

KHẢ NĂNG PHÂN HỦY NAPHTHALENE CỦA CHỦNG VI KHUẨN VTPG5 PHÂN LẬP TỪ CÁC MẪU ĐẤT NHIỄM DẦU THU THẬP TẠI BÀ RỊA - VŨNG TÀU

Lê Thị Nhi Công¹, Cung Thị Ngọc Mai¹, Vũ Ngọc Huy¹, Đỗ Văn Tuân²

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

²Trường Cao đẳng Sơn La

Ngày nhận bài: 05.11.2015

Ngày nhận đăng: 02.7.2016

TÓM TẮT

Naphthalene là một trong những chất gây ô nhiễm môi trường có khả năng gây đột biến và ung thư cho con người. Để phân hủy và chuyển hóa naphthalene, các biện pháp sinh học có sử dụng vi sinh vật đã và đang được quan tâm nghiên cứu. Từ các mẫu đất nhiễm dầu thu thập tại khu vực ven biển Bà Rịa – Vũng Tàu, 03 chủng vi khuẩn có khả năng sinh trưởng và phát triển tốt trên nguồn cơ chất naphthalene, đã được phân lập và tuyển chọn. Trong đó, chủng *Rhodococcus* sp. VTPG5 có khả năng phân hủy tốt các hợp chất hydrocarbon thơm nên đã được lựa chọn để nghiên cứu. Chủng VTPG5 có thể sinh trưởng trên nguồn cơ chất naphthalene với nồng độ lên tới 200 ppm và tốt nhất ở nồng độ 150 ppm. Nhiệt độ 37°C, pH 7 và nồng độ muối NaCl là 2,5% đã được xác định là các điều kiện thích hợp cho chủng VTPG5 sinh trưởng và phát triển sau 7 ngày nuôi cấy. Bằng phương pháp sắc ký lỏng cao áp (HPLC) đã xác định được chủng VTPG5 có khả năng phân hủy được 99,9 % naphthalene sau 7 ngày nuôi cấy với nồng độ ban đầu là 150 ppm. Kết quả này góp phần định hướng cho việc sử dụng chủng vi khuẩn này để xử lý naphthalene và các hợp chất thơm đa vòng khác có trong đất bị ô nhiễm dầu mỏ.

Từ khóa: Naphthalene, ô nhiễm dầu, phân hủy sinh học, *Rhodococcus* sp., vi khuẩn

ĐẶT VẤN ĐỀ

Naphthalene là một trong mười sáu chất hydrocarbon đa vòng (PAH) đã được cơ quan bảo vệ môi trường Mỹ cảnh báo (US-EPA 1980, 1986). Naphthalene là hợp chất đa vòng có cấu tạo đơn giản nhất, gồm hai vòng và ít tan trong nước. Tuy nhiên, chất này và các dẫn xuất methyl hóa của nó được xem là những chất có ảnh hưởng nghiêm trọng nhất đối với sức khỏe con người (Grund *et al.*, 1992). Đây được xem là một trong những chất gây độc, gây đột biến và ung thư cho con người. Để xử lý naphthalene, người ta thường kết hợp giữa các phương pháp sinh học và không sinh học như oxy hóa hóa học, bay hơi, quang oxy hóa, phân hủy sinh học nhờ vi sinh vật. Trong số các phương pháp này, phân hủy sinh học được xem là có ảnh hưởng nhất đến quá trình loại bỏ PAH.

Các nghiên cứu về sản xuất các sản phẩm từ các chủng vi sinh vật nhằm xử lý PAH có trong dầu mỏ hoặc về các chủng có khả năng tạo màng sinh học nhằm tăng cường hiệu quả phân hủy các thành phần hydrocarbon trong dầu mỏ cũng đã được nghiên cứu từ lâu (Lại Thúy Hiền *et al.*, 2010;

Cung Thị Ngọc Mai *et al.*, 2013). Tuy nhiên, cho tới nay chưa có nhiều công bố về việc ứng dụng các chủng vi sinh vật này trong xử lý tại chỗ. Đất là một môi trường không đồng nhất và hơn thế nữa hàm lượng PAH cũng như naphthalene phân bố trong đất là khác nhau. Do vậy, việc xử lý naphthalene trong đất thường phức tạp hơn trong nước. Việc sử dụng các vi sinh vật để xử lý trực tiếp tại các địa điểm đang ngày càng được chú trọng. Năm 2009, Pathrak và đồng tác giả, đã phân lập được chủng *Pseudomonas* sp. HOB1 từ các mẫu nhiễm dầu ở Gujarat, Ấn Độ là chủng có khả năng phân hủy naphthalene khá cao. Đặc biệt, khi bổ sung chủng này cùng với khu hệ vi sinh vật nội tại để xử lý tại chỗ thì hàm lượng naphthalene phân hủy được lên tới 2000 ppm. Do đó, việc phân lập và xác định các vi sinh vật có tiềm năng phân hủy naphthalene từ các mẫu đất nhiễm dầu là rất cần thiết. Trong bài báo này chúng tôi đã tiến hành tuyển chọn chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy naphthalene cao từ các mẫu đất nhiễm dầu ở bờ biển Vũng Tàu nhằm định hướng ứng dụng các chủng vi khuẩn này để xử lý naphthalene tại các vị trí đất bị nhiễm dầu hoặc nhiễm PAH.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Mẫu đất nhiễm dầu được thu thập tại khu vực ven biển Bà Rịa-Vũng Tàu và được lưu giữ ở Phòng Công nghệ sinh học môi trường, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam trong vòng 24 giờ để phân tích.

Hóa chất, môi trường nuôi cấy

Hóa chất

Các hóa chất được sử dụng trong nghiên cứu đều là hóa chất nhập ngoại có độ tinh khiết cao.

Môi trường nuôi cấy

Môi trường Gost dịch để phân lập và đánh giá khả năng sinh trưởng, phát triển và phân hủy phenol của vi khuẩn (g/l): Na₂HPO₄: 0,7; KH₂PO₄: 0,3; KNO₃: 3; MgSO₄: 0,4; NaCl: 5; pH 6,9 – 7,2 và môi trường Gost thạch để tuyển chọn các chủng vi khuẩn có khả năng sinh trưởng và phát triển trên nguồn cơ chất naphthalene: Thành phần giống môi trường Gost dịch nhưng có bổ sung thêm 18-20 g agar (Schauer, 2001).

Môi trường hiếu khí tổng số (HKTS – g/l): để lưu trữ các chủng vi khuẩn: NH₄NO₃: 2; KH₂PO₄: 4; NaCl: 5; KCl: 0,25; MgCl₂: 1,25; glucose: 1; peptone: 5; cao men: 0,2; cao thịt: 3; pH 7 – 7,2 (Schauer, 2001).

Phương pháp làm giàu, phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn có khả năng sinh trưởng và phát triển trên nguồn cơ chất naphthalene

Thực hiện các bước thí nghiệm theo mô tả của Cung Thị Ngọc Mai và đồng tác giả (2010).

Ảnh hưởng của các điều kiện môi trường đến khả năng sinh trưởng và phát triển của chủng vi khuẩn tại nồng độ naphthalene phù hợp

Một số điều kiện môi trường như nhiệt độ, pH và nồng độ muối NaCl đã được sử dụng để nghiên cứu sự ảnh hưởng của các yếu tố đó lên sự sinh trưởng và phát triển của chủng vi khuẩn trên nguồn cơ chất naphthalene. Cụ thể, các giá trị nhiệt độ như 25°C, 30°C, 37°C, 40°C, 45°C, 50°C; dải pH gồm 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10; và nồng độ muối NaCl gồm 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3 đã được sử dụng. Sau 1, 2, 3, 5 và 7 ngày tiến hành kiểm tra khả năng sinh trưởng và phát triển của các chủng trên cơ chất naphthalene.

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Phân tích sắc ký lỏng cao áp (HPLC)

Để đánh giá khả năng phân hủy naphthalene của chủng lựa chọn, sau 1, 3, 5 và 7 ngày nuôi cấy trên môi trường khoáng Gost có bổ sung 150 ppm naphthalene, mẫu đã được tách chiết bằng dung môi như hexane. Dịch chiết xuất đã được phân tích HPLC trên máy HPLC grade (Cica Reagent Kanto Chemicals, Tokyo, Japan) với tốc độ dòng chảy là 1 mL/min từ cột đảo pha (GVP-ODS guard column, 10 × 4.6 mm I.D.; VP-ODS packed column, 150 × 4.6 mm I.D., both Shim-Pack, Shimadzu) được gắn trên hệ thống máy HPLC Shimadzu bao gồm hệ thống kiểm soát SCL-10A VP, DGU-14A loại khí, hai bơm LC-10AD VP và một đầu bơm tự động SIL-10AF. Nhiệt độ sấy của cột CTO-10A VP được cài đặt là 40 °C và các phổ của các chất trung gian được phát hiện tại bước sóng 280 nm trên đầu dò SPD-10A VP UV-VIS. Thời gian lưu (tR) của naphthalene là 12 phút.

Mẫu đối chứng là mẫu không bổ sung chủng VTPG5 vào môi trường khoáng Gost có chứa 150 ppm naphthalene.

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Xác định hàm lượng naphthalene còn lại trong các thí nghiệm

Naphthalene được sử dụng là chất chuẩn với các nồng độ khác nhau và được phân tích bằng phương pháp HPLC. Dựa trên tương quan của chiều cao các phổ của các nồng độ khác nhau này, chúng tôi đã xây dựng được đường chuẩn về hàm lượng naphthalene trong các thí nghiệm. Sử dụng các điều kiện tối ưu cho sự sinh trưởng và phát triển của VTPG5 trên naphthalene với nồng độ ban đầu là 150 ppm để đánh giá khả năng phân hủy cơ chất này sau 7 ngày nuôi cấy. Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn có khả năng sinh trưởng và phát triển trên nguồn cơ chất naphthalene

β Từ các mẫu đất nhiễm dầu lấy tại khu vực ven biển Bà Rịa – Vũng Tàu, đã phân lập được 05 chủng vi khuẩn có khả năng sinh trưởng trên naphthalene. Kết quả được thể hiện trong hình 1.

Kết quả trên Hình 1 cho thấy, các chủng VTPG5, VTB2, VTB3 là những chủng có khả năng sinh trưởng tốt trên naphthalene. Trong đó, chủng VTPG5 là chủng có khả năng phân hủy tốt phenol và đã được

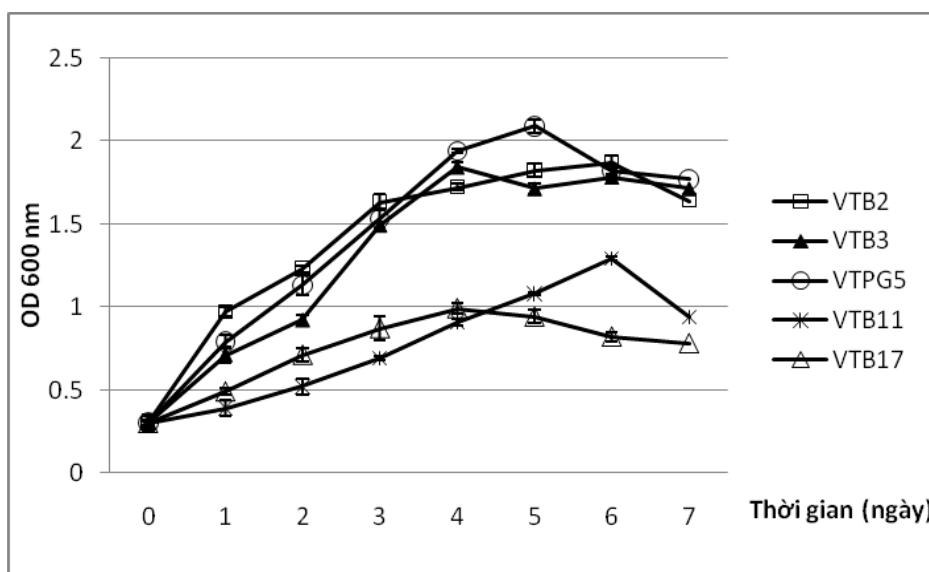
định danh là *Rhodococcus* sp. VTPG5 (Lê Thị Nhi Công *et al.*, 2015). Đồng thời, trình tự đoạn gen của chủng cũng đã được đăng ký trên ngân hàng NCBI với mã số là LC057207. Do vậy, chủng VTPG5 đã được lựa chọn cho những nghiên cứu tiếp theo.

Khả năng sinh trưởng và phát triển của chủng VTPG5 tại các nồng độ naphthalene khác nhau

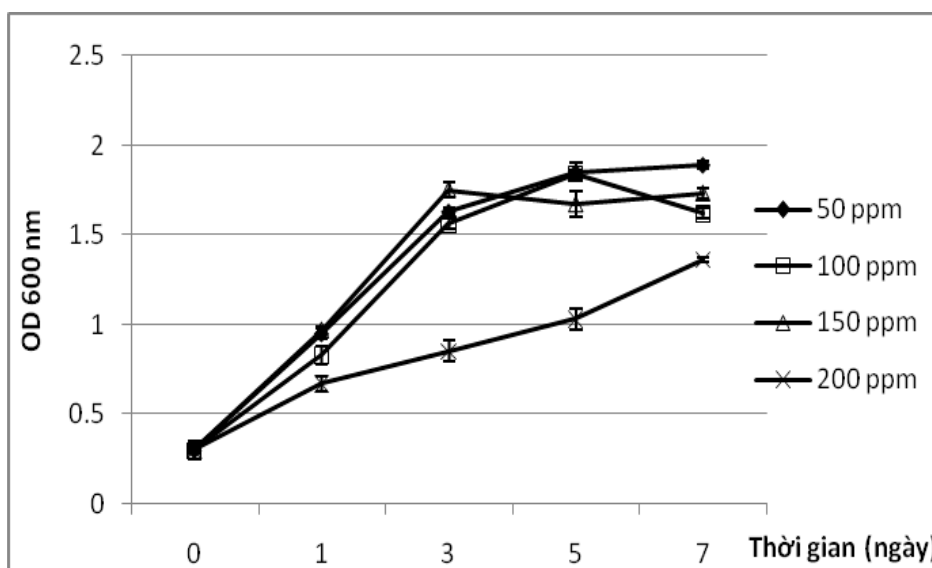
Chủng VTPG5 đã được nuôi cấy trên môi trường khoáng Gost có bổ sung các nồng độ

naphthalene khác nhau nhằm đánh giá khả năng sinh trưởng và phát triển của chủng trên nguồn cơ chất này. Trong nghiên cứu này, các nồng độ 50, 100, 150 và 200 ppm naphthalene đã được sử dụng. Kết quả được thể hiện trên hình 2.

Kết quả trên Hình 2 cho thấy, chủng VTPG5 có khả năng sinh trưởng tốt ở các nồng độ 50, 100 và 150 ppm sau 7 ngày nuôi cấy. Vì vậy, nồng độ 150 ppm đã được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 1. Khả năng sinh trưởng trên naphthalene của các chủng vi khuẩn.



Hình 2. Khả năng sinh trưởng trên naphthalene của chủng VTPG5.

Ảnh hưởng của các điều kiện môi trường đến khả năng sinh trưởng và phát triển của chủng VTPG5 trên naphthalene

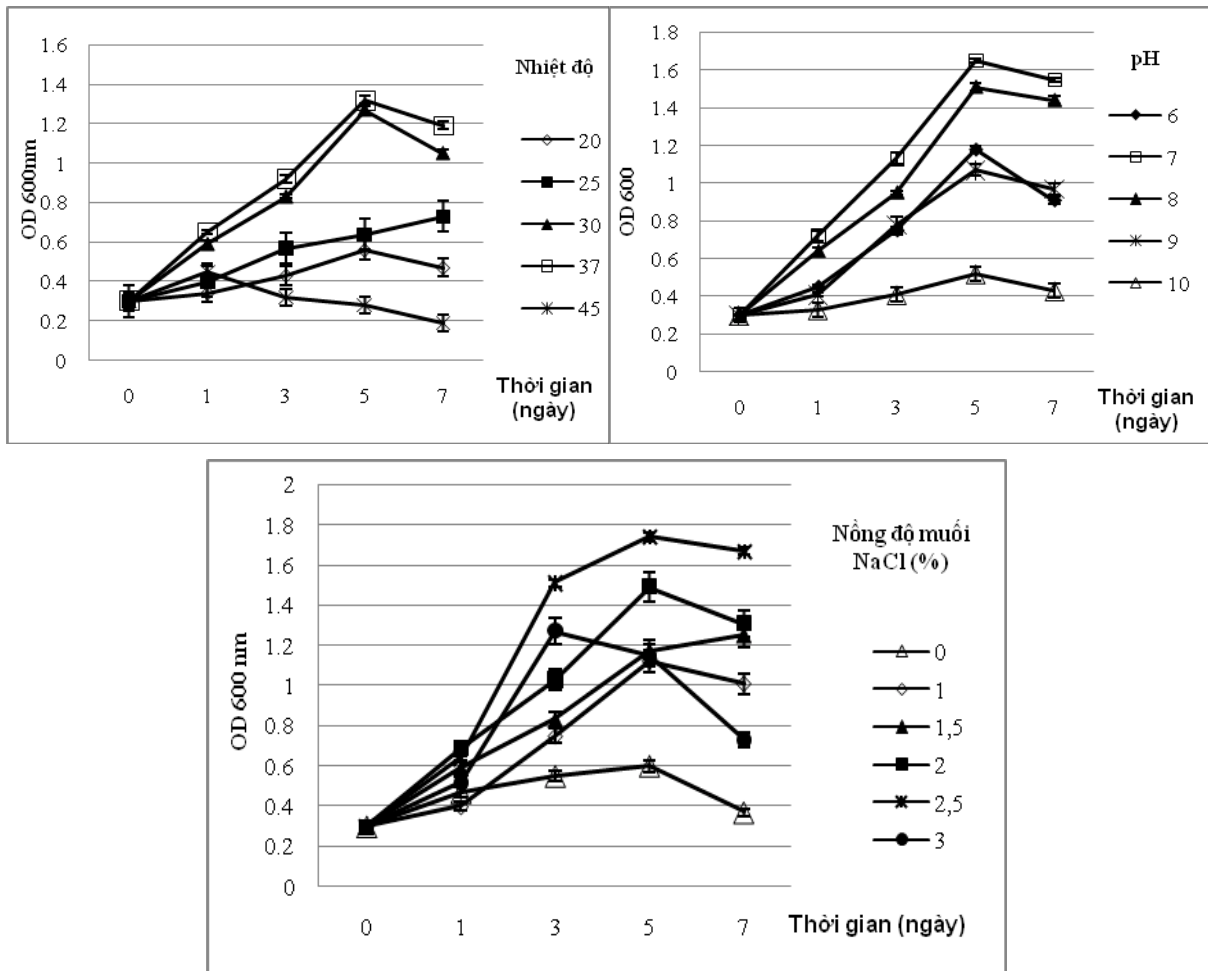
Một số điều kiện môi trường như nhiệt độ, pH và nồng độ muối NaCl đã được sử dụng để đánh giá ảnh hưởng của chúng lên khả năng sinh trưởng và phát triển của chủng VTPG5 trên nguồn cơ chất naphthalene. Kết quả được thể hiện trên hình 3.

Kết quả trên Hình 3 cho thấy, khi nuôi cấy với nồng độ naphthalene là 150 ppm thì chủng VTPG5 có khả năng sinh trưởng và phát triển tối ưu ở 37 °C, pH 7 và nồng độ muối NaCl là 2,5 %. Trong một nghiên cứu khác của chúng tôi về khả năng tạo màng sinh học của chủng VTPG5 cũng cho thấy chủng có

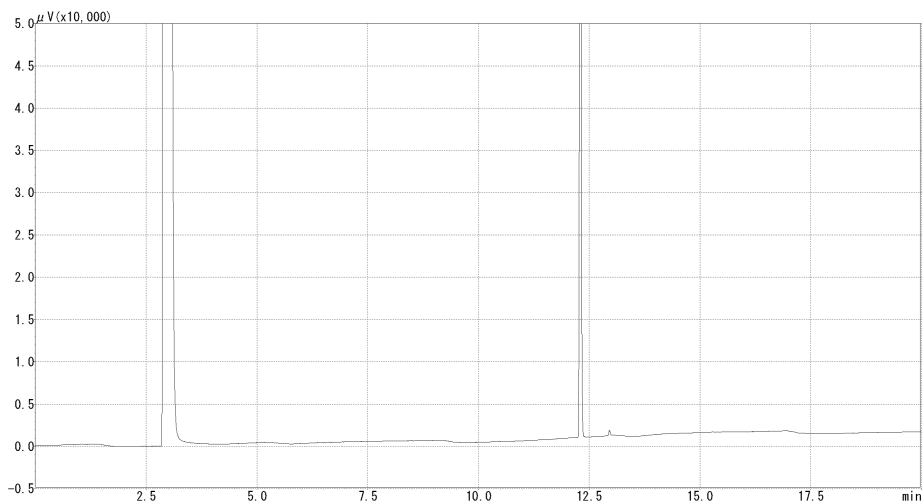
khả năng tạo màng tối ưu ở nhiệt độ 37 °C, pH 7; tuy nhiên nồng độ muối NaCl tối ưu chỉ là 1,5 % (Lê Thị Nhi Công *et al.*, 2015). Như vậy, đây có thể được xem là các điều kiện thích hợp cho chủng VTPG5 sinh trưởng và phát triển trên cơ chất naphthalene.

Khả năng phân hủy naphthalene của chủng VTPG5

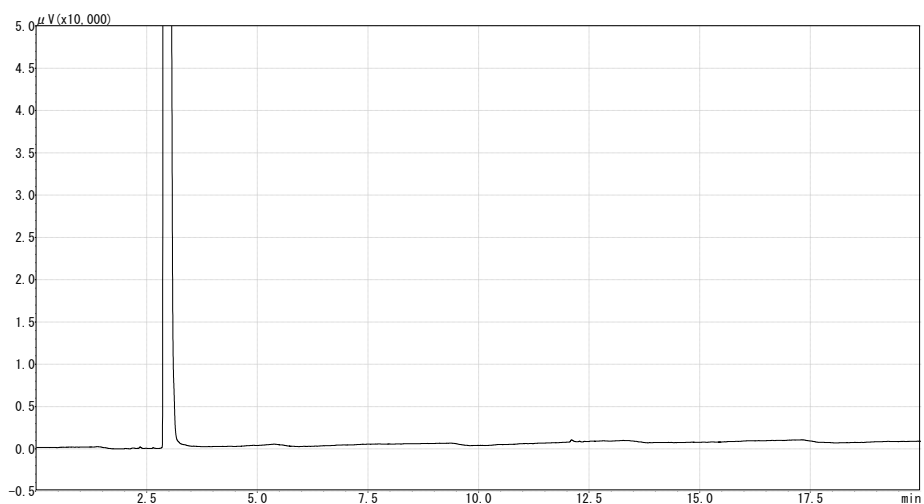
Sử dụng các điều kiện tối ưu như nhiệt độ 37 °C, pH 7 và nồng độ muối NaCl là 2,5 % cho sự sinh trưởng và phát triển của VTPG5 trên naphthalene với nồng độ ban đầu là 150 ppm để đánh giá khả năng phân hủy cơ chất này sau 7 ngày nuôi cấy. Kết quả phân tích HPLC được trình bày ở hình 4.



Hình 3. Ảnh hưởng của một số điều kiện môi trường lên sự sinh trưởng trên naphthalene của chủng VTPG5.



(a)



(b)

Hình 4. Sắc ký đồ khả năng phân hủy naphthalene của chủng VTPG5 sau 7 ngày nuôi cấy. Trong đó, (a): Đối chứng; (b) thí nghiệm.

Dựa vào đường chuẩn để tính toán thì kết quả cho thấy trên 99,9% naphthalene đã được phân hủy sau 7 ngày nuôi cấy với nồng độ ban đầu là 150 ppm.

Cho tới nay trên thế giới đã có nhiều công bố khả năng phân hủy và chuyển hóa naphthalene của chi *Rhodococcus*. Grund *et al.* (1992) đã công bố về chủng *Rhodococcus* sp. B4 được phân lập từ mẫu đất nhiễm hydrocarbon thơm đa vòng có khả năng sinh trưởng trên nguồn carbon và năng lượng duy nhất là naphthalene. Salicylate và gentisate đã được xác định là các sản phẩm trung gian của quá trình chuyển hóa naphthalene bởi chủng B4 này. Năm

2001, nhóm tác giả Gennaro cũng đã phân lập được chủng *Rhodococcus opacus* R7 từ các mẫu đất bị nhiễm hydrocarbon thơm đa vòng (Gennaro *et al.*, 2001). Tuy nhiên, các tác giả này chủ yếu tập trung vào việc phát hiện các enzyme tham gia vào các quá trình chuyển hóa naphthalene.

Ở nước ta, năm 2007, Lê Tiến Mạnh và Nghiêm Ngọc Minh đã phân lập được chủng vi khuẩn BQN31 từ mẫu nước nhiễm dầu của bể thu gom xỉ nghiệp than Quảng Ninh có khả năng phân hủy 69 % naphthalene với nồng độ ban đầu là 100 ppm. Từ mẫu đất nhiễm chất diệt cỏ dioxin trong căn cứ quân sự cũ của Mỹ ở sân bay Đà Nẵng, Nguyễn Ngọc Bảo

và đồng tác giả (2007) đã phân lập được hai chủng vi khuẩn BDNR1 và BDNR4. Hai chủng này đều có khả năng phân hủy 50 % naphthalene với nồng độ ban đầu là 100 ppm. Nhóm tác giả Nguyễn Bá Hữu (2008) đã công bố ba chủng vi khuẩn *Paenibacillus* sp. Ao3, *Terrabacter* sp. DMA và *Rhodococcus* sp. HDN3 được phân lập từ đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin tại Đà Nẵng có khả năng phân hủy tốt một số hợp chất vòng thơm như fluorine, carbazol và biphenyl. Cung Thị Ngọc Mai và đồng tác giả (2010) đã phân lập được chủng vi khuẩn BLT11 từ nước thải khu công nghiệp Từ Liêm, Hà Nội. Chủng này có khả năng phân hủy được nhiều chất PAH, chẳng hạn như naphthalene (64 %), anthracene (44 %), pyrene (70 %) và phenol (99 %) với nồng độ ban đầu là 100 ppm. Năm 2010, nhóm tác giả Lại Thúy Hiền công bố các kết quả về việc sản xuất chất hoạt hóa bề mặt sinh học từ bốn chủng vi khuẩn biển *Rhodococcus* 4C3, TD2 và *Acinetobacter* 6C1, QN15 nhằm ứng dụng trong công nghiệp dầu khí và xử lý ô nhiễm môi trường do dầu mỏ gây ra. Năm 2013, nhóm tác giả Cung Thị Ngọc Mai đã công bố kết quả về khả năng phân hủy naphthalene bởi chủng vi khuẩn tạo màng sinh học *Rhodococcus* sp. BQN11 được phân lập từ các mẫu nước nhiễm dầu thu thập tại vùng biển Quảng Ninh. Trong điều kiện nuôi cấy tối ưu để tạo màng sinh học, chủng này có khả năng phân hủy lên tới 61,1 % naphthalene sau 5 ngày nuôi cấy với nồng độ ban đầu là 200 ppm.

Như vậy, có thể thấy rằng hiệu quả phân hủy naphthalene của chủng VTPG5 là khá cao. Kết quả này góp phần định hướng cho chúng tôi trong việc sử dụng chủng này để xử lý các hợp chất thơm đa vòng khác và ứng dụng trong xử lý đất bị ô nhiễm dầu.

KẾT LUẬN

Từ các mẫu đất nhiễm dầu thu thập tại khu vực ven biển Bà Rịa – Vũng Tàu, đã phân lập và tuyển chọn được chủng *Rhodococcus* sp. VTPG5 có khả năng sinh trưởng và phát triển tốt trên nguồn cơ chất naphthalene. Tại một số điều kiện thích hợp như nhiệt độ 37 °C, pH 7 và nồng độ muối NaCl là 2,5 %, chủng VTPG5 đã phân hủy được 99,9 % naphthalene sau 7 ngày nuôi cấy với nồng độ ban đầu là 150 ppm.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài thăm dò 2015 do Viện Công nghệ sinh học tài trợ và sử dụng trang thiết bị

Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Cung Thị Ngọc Mai, Lê Thị Nhi Công, Nghiêm Ngọc Minh (2013) Degradation of naphthalene by biofilm forming *Rhodococcus* sp. BQN11 isolated from petroleum-polluted water samples in Quang Ninh coastal zone, Vietnam. *Proceedings of VAST-IRD symposium on marine science, Hai Phong, Vietnam*: 125–133.

Cung Thị Ngọc Mai, Trần Hải Đăng, Nguyễn Văn Bắc, Nghiêm Ngọc Minh (2010) Khả năng phân hủy hydrocarbon thơm đa nhân và phenol của chủng vi khuẩn BTL11 phân lập từ nước thải khu công nghiệp. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 8(3B): 1739–1744.

Gennaro PD, Rescalli E, Galli E, Sello G, Bestetti G (2001) Characterization of *Rhodococcus opacus* R7, a strain able to degrade naphthalene and o-xylene isolated from a polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil. *Res Microbiol* 152: 641–651.

Grund E, Denecke B, Eichenlaub R (1992) Naphthalene degradation via salicylate and gentisate by *Rhodococcus* sp. strain B4. *Appl Environ Microbiol* 58(6): 1874–1877.

Lại Thúy Hiền, Nguyễn Thị Thu Huyền, Nguyễn Thị Yên, Phạm Thị Hằng, Phạm Thị Bích Hợp, Trần Đình Mẫn (2010) Nghiên cứu sản xuất chất hoạt hóa bề mặt sinh học từ vi khuẩn biển *Rhodococcus* 4C3, TD2 và *Acinetobacter* 6C1, QN15. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 8(3B): 1751–1759.

Lê Thị Nhi Công, Vũ Thị Thanh, Trịnh Thành Trung, Cung Thị Ngọc Mai, Đỗ Thị Tố Uyên (2015) Khả năng phân hủy phenol của màng sinh học tạo ra bởi chủng vi khuẩn phân lập từ đất nhiễm dầu lấy tại Vũng Tàu. *Báo cáo tóm tắt “Hội nghị Khoa học kỷ niệm 40 năm thành lập Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam”*: 61–64.

Pathack H, Kantharia D, Malpani A, Madamwar D (2009) Naphthalene degradation by *Pseudomonas* sp. HOB1: In vitro studies and assessment of naphthalene degradation efficiency in simulated microcosms. *J Hazard Mater* 166: 1466–1473.

Schauer, F. (2001). Abbau und Verwertung von Mineralölbestandteilen durch Mikroorganismen. *Bodden* 11, 3-31.

US Environmental Protection Agency (1980) Naphthalene: ambient water quality criteria. USEPA Office of Solid Waste, Washington DC.

US Environmental Protection Agency (1986) Naphthalene, health and environmental effects. Profile no. 131. USEPA Office of Solid Waste, Washington DC.

NAPHTHALENE DEGRADATION BY BACTERIAL STRAIN VTPG5 ISOLATED FROM OIL-CONTAMINATED SEDIMENT SAMPLES COLLECTED IN BARIA - VUNGTAU

Le Thi Nhi Cong^{1,✉}, Cung Thi Ngoc Mai¹, Vu Ngoc Huy¹, Do Van Tuan²

¹Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

²Son La College

SUMMARY

Naphthalene is one of the polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) which cause environmental pollution leading to mutation and cancer to human. To transform and degrade naphthalene, a number of bioremediation approaches have been investigated. The fact that bacteria can utilize naphthalene as the sole source of carbon and energy was considered as high potential method to remove naphthalene. In this research, our purpose was to find highly degrading-naphthalene bacterial strains to apply in naphthalene removal from oil-polluted sites. Three bacterial strains which could well grow on naphthalene were isolated from oil contaminated sediment samples taken from coastal zones in Baria – Vungtau province. Among them, the *Rhodococcus* sp. VTPG5 was demonstrated to the best aromatic hydrocarbon degrader then it was selected for further investigation. The VTPG5 strain could grow with the concentration of 200 ppm and the best concentration for degrading capacity was 150 ppm. The optimal physio-chemical conditions for growth of VTPG5 were estimated at 37°C, pH 7 and concentration of NaCl 2.5% after 7 day-incubation. Using these conditions to incubation the VTPG5, by HPLC analysis it was confirmed that 99.9 % of naphthalene was degraded by VTPG5 strain with the initial concentration of 150 ppm after 7 days. The result may lead to the use of this strain in bioremediation technology to treat naphthalene and other PAH components containing in oil-polluted sediment samples.

Keywords: Bacteria, biodegradation, naphthalene, oil-pollution, *Rhodococcus* sp.

✉ Author for correspondence: E-mail: lenhicong@ibt.ac.vn