM, số lượng tế bào tăng tới $1,3 \times 10^{11}$ tế bào / ml. Như vậy, khi bổ sung thêm chất HHBM sinh học, số lượng tế bào vi sinh vật sử dụng dầu thô đã tăng lên 100 lần so với đối chứng không bổ sung chất này.

b) Phân tích thành phần dầu thô trước và sau thí nghiệm

Sau 7 ngày nuôi lắc, chúng tôi tiến hành xác định khả nằng sử dụng dầu thô của các vi sinh vật theo một số chỉ tiêu: tổng hàm lượng dầu thu hồi, thành phần nhóm cuả dầu thu hồi. Trong đó, thành phần nhóm của dầu gồm có: hydrocacbon no, hydrocacbon thơm, nhựa và asphanten.

Kết quả đánh giá khả năng sử dụng dầu tổng số của vi sinh vật được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3

Khả năng sử dụng dầu tổng số của vi sinh vật

STT	Ký hiệu mẫu	Lượng dầu thu hồi (mg/l)	Lượng dầu sử dụng (%)
1	MS1-K	42 212	0,00
2	MS2	39 920	5,43
3	MS3	29 358	30,45
4	MS4	29 751	29,00
5	MS5	24 872	41,00

Ghi chú: MS1-K: mẫu đối chứng
MS2: Mẫu cát biển
MS3: Mẫu cát biển có bổ sung chất HHBM sinh học
MS4: Chủng *Pseudomonas*. sp
MS5: Chủng *Pseudomonas*. sp bổ sung chất HHBM sinh học.

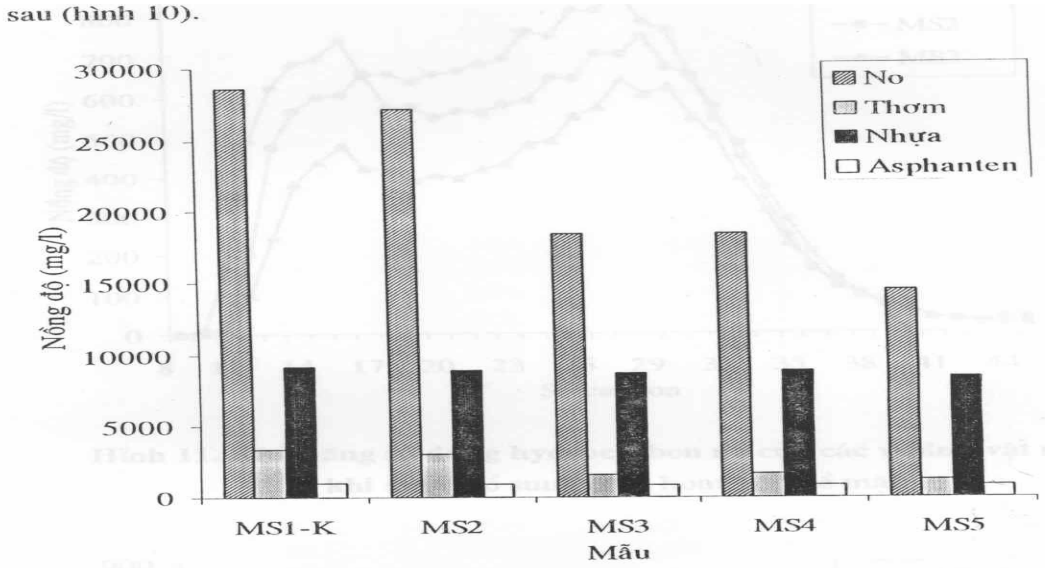
Kết quả nêu ở bảng 3 cho thấy, các vi sinh vật có sẵn trong mẫu cát biển Nha Trang có khả năng sử dụng dầu thô. Tuy nhiên, khả năng sử dụng dầu của chúng không cao. Sau 7 ngày nuôi lắc, các vi sinh vật trong khu hệ chỉ sử dụng được 5,43% hàm lượng dầu tổng số. Điều này khẳng định rằng trên các bãi biển tại nơi lấy mẫu ở Nha Trang đã có hiện tượng ô nhiễm dầu. nhưng khả năng tự làm sạch ô nhiễm dầu không cao. Khi bổ sung thêm chất HHBM sinh học thì khả năng sử dụng dầu tăng lên rõ rệt. Chất HHBM sinh học đã kích thích các vi sinh vật nội tại sử dụng tới 30,45% hàm lượng dầu tổng số, tăng 6 lần so với trường hợp không bổ sung chất HHBM sinh học. Đối với thí nghiệm đơn chủng *Pseudomonas*. sp cũng thu được kết quả tương tự. Khi chưa bổ sung chất HHBM, lượng dầu được vi khuẩn sử dụng là 29% và khi có bổ sung thêm chất HHBM, lượng dầu bị phân hủy tăng tới 41%. Đây là một kết quả quan trọng cho việc ứng dụng chất HHBM sinh học làm sạch môi trường bị ô nhiễm dầu.

Bên cạnh đó, khả năng sử dụng các thành phần trong dầu thô của vi sinh vật cũng khác nhau. Các vi sinh vật trong mẫu cát biển không bổ sung chất HHBM sử dụng được 5,32% hydrocacbon no và 11,47% hydrocacbon thơm. Trong khi đó, nếu bổ sung thêm chất HHBM sinh học thì lượng hydrocacbon no được sử dụng lên tới 35,90% và hydrocacbon thơm tới 55,87%. Chủng *Pseudomonas* sp. sử dụng hydrocacbon no 35,7% và hydrocacbon thơm 52,58%. Khi được hoạt hóa bởi chất HHBM thì khả năng sử dụng hydrocacbon no tăng lên tới 49,50% và hydrocacbon thơm tới 64,92%. Các hợp chất phân cực cũng bị phân hủy nhưng mức độ phân hủy không cao (hình 7).

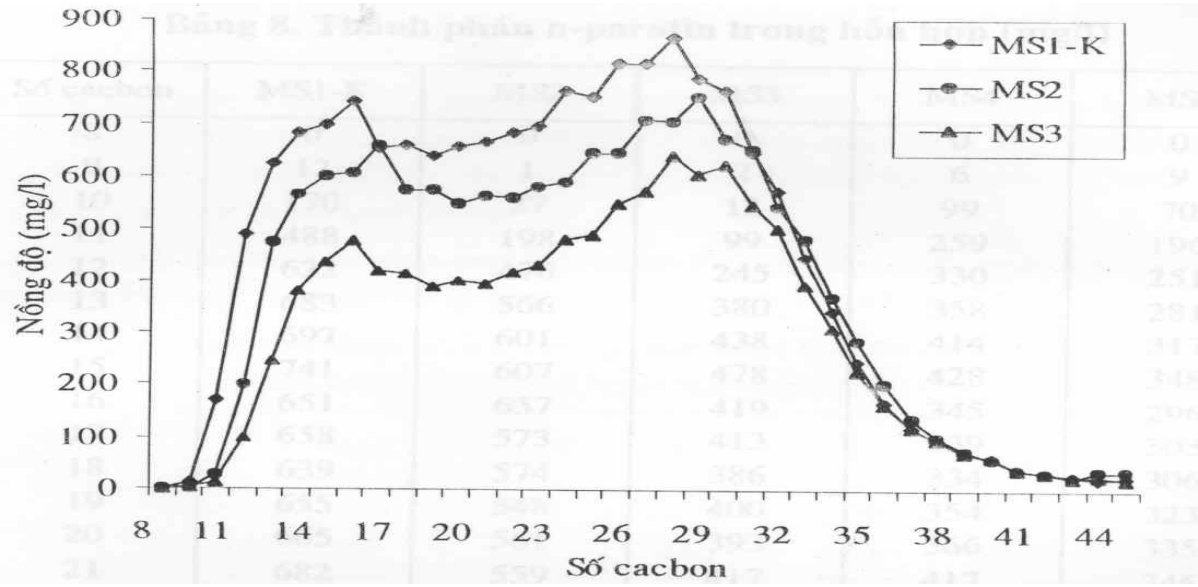
c) Khả năng sử dụng n-parafin của vi sinh vật

Kết quả phân tích thành phần n-parafin còn lại trong hỗn hợp được thể hiện ở các hình 8 và 9 cho thấy, hầu hết các hydrocabon có mạch từ C_9 đến C_{40} đều được các vi sinh vật sử dụng.

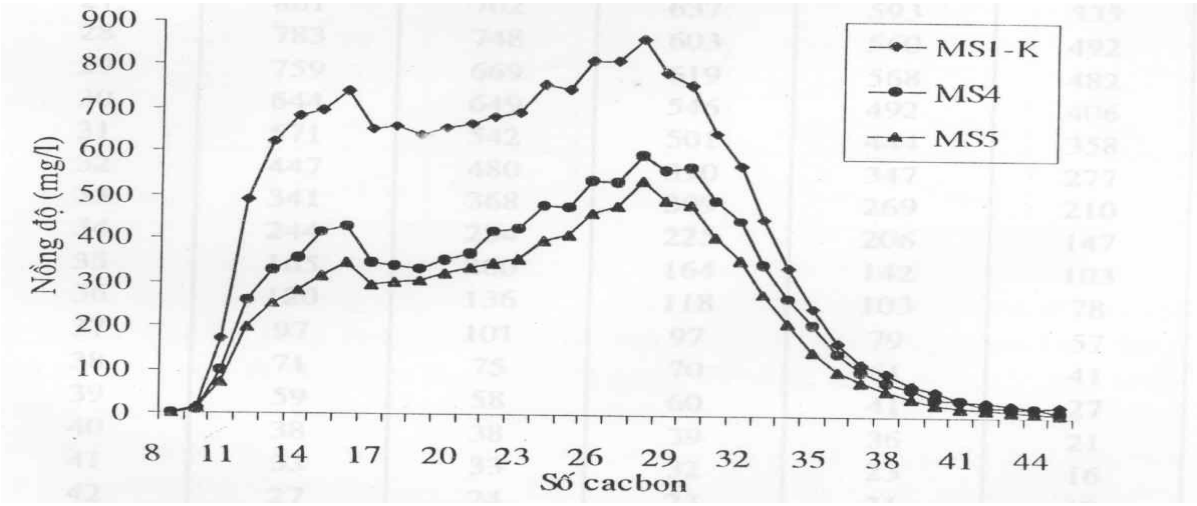
Trong đó, các mạnh cacbon từ C_9-C_{15} và C_{17}-C_{30} được các vi sinh vật sử dụng mạnh nhất. Đối với mẫu có bổ sung chất HHBM sinh học, các hydrocacbon mạch dài từ C_9-C_{42} đều được sử dụng mạnh. Trong đó, các mạch từ C_{10}-C_{28} là được sử dụng mạnh nhất. Từ C_{29}-C_{42} các vi sinh vật vẫn có thể sử dụng được. Điều này, có thể do các chất HHBM sinh học đã tác động vào phân tử hydrocacbon và làm cho các vi sinh vật dễ dàng bẻ mạch hơn. Đối với mẫu MS4 và MS5 (hình 9), khả năng sử dụng các hydrocacbon mạch dài từ C_{12}-C_{30} rất tốt. Điều này được thể hiện bằng khoảng cách giữa các đồ thị MS1-K, MS4 và MS5.



Hình 7. Thành phần nhôm của dầu thu hồi



Hình 8. Khả năng sử dụng hyđrocacbon no của vi sinh vật trong cát biển khi bổ sung chất HHBM



Hình 9. Khả năng sử dụng hyđrocacbon no của chủng *Pseudomonas* sp. khi bổ sung chất HHBM

d) Khả năng sử dụng hydrocacbon thơm của vi sinh vật

Trong các thành phần của dầu mỏ, hydrocacbon thơm là những hợp chất có khả năng gây ảnh hưởng lớn nhất tới sức khỏe con người. Theo cơ quan bảo vệ môi trường của Mỹ (EPA), hydrocacbon thơm có 16 hợp chất được xếp vào nhóm I-nhóm gây ung thư ở người. Do vậy mà khả năng phân hủy hydrocacbon thơm ở dầu thô của vi sinh vật là rất quan trọng.

Đối với mẫu MS2, trong vùng I, vùng mà các phân tử hydrocacbon thơm có số nguyên tử cacbon tương ứng từ C_{11}-C_{16}, các vi sinh vật nội tại không phân hủy hoặc phân hủy rất ít. Tuy nhiên, khi bổ sung chất HHBM thì hàm lượng hydrocacbon thơm trong vùng I giảm đi 60% tức là còn lại 9 mg/l. Từ vùng II tới vùng IV, khả năng sử dụng hydrocacbon thơm đa vòng của vi sinh vật nội tại tốt hơn. Đồng thời cũng phải khẳng định vai trò tích cực của chất HHBM trong việc phân hủy các hợp chất hydrocacbon thơm từ C_{17}-C_{30}. Đặc biệt ở vùng V, vùng có các hợp chất hydrocacbon thơm đa vòng từ C_{31} trở đi đã bị phân hủy mạnh nhờ sự kích thích của chất HHBM, hàm lượng từ 2051 mg/l giảm xuống 787 mg/l.

Kết quả phân tích mẫu MS4 và MS5 cũng cho kết quả tương tự. Hầu hết các hydrocacbon thơm từ vùng I đến vùng IV đều bị phân hủy. Tại vùng I, lượng hydrocacbon thơm giảm từ 30 mg/l xuống 10 mg/l và 4 mg/l, ở vùng V lượng hydrocacbon thơm giảm từ 2051 mg/l xuống 720 mg/l và 590 mg/l.

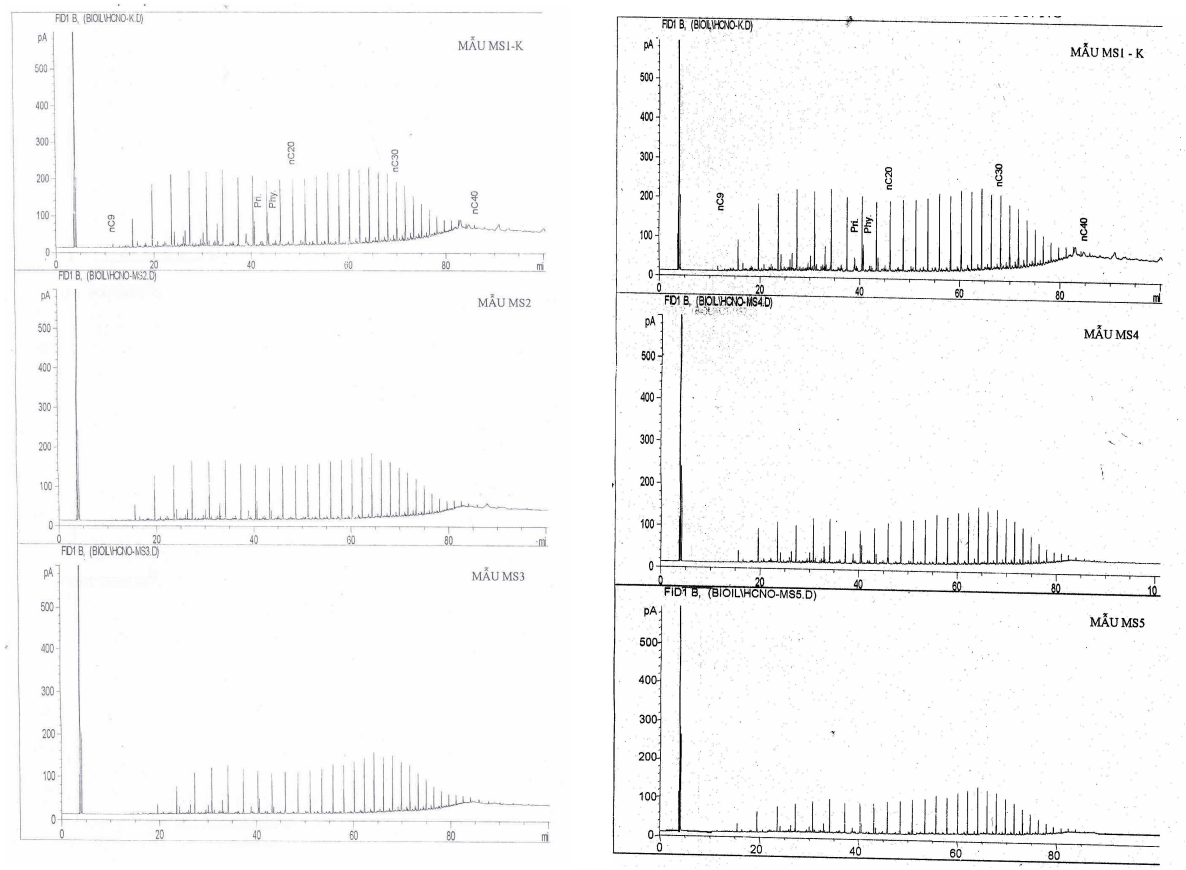
Như vậy, với kết quả nghiên cứu bước đầu đạt được, khả năng của chất HHBM sinh học trong việc kích hoạt quá trình phân hủy dầu thô tự nhiên của các vi sinh vật là rất khả quan. Chúng tôi đã nghiên cứu khả năng tạo chất HHBM sinh học từ một chủng vi sinh vật nội tại có khả năng sử dụng dầu mạnh nhất và ứng dụng thí điểm vào quá trình phân hủy dầu tự nhiên. Kết quả cho thấy hàm lượng dầu tổng số nói chung và hàm lượng hydrocacbon no, hydrocacbon thơm nói riêng đều giảm đáng kể (hình 5, 6).

III. KẾT LUẬN

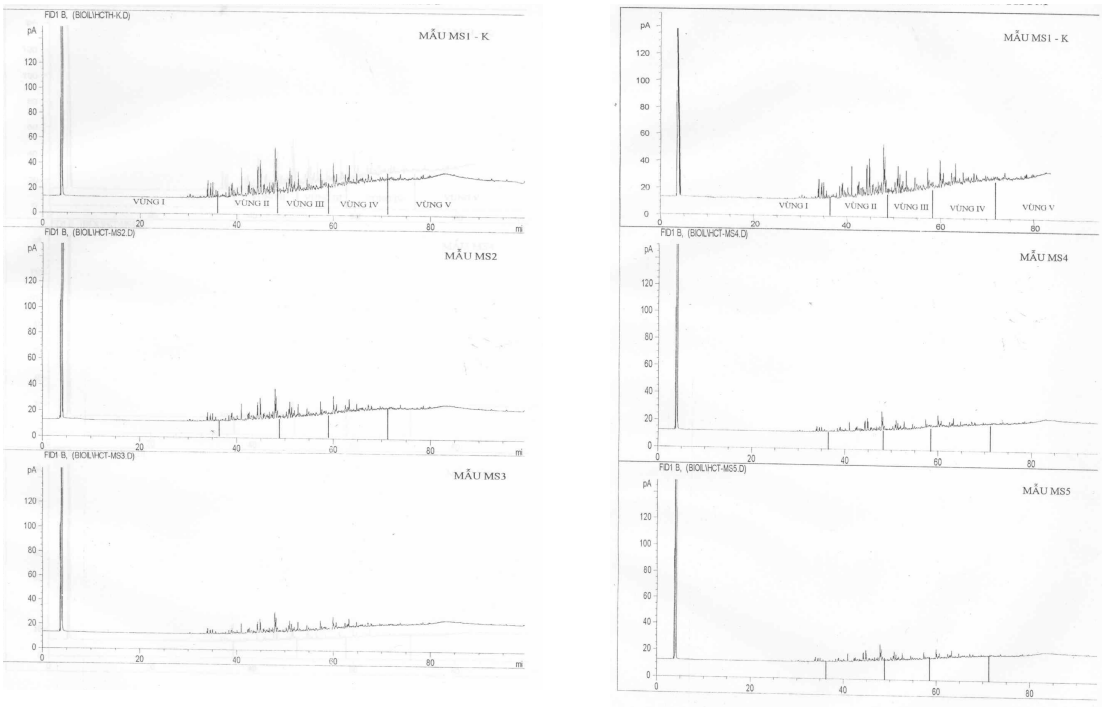
1. Từ các mẫu cát lấy từ bãi biển Nha Trang đã phân lập được 5 chủng vi khuẩn có khả năng tạo ra chất HHBM sinh học, trong đó chủng B303 có khả năng tạo chất HHBM tốt nhất. Theo kit chuẩn API 20NE chủng này thuộc loài *Pseudomonas aeruginosa*.

2. Đã nghiên cứu điều kiện tối ưu cho chủng B303 tạo chất HHBM và đưa ra quy trình tách chiết chất này bằng axêtôn, tỷ lệ 1:4.

3. Kết quả phân tích phổ hồng ngoại của sản phẩm thu được từ chủng B303 khi nuôi trên môi trường chứa dầu oliu cho thấy chất này thuộc nhóm rhamnolipit.



Hình 5. Phổ sắc kí hydrocacbon no



Hình 6. Phổ sắc kí hydrocacbon thơm

4. Chất HHBM sinh học do chủng B303 sinh ra có hoạt tính khá cao : chỉ số nhũ hóa đạt 72,5%. Chất này có tác dụng tăng cường quá trình phân hủy dầu thô ở điều kiện thí nghiệm, hiệu quả tăng gấp 6 lần so với đối chứng không bổ sung chất HHBM.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Babu P. S. et al.**, 1996: Biotechnology Letter. 18(3): 263-268.
2. **Banat I. M. et al.**, 1991: World Journal of Microbiology and Biotechnology. 7: 80-88.
3. **Deziel E. et al.**, 1996: Applied and Environmental Microbiology, 62(6): 1908-1912.
4. **Iqbal S.**, **Khalid Z. M.**, **Malik K. A.**, 1995: Letter in Applied Microbiology, 21: 176-179.
5. **Ivshina I. B. et al.**, 1998: World Journal of Microbiology and Biotechnology, 14: 711-717.
6. **Makkar R. S.**, **Cameotra S. S.**, 1997: *J.* Industrial Microbiology and Biotechnology. 18: 37-42..
7. **Ochsner U. A.**, **Hembach T.**, **Fiechter A.**, 1995: Advances in Biochemical Engineering Biotechnology. 53: 89-117.
8. **Passeri A. et al.**, 1992: Applied of Microbiology and Biotechnology, 37: 281-286.
9. **Patel R. M.**, **Desai A. J.**, 1997: Letters in Applied Microbiology, 25: 91-94.
10. **Pruthi V.**, **Cameotra S. S.**, 1995: Biotechnology Techniques, 9(4): 271-276..
11. **Reiling H. E. et al.**, 1986: Applied and Environmental Microbiology, 51(5): 985-989.
12. **Robert M. et al.**, 1989: Biotechnology letters, 11(12): 871-874.
13. **Vegt W. et al.**, 1991: Applied of Microbiology and Biotechnology, 35: 766-770.
14. **Yakimov M. M. et al.**, 1995: Applied and Environmental Microbiology, 61(5): 1706-1713.
15. **Yalimov M. M. et al.**, 1998: International Journal of Systematic Bacteriology, 48: 339-348.
16. **Zhang Y.**, **Miller R. M.**, 1992: Applied and Environmental Microbiology, 58(10): 3276-3282.

BIOSURFACTANT- PRODUCING BACTERIA ISOLATED FROM THE NHATRANG BEACH

LAI THUY HIEN, DUONG VAN THANG, TRAN CAM VAN, DOAN THAI HOA

SUMMARY

Chemically synthesized surfactants have been used for many years in petroleum industry to lean up of oil spills, to enhance oil recovery from oil reservoirs. These compounds are not biodegradable and can be toxic to the environment, but the biosurfactants are biodegradable, less toxic and have equivalent emulsification properties. The biosurfactants are the surface active compounds produced by certain bacteria, actinomyces, yeast and fungi. In last few decades the biosurfactants are widely used in several industrial fields, mining, leather, in agricultural, pharmaceutical cosmetics and a wide range of chemical industries as wetting agents, foaming, emulsification, and surface activity. In particular in recent years, there is an increasing interest in the possible use of biosurfactants in mobilizing heavy crude oil, transporting petroleum in pipelines, managing oil spills, oil pollution control, cleaning oil sludge from storage facilities, bioremediation and microbial enhanced oil recovery (MEOR).

In Vietnam, there is rare publication on the biosurfactant production, but the requirements are constantly increasing. In this paper, we show some results on the study of biosurfactant producing bacteria isolated from

marine environment and their ability to enhance the crude oil degradation. From Nha trang beach sand samples, 5 biosurfactant producing bacteria strains were isolated. Among them, the strains B303 were the best biosurfactant producer. According to the chemical standard kit API 20NE, this strain was determinated as *Pseudomonas aeruginosa*. The optimum conditions for the biosurfactant production of this strain and the procedure for the biosurfactant extracting were studied. The results of the biosurfactant B303 UV analysis when this strain was cultivated on olive oil showed that it was similar to rhamnolipid.

The biosurfactant produced by the strain B303 had very high activity: its emulsification gained 72.5% and its ability to enhance the crude oil degradation on experimental conditions was higher for six times in comparison with the control.

Ngày nhận bài: 1-11-2002