

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG PHÂN HỦY NAPHTHALENE VÀ PYRENE CỦA MỘT SỐ CHỦNG VI KHUẨN TÍA QUANG HỢP TẠO MÀNG SINH HỌC

Nguyễn Thị Minh Nguyệt^{2,3}, Hoàng Phương Hà^{1,2}, Đồng Văn Quyên^{1,4}, Nguyễn Ngọc Hương Trà⁵, Lê Thị Nhi Công^{1,2,✉}

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2, Xuân Hòa, Phúc Yên, Vĩnh Phúc

⁴Trường Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

⁵Stuart Hall School, Staunton, Virginia, 24401, United States

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: lenhicong@ibt.ac.vn

Ngày nhận bài: 28.12.2019

Ngày nhận đăng: 20.02.2020

TÓM TẮT

Các hợp chất hydrocarbon thơm như naphthalene, pyrene được xem là những chất khó phân hủy nhưng lại có ở nhiều địa điểm bị ô nhiễm dầu như tại các kho xăng dầu hoặc tại các khu vực sản xuất dầu khí. Các hợp chất này thường khó được phân hủy hoặc chuyển hóa trong các điều kiện thiếu khí. Trong số các vi sinh vật phân hủy kỵ khí hoặc vi hiếu khí, vi khuẩn tía quang hợp (VKTQH) được xem là nhóm chiếm ưu thế. Vi khuẩn tía quang hợp thuộc nhóm thủy sinh, có khả năng sinh trưởng trong điều kiện kỵ khí bằng cách quang hợp nhưng không thải oxy. Nhóm vi khuẩn này có các kiểu trao đổi chất linh hoạt tùy thuộc vào điều kiện môi trường sống nên chúng phân bố rất rộng rãi trong tự nhiên. Đã có nhiều công bố về khả năng phân hủy naphthalene và pyrene của VKTQH ở trạng thái tế bào tự do. Tuy nhiên, cho tới nay chưa có nhiều công bố về các chủng VKTQH ở trạng thái tạo màng sinh học có khả năng phân hủy các hợp chất hydrocarbon thơm. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sàng lọc và đánh giá được khả năng phân hủy của 4 chủng vi khuẩn tạo màng sinh học là DQ41, PY2, PY6 và DG12. Kết quả cho thấy, hiệu suất phân hủy của 4 chủng vi khuẩn này ở dạng tạo màng sinh học đều đạt trên 79% với nồng độ cơ chất ban đầu tương ứng là 200 và 250 ppm naphthalene và pyrene. Kết quả này góp phần làm phong phú số lượng các chủng vi sinh vật tạo màng sinh học và có khả năng phân hủy các hợp chất thơm để phục vụ cho công nghệ xử lý ô nhiễm dầu tại Việt Nam.

Từ khóa: màng sinh học, phân hủy sinh học, phân hủy naphthalene, phân hủy pyrene, vi khuẩn tía quang hợp

MỞ ĐẦU

Naphthalene và pyrene là các hydrocarbon thơm khó phân hủy trong tự nhiên (Alessandrello *et al.*, 2017). Hiện có nhiều phương pháp xử lý hydrocarbon thơm bằng vật lý, hóa học, tuy nhiên những phương pháp này đều có những ưu nhược điểm riêng (Deng *et al.*, 2016; Dong *et al.*, 2012). Xử lý hydrocarbon thơm bằng phương pháp sinh học đang được nghiên cứu và sử dụng rộng rãi do chi phí thấp, hiệu quả cao và giảm ô

nhiễm thứ cấp (Girard, 2013). Bằng phương pháp này, một số hợp chất hydrocarbon thơm như naphthalene và pyrene có thể được phân hủy hoặc chuyển hóa để làm nguồn carbon và năng lượng cho sự sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật (González-Gaya *et al.*, 2016).

Thế giới hiện nay đã phát hiện, nghiên cứu và ứng dụng khả năng phân hủy hydrocarbon thơm trên các nhóm vi khuẩn, xạ khuẩn, nấm men và nấm mốc (Harwood, Gibson, 1986).

Trong nhóm vi khuẩn, vi khuẩn tía quang hợp (VKTQH) được quan tâm nghiên cứu nhiều do có nhiều ưu thế như sinh trưởng kỵ khí không bắt buộc, dễ tạo sinh khối lớn; sinh trưởng ở dải nhiệt độ, pH, độ mặn rộng, khả năng sử dụng nguồn carbon, nitrogen linh hoạt. Chúng có khả năng sử dụng nhiều nguồn hydrocarbon thơm như phenol, benzene, naphthalene, pyrene..., làm nguồn C cho sinh trưởng (Harwood *et al.*, 1998, Harwood, Gibson, 1988). Bên cạnh đó, những nghiên cứu gần đây đã cho thấy, VKTQH có khả năng tạo một lớp màng bao phủ xung quanh bảo vệ chúng trước những bất lợi của môi trường gọi là màng sinh học (Madigan, Jung, 2009). Màng sinh học (biofilm) là khái niệm đã và đang được sử dụng rộng rãi và được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực, đặc biệt trong xử lý các hợp chất hydrocarbon thơm (Shimada *et al.*, 2012). Thông qua các tương tác nội bào cùng các tương tác trong hệ thống polimer ngoại bào (EPS), các vi khuẩn trong màng sinh học liên kết với nhau có khả năng hỗ trợ lẫn nhau để chống chịu lại các điều kiện khắc nghiệt của môi trường, đồng thời thúc đẩy sự tích tụ chất dinh dưỡng, tăng cường khả năng trao đổi gene (O'Toole, Kolter, 1998). Hơn thế nữa, VKTQH có khả năng sinh trưởng tốt trong điều kiện hạn chế oxy ở các lớp phía dưới của màng sinh học (Morikawa *et al.*, 2006). Chính vì vậy, việc sử dụng VKTQH tạo màng sinh học sẽ góp phần làm tăng khả năng phân hủy/chuyển hóa các hợp chất hydrocarbon thơm, từ đó tăng khả năng xử lý ô nhiễm giúp bảo vệ môi trường.

Tuy nhiên, hiện nay những nghiên cứu về khả năng phân hủy/chuyển hóa các hợp chất thơm ở VKTQH tạo màng sinh học ở nước ta còn chưa nhiều. Do vậy trong nghiên cứu này chúng tôi sẽ đề cập tới khả năng tạo màng sinh học của một số chủng VKTQH phân lập từ các địa điểm ô nhiễm dầu cũng như hiệu quả sử dụng naphthalene và pyrene ở trạng thái tạo biofilm của chúng.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng vi khuẩn

Các chủng VKTQH phân hủy hydrocarbon

thơm đã được phân lập và tuyển chọn từ các vùng biển ô nhiễm dầu tại Việt Nam, thuộc bộ sưu tập chủng giống của Phòng Công nghệ sinh học môi trường, Viện Công nghệ sinh học, VAST, bao gồm 18 chủng: DQ41, DQ42, DQ51, DQ52, DQ81, DQ82, FO1, FO2, DD3, DD4, PY2, PY6, PY9, LC1, LC5, LACM1, MI1 và DG12.

Môi trường

Môi trường AT để phân lập nuôi cấy và cất giữ vi khuẩn tía quang hợp. Thành phần 1 lít môi trường AT (g/l) gồm: EDTA 0,005, acetate 1, succinate 0,5, vitamin 1 mL, cao nấm men 0,1, Mg.SO₄.7H₂O 0,2, CaCl₂.2H₂O 0,075, NH₄Cl 0,1, KH₂PO₄ 0,06, K₂HPO₄ 1, thạch 20 ‰, muối 15 ‰, nước vừa đủ 1000 mL trên dải pH 6,8 – 7. Môi trường được khử trùng ở 121°C trong 30 phút.

Môi trường AT cải tiến: là môi trường AT trong đó acetate và succinate được thay thế bằng các nguồn hydrocarbon khác nhau như naphthalene, pyrene với nồng độ từ 100-300 ppm. Dung dịch vitamin hỗn hợp được bổ sung sau khi môi trường đã khử trùng.

Dung dịch vitamin hỗn hợp: là hỗn hợp của các chất hỗ trợ cho vi khuẩn giúp chúng sinh trưởng tốt hơn. Thành phần dung dịch vitamin hỗn hợp (mg/100 mL) như sau: biotin 10, niacin 35, thiamin-HCl 30, vitamin B₁₂ 5, p-aminobenzoic axit 20, pridoxolium-HCl 10, panthothenate-Ca 10. Hòa tan các vitamin trong 100 mL nước cất khử trùng sau đó lọc bằng màng lọc khuẩn và bảo quản trong tủ lạnh.

Đánh giá khả năng tạo màng sinh học

Để đánh giá khả năng tạo màng sinh học của các chủng đã lựa chọn, chúng tôi tiến hành nhuộm với tím tinh thể theo phương pháp của O'Toole và Kolter (1998), Morikawa và đồng tác giả (2006). Phương pháp nhuộm tím tinh thể giúp phát hiện ra các tế bào bám dính trong một màng sinh học trên bề mặt giá thể đồng thời cũng cho phép định lượng mức độ hình thành màng sinh học mạnh hay yếu trong một khoảng thời gian nhất định bằng phương pháp đo độ hấp thụ ở bước sóng OD₅₇₀. Chỉ số OD₅₇₀ đo lường

tím tinh thể bất màu với tế bào thông qua biểu thị mật độ tế bào sống trong màng sinh học. Chỉ số OD₅₇₀ càng cao chứng tỏ mật độ trong tế bào màng sinh học càng cao và ngược lại.

Tuy nhiên đối với đối tượng là VKTQH là nhóm vi khuẩn kỵ khí sáng, chúng tôi có thay đổi một số bước để phù hợp với nhóm vi khuẩn này. Các bước tiến hành đánh giá khả năng tạo màng sinh học của chủng vi sinh vật:

- Hoạt hóa các chủng làm màng sinh học: nuôi cấy các chủng trên môi trường AT lỏng. Sau từ 3-5 ngày nuôi cấy, sinh khối tế bào được thu lại bằng ly tâm (ly tâm 3 lần ở 4000 vòng/phút 4°C trong vòng 10 phút và rửa nước cất 2 lần với thể tích tương ứng), loại dịch nuôi cấy. Sau đó, sinh khối được huyền phù trong nước, pha loãng tới hạn bằng nước muối sinh lý để đạt OD₆₀₀ = 0,3. Sau đó, chuyển 100 µL dịch tế bào vào các Eppendorf 1,5 mL chứa 900 µL môi trường AT. Bố trí thí nghiệm lặp lại 3 lần và theo dõi trong 7 ngày. Các mẫu được nuôi tĩnh dưới bóng đèn sợi đốt 40 W và đánh giá khả năng tạo màng sau 7 ngày.

- Kiểm tra khả năng tạo màng sinh học của các chủng vi sinh vật: sau 7 ngày nuôi cấy trong Eppendorf, dùng pipetman hút bỏ dịch nuôi cấy nhẹ không làm vỡ màng; rửa nhẹ nhàng màng sinh học bằng 1 mL nước cất rồi hút ra lặp lại lần nữa; cho 1 mL dung dịch tím tinh thể 0,1% vào các Eppendorf và để ở nhiệt độ phòng trong 10 phút để cố định; hút bỏ dung dịch tím tinh thể; rửa bằng 1 mL nước cất, 2 lần; bổ sung 1 mL dung dịch axit axetic 33%; đảo trộn hỗn hợp này, pha loãng tới hạn và đo OD ở bước sóng 570 nm; công thức tính giá trị màng tạo thành: $Y = X \times \text{độ pha loãng} \times 10/3$, trong đó X là giá trị đo OD thu được, 10/3 là chỉ số quy đổi từ giá trị OD sang giá trị hấp thụ tím violet của màng tạo thành.

Đánh giá sinh trưởng và phát triển của VKTQH trên các hydrocarbon thơm

VKTQH được đánh giá khả năng sinh trưởng trên naphthalene, pyren theo quy trình bao gồm các bước: hoạt hóa các chủng VKTQH trong môi trường AT 3-5 ngày; bổ sung 1 mL dịch sinh khối của mỗi chủng vào các bình với dung tích 12 mL

chứa 9 mL môi trường AT cải tiến, từng nguồn cơ chất ở nồng độ 100 - 300 ppm. Các bình được đậy nút cao su kín, giữ bằng gông sắt và được đặt dưới ánh đèn sợi đốt; sau 7 ngày, hút 1 mL dịch nuôi và kiểm tra mật độ quang phổ tại bước sóng 800 nm để đánh giá khả năng phát triển của các chủng vi khuẩn.

Đánh giá khả năng phân hủy hydrocarbon thơm của màng sinh học do các chủng VKTQH tạo thành

Tiến hành nuôi tạo màng sinh học với thể tích 10 mL môi trường AT trong bình trụ. Sau 7 ngày nuôi cấy trong điều kiện kỵ khí sáng, màng sinh học được tạo thành.

Khả năng phân hủy hydrocarbon thơm được đánh giá như sau: dùng pipetman hút toàn bộ dịch nuôi cấy một cách nhẹ nhàng để tránh làm vỡ màng; rửa màng 2 lần bằng nước cất vô trùng với thể tích tương ứng (10 mL); bổ sung 10 mL môi trường AT cải tiến, 0,1% vitamin và các nguồn hydrocarbon thơm khác nhau với nồng độ từ 100 - 300 ppm; đặt các bình nuôi cấy trong điều kiện kỵ khí và có chiếu sáng; sau 14 ngày, tiến hành xác định hàm lượng các nguồn hydrocarbon thơm của các mẫu chứa chủng vi khuẩn và mẫu đối chứng theo phương pháp phân tích sắc ký lỏng cao áp.

Phân tích thành phần hydrocarbon thơm

Thành phần hydrocarbon thơm có trong dịch nuôi cấy vi khuẩn được phân tích hóa học bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) Agilent 1100 (Mỹ) được trang bị detector chuỗi (DAD) để đo hàm lượng hydrocarbon thơm còn lại trong dịch nuôi, từ đó tính được hiệu suất phân hủy hydrocarbon thơm. Điều kiện đo: cột sắc ký Hypersil C 18 (200 x 4 mm), tỷ lệ pha động axetonitril/nước = 67/33 (theo thể tích); tốc độ dòng: 0,6 ml/phút; áp suất: 280 bar; tín hiệu đo ở bước sóng của phenol: 271 nm; toluene: 261 nm; naphthalene: 280 nm; Pyrene: 336 nm. Hàm lượng phenol, toluene, naphthalene, pyrene được xác định theo phương pháp ngoại chuẩn. Các mẫu phân tích được gửi phân tích tại Viện Công nghệ mới – Viện Khoa học và Công nghệ quân sự. Thí nghiệm lặp lại 3 lần và lấy giá trị trung bình.

Xử lý thống kê

Các số liệu thu được từ thực nghiệm được xử lý thống kê sinh học. Giá trị trung bình, độ lệch chuẩn và vẽ đồ thị được thực hiện trên Microsoft Excel. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần để tính trung bình mẫu. Mức khác biệt có ý nghĩa thống kê được đề nghị là $p < 0,05$.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

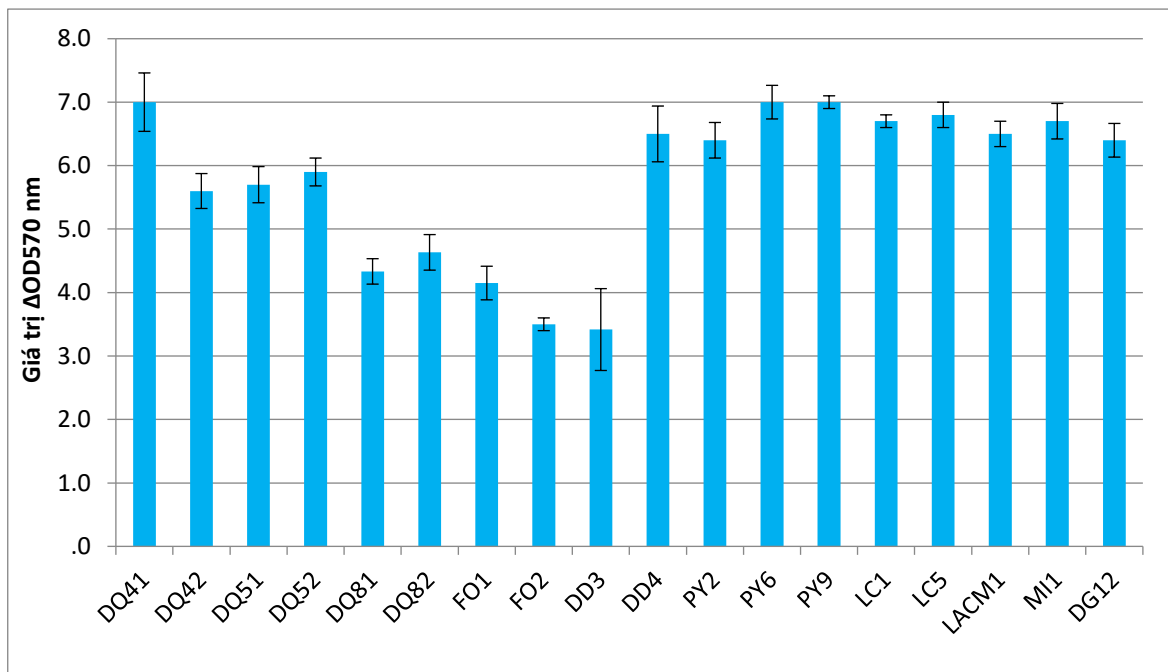
Sàng lọc các chủng vi khuẩn tía quang hợp tạo màng sinh học

Mười tám chủng VKTQH có khả năng sinh trưởng trên các nguồn hydrocarbon thơm khác nhau đã được đánh giá khả năng tạo màng sinh học (biofilm) theo phương pháp của Morikawa và đồng tác giả (2006). Kết quả được trình bày ở Hình 1.

Kết quả trên Hình 1 cho thấy, 10 chủng DQ41, DD4, PY2, PY6, PY9, LC1, LC5,

LACM1, MI1 và DG12 có khả năng tạo biofilm tốt hơn các chủng còn lại. Các nghiên cứu cũng đã cho thấy, để có thể tăng khả năng chống chịu cũng như phân hủy các hợp chất này, vi sinh vật cần có những lợi thế giúp chúng có thể chống chịu với các điều kiện bất lợi trong tự nhiên. Các chủng VSV trong màng sinh học đã được chứng minh là có những lợi thế hơn các VSV tồn tại tự do (Shimada *et al.*, 2012). Vì vậy, các chủng này đã được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

Như vậy, có thể nói các chủng VKTQH đã có khả năng tạo màng sinh học tốt để tồn tại ở những nơi có sự ô nhiễm dầu rất cao. Chứng tỏ chúng có thể chống chịu với một số nguồn hydrocarbon thơm phổ biến có trong các mẫu ô nhiễm dầu như naphthalene, pyrene... Tuy nhiên để có thể khẳng định chúng có thể sinh trưởng và có khả năng phân hủy một số nguồn hydrocarbon thơm hay không thì cần phải có những nghiên cứu sâu hơn. Các chủng VKTQH này đã được sử dụng để đánh giá khả năng sinh trưởng trên naphthalene và pyrene.

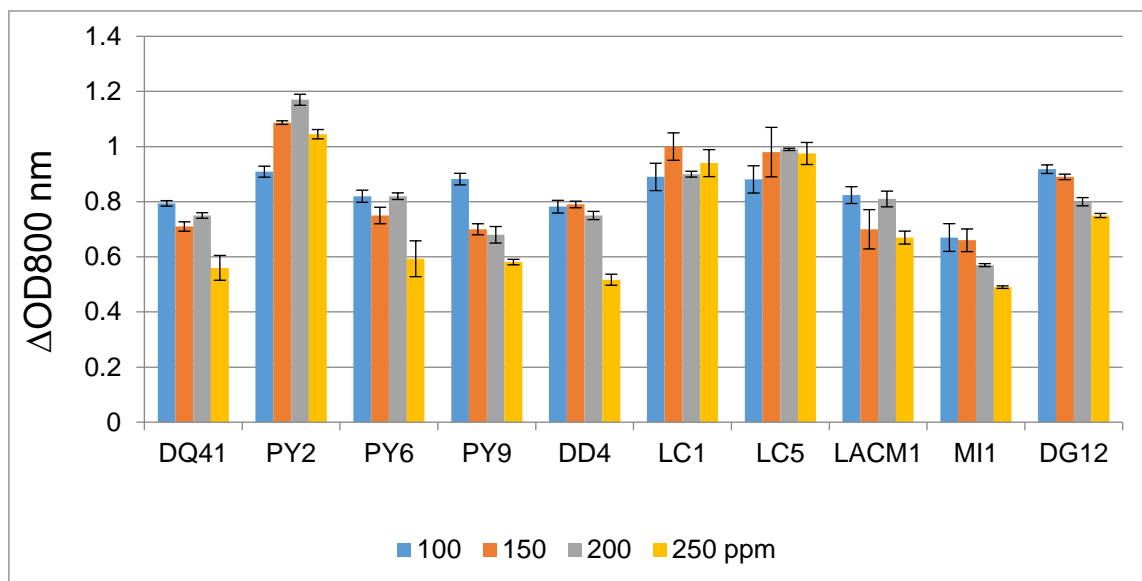


Hình 1. Khả năng tạo màng sinh học của các chủng VKTQH

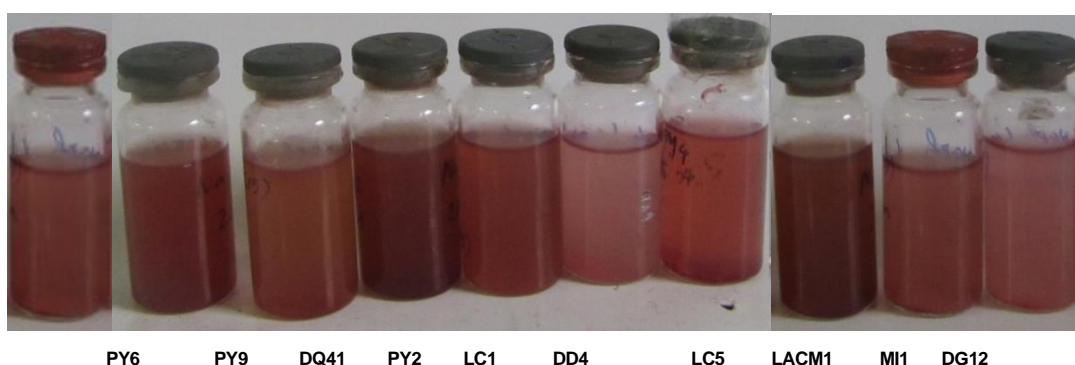
Khả năng sinh trưởng của các chủng VKTQH trên naphthalene

Naphthalene là hợp chất PAH tan tốt nhất trong nước nên sự có mặt của naphthalene trong nước gây độc rất lớn cho quần thể sinh vật. Mặt khác cấu trúc của naphthalene có 2 vòng benzene liên kết với nhau cho nên đây là một hợp chất rất

khó bị phân hủy trong tự nhiên. Để đánh giá khả năng sinh trưởng và phát triển của các chủng VKTQH với nguồn C là naphthalene, 10 chủng VKTQH đã được nuôi cấy trong môi trường khoáng có bổ sung naphthalene làm nguồn carbon và năng lượng duy nhất với nồng độ cơ chất ban đầu là 100, 150, 200 và 250 ppm. Sau 7 ngày nuôi, kết quả được thể hiện trong Hình 2 và 3.



Hình 2. Khả năng sinh trưởng của 10 chủng VKTQH sau 7 ngày nuôi cấy ở các nồng độ naphthalene khác nhau.



Hình 3. Dịch nuôi cấy 10 chủng VKTQH ở 200 ppm naphthalene sau 7 ngày.

Kết quả trên Hình 2 và 3 cho thấy các chủng PY6, PY9, DQ41, PY2, LC1, LC5 và LACM1 có khả năng sinh trưởng tốt ở nồng độ naphthalene là 200 ppm. Tuy nhiên, với nồng độ 250 ppm, chỉ có 3 chủng LC1, LC5 và PY2

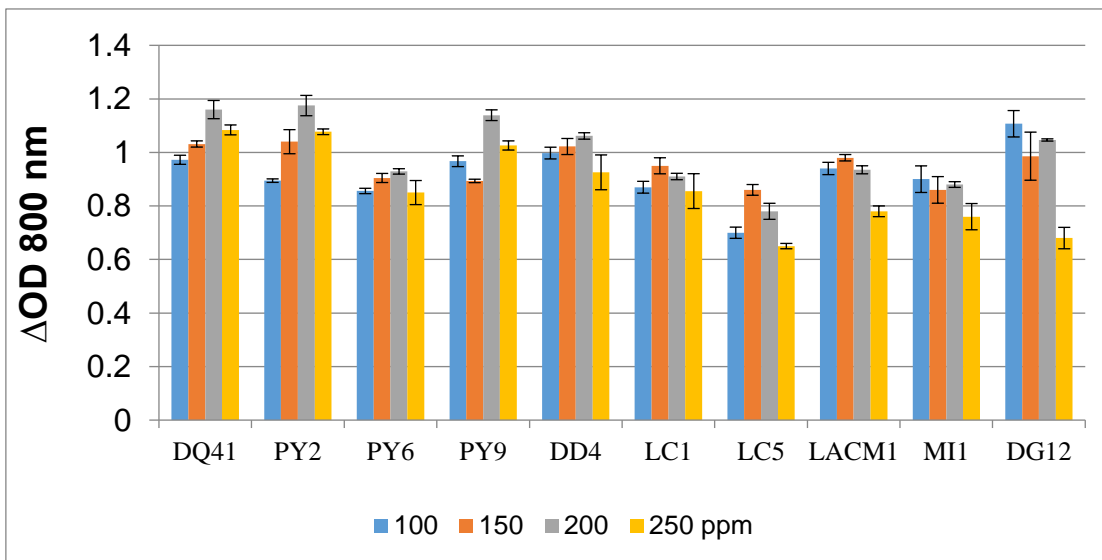
là có khả năng sinh trưởng tốt nhất. Do vậy, dịch nuôi cấy của các chủng này đã được lựa chọn để phân tích đánh giá khả năng phân hủy naphthalene bằng phương pháp HPLC. Kết quả này sẽ được trình bày trong phần sau.

Khả năng sinh trưởng trên pyrene của các chủng VKTQH

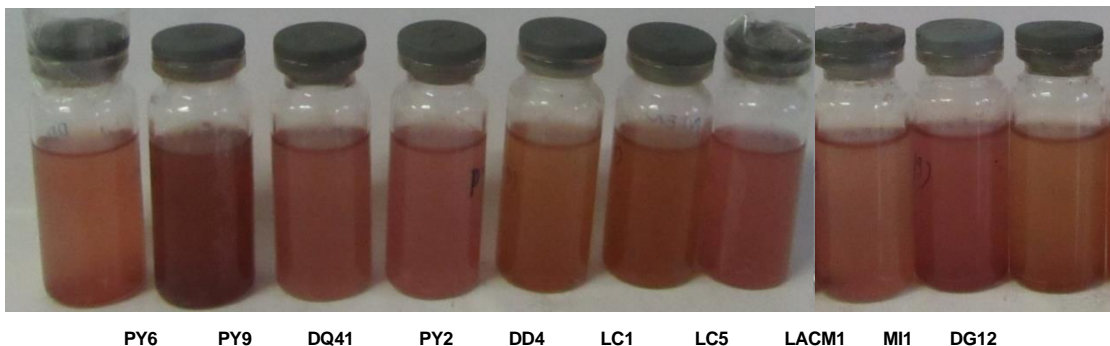
Pyrene có cấu tạo 4 vòng thơm, ít tan trong nước, tan tốt trong dung môi hữu cơ. Pyrene là hợp chất khó phân hủy nhất trong số 4 loại hydrocarbon thơm mà chúng tôi đã lựa chọn. Hiện nay các nghiên cứu về phân hủy kỵ khí pyrene còn rất ít, đặc biệt tại Việt Nam chưa có bất kỳ công trình nghiên cứu nào về khả năng phân hủy pyrene trên nhóm VKTQH. Do đó, 10 chủng VKTQH đã được đánh giá khả năng

sinh trưởng và phát triển trên nguồn C là pyrene với nồng độ ban đầu là 100, 150, 200 và 250 ppm. Kết quả thu được thể hiện ở Hình 4 và 5.

Dựa vào kết quả thu được trên Hình 4 và Hình 5 có thể thấy rằng ở nồng độ pyrene 200 ppm, có 5 chủng trong số 10 chủng được lựa chọn có khả năng sinh trưởng tốt (bao gồm DQ41, PY2, PY9, DD4 và DG12). Còn với nồng độ 250 ppm, 3 chủng DQ41, PY2 và PY9 là những chủng có khả năng sinh trưởng tốt.



Hình 4. Khả năng sinh trưởng của 10 chủng VKTQH sau 7 ngày nuôi cấy ở các nồng độ pyrene khác nhau.



Hình 5. Dịch nuôi cấy của 10 chủng VKTQH ở 200 ppm pyrene sau 7 ngày.

Bảng 1. Khả năng sinh trưởng trên các nguồn cơ chất của VKTQH.

Nguồn cơ chất	Nồng độ (ppm)	Chủng VSV có khả năng sinh trưởng tốt
Naphthalene	200	PY2, PY6, LC1, LC5, LACM1 và DG12
	250	LC1, LC5 và PY2
	200	DQ41, PY2, PY9, DD4 và DG12
Pyrene	250	DQ41, PY2 và PY9

Như vậy, qua các thí nghiệm về khả năng sinh trưởng trên các hợp chất hydrocarbon thơm với các dải nồng độ khác nhau nằm trong khoảng 100 - 250 ppm của các chủng VKTQH trên nguồn hydrocarbon thơm đã được tổng hợp ở Bảng 1.

Dựa vào thống kê ở Bảng 1 chúng tôi nhận thấy, 7 chủng DQ41, PY2, PY6, PY9, LACM1, DG12 và LC1 có khả năng sử dụng đa dạng các nguồn hydrocarbon thơm này ở nồng độ khá cao. Với những khả năng sử dụng nguồn C linh hoạt như vậy, 7 chủng này đã được lựa chọn để tiến hành đánh giá khả năng phân hủy các nguồn hydrocarbon thơm của màng sinh học do các chủng tạo ra.

Khả năng phân hủy các hợp chất thơm của màng sinh học do các chủng VKTQH tạo thành

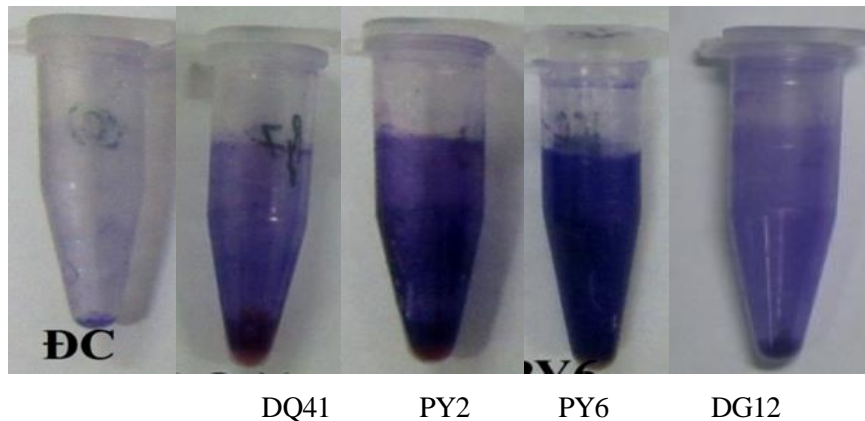
Để khẳng định khả năng phân hủy các hợp

chất thơm của màng sinh học do các chủng VKTQH đã lựa chọn, sau khi tiến hành thí nghiệm theo phương pháp HPLC, chúng tôi tiến hành phân tích hàm lượng của naphthalene, pyrene còn lại ở các thí nghiệm trên nồng độ cao mà vẫn đảm bảo mức độ sinh trưởng của các chủng VK ở mức tốt (OD \geq 1,0) (Bảng 2).

Kết quả từ Bảng 2 cho thấy, màng sinh học do 4 chủng DQ41, PY2, PY6 và DG12 có khả năng phân hủy rất cao các hợp chất naphthalene, pyrene (trên 79%). Bên cạnh đó, đây cũng là những chủng có khả năng tạo biofilm tốt (Hình 6). So sánh với đại diện của nhóm vi khuẩn kỵ khí khử sulfur là *Desulfobacula toluolica*, hiệu suất phân hủy sau 14 ngày của loài này đạt 98,88% với nồng độ toluene ban đầu chỉ 1,79 mmol/L (~164 ppm) cho thấy các chủng VKTQH này có hiệu suất phân hủy và nồng độ chống chịu cao hơn khá nhiều.

Bảng 2. Khả năng phân hủy một số hydrocarbon thơm của màng sinh học do các chủng VKTQH tạo thành sau 7 ngày nuôi cấy.

Tên chủng	Hydrocarbon thơm	Nồng độ ban đầu (ppm)	Hiệu suất phân hủy (%)	
			Đối chứng	Mẫu
DQ41	Pyrene	250	1,7	81,23
	Naphthalene	250	1,52	87,23
PY2	Pyrene	250	1,7	89,02
	Naphthalene	200	2,1	79,37
PY6	Naphthalene	200	2,1	81,24
PY9	Pyrene	250	1,2	81,21
LACM1	Naphthalene	200	1,2	79,67
DG12	Naphthalene	200	2,3	81,21
	Pyrene	200	1,2	79,45
LC1	Naphthalene	250		



Hình 5. Khả năng tạo màng sinh học của các chủng VKTQH lựa chọn.

Bên cạnh đó, hiệu suất phân hủy pyrene của các chủng cũng rất tốt đều đạt trên 81%. Chủng PY2 có khả năng phân hủy pyrene cao nhất với hiệu suất lên tới 89,02% với nồng độ ban đầu là 250 ppm. Kết quả này cho thấy hiệu suất phân hủy pyrene của biofilm do các chủng VKTQH này tạo ra cao hơn nhiều so với các chủng vi khuẩn hiếu khí (Deng *et al.*, 2016). Chủng *Paracoccus* sp. DG25 do Lê Thị Nhi Công và cs (2014) phân lập từ nước thải kho xăng dầu Đỗ Xá, Thường Tín, Hà Nội có hiệu suất phân hủy pyrene đạt 76,07% với nồng độ ban đầu 300 ppm. Chủng *Paracoccus* sp. BTL4 do nhóm nghiên cứu của Cung Thị Ngọc Mai và cs (2014) phân lập có khả năng phân hủy 25,5% pyrene sau 7 ngày với nồng độ ban đầu là 100 ppm.

Hiệu suất phân hủy naphthalene của các chủng được lựa chọn cũng đạt trên 79% với nồng độ ban đầu là 200-250 ppm. Theo công bố năm 2012 của Shimada và cs, chủng *Pseudomonas stutzeri* T102 có khả năng phân hủy tốt naphthalene khi tạo màng sinh học. Tại Việt Nam, chủng *Paracoccus* sp. DG25 do Lê Thị Nhi Công phân lập, ngoài khả năng phân hủy pyrene nêu trên, cũng có khả năng phân hủy naphthalene với hiệu suất 86,64% sau 7 ngày với nồng độ ban đầu là 250 ppm. Tuy nhiên, cho tới nay chưa có nhiều công bố về các chủng VKTQH ở trạng thái tạo màng sinh học có khả năng phân hủy các hợp chất hydrocarbon thơm.

Như vậy, các chủng VKTQH được sàng lọc

ở đây đã góp phần làm phong phú số lượng các chủng vi sinh vật tạo màng sinh học và có khả năng phân hủy các hợp chất thơm để phục vụ cho công nghệ phân hủy sinh học xử lý các vùng ô nhiễm các hydrocarbon thơm ở các địa điểm ô nhiễm khác nhau. Do vậy, màng sinh học của 4 chủng DQ41, PY2, PY6 và DG12 đã cho thấy tiềm năng trong việc ứng dụng để xử lý các hợp chất thơm khó phân hủy.

KẾT LUẬN

Từ các chủng VKTQH phân lập từ các vùng biển bị ô nhiễm dầu ở Việt Nam, đã sàng lọc và đánh giá được khả năng phân hủy của 4 chủng vi khuẩn tạo màng sinh học là DQ41, PY2, PY6 và DG12. Cụ thể, hiệu suất phân hủy của 4 chủng vi khuẩn này đều đạt trên 76% với nồng độ cơ chất ban đầu tương ứng là 200 và 250 ppm naphthalene và pyrene. Kết quả này góp phần làm phong phú số lượng các chủng vi sinh vật tạo màng sinh học và có khả năng phân hủy các hợp chất thơm để phục vụ cho công nghệ xử lý ô nhiễm dầu tại Việt Nam.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106-NN.04-2015.45

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Alessandrello MJ, Parellada EA, Tomás MSJ, Neske

- A, Vullo DL, Ferrero MA (2017a) Polycyclic aromatic hydrocarbons removal by immobilized bacterial cells using ammoniacal acetogenins for biofilm formation stimulation on polyurethane foam. *J Environ Chem Engin* 5(1): 189-195.
- Deng F, Liao C, Yang C, Guo C, Dang Z (2016) Enhanced biodegradation of pyrene by immobilized bacteria on modified biomass materials. *Inter Biodeterio Biodegrad* 110: 46-52.
- Dong CD, Chen CF, Chen CW (2012) Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in industrial harbor sediments by GC-MS. *Inter J Environ Res Public Health* 9(6): 2175-2188.
- Girard JE (2013) Principles of environmental chemistry. Jones & Bartlett Publishers.
- González-Gaya B, Fernández-Pinos MC, Morales L, Méjanelle L, Abad E, Piña B, Duarte CM, Jiménez B, Dachs J (2016) High atmosphere-ocean exchange of semivolatile aromatic hydrocarbons. *Nature Geosci* 9(6): 438.
- Harwood CS, Burchhardt G, Herrmann H, Fuchs G (1998) Anaerobic metabolism of aromatic compounds via the benzoyl-CoA pathway. *FEMS Microbiol Rev* 22(5): 439-458.
- Harwood CS, Gibson J (1988) Anaerobic and aerobic metabolism of diverse aromatic compounds by the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *Appl Environ Microbiol* 54(3): 712-717.
- Le TNC, Cung TNM, Vu TT, Nghiem NM, Hoang PH, Do TL, Do TTU (2014) Pyrene degradation of biofilm-forming *Paracoccus* sp. DG25 isolated from oil polluted samples collected in petroleum storage Duc Giang, Hanoi. *J Vietnam Environ* 6(2): 178-183.
- Madigan MT, Jung DO (2009) *An overview of purple bacteria: systematics, physiology, and habitats, The purple phototrophic bacteria*, Springer, 1-15.
- Morikawa M, Kagihiro S, Haruki M, Takano K, Branda S, Kolter R, Kanaya S (2006) Biofilm formation by a *Bacillus subtilis* strain that produces γ -polyglutamate. *Microbiology* 152(9): 2801-2807.
- O'toole GA, Kolter R (1998) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis", *Mol Microbiol*, 28(3): 449-461.
- Shimada K, Itoh Y, Washio K, Morikawa M (2012) Efficacy of forming biofilms by naphthalene degrading *Pseudomonas stutzeri* T102 toward bioremediation technology and its molecular mechanisms", *Chemosphere* 87(3): 226-233.

DEGRADATION OF NAPHTHALENE AND PYRENE BY SEVERAL BIOFILM-FORMING PHOTOSYNTHESIS PURPLE BACTERIAL STRAINS

Nguyen Thi Minh Nguyet^{2,3}, Hoang Phuong Ha^{1,2}, Dong Van Quyen^{1,4}, Nguyen Ngoc Huong Tra⁵, Le Thi Nhi Cong^{1,2}

¹Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Agricultural Sciences

²Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Agricultural Sciences

³Hanoi Pedagogical University 2, Xuan Hoa, Phuc Yen, Vinh Phuc

⁵University of Science and Technology Hanoi

⁵Stuart Hall School, Staunton, Virginia, 24401, United States

SUMMARY

Aromatic hydrocarbons such as naphthalene, pyrene are recalcitrant compounds found in oil contaminated areas including petroleum storage tanks, oil exploiting companies. These components are difficult to be degraded/transformed in the lack of oxygen conditions. Among anaerobic and micro-aerobic microorganisms, photosynthetic purple bacteria are the dominant group. Photosynthetic purple bacteria (PPB) are considered as aquatic organisms which are able to grow in anaerobic conditions by photosynthesis but without oxygen. This bacterial group has flexible metabolic types depending on living conditions, then they are widely distributed in nature. There are

numerous publications on planktonic PPB which could use naphthalene and pyrene as carbon and energy sources. However, there is no publication on biofilm formed by PPB to degrade their aromatic compounds. In this research, 4 biofilm-forming PPB strains including DQ41, PY2, PY6 and DG12 were screened and estimated their pyrene and naphthalene degradation capacity. These organisms demonstrated high biofilm forming ability. As biofilm types, their utilization efficiencies were upper 79% with the initial concentrations of naphthalene and pyrene of 200 and 250 ppm, respectively. These results may contribute to enlarge the number of biofilm-forming microorganisms to degrade/transform aromatic hydrocarbons in polluted area treatment in Vietnam.

Keywords: biodegradation, biofilm, naphthalene degradation, photosynthetic purple bacteria, pyrene degradation