

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG PHÂN HỦY DẦU DIESEL CỦA CHỦNG VI KHUẨN BTLĐ5 PHÂN LẬP TỪ NƯỚC THẢI KHU CÔNG NGHIỆP

CUNG THỊ NGỌC MAI, NGUYỄN THÙY LINH,
NGUYỄN VĂN BẮC, VŨ THỊ THANH,
NGHIÊM NGỌC MINH

Viện Công nghệ sinh học

Sau than đá, dầu mỏ là nguyên liệu hóa thạch thứ hai được con người biết đến và đưa vào khai thác, sử dụng. Kể từ khi phát hiện ra đến nay, dầu mỏ vẫn được coi như là một nguồn năng lượng không thể thiếu cũng như chưa thể thay thế. Chính vì có một vị trí quan trọng đối với loài người mà ngành công nghiệp dầu mỏ ngày một phát triển mạnh mẽ và đã trở thành thế mạnh kinh tế đối với những nước có tiềm năng dầu mỏ.

Tuy nhiên, bên cạnh nguồn lợi về kinh tế do ngành công nghiệp này đem lại là hiểm họa ô nhiễm môi trường có nguyên nhân từ những sự cố khai thác, vận chuyển dầu mỏ trên biển... gây ra. Ngoài sự cố tràn dầu, phải kể đến một số lượng không nhỏ cặn thải xăng dầu tồn đọng trong các kho chứa, cũng như hàm lượng dầu được sử dụng cho các động cơ, các loại dây chuyền sản xuất công nghiệp cũng làm lượng dầu ô nhiễm có trong nước thải công nghiệp và sinh hoạt ngày càng gia tăng. Vấn đề ô nhiễm dầu ngày nay đang trở thành nỗi bức xúc toàn cầu. Đứng trước những hiểm họa ô nhiễm dầu mỏ và các sản phẩm của nó, để có thể giải quyết một cách triệt để, đòi hỏi phải có sự kết hợp nghiên cứu của nhiều nhà khoa học, công nghệ và các nhà quản lý môi trường cũng như sự hợp tác giữa các đơn vị vận chuyển, kinh doanh và sử dụng dầu mỏ.

Hiện nay, công nghệ phân hủy sinh học (Bioremediation) đã được áp dụng rộng rãi đối với xử lý ô nhiễm dầu và các chất độc hóa học, cũng như các chất ô nhiễm khác do có hiệu quả cao, chi phí thấp và an toàn với môi trường. Bản chất của công nghệ phân hủy sinh học là kích thích sự phân hủy, sự phát triển của vi sinh vật bản địa có khả năng phân hủy dầu hoặc các chất gây ô nhiễm khác có sẵn trong tự nhiên, bằng

cách thay đổi các yếu tố môi trường như độ thông khí, các chất dinh dưỡng như nguồn nitơ và photpho, các chất vi lượng, các chất hoạt động bề mặt sinh học... có nghĩa là tạo ra điều kiện tối ưu để vi sinh vật sử dụng các thành phần dầu mỏ phát triển và hoạt động phân hủy. Vì vậy, để góp phần xử lý ô nhiễm dầu diesel (dầu DO) trong nước thải công nghiệp, chủng vi khuẩn BTLĐ5 đã được phân lập từ nước thải khu công nghiệp (KCN) Từ Liêm và đánh giá khả năng sử dụng dầu DO của nó.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu

Chủng vi khuẩn BTLĐ5 được phân lập từ nước thải tại bể chứa tập trung của KCN Từ Liêm Hà Nội ở các vị trí khác nhau.

2. Phương pháp

a. Phân lập

Phương pháp làm giàu 3 lần được dùng để phân lập chủng vi khuẩn BTLĐ5. Hút 5 ml mẫu nước thải sau khi trộn đều vào bình tam giác 250 ml chứa 45 ml môi trường khoáng có bổ sung 5% dầu DO, nuôi lác 5 - 7 ngày ở 30°C với tốc độ 200 vòng/phút. Sau 5 - 7 ngày, chuyển 10% giống ở lần làm giàu thứ nhất sang bình làm giàu lần hai và lần ba. Sau lần làm giàu thứ ba, hút 0,5 ml dịch nuôi cấy, pha loãng và cấy gạt trên môi trường hiếu khí tổng số, mẫu được nuôi tĩnh ở 30°C. Sau 7 ngày, các khuẩn lạc mọc riêng rẽ sẽ được tách riêng ra nuôi trên 20 ml môi trường khoáng dịch thể.

b. Quan sát hình thái khuẩn lạc và hình thái tế bào

Hình thái khuẩn lạc của chủng vi khuẩn

BTLĐ5 được quan sát trên môi trường hiếu khí tổng số thạch.

Hình thái tế bào của chủng vi khuẩn được quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét JSMLV5410 với sự phối hợp của Viện 69, Bộ Tư Lệnh Lãng.

c. Nghiên cứu khả năng phân hủy dầu DO của chủng BTLĐ5

Chủng vi khuẩn BTLĐ5 được nuôi lắc 200 vòng/phút trên môi trường muối khoáng có bổ sung 5% dầu DO ở 30°C. Khả năng phân hủy dầu của chủng BTLĐ5 được thực hiện theo phương pháp phân tích khối lượng của TCVN 4582-88. Quá trình phân tích dầu được thực hiện với sự phối hợp của Viện Hóa học công nghiệp.

d. Phân loại vi khuẩn dựa trên việc so sánh trình tự gen 16S rRNA

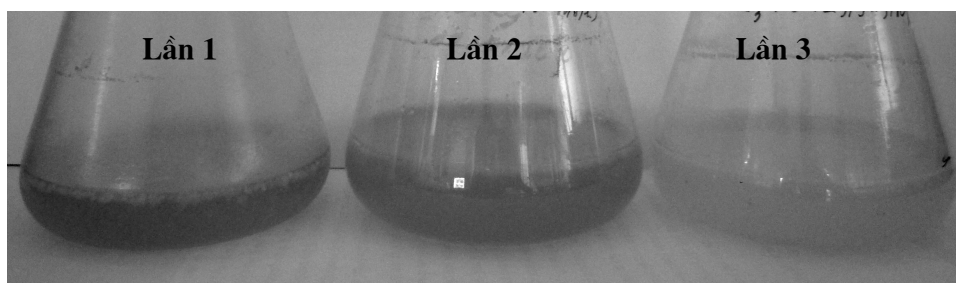
DNA tổng số của chủng BTLĐ5 được tách chiết theo hướng dẫn của bộ kit (hãng Bioneer), sau đó DNA tổng số được nhân lên với cặp mồi 27f và 1492r với chu trình phản ứng là: 94°C trong 5 phút; lặp lại 32 chu kỳ: 94°C trong 1 phút, 55°C trong 1 phút 30 giây, 72°C trong 1 phút 30 giây; 72°C trong 7 phút; 4°C để giữ.

Tiếp đó sản phẩm PCR (kích thước khoảng 1500 bp) được gắn vào vector tách dòng, biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5 α . Dòng plasmid chứa đoạn gen mong muốn được tách chiết, tinh sạch và xác định trình tự trên máy xác định trình tự gen tự động (ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer). Việc so sánh trình tự nucleotit và xây dựng cây phát sinh chủng loại của chủng BTLĐ5 với các chủng vi khuẩn đại diện khác sử dụng phần mềm Blast, Bioedit, Clustal X và Treeview.

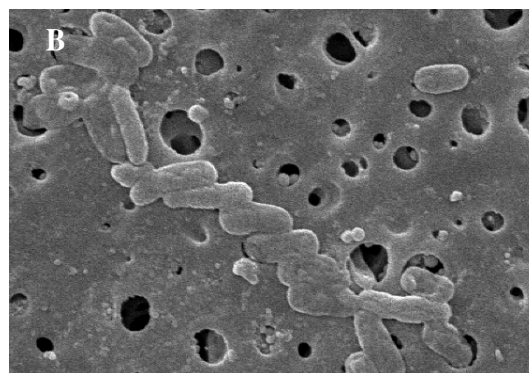
II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Phân lập chủng BTLĐ5 từ nước thải KCN Từ Liêm, Hà Nội

Sau 3 lần làm giàu, chúng tôi nhận thấy màu sắc và độ đục của môi trường thay đổi rõ rệt so với mẫu nước thải ban đầu. So sánh kết quả các lần làm giàu thứ nhất, lần làm giàu thứ 2 và thứ 3 chúng tôi quan sát thấy sau 24 giờ, màu môi trường thay đổi rõ rệt và sinh khối ngày càng tăng lên, điều đó cho thấy sự phát triển nhanh chóng của các vi sinh vật trong mẫu nước thải (hình 1).



Hình 1. Mẫu làm giàu lần 1, lần 2, lần 3 trên môi trường khoáng có bổ sung 5% dầu DO



Hình 2. Hình thái khuẩn lạc (A) và hình thái tế bào chủng BTLĐ5 với độ phóng đại 7500 lần (B)

Sau khi pha loãng lần làm giàu thứ 3 và cấy gạt trên môi trường hiếu khí tổng số thạch, rồi cấy chuyển sang môi trường khoáng dịch chứa 5% dầu DO, chúng tôi nhận thấy chủng BTLĐ5 là chủng vi khuẩn phát triển nhanh nhất, sau 24h lượng sinh khối bám trên thành bình và lượng dầu nổi trên bề mặt dịch cũng biến mất nhanh nhất. Vì vậy, chúng tôi sử dụng chủng vi khuẩn này để dùng cho các nghiên cứu tiếp theo.

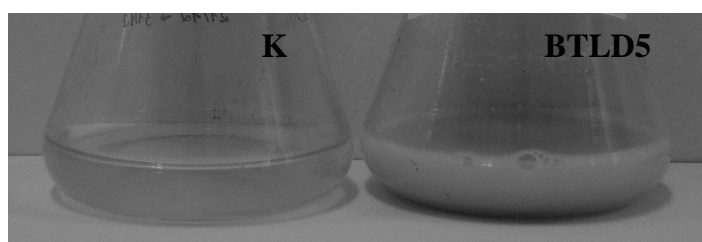
2. Hình thái khuẩn lạc và hình thái tế bào chủng BTLĐ5

Trên môi trường hiếu khí tổng số thạch, khuẩn lạc chủng vi khuẩn BTLĐ5 có màu trắng đục, nhớt, lồi, đường kính khoảng 2 mm và tiết ra môi trường sắc tố xanh lục (hình 2A). Dưới kính hiển vi điện tử quét với độ phóng đại 7500 lần, tế bào chủng BTLĐ5 có dạng hình que ngắn, kích thước từ 0,73 - 0,91 $\mu\text{m} \times 1 - 1,8 \mu\text{m}$

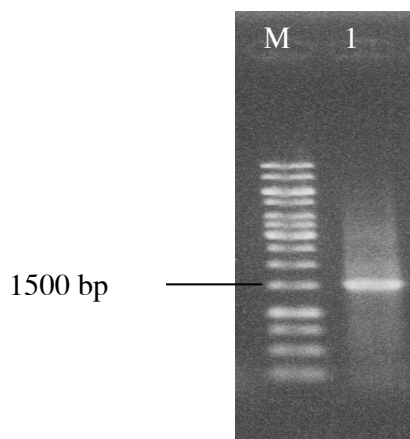
(hình 2B).

3. Nghiên cứu khả năng phân hủy dầu DO của chủng BTLĐ5

Chủng BTLĐ5 được nuôi lắc trên môi trường khoáng dịch có bổ sung 5% dầu DO. Sau 7 ngày nuôi lắc ở 30°C, so với mẫu đối chứng không có vi sinh vật (mẫu K), môi trường nuôi cấy chủng BTLĐ5 đã có sự đổi màu rõ rệt và lượng sinh khối bám vào thành bình cũng lớn (hình 3). Vì vậy, có thể phân nào khẳng định được khả năng phân hủy dầu của chủng vi khuẩn này. Tuy nhiên, để đánh giá chính xác khả năng phân hủy dầu DO, chúng tôi đã gửi phân tích ở Viện Hóa công nghiệp. Bằng phương pháp phân tích khối lượng, sau 7 ngày nuôi lắc hàm lượng dầu còn lại là 3 g/l giảm 25 g/l so với mẫu đối chứng (28 g/l). Từ đó, chúng tôi tính toán được lượng dầu do BTLĐ5 sử dụng là 89,3%.

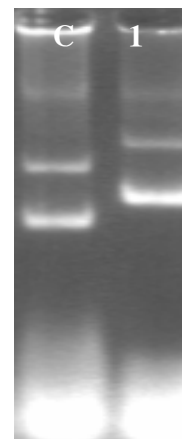


Hình 3. Khả năng sinh trưởng của chủng BTLĐ5 trên môi trường chứa 5% dầu DO



Hình 4. Sản phẩm nhân đoạn gene mã hóa 16S rRNA của chủng BTLĐ5

M. Thang DNA chuẩn kích thước 1 kb;
1. Sản phẩm PCR của chủng BTLĐ5.



Hình 5. Sản phẩm điện di DNA plasmid của dòng số 2 trên gel agarose 1%

C. DNA plasmid dòng khuẩn lạc màu xanh (đối chứng); 1. DNA plasmid dòng khuẩn lạc số 2.

4. Phân loại vi khuẩn dựa trên trình tự đoạn gen 16S rRNA

DNA tổng số của BTLĐ5 được chúng tôi

tách chiết, nhân đoạn gen 16S rRNA với cặp môi 27f và 1492r với chu trình nhiệt phản ứng nêu ở phần phương pháp. Điện di đồ sản phẩm

PCR thu được 1 băng rõ nét, đặc hiệu, có kích thước khoảng 1500 bp, hoàn toàn phù hợp với tính toán lý thuyết (hình 4). Sản phẩm PCR được tinh sạch, gắn vào vector tách dòng pBT và biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5 α . Một dòng khuẩn lạc trắng được tách chiết DNA plasmid (hình 5). DNA plasmid của dòng khuẩn lạc này được kiểm tra bằng cách PCR lần 2 với cặp mồi 27f và 1492r với DNA plasmid của dòng khuẩn lạc số 2 làm khuôn (thành phần phản ứng và chu

trình nhiệt như lần PCR thứ nhất), kết quả cho thấy dòng khuẩn lạc trắng đó chứa đúng đoạn gen cần thiết (1500 bp). Do đó, DNA plasmid của dòng khuẩn lạc đó được tách chiết, tinh sạch và xác định trình tự gene.

Trình tự đoạn gen 16S rRNA của chủng BTLĐ5 đã được xác định trên máy đọc trình tự tự động ABI PRISM 3100. Sau khi phân tích và xử lý số liệu, trình tự đoạn gen 16S rRNA của chủng vi khuẩn này được trình bày trên hình 6.

```

1      tccctggattc agcggcgac gggtgagtaa tgcctaggaa tctgcctggg agtgggggat
61     aacgtccgga aacggggcgt aataaccgcat acgtcctgag ggagaaagtg ggggatcctc
121    ggacctcacg ctatcagatg agcctaggctc ggattagcta gttgggtggg taaaggccta
181    ccaaggcgac gatccgtaac tggctcgaga ggatgatcag tcacactgga actgagacac
241    ggtccagact cctacgggag gcagcagtg ggaatattgg acaatgggcg aaagcctgat
301    ccagccatgc cgcgtgtgtg aagaaggtct tccgattgta aagcacttta agttgggagg
361    aagggcagta agttaatacc ttgctgtttt gacgttacca acagaataag caccggctaa
421    cttcgtgcca gcagccgcgg taatacgaag ggtgcaagcg ttaatcgga ttactgggcg
481    taaagcgcg gtaggtggtt cagcaagttg gatgtgaaat ccccgggctc aacctgggaa
541    ctgcatccaa aactactgag ctagagtacg gtagagggtg gtggaatttc ctgtgtagcg
601    gtgaaatgcg tagatatagg aaggaacacc agtggcgaag gcgaccacct ggactgatac
661    tgacactgag gtgcgaaagc gtgggggagc aacacaggatt agataccctg gtagtccacg
721    ccgtaaacga tgtcgactag ccgttgggat ccttgagatc ttagtggcgc agctaacgcg
781    ataagtcgac cgcctgggga gtacggccgc aaggttaaaa ctcagatgaa ttgactgggg
841    gcccgcacaa gcggtggagc atgtggttta attcgaagca acgcaagaa ccttacctgg
901    ccttgacatg ctgagaactt tccagagatg gattggtgcc ttcgggaact cacacacagg
961    tgctgcatgg ctgtcgtcag ctcgtgtcgt gagatggttg gtaagtccc gtaacgagcg
1021   caacccttgt ccttagttac cagcacctcg ggtgggcaact ctaaggagac tgccggtgac
1081   aaaccggagg aaggtgggga tgacgtcaag tcatcatggc ccttacggcc agggctacta
1141   cacgtgctac aatgggtcgg acaaagggtt gccaaagccg gaggtggagc taatcccata
1201   aaaccgatcg tagtccggat cgcagtctgc aactcgactg cgtgaagtcg gaatcgctag
1261   taatcgtgaa tcagaatgct acggtgaata cgttcccggg ccttgtacac accgcccgtc
1321   ccaccatggg atcgttgctc cagaagtatc tag

```

Hình 6. Trình tự đoạn gen 16S rRNA của chủng vi khuẩn BTLĐ5

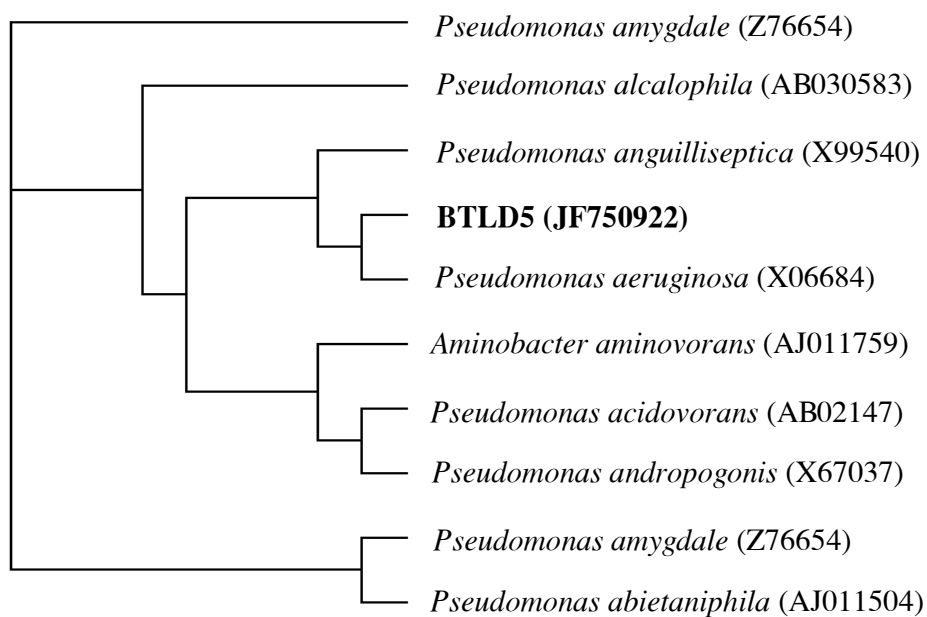
Dựa vào việc so sánh trình tự đoạn gen 16S rRNA của chủng vi khuẩn BTLĐ5 với trình tự các chủng vi sinh vật prokaryote chuẩn khác trên LPSN (List of Prokaryotic names with

Standing in Nomenclature), chúng tôi đã thống kê mức độ tương đồng của các chủng so sánh (bảng 1) và xây dựng cây phát sinh chủng loại của chủng vi khuẩn này (hình 7).

Bảng 1

Mức độ tương đồng của BTLĐ5 so với một số chủng vi khuẩn

STT	Tên chủng vi khuẩn	Mã số trên NCBI	Số nucleotit so sánh	Mức độ tương đồng
1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	X06684	1329/1355	98%
2	<i>Pseudomonas agarici</i>	Z76652	1294/1371	94%
3	<i>Pseudomonas acidovorans</i>	AB02147	1147/1354	85%
4	<i>Pseudomonas abietaniphila</i>	AJ011504	1297/1369	95%
5	<i>Pseudomonas alcalophila</i>	AB030583	1311/1363	96%
6	<i>Aminobacter aminovorans</i>	AJ011759	806/956	84%
7	<i>Pseudomonas amygdale</i>	Z76654	1276/1359	94%
8	<i>Pseudomonas andropogonis</i>	X67037	1160/1372	85%
9	<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	X99540	1300/1349	96%



Hình 7. Cây phát sinh chủng loại của chủng BTL5 so với các loài có họ hàng gần gũi

Quan sát trên bảng 1 và hình 7 chúng tôi nhận thấy, chủng BTL5 có quan hệ gần gũi với các chủng thuộc chi *Pseudomonas*, dựa trên việc so sánh nucleotit thì chủng vi khuẩn này có độ tương đồng cao với chủng *Pseudomonas aeruginosa* (98%). Do đó, chúng tôi tạm đặt tên chủng vi khuẩn này là *Pseudomonas* sp. BTL5. Chủng vi khuẩn này đã được đăng ký trên ngân hàng Genbank (NCBI) với mã số là JF750922.

Một số tác giả trên thế giới đã công bố về khả năng phân hủy dầu DO của chi *Pseudomonas*. Nghiên cứu mới nhất của nhóm tác giả Kaczorek và nnk. (2011) khi nghiên cứu về khả năng phân hủy sinh học các hợp chất hydrocarbon đã phân lập được chủng vi khuẩn *Pseudomonas alcaligenes* S22 có khả năng phân hủy 92% dầu DO sau 21 ngày nuôi cấy có bổ sung thêm Triton X-100 [3]. Năm 2009, tác giả Adeline và nnk., đã phân lập được chủng *Pseudomonas lundensis* UTAR FPE2 từ lò nhiên liệu của nhà máy có khả năng phân hủy 69% dầu diesel trong 3 ngày đầu tiên [1]. Năm 2006, nhóm tác giả Ueno A và nnk., đã phân lập được chủng *Pseudomonas aeruginosa* WatG trong đất ô nhiễm dầu có khả năng phân hủy 51% tổng lượng hydrocarbon mạch thẳng có trong dầu DO [5]. Năm 2004, nhóm tác giả Hong và nnk. đã phân lập được chủng vi khuẩn

Pseudomonas aeruginosa IU5 có khả năng phân hủy 60% dầu DO (8500 mg/kg) sau 13 ngày nuôi cấy [2].

Ở Việt Nam đã có công bố của một số nhóm tác giả về các chủng vi khuẩn có khả năng sử dụng dầu DO. Năm 2010, nhóm tác giả tại Phòng Vi sinh vật Dầu mỏ, Viện Công nghệ sinh học đã nghiên cứu khả năng tạo chất hoạt động bề mặt từ chủng vi khuẩn *Pseudomonas pseudomalei* H24 giúp tăng cường khả năng phân hủy dầu DO của vi sinh vật từ mẫu cát biển có khả năng phân hủy 67% và 37% với nồng độ dầu ban đầu là 39,2 g/l [4].

Như vậy, so sánh với các chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy dầu DO trên thế giới và Việt Nam, chủng BTL5 của chúng tôi có khả năng phân hủy dầu khá lớn. Chủng vi khuẩn này cũng đã chứng minh ưu thế xử lý dầu trong nước thải công nghiệp. Do đó, có thể bổ sung chủng này vào tập đoàn giống tạo bùn hoạt tính để nâng cao hiệu quả xử lý nước thải công nghiệp.

III. KẾT LUẬN

Chủng vi khuẩn BTL5 có khuẩn lạc tròn, màu trắng đục, nhớt, lồi, đường kính khoảng 2 mm và tiết ra môi trường sắc tố xanh lục. Dưới kính hiển vi điện tử quét, tế bào chủng BTL5 có dạng hình que ngắn, kích thước từ 0,73 - 0,91 $\mu\text{m} \times 1 - 1,8 \mu\text{m}$.

Chủng vi khuẩn BTLĐ5 có khả năng phân hủy 89,3% dầu DO với hàm lượng ban đầu là 28 g/l sau 7 ngày nuôi cấy.

Kết quả phân loại thông qua việc xác định trình tự nucleotide của đoạn gen mã hóa 16S rRNA cho thấy, chủng BTLĐ5 có mối quan hệ gần gũi với các loài thuộc chi *Pseudomonas*. Trình tự nucleotide của đoạn gen mã hóa 16S rRNA ở chủng này có độ tương đồng 98% so với loài *Pseudomonas aeruginosa* (X06684). Vì vậy, chủng BTLĐ5 được đặt tên là *Pseudomonas* sp. BTLĐ5. Trình tự nucleotit của đoạn gen mã hóa 16S rRNA của chủng này đã được đăng ký trên Ngân hàng gen quốc tế NCBI với mã số là JF750922.

Lời cảm ơn: Bài báo được hoàn thành nhờ sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài: “Ứng dụng công nghệ vi sinh để xử lý nước thải có chứa các hợp chất hữu cơ hydrocacbon thơm đa vòng”, mã số 01C-09/02-2009-2, do Sở Khoa học và Công nghệ Hà Nội tài trợ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Adeline S. Y. Ting, Carol H. C. Tan and Aw C. S.**, 2009: Hydrocarbon-degradation by isolate *Pseudomonas lundensis* UTAR FPE2. Malaysian Journal of Microbiology, 5(2): 104-108.
2. **Hong J. H., Kim J., Choi O. K., Cho K. S. and Ryu H. W.**, 2005: Characterization of a diesel-degrading bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* IU5, isolated from oil-contaminated soil in Korea. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 21: 381-384.
3. **Kaczorek E., Moszynska S., Olszanowski A.**, 2011: Modification of cell surface properties of *Pseudomonas alcaligenes* S22 during hydrocarbon biodegradation. Biodegradation, 22(2): 359-366.
4. **Lại Thúy Hiền, Nguyễn Thị Thu Huyền, Đỗ Thu Phương, Phạm Thị Hằng, Vương Thị Nga, Lê Thị Nhi Công, Nguyễn Thị Yên, Nguyễn Bá Tú, Hoàng Văn Thắng.** 2010: Nghiên cứu tạo chất hoạt hóa bề mặt sinh học từ vi sinh vật nhằm ứng dụng trong các ngành công nghiệp và xử lý môi trường: 199-209. Hội nghị Khoa học kỷ niệm 35 năm Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.
5. **Ueno A., Yukiya I., Isao Y., Hidetoshi O.**, 2007: Isolation and characterization of bacteria from soil contaminated with diesel oil and the possible use of these in autochthonous biogaugmentation. World Journal of Microbiology & Technology, 23(12): 1739-1745.

STUDYING DIESEL OIL BIODEGRADATION OF THE BACTERIAL STRAIN BTLĐ5 ISOLATED FROM INDUSTRIAL WASTEWATER

CUNG THI NGOC MAI, NGUYEN THUY LINH,
NGUYEN VAN BAC, VU THI THANH, NGHIEM NGOC MINH

SUMMARY

The bacterial strain BTLĐ5 was isolated from wastewater of Tu Liem industrial zone. This strain had round and smooth colony with 2 mm diameter. The cell morphology of the strain BTLĐ5 was observed under the Scanning Electron Microcopy showed that it was a short rod with 0.73 - 0.91 μm in wide and 1 - 1.8 μm in length.

The strain BTLĐ5 is able to utilize diesel oil as sole energy and carbon sources. After 7 days in shake cultivation, 89.3% adding oil was removed. The nucleotide sequence of the 16S rRNA gene had been used for taxonomy of the strain BTLĐ5. The result of the amplification of the nucleotide sequence with the primer 27f/1492r indicated that the strain BTLĐ5 had high homology with the species of the genus *Pseudomonas* and was close to the *Pseudomonas aeruginosa* strain (X06684). Based on the morphology and the 16S rRNA gene nucleotide sequence, this strain belong to genus *Pseudomonas* and named *Pseudomonas* sp. BTLĐ5. The nucleotide sequence of the 16S rRNA gene was deposited in the NCBI genbank database with assession number JF750922.

Ngày nhận bài: 26-4-2011