

PHÂN HỦY SINH HỌC DẦU DIESEL VÀ HYDROCARBON THƠM ĐA NHÂN CỦA MỘT SỐ CHỦNG VI KHUẨN PHÂN LẬP TỪ NƯỚC THẢI NHIỄM DẦU KHO CẢNG B12, QUẢNG NINH

Nguyễn Bá Hữu - Trần Thị Tường Vi - Nghiêm Ngọc Minh - Đặng Thị Cẩm Hà
(Viện Công nghệ Sinh học - Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam)

1. Mở đầu

Hiện nay, dầu mỏ được coi là một trong những nguồn năng lượng chính cho các ngành sản xuất công nghiệp và đời sống xã hội. Do nhu cầu kinh tế và xã hội, hằng năm nước ta phải nhập lượng lớn xăng dầu, tuy nhiên nhiều doanh nghiệp kinh doanh và sử dụng dầu mỏ chưa có hệ thống xử lý nước thải, cặn nhiễm xăng dầu .v.v. những loại phế thải này khi thải ra môi trường sẽ gây ô nhiễm, ảnh hưởng đến sức khỏe con người và động vật. Hiện nay, công nghệ phân huỷ sinh học (Bioremediation) được áp dụng rộng rãi trong việc xử lý ô nhiễm dầu, 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. Công nghệ này đã được Viện Công nghệ Sinh học áp dụng thành công xử lý nước thải nhiễm dầu tại kho Cảng B12, Công ty xăng dầu B12 từ 1999 [4]. Tuy nhiên, để phát triển và nhân rộng công nghệ xử lý, cần thiết có các đánh giá về số lượng, khả năng phân huỷ dầu tổng số, hydrocarbon thơm đa nhân (polycyclic aromatic hydrocarbon - PAH) của vi sinh vật (VSV) trong hệ thống xử lý nước thải nhiễm dầu ở kho Cảng B12. Xuất phát từ những yêu cầu trên, chúng tôi đã điều tra số lượng một số nhóm VSV dị dưỡng, VSV sử dụng dầu, VSV sử dụng n-hexadecan và VSV vật sử dụng PAH, phân lập, nghiên cứu khả năng sử dụng dầu diesel, hexadecan và PAH của một số chủng vi khuẩn phân lập từ kho Cảng B12. Xác định vị trí phân loại của chủng vi khuẩn mới BPQ1 sử dụng dầu và PAH dựa trên so sánh một phần trình tự gen 16S rARN và bước đầu xác định đoạn gen mã hóa enzym catechol 2,3-dioxygenaza từ chủng vi khuẩn này.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Mẫu nước thải

Mẫu nước thải lấy từ bể chứa thuộc hệ thống xử lý nước thải nhiễm dầu tại kho Cảng B12, Quảng Ninh.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Xác định số lượng VSV dị dưỡng trên môi trường hiếu khí tổng số (HKTS), VSV sử dụng dầu DO, n-hexadecan, PAH trên các môi trường muối khoáng theo phương pháp xác định số lượng có thể nhất (MPN-most probable number) [14].

- Phân lập và đánh giá khả năng sử dụng dầu DO, n-hexadecan và PAH của các chủng vi khuẩn theo các phương pháp đã mô tả trước đây [14]. Quan sát hình thái tế bào vi khuẩn dưới kính hiển vi điện tử quét JEOL 5410 LV.

- Nhân đoạn gen 16S rARN và gen mã hoá catechol 2,3-dioxygenaza của chủng vi khuẩn BPQ1

2.3.1. Tách ADN tổng số

Chủng BPQ1 được nuôi lắc qua đêm trên môi trường LB lỏng, li tâm thu sinh khối và tách chiết ADN tổng số theo mô tả của Sambrook và cộng sự [17].

2.3.2. Nhân đoạn gen 16S rARN

Đoạn gen 16S rARN được nhân lên bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi 341F: 5' - CCT ACG GGA GGC AGC AG - 3' (vị trí 341-357 16S *E. coli*) và mồi 907R: 5' - CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT - 3' (vị trí 907-926 16S *E. coli*). Hỗn hợp phản ứng PCR 25µl gồm ADN khuôn (5-10 ng), *Taq* polymeraza (2 đơn vị), dNTPs (0,25 mM), dung dịch đệm 1X, MgCl₂ (3 mM) và cặp mồi 341F và 907R (0,5 µM). Phản ứng PCR được thực hiện với chu trình nhiệt 95°C - 5 phút; 4 chu kỳ (95°C - 1 phút, 50°C - 1 phút, 72°C - 1 phút); 30 chu kỳ (95°C - 1 phút, 55°C - 1 phút, 72°C - 1 phút); 72°C - 10 phút; giữ mẫu 4°C.

2.3.3. Nhân đoạn gen mã hóa catechol 2,3-dioxygenaza từ chủng BPQ1

Đoạn gen mã hoá enzym catechol 2,3-dioxygenaza được nhân lên bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi như miêu tả của Meyer và cộng sự [10].

2.3.4. Xác định trình tự đoạn gen 16S rARN

Sản phẩm PCR được gắn vào vector pCR[®] 2.1 nhờ enzym ligaza ở 14°C, biến nạp vào tế bào *E. coli* INVαF', tách chiết và kiểm tra ADN plasmid theo Sambbook và cộng sự [17]. Đoạn gen 16S rARN chủng BPQ1 được nhân lên bằng phản ứng PCR sử dụng mồi M13, tinh sạch và xác định trên máy đọc tự động ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer. Trình tự nucleotid được xử lý bằng phần mềm ABI PRISM 3100 Avant Data Collection v.1.0 và ADN sequencing analysis, so sánh với các trình tự gen 16S rARN trên GenBank và dữ liệu trong dự án về ribosom (RDP). Cây phát sinh loài của chủng BPQ1 và các chủng đại diện được xây dựng dựa trên phần mềm Clustal X, Bioedit, Blast, và NJ tree.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Số lượng một số nhãn VSV trong mẫu nước thải kho cảng B12

Bảng 1. Số lượng một số nhãn VSV trong nước thải nhiễm xăng dầu kho Cảng B12 (MPN/ml)

VSV hiếu khí dị dưỡng	VSV sử dụng DO	VSV sử dụng hexadecan	VSV sử dụng PAH
2 x 10 ³	1,1 x 10 ²	1,5 x 10 ¹	1,1 x 10 ²

Kết quả bảng 1 cho thấy trong mẫu nước thải nhiễm dầu kho Cảng B12 số lượng vi sinh vật (VSV) hiếu khí dị dưỡng là 2 x 10³ MPN/ml, VSV sử dụng DO là 1,1 x 10² MPN/ml, VSV sử dụng hexadecan là 1,5 x 10¹ MPN/ml và VSV sử dụng PAH là 1,1 x 10² MPN/ml. Kết quả đợt khảo sát năm 1998 đối với mẫu tại kho Cảng B12 cho thấy số lượng của hai nhóm VSV dị dưỡng và sử dụng dầu là 2,3 x 10⁵ CFU/ml và 10⁴ MPN/ml cao hơn đợt khảo sát này [4], [15] lưu lượng và thành phần dầu trong nước thải của mỗi kho phụ thuộc chủ yếu vào hoạt động kinh doanh của đơn vị, do đó ở các thời điểm khác nhau mức độ ô nhiễm cũng như thành phần và số lượng của các nhóm VSV cụ thể trong nước thải cũng khác nhau. Nghiên cứu trước đây ở phòng Công nghệ sinh học môi trường cho thấy có thể áp dụng thành công xử lý nước thải nhiễm dầu tại nhà máy Z151 khi số lượng VSV sử dụng dầu chỉ đạt 10² MPN/ml [3][13]. Hơn nữa, tại kho Cảng B12 đã áp dụng thành công công nghệ phân huỷ sinh học [4]. Việc đánh giá thường xuyên số lượng một số nhóm VSV quan trọng sẽ giúp các nhà khoa học và công nghệ nâng cao hiệu quả xử lý ô nhiễm dầu.

Các nghiên cứu ở trong và ngoài nước cho thấy nhóm VSV sử dụng dầu chiếm khoảng 10% tổng số vi sinh vật dị dưỡng [11]. Mặc dầu số lượng VSV dị dưỡng không phản ánh trực tiếp số lượng VSV sử dụng dầu, tuy nhiên thời gian nuôi cấy nhóm VSV dị dưỡng ngắn hơn so với nhóm VSV sử dụng dầu. Do đòi hỏi về thời gian trong quá trình xử lý ô nhiễm dầu nên việc đánh giá số lượng nhóm VSV sử dụng dầu thông qua nhóm VSV dị dưỡng có ý nghĩa rất quan trọng, thông qua sự biến động VSV có thể quyết định kịp thời và chính xác các yếu tố cần bổ sung cho quá trình phân hủy dầu.

Trong thành phần dầu các alkan mạch thẳng chiếm hàm lượng lớn nhất và dễ sử dụng hơn cả, trong đó alkan từ C10 đến C24 là những hydrocarbon mà VSV dễ phân hủy nhất [11]. Trong số các n-alkan mạch thẳng, n-hexadecan ($C_{16}H_{34}$) được sử dụng làm cơ chất đại diện cho việc đánh giá phân hủy sinh học n-alkan của vi sinh vật. Trong các thành phần của dầu mỏ PAH được quan tâm đặc biệt do những ảnh hưởng của chúng đến sức khỏe con người và động vật, do đó một trong những ưu tiên của xử lý ô nhiễm dầu là loại bỏ PAH. Trong tự nhiên ô nhiễm PAH thường gặp với hỗn hợp của nhiều PAH khác nhau. Trong nghiên cứu này, hỗn hợp PAH được sử dụng như công bố trước đây của Nguyễn Bá Hữu và cộng sự nhằm tối ưu khả năng đánh giá phân hủy sinh học PAH [14].

Các nghiên cứu trước đây tại Việt Nam chưa tập trung nhiều về phân tích số lượng hai nhóm VSV sử dụng n-hexadecan và PAH trong nước thải nhiễm xăng dầu. Kết quả phân tích số lượng hai nhóm VSV sử dụng n-hexadecan và PAH sẽ giúp chúng ta hiểu rõ hơn bức tranh về VSV trong nước thải nhiễm dầu tại kho Cảng B12.

3.2. Nghiên cứu khả năng sử dụng dầu DO, hexadecan và PAH của một số chủng vi khuẩn phân lập từ nước thải kho cảng B12

3.2.1 Phương pháp phân lập vi sinh vật sử dụng DO, hexadecan và PAH

Vi sinh vật sử dụng DO, hexadecan và PAH được phân lập theo phương pháp làm giàu trên môi trường muối khoáng chứa các nguồn carbon trên như nguồn carbon và năng lượng duy nhất. Đã phát hiện được bốn nhóm vi khuẩn sử dụng DO, các nhóm này được ký hiệu từ BDQ1 đến BDQ4, trong đó loại có khuẩn lạc vàng đục, nhớt, lồi, tròn chiếm ưu thế. Vi sinh vật sử dụng PAH từ mẫu nước thải ô nhiễm không đa dạng, chỉ phát hiện được hai loại khuẩn lạc trong đó loại chiếm đa số BPQ1 có thể phân hủy được PAH. Kết quả tương tự cũng được ghi nhận đối với mẫu làm giàu VSV sử dụng n-hexadecan. Hai loại khuẩn lạc nhỏ, vàng và to, da cam được ký hiệu là BHQ1 và BHQ2.

Kết quả phân lập cho thấy sự tồn tại của 8 chủng vi khuẩn sử dụng dầu DO, hexadecan và PAHs khác nhau trong bể thu gom ở kho xăng dầu B12. Sự tồn tại các nhóm VSV bản địa nói trên cho thấy có thể áp dụng công nghệ phân hủy sinh học và thực tế công nghệ này đó và đang được áp dụng thành công xử lý nước thải nhiễm dầu kho Cảng B12.

3.2.2. Khả năng sử dụng dầu DO, hexadecan và PAH của các chủng vi khuẩn

Khả năng sử dụng DO, PAH và n-hexadecan của 8 chủng vi khuẩn đã được nghiên cứu. Kết quả ở bảng 2 cho thấy, 8 chủng đều phân hủy DO, trong đó 3 chủng BDQ4, BHQ1, BHQ2 phân hủy dầu DO mạnh nhất. Ba chủng BPQ1, BHQ1 và BHQ2 sử dụng rất tốt hexadecan, trong đó BHQ1 và BHQ2 sử dụng mạnh hơn BPQ1. Trong số 8 chủng trên, chỉ hai chủng BPQ1 và BDQ4 có thể

phân huỷ PAH, trong đó BPQ1 sử dụng PAH tốt hơn, môi trường chuyển sang màu nâu. Chủng BPQ1 có thể sử dụng phenanthren, fluoren và không sử dụng fluoranthren, anthracen và pyren.

Bảng 2. Khả năng phân huỷ dầu DO, hexadecan và hỗn hợp PAH của 8 chủng vi khuẩn phân lập từ nước thải nhiễm dầu kho Cảng B12

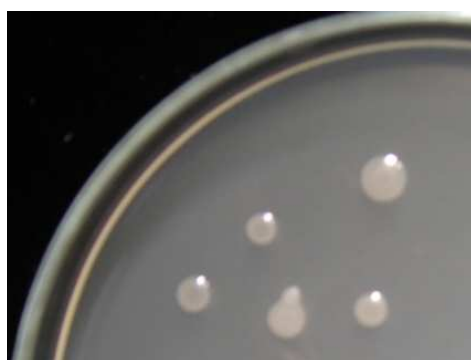
Chủng vi khuẩn	Nguồn carbon và năng lượng duy nhất		
	Hỗn hợp PAH	DO	Hexadecan
BDQ1	-	+	ND
BDQ2	-	+	ND
BDQ3	-	++	ND
BDQ4	+	+++	ND
BPQ1	+++	++	++
BPQ2	-	+	ND
BHQ1	-	+++	+++
BHQ2	-	+++	+++

Chú thích: +++ : Phân huỷ mạnh nhất, + : Phân huỷ yếu, ND : Không thử
 ++ : Phân huỷ trung bình, - : Không phân huỷ

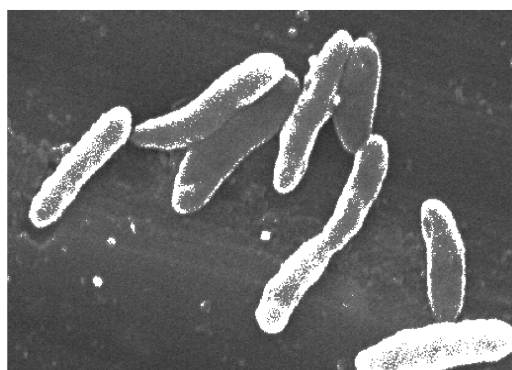
Thông thường, trong tự nhiên mỗi vi sinh vật đảm nhận một khâu nào đó trong quá trình phân huỷ sinh học các chất ô nhiễm. Có rất ít công bố về đơn chủng vi khuẩn mang cả hai gen tham gia vào quá trình chuyển hóa n-alkan và hydrocarbon thơm. Các chủng vi sinh vật mang cả hai gen như vậy có thể đóng vai trò quan trọng trong quá trình làm sạch ô nhiễm dầu. Trong nghiên cứu này chủng BPQ1 sử dụng cả dầu DO, n-hexadecan và hỗn hợp PAH, chủng này được lựa chọn nghiên cứu sâu về định loại cũng như gen mã hóa catechol 2,3 dioxygenaza.

3.3. Định loại chủng vi khuẩn BPQ1

Sau 24 giờ nuôi cấy trên môi trường HKTS, khuẩn lạc chủng BPQ1 dạng lồi, tròn, trơn, hơi ướt, trắng đục và có kích thước 2-5 mm (hình 1). Chủng BPQ1 thuộc nhóm vi khuẩn Gram âm, tế bào dạng que, hơi phẩy, kích thước từ 0,4 - 0,46 μm x 1 - 1,7 μm (hình 2).



Hình 1: Khuẩn lạc chủng BPQ1 trên môi trường HKTS



Hình 2: Hình thái tế bào chủng vi khuẩn BPQ1 dưới kính hiển vi điện tử quét ở độ phóng đại 15.000 lần

Gen rARN có tính bảo thủ cao nên được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu đa dạng vi sinh vật cũng như là một trong các thông tin quan trọng để định loại vi sinh vật. Kết quả phân ứng nhân đoạn gen 16S rARN từ ADN tổng số chủng BPQ1 và với cặp môi 341F và 907R cho

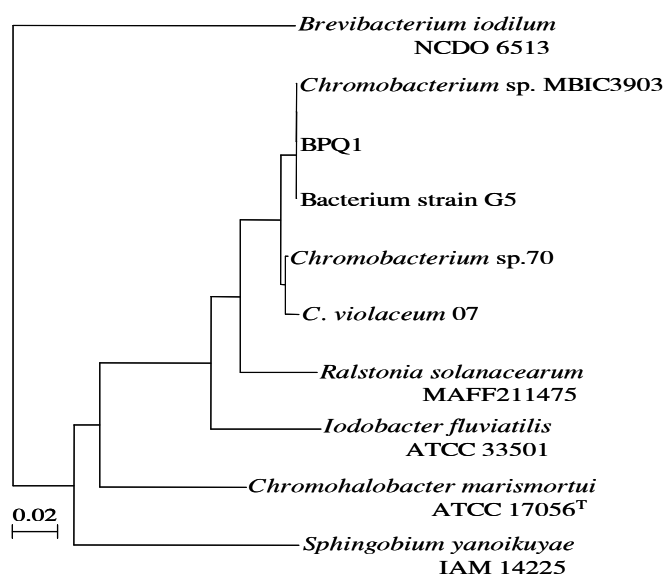
thấy sản phẩm PCR có kích thước như tính toán lý thuyết (kết quả không trình bày ở đây). Tiếp theo, sản phẩm PCR được gắn vào vectơ pCR[®]2.1, biến nạp vectơ tái tổ hợp vào tế bào *E. coli* INV α F', tách, làm sạch plasmid và xác định trình tự nucleotide. Trình tự đoạn gen 16S rARN (585 nucleotid) của chủng BPQ1 được đăng ký trên Genbank với số đăng ký là DQ494194.

Bảng 3: So sánh trình tự đoạn gen 16S rARN chủng BPQ1 và một số chủng đại diện

Chủng vi khuẩn	% tương đồng	Số nucleotid so sánh
Bacterium G5	99,82	585*/586#
<i>Chromobacterium</i> sp. MBIC 3903	99,48	582*/585#
<i>Chromobacterium</i> sp. 70	97,77	572*/585#
<i>Chromobacterium violacea</i> 07	96,58	565*/585#
<i>Ralstonia solanacearum</i> MAFF211475	92,64	542*/585#
<i>Iodobacter fluviatilis</i> ATCC 33501	89,38	522*/584#
<i>Sphingobium yanoikuyae</i> IAM 14225	80,40	361*/449#

Chú thích: * - số nucleotid đoạn gen 16S rARN chủng BPQ1
- số nucleotid đoạn gen 16S rARN của các chủng đại diện

Kết quả so sánh với các trình tự gen 16S rARN trên GenBank và RDP cho thấy, chủng BPQ1 có mức tương đồng cao với các chủng thuộc lớp β -proteobacteria và chi *Chromobacterium* (Bảng 3, Hình 3). Chủng BPQ1 có mức tương đồng cao nhất 99,82% với chủng vi khuẩn G5, 99,48% với chủng *Chromobacterium* sp. MBIC 3903 và 97,77% với chủng *Chromobacterium* sp. 70.



Hình 5: Cây phát sinh loài dựa trên so sánh trình tự đoạn gen 16S rARN chủng BPQ1 và một số chủng đại diện

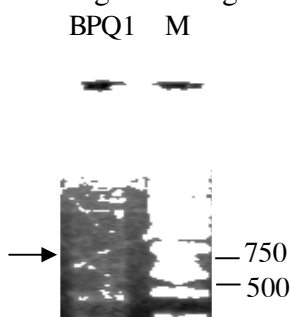
Các nghiên cứu trước đây cho thấy vi khuẩn thuộc chi *Chromobacterium* thuộc nhóm Gram âm, tế bào hình que, di động, phân lập được từ môi trường đất, nước và mẫu bệnh phẩm từ động vật. Dựa trên một số đặc điểm hình thái và so sánh trình tự đoạn gen 16S rARN cho thấy chủng BPQ1 có thể được xếp vào chi *Chromobacterium* và được đặt tên là *Chromobacterium* sp. BPQ1.

Hiện nay, có khoảng 39 chi vi khuẩn, nấm [8]; [1], [11], [20], [12], [16], [5] sử dụng dầu và 61 chi vi khuẩn, nấm sử dụng PAH thường gặp phân lập được từ môi trường [8], [1], [2], [11], [18], [6]. Hiện chưa, có tài liệu nào công bố về khả năng sử dụng dầu và PAH của các vi khuẩn trong chi *Chromobacterium*. Kết quả trong nghiên cứu này một lần nữa phản ánh sự đa dạng của vi sinh vật sử dụng dầu và PAH trong môi trường tự nhiên. Tuy nhiên, để có kết luận chính xác hơn về vị trí phân loại của chủng BPQ1 cần có thêm các kết quả sinh lý-sinh hóa, đọc toàn bộ trình tự gen 16S rARN cũng như lai ADN:ADN với các chủng vi khuẩn đại diện trong chi *Chromobacterium*.

3.4. Nhân đoạn gen mã hóa catechol 2,3 dioxygenaza bằng kỹ thuật PCR

Trong môi trường tự nhiên, PAH thường tồn tại ở dạng hỗn hợp gồm nhiều PAH khác nhau. Do đó việc đánh giá khả năng sử dụng hỗn hợp các PAH bởi vi sinh vật bản địa có ý nghĩa rất quan trọng đối với đánh giá tiềm năng của chúng trong quá trình làm sạch ô nhiễm dầu và PAH bằng phương pháp phân hủy sinh học. Phân hủy sinh học của hydrocarbon thơm ở điều kiện hiếu khí thường xảy ra qua các bước cắt vòng thơm và tạo thành catechol, đây là sản phẩm trung gian phổ biến nhất của quá trình phân hủy các hợp chất hydrocarbon thơm [2], [19]. Quá trình cắt vòng của catechol bởi enzym dioxygenaza có thể xảy ra tại hai vị trí *meta* và *ortho*. Tuy nhiên, cắt vòng tại vị trí *meta* được thực hiện bởi enzym C23O được coi là quá trình phổ biến nhất ở các giai đoạn tiếp sau của phân hủy PAH [2], [19], [9].

Xuất phát từ vị trí quan trọng của gen mã hóa enzym C23O nên việc nghiên cứu sự tồn tại của gen này trong tự nhiên cũng như trong các chủng vi khuẩn sử dụng PAH giúp chúng ta hiểu rõ thêm quá trình làm sạch dầu ô nhiễm cũng như đa dạng gen chức năng tại kho Cảng B12 và ở các điểm ô nhiễm dầu khác. Trong nghiên cứu này, sự tồn tại đoạn gen mã hoá C23O trong chủng BPQ1 sử dụng dầu và PAH được kiểm tra bằng phản ứng PCR sử dụng mồi C23OF và C23OR. Theo Wikstrom và cộng sự [19], nhiệt độ gắn mồi là 63°C, tuy nhiên, các nghiên cứu trước đây cho thấy với nhiệt độ gắn mồi 63°C sẽ không thu được sản phẩm PCR [7]. Trong nghiên cứu này, nhiệt độ gắn mồi được điều chỉnh giảm xuống 55°C, sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agaroz 1,5% (Hình 6).



Hình 6: Điện di sản phẩm PCR nhân đoạn gen mã hóa catechol 2,3-dioxygenaza chủng BPQ1. M: thang ADN chuẩn kích thước 1 kb


Kết quả điện di cho thấy, có băng có kích thước gần 750 bp và sản phẩm PCR không đặc hiệu. Theo tính toán lý thuyết [10], sản phẩm đoạn gen mã hoá C23O là 722 bp. Như vậy, có thể băng ADN gần 750 bp là sản phẩm nhân đoạn gen mã hóa C23O ở chủng BPQ1. Kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu trước đây của các tác giả khác [14], [7], [6]. Khi sử dụng cặp mồi C23OF và C23OR đã thu được sản phẩm PCR không đặc hiệu, băng ADN gần 750 bp đã được xác định là đoạn gen mã hóa C23O ở các chi vi khuẩn *Pseudomonas*, *Sphingomonas* [6], [7], [19]. Tuy nhiên, để có kết luận chính xác hơn cần tiến hành tinh sạch và xác định trình tự sản phẩm PCR nhân lên từ chủng BPQ1.

4. Kết luận

- Số lượng một số nhóm VSV trong mẫu nước thải kho Cảng B12 không cao: số VSV dị dưỡng là 2×10^3 MPN/ml, VSV sử dụng DO là $1,1 \times 10^2$ MPN/ml, VSV sử dụng PAH là $1,1 \times 10^2$ MPN/ml và VSV sử dụng hexadecan là $1,5 \times 10^1$ MPN/ml.

- Đã phân lập được 8 chủng vi khuẩn sử dụng DO, PAH, hexadecan, trong đó BPQ1 có khả năng sử dụng DO, hexadecan và sử dụng mạnh hỗn hợp PAH. BPQ1 có khả năng sử dụng phenanthren và fluoren

- BPQ1 thuộc nhóm vi khuẩn Gram âm, khuẩn lạc tròn, ướt, lồi, trơn, trắng đục, đường kính 2-5 mm. Tế bào chủng BPQ1 hình que, hơi phẩy, kích thước $0,4 - 0,46 \mu\text{m} \times 1 - 1,7 \mu\text{m}$. So sánh trình tự đoạn gen 16S rARN của chủng vi khuẩn BPQ1 cho thấy, chủng này có độ tương đồng cao với các chủng vi khuẩn thuộc chi *Chromobacterium*, 99,82% với chủng vi khuẩn G5; 98,42% với chủng *Chromobacterium* sp. MPIC 3903 và 97,77% với chủng *Chromobacterium* sp.70. Dựa trên một số đặc điểm hình thái và so sánh trình tự gen 16S rARN, chủng BPQ1 có thể được xếp vào chi *Chromobacterium* và được đặt tên là *Chromobacterium* sp. BPQ1.

- Bước đầu đã thu được sản phẩm PCR sử dụng cặp mồi nhân đoạn gen mã hóa catechol 2,3-dioxygenaza của chủng vi khuẩn BPQ1, tuy nhiên cần có nghiên cứu tiếp để tách dòng và đọc trình tự đoạn gen này 

Summary

Biodegradation of diesel oil and polycyclic aromatic hydrocarbon of some bacterial strains isolated from oil contaminated wastewater of oil-gasoline storage B12, Quang Ninh

Nguyen Ba Huu, Tran T.T. Vi, Nghiem Ngoc Minh, Dang T.C. Ha
Institute of Biotechnology, Vietnamese Academy of Science and Technology

Bioremediation technology has been successful applied in oil contaminated wastewater treatment plant at B12 oil-gasoline Company in Quang Ninh province since 1999. In order to improve this technology, a microbial survey on oil contaminated wastewater tank of oil-gasoline storage B12, Quang Ninh ben was carried out. The numbers of heterotrophs, diesel oil (DO) degrading microorganisms, polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) degrader and hexadecane degrading microorganisms are 2×10^3 MPN/ml, $1,1 \times 10^2$ MPN/ml, $1,1 \times 10^2$ MPN/ml and $1,5 \times 10^1$ MPN/ml respectively. Eight DO and/or PAH and/or hexadecane degrading bacterial strains were isolated, among those BPQ1 strain was able to degrade diesel oil, hexadecane and strongly utilise PAH mixture. BPQ1 strain was also utilise phenanthrene and fluorene. BPQ1 colony is round, convex, smooth, white cream and 2-5 mm diameter. The BPQ1 cells are Gram negative, rod shape and $0,4-0,46 \mu\text{m} \times 1-1,7 \mu\text{m}$ size. The comparison as a part of 16S rRNA gene sequence of BPQ1 (585 bp) shown that this strain had high similar levels to bacteria of genus *Chromobacterium*, 99.82% to bacterium G5; 98.42% to *Chromobacterium* sp. MPIC 3903 and 97.77% to *Chromobacterium* sp.70. Based on some morphological characteristics and 16S rRNA analysis, the BPQ1 strain should be placed in genus *Chromobacterium* and named as *Chromobacterium* sp. BPQ1. The sequence as a part of 16S rARN gene of BPQ1 strain has been deposited in GenBank with accession number DQ494194. Primary result showed that PCR product was amplified from DNA total of BPQ1 and specific primers for *C23O* gene encoded catechol 2,3-dioxygenase, however, further studies on cloning and sequence analysis of this PCR product are necessary to confirm present of this gene in *Chromobacterium* sp. BPQ1.

Tài liệu tham khảo

- [1] Atlas R.M and R. Barthar (1992) “Hydrocarbon biodegradation” In (*Advances in Microbial Ecology*), Volume 12, K. C. Marshall (ed), p.287-338. Plenum press, New York.
- [2] Cerniglia C.E.(1993), “Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons”, *Current Opinion in Biotechnology* 4: 331-338.
- [3] Đặng Thị Cẩm Hà, Đinh Thuý Hằng, Nguyễn Bá Hữu, Nguyễn Thu Hằng, Lưu Thị Bích Thảo (1999), “Làm sạch nước thải nhiễm dầu bằng phân huỷ sinh học (Bioremediation)”, *Tuyển tập các báo cáo khoa học tại hội nghị môi trường toàn quốc năm 1998*, tr. 577 – 589, NXB khoa học và kỹ thuật, Hà Nội.
- [4] Đặng Thị Cẩm Hà, Nguyễn Bá Hữu, Nguyễn Thị Đệ, Trần Như Hoa, Nguyễn Quang Huy, Nguyễn Thanh Phương, Cù Việt Nga (2002), “Nghiên cứu làm sạch dầu mỏ bằng công nghệ phân huỷ sinh học”. Báo cáo tổng kết đề tài nghiên cứu khoa học và phát triển công nghệ”, *Chương trình KHCN – 02*.
- [5] Hamamura N., Olson S.H., Ward D.M., and Inskip W.P. 2006. Microbial Population Dynamics Associated with Crude-Oil Biodegradation in Diverse Soils. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 6316-6324.
- [6] La Thị Thanh Phương, Nguyễn Bá Hữu, Đặng Thị Cẩm Hà (2003). “Phân huỷ sinh học hydrocarbon thơm đa nhân (PAHs) bởi chủng vi khuẩn MXL-9 phân lập từ cặn dầu thô của mỏ Bạch Hổ, Vũng Tàu”. *Tạp chí Công nghệ Sinh học số 1 (1)*: 109-117
- [7] La Thị Thanh Phương, Nguyễn Bá Hữu, Đặng Thị Cẩm Hà (2004), “Xác định gen mã hóa catechol 2,3-dioxygenaza từ ba chủng vi khuẩn sử dụng hydrocarbon thơm đa nhân phân lập tại Khe Chè, Quảng Ninh”, *Tạp chí Sinh học* 26(2): 51-56
- [8] Leahy J. G., R. R. Colwell (1990), “Microbial degradation of hydrocarbon in the environment”, *Microbiological reviews* 54: 305-315.
- [9] Mesarch M. B., C. H. Nakatsu, L. Nies (2000), “Development of catechol 2,3 – dioxygenaza specific primers for monitoring bioremediation by competitive quantitative PCR”, *Applied and Environmental Microbiology* 66: 678-683.
- [10] Meyer S., R. Moser, A. Neef, U. Stahl and P. Kampfer (1999) “Differential detection of key enzymes of polyaromatic hydrocarbon – degrading bacteria using PCR and gene probes”, *Microbiology* 135: 1731-1741.
- [11] Morgan P., R. J. Watkinson (1994), “ Biodegradation of components of petroleum”, In *Biochemistry of microbial degradation*, C. Ratledge (ed.). pp. 1-31. Kluwer Academic Publishers
- [12] Nguyễn Bá Hữu, Đặng Thị Cẩm Hà (2000), “Vi khuẩn ưa mặn trung bình và khả năng phân huỷ sinh học dầu thụ của *Marinobacter aquaeolei* phân lập từ mỏ dầu Bạch Hổ”, *Tạp chí Sinh học* 20 (2): 33-38.
- [13] Nguyễn Bá Hữu, Đặng Thị Cẩm Hà, Trần Như Hoa (1999), “Phân bố của VSV sử dụng hydrocarbon và các nhóm VSV khác trong quá trình sinh học nước thải nhiễm dầu ở điều kiện phòng thí nghiệm”, *Tạp chí khoa học và công nghệ XXXVII (5)*: 1-5.
- [14] Nguyễn Bá Hữu,(2002) *Luận án thạc sĩ khoa học*. “Nghiên cứu các nhóm vi sinh vật và khả năng phân huỷ hydrocarbon thơm đa nhân của một số chủng vi khuẩn trong quá trình xử lý ô nhiễm dầu tại Khe Chè, Quảng Ninh”, Viện Sinh thái & Tài nguyên sinh vật.
- [15] Nguyễn Văn Diễn, (1998) *Luận văn tốt nghiệp* “Bước đầu khảo sát sự biến đổi số lượng vi sinh vật trong quá trình xử lý nước thải ô nhiễm dầu tại kho B12- Quảng Ninh”, Đại học KH TN, ĐHQG Hà Nội.
- [16] Pop N., Schlomann M., Mau M., (2006) Bacterial diversity in the active stage of a bioremediation system for mineral oil hydrocarbon-contaminated soils. *Microbiology* 152: 3291-3304.
- [17] Sambrook J., Fritsch E.F., and T. Maniatis (1989), “Molecular cloning, a laboratory manual”, *Cold Spring Harbor Laboratory*.
- [18] Widada J., H nojirir , K. Kasuga, T. Yoshida, H. Habe, T. Omori (2002), “Molecular detection and diversity of polycyclic aromatic hydrocarbon – degradation bacteria isolated from geographically diverse site”, *Applied Microbiology and Biotechnology* 58: 202-209.
- [19] Wikstrom P., Wiklund A., Andersson A.-C., Forsman M. (1996) “DNA recovery and PCR quantification of catechol 2,3-dioxygenaza genes from different soil types” *Journal of Biotechnology* 52: 107-120.
- [20] Yakimov M. M., P. N. Golyshin, S. Lang, E. R. B. Moore, M. R. Abraham, H. Lunsdorf, and K. N. Timmis (1998), “*Alcanivorax borkumensis* den. Nov., sp. nov., a new, hydrocarbon - degrading and surfactant - producing marine bacterium”, *International Journal of Systematic Bacteriology* 48: 339-348.