

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

NGUYỄN HƯƠNG QUỲNH

**PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN CHỦNG
VI SINH VẬT CÓ KHẢ NĂNG PHÂN HỦY
PYRENE VÀ KHẢ NĂNG XỬ LÝ NƯỚC THẢI
Ở QUY MÔ PHÒNG THÍ NGHIỆM 5 LÍT**

**Chuyên ngành: SINH HỌC THỰC NGHIỆM
Mã số: 60 42 30**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học: PGS.TS. NGHIÊM NGỌC MINH

THÁI NGUYÊN - 2011

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi, các số liệu, kết quả nghiên cứu trong luận văn này là trung thực và chưa có ai công bố trong một công trình nào khác.

Tác giả

Nguyễn Hương Quỳnh

LỜI CẢM ƠN

Trước hết, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành và sâu sắc tới:

PGS.TS. Nghiêm Ngọc Minh, trưởng phòng Công nghệ Sinh học Môi trường, Viện Công nghệ Sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tận tình hướng dẫn và dìu dắt tôi trong quá trình nghiên cứu và hoàn thành luận án.

Trong quá trình nghiên cứu vừa qua, tôi đã nhận được sự giúp đỡ và chỉ bảo tận tình của các cán bộ phòng Công nghệ Sinh học Môi trường, đặc biệt là **KS. Cung Thị Ngọc Mai, CN. Vũ Thị Thanh** đã giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện luận văn của mình.

Tôi cũng xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới các thầy cô khoa Sinh trường Đại học Sư phạm, Đại học Thái Nguyên, lãnh đạo Viện Công nghệ Sinh học đã tạo điều kiện và giúp đỡ tôi trong quá trình học tập nghiên cứu tại trường và tại Viện.

Bên cạnh đó tôi xin cảm ơn người thân trong gia đình, bạn bè, đồng nghiệp đã tạo điều kiện động viên và giúp đỡ tôi cả về vật chất và tinh thần để tôi có thể hoàn thành tốt luận văn này.

Một lần nữa tôi xin chân thành cảm ơn!

Thái Nguyên, ngày tháng năm 2011

Học viên

Nguyễn Hương Quỳnh

MỤC LỤC

Trang phụ bìa	
Lời cam đoan	i
Lời cảm ơn	ii
Mục lục.....	iii
Danh mục các ký hiệu, các chữ viết tắt	v
Danh mục các bảng	vi
Danh mục các hình	vii
MỞ ĐẦU	1
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Đặc điểm chung của PAH	3
1.1.1. Cấu trúc hóa học và một số đặc tính cơ bản của PAH	3
1.1.2. Tính độc và ảnh hưởng của PAH tới con người và môi trường	5
1.2. Nguồn gốc phát sinh PAH	7
1.3. Tình trạng ô nhiễm PAH và các biện pháp xử lý	9
1.3.1. Tình trạng ô nhiễm PAH	9
1.3.2. Các biện pháp xử lý tẩy độc PAH	11
1.4. Phân hủy sinh học các PAH bởi vi sinh vật	14
1.4.1. Vi sinh vật phân hủy PAH	14
1.4.2. Cơ chế phân hủy PAH bởi vi sinh vật	16
1.4.3. Các yếu tố ảnh hưởng tới quá trình phân hủy PAH	22
1.5. Các phương pháp phân loại vi sinh vật	26
1.5.1. Phân loại theo phương pháp cổ điển	26
1.5.2. Phương pháp phân loại bằng sinh học phân tử	26
1.6. Quá trình xử lý sinh học nước thải và thành phần các chất ô nhiễm điển hình trong nước thải công nghiệp	29
1.6.1. Quá trình xử lý sinh học nước thải	29
1.6.2. Thành phần các chất ô nhiễm điển hình trong nước thải công nghiệp	31
Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP	33
2.1. Nguyên liệu, hóa chất và các thiết bị sử dụng	33

2.1.1. Nguyên liệu	33
2.1.2. Hóa chất, môi trường	33
2.1.3. Thiết bị	34
2.2. Phương pháp nghiên cứu	35
2.2.1. Thu thập mẫu nước thải	35
2.2.2. Làm giàu tập đoàn vi sinh vật trên môi trường chứa hỗn hợp PAH	35
2.2.3. Phân lập một số chủng vi khuẩn có khả năng sử dụng PAH	35
2.2.4. Quan sát hình thái tế bào trên kính hiển vi điện tử quét	36
2.2.5. Phân loại, định tên và xây dựng cây phát sinh chủng loại	36
2.2.6. Các yếu tố ảnh hưởng lên sự phát triển của các chủng vi khuẩn được lựa chọn	37
2.2.7. Xác định khả năng phân hủy pyrene của vi khuẩn	42
2.3. Thử nghiệm trên quy mô 5 lít	43
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	44
3.1. Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn có khả năng phát triển trên môi trường chứa PAH	44
3.2. Đặc điểm khuẩn lạc và hình thái tế bào của chủng BTL4	47
3.3. Xác định trình tự đoạn gen mã hóa 16S rRNA của chủng vi khuẩn BTL4	47
3.3.1. Tách chiết DNA tổng số và nhân đoạn gen 16S rRNA của chủng BTL4	47
3.3.2. Tách dòng gen 16S rRNA của chủng BTL4	48
3.3.3 Trình tự đoạn gen mã hóa 16S rRNA của chủng BTL4	50
3.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ, pH đến sự phát triển của chủng BTL4	53
3.4.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ	53
3.4.2. Ảnh hưởng của pH	54
3.5. Khả năng phân hủy pyrene của chủng BTL4	55
3.6. Kết quả mô hình xử lý nước thải ở quy mô 5 lít	58
3.6.1. Quá trình hoạt hóa bùn	58
3.6.2. Xử lý nước thải ở quy mô 5 lít	59
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	62
TÀI LIỆU THAM KHẢO	64

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT

bp	Base pair (cặp bazơ)
DNA	Deoxyribonucleic acid
LB	Luria-Bertani
PAH	Polycyclic aromatic hydrocacbon (hydrocarbon thơm đa nhân)
PCR	Polymerase Chain Reaction (phản ứng chuỗi trùng hợp)
ppm	Đơn vị một phần triệu (mg/l)
RNA	Ribonucleic acid
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid
USEPA	United State Environmental Protection Agency (Cục bảo vệ môi trường Hoa Kỳ)
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside
μ l	Microlit
μ m	Micromet

DANH MỤC CÁC BẢNG

<i>Bảng 1.1:</i>	Tính chất vật lý của một số PAH	4
<i>Bảng 1.2:</i>	Một số chủng vi sinh vật có khả năng phân hủy PAH	15
<i>Bảng 1.3:</i>	Một số phương pháp phân loại vi sinh vật	28
<i>Bảng 3.1:</i>	Chủng vi khuẩn phát triển trên môi trường khoáng có bổ sung hỗn hợp PAH	46
<i>Bảng 3.2:</i>	Chủng vi khuẩn phát triển trên môi trường khoáng có bổ sung hỗn hợp PAH và 0,5% glucose.....	46
<i>Bảng 3.3:</i>	Mức độ tương đồng của BTL4 so với một số chủng vi khuẩn.....	52
<i>Bảng 3.4:</i>	Kết quả đo và phân tích 1 số chỉ tiêu của nước thải KCN Từ Liêm trước và sau xử lý ở quy mô 5 lit phòng thí nghiệm	61

DANH MỤC CÁC HÌNH

<i>Hình 1.1:</i>	Cấu trúc hóa học của một số hydrocarbon thơm đa nhân (PAH).....	3
<i>Hình 1.2:</i>	Các con đường phân hủy hiếu khí PAH chính của vi khuẩn và nấm	16
<i>Hình 1.3:</i>	Con đường phân hủy naphthalene ở <i>Pseudomonas</i>	19
<i>Hình 1.4:</i>	Con đường phân hủy pyrene ở <i>Mycobacterium</i> sp. AP1	20
<i>Hình 1.5:</i>	Con đường phân hủy anthracene ở <i>Mycobacterium</i> sp. PYR-1	21
<i>Hình 3.1:</i>	Mẫu làm giàu lần 3 của mẫu nước thải lấy từ khu công nghiệp Từ Liêm	44
<i>Hình 3.2:</i>	Tập đoàn vi sinh vật trên môi trường khoáng thạch với 50 ppm PAH sau 3 lần làm giàu: (A) có bổ sung glucose, (B) không bổ sung glucose	45
<i>Hình 3.3:</i>	(A) Hình thái khuẩn lạc và (B) hình thái tế bào chủng BTL 4.....	47
<i>Hình 3.4:</i>	Điện di đồ DNA tổng số chủng BTL4 (A), và kiểm tra nhân đoạn gen 16S rRNA bằng kỹ thuật PCR (B).....	48
<i>Hình 3.5:</i>	Kết quả biến nạp chủng BTL4(A), và điện di đồ DNA plasmid của dòng số 2 từ BTL4 trên gel agarose 1% plasmid của chủng lạc màu xanh (B)	49
<i>Hình 3.6:</i>	Sản phẩm cắt DNA plasmid của dòng số 2 từ BTL4	50
<i>Hình 3.7:</i>	Kết quả giải trình tự đoạn gen 16S rRNA của chủng BTL4	51
<i>Hình 3.8:</i>	Cây phát sinh chủng loại của chủng BTL4	52
<i>Hình 3.9:</i>	Đồ thị thể hiện sự phát triển của chủng BTL4 ở 30 ⁰ C và 37 ⁰ C	54
<i>Hình 3.10:</i>	Đồ thị mật độ quang phổ của chủng BTL4 ở các điều kiện pH khác nhau	54
<i>Hình 3.11:</i>	Kết quả nuôi BTL4 ở các nồng độ pyrene khác nhau	56
<i>Hình 3.12:</i>	Kết quả phân tích khả năng phân hủy pyrene của chủng BTL4	56
<i>Hình 3.13:</i>	Quá trình hoạt hóa bùn sau 3 tuần.....	59
<i>Hình 3.14:</i>	Màu sắc của nước thải trước xử lý (A, C) và sau xử lý (B, D) với thời gian lưu của nước thải là 3 ngày	60

MỞ ĐẦU

Nước là nguồn tài nguyên quý giá của nhân loại, không một ai, không một sinh vật nào có thể sống được nếu thiếu nước. Tuy nhiên cùng với sự phát triển của mình, con người đang ngày càng làm cho nguồn nước bị ô nhiễm nghiêm trọng trong đó phải kể đến nước thải công nghiệp.

Xã hội phát triển, các ngành công nghiệp khác nhau phát triển làm cho các khu công nghiệp không ngừng tăng về số lượng. Tính đến tháng 10 năm 2009, toàn quốc đã có 233 khu công nghiệp được thành lập theo Quyết định của Thủ tướng Chính phủ. Trong đó, 171 khu công nghiệp đã đi vào hoạt động, với tổng diện tích đất 57264 ha, đạt tỷ lệ lấp đầy trung bình khoảng 46% [2]. Không ai có thể phủ nhận sự độc hại của nước thải công nghiệp, và việc xử lý chúng là một trong những vấn đề đã được quan tâm, chú ý từ lâu, tuy nhiên do mức độ ô nhiễm và thành phần nước thải của các khu công nghiệp phụ thuộc vào thành phần các nhà máy, làng nghề thuộc khu công nghiệp, làm cho quá trình xử lý nước thải công nghiệp gặp rất nhiều khó khăn.

Một trong những chất gây ô nhiễm nghiêm trọng nhất của nước thải công nghiệp là các hydrocarbon thơm đa vòng (PAH - Polycyclic Aromatic Hydrocarbon). PAHs có nguồn gốc khá đa dạng từ dầu mỏ, than đá, sản phẩm phụ của việc đốt nhiên liệu... [1].

PAHs tồn tại trong không khí có khả năng phản ứng với ozone và tạo thành ozone-alken có khả năng gây ung thư tồn tại trong khí quyển, ngoài ra nếu PAHs xâm nhập vào cơ thể con người thông qua con đường thực phẩm, tiếp xúc trực tiếp qua da... có thể gây ung thư, giảm tuổi thọ, đột biến thai nhi... Hầu hết PAHs đều ít tan trong nước nhưng tan tốt trong chất béo và khả năng gây ô nhiễm môi trường của chúng phụ thuộc vào khả năng tan của chúng trong môi trường nước. Do tác hại của PAH với con người mà từ lâu con người đã quan tâm nghiên cứu các phương pháp phân hủy PAH. Các PAH được nghiên cứu thường là các PAH có cấu tạo đơn giản như anthracene, naphthalene, phenanthrene, pyren ... trong đó pyren là chất có cấu tạo phức tạp, có khả năng gây độc hơn những chất còn lại, vì vậy nếu vi

khuẩn có khả năng phân hủy pyren thì cũng có khả năng phân hủy các loại PAH đơn giản khác. Có nhiều phương pháp phân hủy pyren như các phương pháp vật lý, hóa học tuy nhiên những phương pháp này vừa đắt lại vừa không triệt để nên khó có thể thực hiện trên quy mô lớn. Tuy nhiên ngày nay các nhà khoa học đã thấy rằng không những có thể sử dụng vi sinh vật để loại bỏ pyren mà đó còn là phương pháp vừa rẻ, triệt để và có khả năng thực hiện trên quy mô công nghiệp, có thể tiến hành thuận lợi trong điều kiện tự nhiên, độ an toàn cao và thân thiện với môi trường. Do vậy, trên thế giới và ở Việt Nam đã có nhiều nhà khoa học tập trung nghiên cứu và điều tra về phân bố, cấu trúc các tập đoàn vi sinh vật, khả năng phân hủy pyren của các chủng đơn cũng như các tập đoàn vi sinh vật.

Trong phương pháp này, vi sinh vật đóng vai trò quyết định do có khả năng xử lý các chất có trong nước thải. Vì vậy, chúng tôi tiến hành thực hiện đề tài: **"Phân lập, tuyển chọn chủng vi sinh vật có khả năng phân hủy pyrene và khả năng xử lý nước thải ở quy mô phòng thí nghiệm 5 lít"**.

Mục tiêu của đề tài

- Phân lập tuyển chọn định tên , và kiểm tra khả năng phân hủy pyrene của chủng vi khuẩn được phân lập từ nguồn nước thải của khu công nghiệp Từ Liêm
- Nghiên cứu khả năng xử lý nước thải của tập đoàn vi sinh vật được phân lập từ nguồn nước thải của khu công nghiệp Từ Liêm ở quy mô 5 lít

Nội dung của đề tài:

- Phân lập, tuyển chọn một số chủng vi sinh vật trên môi trường chứa PAH.
- Nghiên cứu khả năng phân hủy pyrene của chủng vi khuẩn đại diện từ những chủng vi khuẩn đã tuyển chọn được.
- Đánh giá ảnh hưởng pH, nhiệt độ lên sự sinh trưởng...
- Thử nghiệm khả năng xử lý nước thải bởi các chủng vi khuẩn phân lập được ở quy mô 5 lít phòng thí nghiệm