

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

LÊ THÀNH CÔNG

**PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN VÀ NGHIÊN CỨU
KHẢ NĂNG PHÂN HỦY PHENOL CỦA MỘT SỐ
CHỨNG VI KHUẨN TẠO MÀNG SINH HỌC**

Chuyên ngành: Công nghệ Sinh học

LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học: PGS.TS. Nghiêm Ngọc Minh

THÁI NGUYÊN - 2014

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của chúng tôi. Các kết quả trong luận văn là trung thực và là các kết quả thực tế do chúng tôi nghiên cứu, chưa từng được công bố trong các công trình khác. Các tài liệu tham khảo có nguồn gốc rõ ràng và được trích dẫn đầy đủ.

Thái Nguyên, ngày 20 tháng 5 năm 2014

Học viên

Lê Thành Công

LỜI CẢM ƠN

Lời đầu tiên cho tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới **PGS.TS. Nghiêm Ngọc Minh**, Trưởng phòng Công nghệ sinh học Môi trường, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tận tình hướng dẫn, chỉ bảo và dìu dắt tôi trong suốt quá trình nghiên cứu và hoàn thành luận văn.

Tôi cũng xin được bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới các anh chị cán bộ Phòng Công nghệ sinh học Môi trường – Viện Công nghệ sinh học, đặc biệt là **TS. Lê Thị Nhi Công, ThS. Cung Thị Ngọc Mai, ThS. Vũ Thị Thanh, CN. Vũ Hải Hà** đã giúp đỡ và chỉ bảo tận tình tôi trong quá trình hoàn thành luận văn của mình.

Tôi xin chân thành cảm ơn ban lãnh đạo Khoa Khoa học sự sống - Trường Đại học Khoa học, đặc biệt là **PGS.TS. Nguyễn Vũ Thanh Thanh** - Trưởng Khoa Khoa học sự sống đã tạo điều kiện, giới thiệu, giúp đỡ tôi trong suốt thời gian học tập và nghiên cứu tại trường.

Bên cạnh đó, tôi cũng xin chân thành cảm ơn gia đình và bạn bè và người thân đã luôn động viên, khích lệ và giúp đỡ tôi hoàn thành luận văn này.

Với tất cả những tình cảm và lòng biết ơn chân thành sâu sắc, tôi xin cảm ơn tất cả những sự giúp đỡ quý báu đó.

Thái Nguyên, tháng 5 năm 2014

Học Viên

Lê Thành Công

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC.....	iii
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	vi
DANH MỤC CÁC HÌNH.....	vii
BẢNG CHỮ VIẾT TẮT	ix
MỞ ĐẦU.....	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Cấu trúc, tính chất vật lý, hóa học của phenol.....	3
1.1.1. Cấu trúc phenol.....	3
1.1.2. Tính chất vật lý	3
1.1.3. Tính chất hóa học.....	3
1.2. Tổng quan về tình hình ô nhiễm phenol trên thế giới và Việt Nam.....	5
1.2.1. Trên thế giới.....	5
1.2.2. Ở Việt Nam.....	5
1.3. Ảnh hưởng của phenol tới môi trường và sức khỏe con người.....	6
1.3.1. Ảnh hưởng tới môi trường.....	6
1.3.2. Ảnh hưởng tới sức khỏe con người	7
1.4. Biện pháp xử lý ô nhiễm phenol.....	9
1.4.1. Biện pháp cơ học	9
1.4.2. Biện pháp vật lý	9
1.4.3. Biện pháp hóa học.....	10
1.4.4. Biện pháp sinh học.....	10
1.5. Giới thiệu chung về màng sinh học (biofilm).....	16

1.5.1. Định nghĩa.....	16
1.5.2. Sự hình thành biofilm	18
1.5.2. Các yếu tố ảnh hưởng tới sự hình thành biofilm	19
1.6. Phương pháp phân loại vi sinh vật	20
1.6.1. Phân loại vi sinh vật theo phương pháp truyền thống	20
1.6.2. Phân loại vi sinh vật bằng sinh học phân tử	20
CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	22
2.1. Nguyên liệu, hoá chất, thiết bị sử dụng.....	22
2.1.1. Nguyên liệu.....	22
2.1.2. Hoá chất, môi trường.....	22
2.1.3. Thiết bị và dụng cụ	23
2.2. Phương pháp nghiên cứu	24
2.2.1. Thu thập mẫu	24
2.2.2. Làm giàu tập đoàn vi sinh vật trên môi trường chứa phenol.....	24
2.2.3. Phân lập và tuyển chọn một số chủng vi khuẩn có khả năng sử dụng phenol.....	25
2.2.4. Đánh giá và tuyển chọn một số chủng vi khuẩn tạo màng sinh học	26
2.2.5. Phân loại và định tên một số chủng vi khuẩn tạo màng sinh học.....	27
2.2.6. Nghiên cứu một số điều kiện hoá lý ảnh hưởng tới khả năng tạo màng sinh học do các chủng vi khuẩn tạo thành.....	30
2.2.7. Đánh giá khả năng phân huỷ phenol của màng sinh học đa chủng tạo thành ở điều kiện tối ưu	31
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	33
3.1. Thu thập mẫu và phân lập một số chủng có khả năng phân huỷ phenol.....	33

3.1.1. Thu thập mẫu	33
3.1.2. Phân lập một số chủng có khả năng phân huỷ phenol.....	33
3.1.3. Sàng lọc các chủng vi khuẩn có khả năng tạo màng tốt.....	36
3.1.4. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào của các chủng nghiên cứu	37
3.2. Phân loại và định tên 3 chủng tạo biofilm tốt	38
3.2.1. Tách chiết DNA tổng số	38
3.2.2. Nhân đoạn gen 16S rRNA bằng kỹ thuật PCR.....	39
3.3. Nghiên cứu một số điều kiện hoá lý ảnh hưởng tới khả năng tạo màng sinh học	41
3.3.1. Ảnh hưởng của pH.....	41
3.3.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ.....	42
3.3.3. Ảnh hưởng của nguồn carbon.....	43
3.3.4. Ảnh hưởng của nguồn nitor	44
3.4. Đánh giá khả năng phân huỷ phenol của biofilm đa chủng tạo thành ở điều kiện tối ưu.....	45
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	49
PHỤ LỤC.....	50
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	51

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1. Bảng giá trị giới hạn cho phép của tổng nồng độ phenol	6
Bảng 1.2. Ảnh hưởng của phenol đến sức khoẻ của con người và động vật	8
Bảng 1.3. Các vi sinh vật có khả năng phân huỷ sinh học phenol.....	12
Bảng 2.1. Các môi trường nuôi cấy	22
Bảng 2.2. Các thành phần của phản ứng PCR	28
Bảng 3.1. Hình thái, đặc điểm khuẩn lạc và tế bào của 3 chủng vi khuẩn	37

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1. Cấu trúc hoá học của phenol.....	3
Hình 1.2. Con đường mở vòng ở vị trí ortho bởi.....	13
Hình 1.3. Con đường phân hủy sinh học kỵ khí phenol bởi <i>Pseudomonas</i> sp.	14
Hình 1.4. Cấu trúc của biofilm qua ảnh hiển vi quét.....	18
Hình 1.5. Sự hình thành biofilm	19
Hình 2.1. Sơ đồ chu trình nhiệt phản ứng PCR	29
Hình 3.1. Mẫu nước (A) và mẫu bùn (B) thu thập được từ bể chứa nước thải kho xăng dầu Đức Giang, Gia Lâm, Hà Nội	33
Hình 3.2. Mẫu làm giàu vsv trên môi trường khoáng Gost dịch có bổ sung 50 ppm phenol	34
Hình 3.3. Tập đoàn vi sinh vật trên môi trường khoáng Gost thạch.....	35
Hình 3.4. Khả năng sinh trưởng và phát triển của các chủng vi khuẩn	36
Hình 3.5. Khả năng tạo biofilm của 8 chủng vi khuẩn	36
Hình 3.6. Khả năng tạo màng của 8 chủng vi khuẩn	37
Hình 3.7. Hình ảnh điện di DNA tổng số 3 chủng vi khuẩn.....	39
Hình 3.8. Hình ảnh điện di sản phẩm nhân đoạn gen 16S rRNA của các chủng vi khuẩn..	39
Hình 3.9. Cây phát sinh chủng loại của 3 chủng ĐGP2, ĐGP4 và ĐGP8.....	40
Hình 3.10. Ảnh hưởng của pH lên khả năng tạo biofilm của các chủng vi khuẩn	42
Hình 3.11. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên khả năng tạo biofilm của các chủng vi khuẩn	43
Hình 3.12. Ảnh hưởng của nguồn carbon lên khả năng tạo màng sinh học của các chủng vi khuẩn.....	44
Hình 3.13. Ảnh hưởng của nguồn nitơ lên khả năng tạo màng sinh học của các chủng vi khuẩn.....	45
Hình 3.14. Khả năng sinh trưởng và phát triển của màng sinh học do các chủng vi khuẩn tạo thành ở các nồng độ phenol khác nhau	46

Hình 3.15. Hiệu suất phân hủy 150 ppm phenol của màng sinh học đa chủng của mẫu đối chứng và mẫu thí nghiệm sau 7 ngày xử lý47

BẢNG CHỮ VIẾT TẮT

DNA	: Deoxyribonucleic acid
EPS	: Extracellular Polymeric Substances (hợp chất ngoại bào)
h	: hour (giờ)
kDa	: KiloDalton
LB	: Luria-Bertani
LD50	: Lethal Dose, 50% (liều lượng gây chết một nửa)
mg, g	: milligram, gram
OD	: Optical Density (mật độ quang học)
GAC	: Granular Activated Carbon (than hoạt tính dạng hạt)
PAC	: Powder Activated Carbon (than hoạt tính dạng bột)
PCR	: Polymerase Chain Reaction (phản ứng chuỗi trùng hợp)
ppm	: parts per million (đơn vị một phần triệu, mg/l)
RNA	: Ribonucleic acid
vsv	: Vi sinh vật
nm, μ m, cm, mm	: Nanometer, micrometer, centimeter, milimeter
μ l, ml, l	: Microliter, milliliter, liter
HKTS	: Hiệu khí tổng số
PAH	: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons