

KHẢ NĂNG CHUYÊN HÓA VÀ PHÂN HỦY PHENOL DO MÀNG SINH HỌC TẠO THÀNH TỪ CÁC CHỦNG VI KHUẨN PHÂN LẬP TẠI KHO XĂNG ĐỨC GIANG, GIA LÂM, HÀ NỘI

Cung Thị Ngọc Mai, Lê Thị Nhi Công, Lê Thành Công, Nghiêm Ngọc Minh

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

Ngày nhận bài: 13.02.2014

Ngày nhận đăng: 24.4.2014

TÓM TẮT

Từ mẫu nước thải tại bể chứa kho xăng dầu Đức Giang, Gia Lâm, Hà Nội, 8 chủng vi khuẩn đã được phân lập trên nguồn cơ chất phenol (trong đó 3 chủng ĐGP2, ĐGP4 và ĐGP8 có khả năng tạo màng tốt nhất). Từ các chủng này, nghiên cứu tạo màng đa chủng để thử nghiệm khả năng sinh trưởng, phát triển và phân hủy phenol với các nồng độ khác nhau được thực hiện. Kết quả cho thấy, màng sinh học đa chủng có khả năng sử dụng, sinh trưởng và phát triển ở 200 mg/l phenol tuy nhiên tại nồng độ 150 mg/l là tốt nhất. Bằng phương pháp phân tích sắc ký lỏng cao áp (HPLC), đã xác định được sự chuyển hóa của phenol thành các sản phẩm khác nhau; được thể hiện ở diện tích phổ (tương ứng với nồng độ phenol là 150 mg/l) giảm dần và xuất hiện thêm các phổ khác với các diện tích khác nhau tại các thời gian lưu khác nhau. Dưa vào đường chuẩn được xây dựng với các nồng độ phenol khác nhau cho thấy khả năng phân hủy phenol sau 7 ngày nuôi cấy của màng sinh học đa chủng là 99,3% với nồng độ ban đầu là 150 mg/l. Nghiên cứu này đã mở ra một hướng đi mới về việc sử dụng màng sinh học do các chủng vi khuẩn tạo thành có thể xử lý nước thải ô nhiễm phenol cũng như những nguồn nước thải tương tự.

Từ khóa: Màng sinh học, phân hủy sinh học, phenol, vi khuẩn, xử lý nước thải

MỞ ĐẦU

Quá trình ô nhiễm dầu mỏ xảy ra do các sự cố tràn dầu, rò rỉ dầu khi khai thác cũng như vận chuyển trên biển, hay từ các bể chứa kho xăng dầu trong thành phố. Chính từ đó đã gây ảnh hưởng xấu tới đời sống con người cũng như hệ sinh thái. Ô nhiễm dầu mỏ gây ra do các chất ô nhiễm khó phân hủy có trong dầu mỏ như các hợp chất hydrocarbon mạch thẳng như alkane, alkene, hay các hợp chất vòng thơm như phenol, naphthalene, pyrene, ... Xử lý nước ô nhiễm dầu bằng phương pháp cơ học (như lắng, gạn hay hấp phụ) hay sử dụng các chất phân tán, các chất phá nhũ tương dầu - nước, các chất keo tụ và hấp thụ dầu có ưu điểm là xử lý được kịp thời, nhanh, tuy nhiên phương pháp này xử lý không được triệt để do đó gây ô nhiễm thứ cấp cho môi trường và hủy hoại hệ sinh thái. Vì vậy, việc tìm ra một phương pháp cho phép xử lý được triệt để, thân thiện với môi trường và giá thành hạ đang là hướng đi mới của các nhà khoa học trong việc xử lý các chất ô nhiễm.

Trong những năm gần đây, màng sinh học (biofilm) là một đề tài thu hút của các nhà khoa học nghiên cứu trong việc xử lý các chất ô nhiễm. Từ

năm 1978, cụm từ "biofilm" đã được định nghĩa và mô tả bởi Costerton. Biofilm là tập hợp các tế bào vi sinh vật như vi khuẩn, tảo, nấm và nguyên sinh động vật có quan hệ chặt chẽ với nhau và được bảo vệ trong một chất nền (matrix) của hỗn hợp các chất polymer ngoại bào (EPS – extracellular polymeric substances) có khả năng bám trên bề mặt khác nhau như môi trường nước và đất, mô sống, vật liệu y tế, hay trong các đường ống nước (Donlan *et al.*, 2002). Các tế bào trong biofilm có mật độ cao hơn và hỗ trợ nhau trong việc chuyển hóa các chất ô nhiễm do chúng duy trì được độ ẩm, nồng độ muối hay thế oxy hóa khử giữa các tế bào lân cận. Chính đặc điểm này đã tạo nên cấu trúc đặc biệt của biofilm và giúp chúng kiểm soát được sự lưu thông dòng chảy giữa các tế bào (Horn, Morgenroth, 2006).

Trong biofilm, quá trình chuyển hóa các chất ô nhiễm (như phenol) ban đầu theo con đường hiếu khí. Trước tiên, nhóm -OH được thêm vào vòng thơm nhờ phenol hydroxylase ở vị trí ortho với chất khử là NADH₂ tạo sản phẩm trung gian là catechol (1,2-dihydroxybenzene). Từ đó, hợp chất trung gian sẽ xảy ra quá trình cắt vòng ở vị trí meta do catechol 2,3-dioxygenase xúc tác Kilby (1948) và cắt vòng ở vị trí

ortho do catechol 1,2-dioxygenase xúc tác (Harwood, Parales, 1996). Quá trình cắt vòng ở vị trí ortho hay meta phụ thuộc vào từng nhóm vi sinh vật. Có nhiều chi vi khuẩn vừa có khả năng tạo màng tốt, vừa có khả năng phân hủy phenol cao đã được nghiên cứu như: *Pseudomonas*, *Acinetobacter calcoeticus*, *Bacillus*, *E. coli*, (Das *et al.*, 2012). Chính vì vậy, việc tìm kiếm các chủng vi khuẩn có khả năng tạo màng tốt và hiệu biết được quá trình chuyển hóa cũng như phân hủy phenol bởi các tế bào vi sinh vật trong biofilm giúp các nhà khoa học dễ dàng điều khiển được quá trình xử lý nguồn nước ô nhiễm phenol nói riêng và nước ô nhiễm dầu nói chung.

VẬT LIỆU, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Nguyên liệu

Mẫu nước thải được thu thập tại bể chứa kho xăng dầu Đức Giang, Gia Lâm, Hà Nội và được lưu giữ ở Phòng CNSH môi trường, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam trong vòng 24 h để phân tích.

Hóa chất, môi trường nuôi cấy

Các hóa chất được sử dụng trong nghiên cứu đều là hóa chất nhập ngoại có độ tinh khiết cao do các nhà sản xuất có uy tín như Sigma-Aldrich, Merk cung cấp.

Môi trường Gost để phân lập và đánh giá khả năng sinh trưởng, phát triển và phân hủy phenol của vi khuẩn gồm các thành phần sau (g/l): Na_2HPO_4 : 0,7; KH_2PO_4 : 0,3; KNO_3 : 3; MgSO_4 : 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 phenol: Thành phần giống môi trường Gost dịch nhưng có bổ sung thêm 18-20 g agar.

Môi trường hiếu khí tổng số (HKTS): để kiểm tra khả năng tạo màng của vi khuẩn gồm các thành phần sau (g/l): NH_4NO_3 : 2; KH_2PO_4 : 4; NaCl : 5; KCl : 0,25; MgCl_2 1,25; glucose: 1; peptone: 5; cao men: 0,2; cao thịt: 3; pH 7 – 7,2.

Phương pháp nghiên cứu

Làm giàu, phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn có khả năng sinh trưởng và phát triển trên nguồn cơ chất phenol

Thực hiện các bước thí nghiệm theo mô tả của Cung Thị Ngọc Mai *et al.*, 2010.

Đánh giá khả năng tạo màng của các chủng vi khuẩn

Tiến hành theo phương pháp của O'Toole, Kolter (1998); Morikawa *et al.*, (2006).

Các chủng đơn vi khuẩn có khả năng tạo màng tốt (tương ứng với độ hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 570 nm cao nhất) được lựa chọn để tạo màng sinh học đa chủng. Phương pháp giống như tạo màng đơn chủng chỉ khác là sinh khối của các chủng vi khuẩn tạo màng tốt được bổ sung vào bình thí nghiệm, thay cho sinh khối đơn chủng.

Đánh giá khả năng sinh trưởng, phát triển của màng sinh học đa chủng tạo thành tại các nồng độ phenol khác nhau

Thí nghiệm được tiến hành ở điều kiện nuôi tĩnh tại 30°C trong môi trường Gost dịch có bổ sung phenol (với các nồng độ là: 50 mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l và 200 mg/l) và được xác định bởi độ hấp thụ của tế bào vi sinh vật tại bước sóng 600 nm.

Đánh giá khả năng chuyển hóa và phân hủy phenol của màng sinh học đa chủng tạo thành

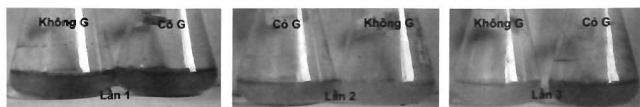
Quá trình đánh giá khả năng chuyển hóa phenol của màng sinh học đa chủng vi khuẩn bằng phương pháp HPLC dựa theo mô tả chi tiết của Lê Thị Nhi Công *et al.*, (2013).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Làm giàu, phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn có khả năng sinh trưởng và phát triển trên nguồn cơ chất phenol

Mẫu nước thải từ kho xăng dầu Đức Giang, Gia Lâm, Hà Nội được sử dụng để làm giàu vi khuẩn chuyển hóa phenol trong môi trường khoáng Gost dịch có bổ sung phenol 50 mg/l làm nguồn cacbon và năng lượng duy nhất. Sau 3 lần cấy truyền, màu sắc môi trường có sự thay đổi rõ rệt (Hình 1), bằng việc đếm MPN (Most Possible Number), số lượng tế bào vi sinh vật có sự tăng lên đáng kể. Cụ thể, từ lần làm giàu thứ nhất, số lượng tế bào sử dụng phenol chỉ đạt 210 tế bào/ml, sau 3 lần làm giàu số lượng tế bào sử dụng phenol đã lên tới 46.10^4 tế bào/ml.

Tiến hành cấy gạt mẫu sau lần làm giàu thứ ba trên môi trường khoáng Gost thạch có bổ sung 50 mg/l phenol đã thu được 8 chủng vi khuẩn. Trên môi trường không bổ sung glucose, phân lập được 6 chủng vi khuẩn; trên môi trường có bổ sung glucose phân lập được 2 chủng vi khuẩn có hình dạng khác nhau. Đặc điểm khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn này được chỉ ra ở bảng 1.



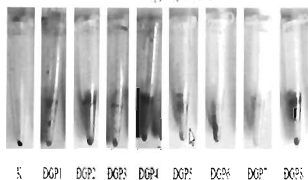
Hình 1. Làm giàu mẫu ban đầu trên môi trường khoáng Gost có bổ sung 50 mg/l phenol; G: glucose

Bảng 1. Đặc điểm khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn phân lập được sau 3 lần làm giàu.

TT	Tên chủng	Đặc điểm khuẩn lạc
Không bổ sung glucose		
1	BDGP1	Tròn, lồi, màu vàng nghệ, xung quanh trắng trong, nhỏ li ti, d = 1-1,5mm
2	BDGP3	Tròn, màu trắng trong, ướt, bóng, d = 1,5-2mm
3	BDGP5	Mọc loang, màu trắng trong, d = 2-3 mm
4	BDGP6	Màu hồng, lồi, bóng, ướt, d = 1,5mm
5	BDGP7	Trắng đục, có viền trắng, trong, nhẵn xung quanh, d = 2 mm
6	BDGP8	Tròn, màu trắng, nhớt, có nhân trắng đục, viền trắng trong, d = 2-2,5 mm
Có bổ sung glucose		
7	BDGP2	Tròn, màu trắng đục, lồi, bóng, d = 1,5-2 mm
8	BDGP4	Tròn, tâm màu trắng sữa, viền trắng trong, dẹt, d = 2,5-3 mm

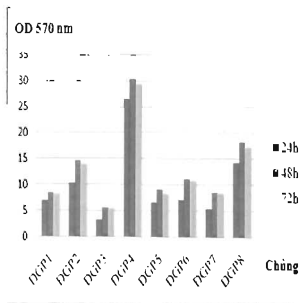
Khả năng tạo màng của các chủng vi khuẩn phân lập

Tám chủng vi khuẩn được hoạt hóa và đánh giá khả năng tạo màng qua giá trị đo OD ở bước sóng 570 nm (Hình 2, Hình 3)



Hình 2. Khả năng bắt màu tím tinh thể 0,01% của màng sinh học do các chủng vi khuẩn tạo thành. K: Đối chứng âm (không có vi sinh vật).

Đồ thị tại Hình 3 cho thấy ba chủng DGP2, DGP4 và DGP8 có khả năng tạo màng tốt nhất. Chính vì vậy 3 chủng này được lựa chọn để sử dụng cho nghiên cứu khả năng tạo màng sinh học đa chủng.



Hình 3. Khả năng tạo màng sinh học của vi khuẩn tại bước sóng 570 nm.

Khả năng sinh trưởng, phát triển và chuyển hóa của màng sinh học do các chủng vi khuẩn tạo thành

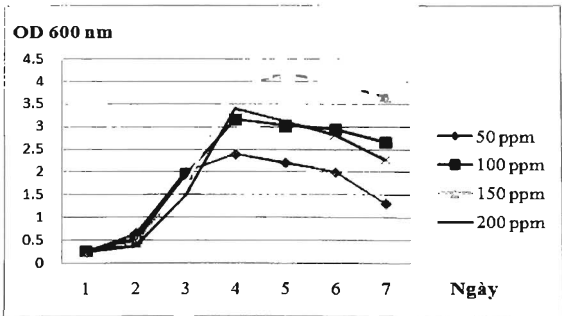
Nghiên cứu tạo màng sinh học đa chủng được thực hiện trong bình trụ 100 ml chứa 20 ml môi trường nuôi cấy tương tự như với tạo màng sinh học đơn chủng. Màng sinh học đa chủng do 3 chủng vi khuẩn ĐGP2, ĐGP4 và ĐGP8 tạo thành được sử dụng cho thí nghiệm chuyển hóa phenol tại các nồng độ phenol khác nhau, cụ thể là 50, 100, 150 và 200 g/l. Mức chuyển hóa được đánh giá thông qua phân tích độ hấp thụ ánh sáng của dịch nuôi tại bước sóng 600 nm.

Mẫu dịch tế bào được chiết rút sau mỗi 24 h để phân tích. Sau 7 ngày, thí nghiệm tại nồng độ phenol 150 mg/l cho kết quả chuyển hóa cao nhất (Hình 4), theo đó mẫu thí nghiệm này được phân tích định lượng bằng thiết bị HPLC (Hình 5).

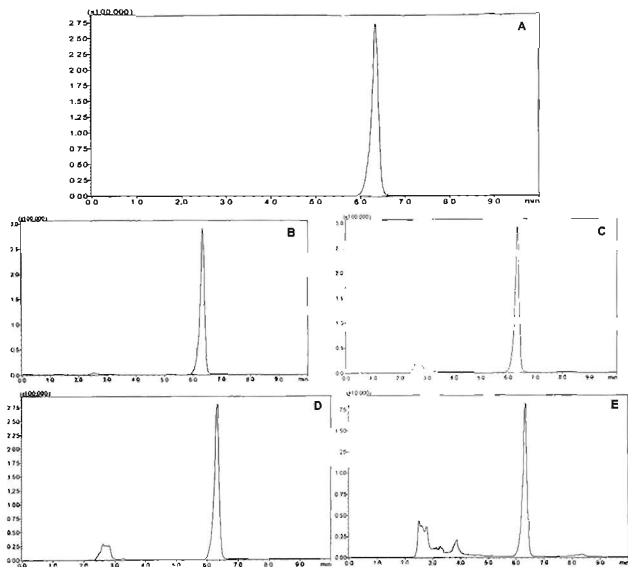
Mẫu phân tích tại các thời điểm 1, 3, 5 và 7 ngày chỉ ra đỉnh của cơ chất ban đầu (phenol) giảm dần theo thời gian, trong khi đó một số đỉnh mới xuất hiện là các sản phẩm trung gian của quá trình chuyển hóa. Như vậy, màng sinh học đa chủng có khả năng chuyển hóa phenol khá tốt. Việc chuyển hóa được định lượng qua xác định đường chuẩn với phenol chuẩn (kết quả cụ thể không chỉ ra trong nghiên cứu này), chỉ ra hiệu suất chuyển hóa phenol do màng sinh học đa chủng tạo thành là 99,3%.

Hiện nay, các công bố về khả năng phân hủy phenol của màng sinh học đa chủng còn hạn chế, các nghiên cứu về phân hủy phenol chỉ tập trung ở các

chủng đơn lẻ hoặc các chủng vi sinh vật được cố định trên các vật liệu mang khác nhau. (Cung Thị Ngọc Mai *et al.*, 2010) đã công bố chủng BTL1 có khả năng phân hủy 99% phenol với hàm lượng ban đầu là 100 mg/l sau 14 ngày. (Feakin *et al.*, 1995) đã chỉ ra rằng, bằng việc thiết kế các reactor để vi sinh vật cố định trên than hoạt tính dạng hạt có khả năng sử dụng từ 1 – 10 µg/l atrazine và simazine với hiệu suất lần lượt là 53% và 58%. Cũng trong năm 1995, nghiên cứu của Massol-Deya *et al.*, có khả năng loại bỏ 98% toluene với nồng độ ban đầu là 3 mg/l trong các reactor tầng sôi. Tương tự như vậy, việc xử lý nước ô nhiễm chlorobenzene lên tới nồng độ 170 mg/l trong reactor tầng sôi có chứa các hạt than hoạt tính hiệu suất lên tới 99%. Ngoài ra, việc sử dụng kết hợp giữa trấu và cám lúa mỳ làm giá thể đã thành công để xử lý nước ô nhiễm dichlorophenol và pentachlorophenol bởi nấm *Coriolus versicolor* với nồng độ ban đầu 50 mg/l cho hiệu suất loại bỏ lần lượt là 75-80% và 100% sau 24 h nuôi cấy (Ullah *et al.*, 2000). Năm 2006, Viggiani và đồng tác giả, đã có công bố về chủng *Pseudomonas stutzeri* OX1 có khả năng tạo màng tốt sau khi được tối ưu các điều kiện trên nhiều loại vật liệu mang dạng rắn là (đất cát, đá và carbon hoạt tính) chuyển hóa 95% phenol theo con đường meta với hàm lượng ban đầu là 600 mg/l. Kết quả này góp phần định hướng cho chúng tôi trong việc nghiên cứu các vật liệu mang để kiểm và giá thành thấp ở trong nước để nâng cao hiệu quả xử lý nước thải ô nhiễm phenol.



Hình 4. Khả năng sử dụng phenol tại các nồng độ khác nhau do màng sinh học đa chủng tạo thành (ppm = mg/l)



Hình 5. Quá trình chuyển hóa phenol do màng sinh học đa chủng tạo thành sau 1 ngày (b), 3 ngày (c), 5 ngày (d) và 7 ngày (e) so với mẫu đối chứng (a).

KẾT LUẬN

Từ mẫu nước thải bể chứa kho xăng dầu Đức Giang, Gia Lâm, Hà Nội phân lập được 8 chủng vi khuẩn trên nguồn cơ chất phenol, trong đó 3 chủng ĐGP2, ĐGP4 và ĐGP8 có khả năng tạo màng tốt nhất. Màng sinh học đa chủng do 3 chủng vi khuẩn trên tạo thành có khả năng phân hủy 99,3% phenol nồng độ 150 mg/l sau 7 ngày xử lý.

Lời cảm ơn: Công trình được hỗ trợ kinh phí từ đề tài: “Nghiên cứu tạo màng sinh học (Biofilm) từ vi sinh vật dùng trong xử lý ô nhiễm dầu mỏ”, mã số KC04.21/11-15 thuộc Chương trình khoa học và

công nghệ trọng điểm cấp Nhà nước KC 04/11-15, giai đoạn 2014-2015 và trang thiết bị của phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ (1978) How bacteria stick. *Scientific American* 238(1): 86-95.
- Cung Thị Ngọc Mai, Trần Hải Đăng, Nguyễn Văn Bắc, Nguyễn 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

- Das N, Basak VGL, Salm AJ, Abigail AE (2012) Application of Biofilms on Remediation of Pollutants – An Overview. *J Microbiol Biotechnol Res* 2(5): 783-790.
- Donlan RM (2002) Biofilms: Microbial life on surfaces. *Infect.* 881 – 890.
- Feakin SJ, Blackburn E, Burns RG (1995) Inoculation of granular activated carbon in a fixed bed with s-triazine-degrading bacteria as a water treatment process. *Water Res* 29: 819–825
- Harwood CS and Parales RE (1996) The β -Ketoadipate Pathway and the Biology of Self-Identity. *Ann Rev Microbiol* 50: 553-590
- Hom H and Morgenroth (2006) Transport of oxygen, sodium chloride, and sodium nitrate in biofilms. *Chem Eng Sci* 61(5): 1347-1356.
- Kilby BA (1948) The Bacterial oxidation of Phenol to β -etoadipic Acid *Proceedings of the Biochemical Society Biochem J*. 43: V-VI.
- Lê Thị Nhi Công, Nghiênn Ngọc Minh (2013) Nghiênn cứu khả năng phân hủy phenol của màng sinh học do hỗn hợp nấm men biến tạo thành *Tap chí Khoa học và Công nghệ* 51(5B): 217-221.
- Massol-Deya AA, Whallon J, Hickey RF, Tiedje JM (1995) Channel structures in aerobic biofilms of fixed-film reactors treating contaminated groundwater. *App Environ Microbiol* 61: 769–777.
- Monkawa M, Kagihiro S, Haruki M, Takano K, Branda S, Kolter R and Kanaya S (2006) Biofilm formation by a *Bacillus subtilis* strain that produces gamma -polyglutamate. *Microbiology* 152: 2801-2807
- O'Toole G A and Kolter R (1998) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis *Mol Microbiol* 28: 449-46.
- Ullah MA, Kadhim H, Rastall RA, Evans CS (2000) Evaluation of solid substrates for enzyme production by *Coriolus versicolor*, for use in bioremediation of chlorophenols in aqueous effluents. *App Microbiol Biotechnol* 54: 832–837.
- Viggiani A, Olivieri G, Siani L, Donato DA, Marzocchella A, Salatino P, Barbieri P Galli E (2006) An airlift biofilm reactor for the biodegradation of phenol by *Pseudomonas stutzeri* OX1. *J Biotechnol* 123(4). 464-477.

PHENOL TRANSFORMATION AND DEGRADATION OF A BIOFILM FORMED BY A MIXTURE OF BACTERIAL STRAINS ISOLATED FROM DUC GIANG PETROL STORAGE TANK AT GIA LAM, HANOI

Cung Thị Ngọc Mai, Lê Thị Nhi Công, Lê Thanh Công, Nghiênn Ngọc Minh^{1,*}

Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Biofilms are a group of microorganism cells such as bacteria, alga, yeast or protozoa which stick to each other on a surface or interface and are protected in matrix of extracellular polymeric substance (EPS). Cells in biofilms have higher density and support each other in polluted-substance metabolism because they preserve moisture, salt concentration or oxidation-reduction potential between contiguous cells. Thus they create a special structure of biofilm and help them to control flowing circulation between cells. Therefore, the study on biofilm formed by microorganisms isolated from polluted areas enhances remediation of polluted matters. Eight bacterial strains were isolated from wastewater of Duc Giang petrol storage tank in Gia Lam District, Hanoi via enrichment in liquid mineral medium supplemented with phenol as the only carbon and energy sources. Of the eight strains, three strains (DGP8, DGP2 and DGP4) have the best capacity of biofilm formation, therefore they were used to provide multi-species biofilm for further investigation. The results indicated that, biofilm formed by these strains could transform phenol at different concentration in the mineral medium, optimally at 150 mg/l phenol. HPLC analysis confirmed that phenol peak decreased gradually whereas new peaks with different retention times appeared over time, indicating the transformation of phenol to intermediate products. Quantitative analyses of the peaks showed that as much as 99.3% of phenol in the medium was removed after 7 day incubation (with 150 mg/l of initial concentration). Thus, using multi-species biofilms for getting efficient and sustainable systems of phenol transformation (and other pollutants as well) has promising application potentials.

Keywords: Bacteria, biodegradation, biofilm, phenol, wastewater treatment

* Author for correspondence: Tel: +84-4-37917975; E-mail: nghienminh@ibt.ac.vn