

## NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG PHÂN HỦY PHENOL CỦA CHỦNG VI KHUẨN DX3 PHÂN LẬP TỪ NƯỚC THẢI KHO XĂNG DẦU ĐỔ XÁ, HÀ NỘI

Vũ Thị Thanh\*, Lê Thị Nhi Công, Nghiên Ngọc Minh

Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam, \*thanhvu1201@gmail.com

**TÓM TẮT:** Hiện nay, việc xử lý phenol trong nước thải ô nhiễm dầu theo phương pháp phân hủy sinh học được nhiều nhà khoa học trên thế giới cũng như ở Việt Nam quan tâm nghiên cứu. Chúng vi khuẩn DX3 được phân lập từ bể chứa nước thải kho xăng dầu Đỗ Xá, Thường Tín, Hà Nội sau 3 lần làm giàu liên tiếp trên môi trường muối khoáng Gost có bổ sung 50 mg/l phenol. Khuẩn lạc chủng vi khuẩn DX3 có hình tròn, màu trắng đục, nhớt, đường kính khoảng 1,5-2 mm, không ăn sâu vào thạch. Dưới kính hiển vi điện tử quét, tế bào có dạng hình que ngắn, kích thước tế bào vi khuẩn 1,14  $\mu\text{m} \times 2,67 \mu\text{m}$ , hai đầu vi khuẩn tròn, màng tế bào mỏng, nhẵn, có tiền mao ngắn xung quanh. Dựa vào đặc điểm hình thái và so sánh trình tự gene mã hóa 16S rRNA, đã xác định được chủng *Bacillus* sp. DX3 có độ tương đồng cao tới 99% với loài *Bacillus megaterium* IAM 13418. Trình tự nucleotide này đã được đăng ký trên GenBank với mã số KC845545. Chủng vi khuẩn này có khả năng phân hủy 99,95% phenol với nồng độ ban đầu là 150 mg/l trong môi trường khoáng sau 7 ngày nuôi cấy ở 30°C. Với những kết quả trên, chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. DX3 đã góp phần làm phong phú thêm số lượng các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* nói riêng và hệ vi sinh vật có khả năng phân hủy phenol cao trong nước thải ô nhiễm dầu nói chung để phục vụ cho công nghệ phân hủy sinh học nguồn nước thải sau này.

*Từ khóa:* *Bacillus*, nước thải công nghiệp, ô nhiễm dầu, phân hủy phenol.

### MỞ ĐẦU

Ngành công nghiệp sản xuất dầu mỏ ngày một phát triển mạnh và đã trở thành thế mạnh kinh tế đối với những quốc gia có tiềm năng dầu mỏ, trong đó có Việt Nam. Tuy nhiên, bên cạnh nguồn lợi về kinh tế do ngành công nghiệp này mang lại, hiểm họa ô nhiễm môi trường có nguyên nhân từ những sự cố khai thác, vận chuyển trên biển và dự trữ dầu mỏ tăng lên [2]. Ngoài sự cố tràn dầu phải kể đến một số lượng lớn cặn thải xăng dầu tồn đọng trong các kho chứa, cũng như hàm lượng xăng dầu được sử dụng cho các loại động cơ, các loại dây chuyền sản xuất công nghiệp cũng làm tăng lượng dầu trong nước thải công nghiệp và nước thải sinh hoạt. Trong nước thải ô nhiễm dầu, phenol là một chất gây ô nhiễm nghiêm trọng và có nhiều tác động xấu đến môi trường xung quanh. Phenol là một hợp chất vòng thơm rất độc, khó phân hủy, gây ra mùi khó chịu, ảnh hưởng lớn đến sản xuất nông nghiệp, gia tăng bệnh tật và tỷ lệ người mắc bệnh kể cả ở nồng độ rất thấp, nó cũng là tác nhân tiềm ẩn gây ung thư và nhiều bệnh nguy hiểm cho con người [4]. Chính vì vậy, việc loại bỏ phenol ra khỏi nguồn nước là một vấn đề cấp thiết hiện nay.

Có nhiều phương pháp đã được áp dụng để xử lý ô nhiễm phenol như sử dụng hóa chất, hấp phụ, lắng đọng. Tuy nhiên, các phương pháp này đòi hỏi chi phí lớn và có thể gây ra ô nhiễm thứ cấp. Thực nghiệm cho thấy, phương pháp xử lý phenol bằng công nghệ sinh học thể hiện tính ưu việt riêng. Đó là giá thành rẻ, có thể tiến hành thuận lợi trong điều kiện tự nhiên, độ an toàn cao và thân thiện với môi trường. Quá trình phân hủy sinh học phenol cũng như các hợp chất hydrocacbon thơm đa nhân bởi các vi sinh vật thường xảy ra với tốc độ chậm, vì vậy, việc tạo điều kiện thích hợp cho tập đoàn vi sinh vật phát triển tốt nhất, có hiệu quả phân hủy sinh học cao có thể coi là chìa khóa của công nghệ phân hủy sinh học [3]. Để góp phần xử lý ô nhiễm phenol trong nước thải công nghiệp, chủng vi khuẩn DX3 đã được phân lập từ nước thải kho xăng dầu Đỗ Xá, Thường Tín, Hà Nội và đánh giá khả năng phân hủy sinh học phenol của vi khuẩn.

### VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Chủng vi khuẩn DX3 được phân lập từ bể chứa nước thải kho xăng dầu Đỗ Xá, Thường Tín, Hà Nội.

### Phân lập vi khuẩn

Phương pháp làm giàu 3 lần liên tiếp được dùng để phân lập chủng vi khuẩn DX3. Mẫu nước thải được làm giàu trên môi trường khoáng Gost dịch, bổ sung 50 mg/l phenol làm nguồn cơ chất. Sau khi làm giàu 3 lần liên tiếp, mẫu được pha loãng tới hạn trong nước muối sinh lý 0,85% và cấy gọt trên môi trường khoáng Gost thạch có bổ sung 50 mg/l phenol để tách riêng từng chủng sạch.

### Quan sát hình thái khuẩn lạc và hình thái tế bào

Hình thái khuẩn lạc của chủng vi khuẩn DX3 được quan sát trên môi trường khoáng Gost thạch.

Hình thái tế bào của chủng vi khuẩn DX3 được quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét JEOL V5410LV của Nhật Bản với sự phối hợp của Viện 69, Bộ Tư lệnh Lãng.

### Phân loại vi khuẩn DX3 dựa trên so sánh trình tự gene 16S rRNA

DNA tổng số của chủng vi khuẩn DX3 được tách chiết theo mô tả của Zhou et al. (1996) [8] và được dùng làm khuôn để khuếch đại gene 16S rRNA với cặp mồi đặc hiệu 341f (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') và 907r (5'-CCGTCATCCMTTGTGAGTTT-3') theo Mendoca et al. (2004) [6]. Chu trình phản ứng: 94°C trong 5 phút; lặp lại 32 chu kỳ (94°C trong 1 phút; 56°C trong 30 giây; 72°C trong 1 phút); 72°C trong 7 phút và 4°C để bảo quản. Tiếp đó sản phẩm PCR (kích thước khoảng 550 bp) được gắn vào vector pBT, biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* DH5 $\alpha$ . Dòng plasmid chứa đoạn gen mong muốn được tách chiết, tinh sạch bằng bộ kit Gene JET<sup>TM</sup> plasmid Miniprep kit của

nhà sản xuất Fermentas và xác định trình tự trên máy xác định trình tự tự động ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer. Sử dụng phần mềm Blast, Bioedit, Clustal X và Treeview để so sánh trình tự nucleotide và xây dựng cây phát sinh chủng loại của chủng vi khuẩn đại diện với các chủng vi khuẩn có trên GenBank (NCBI).

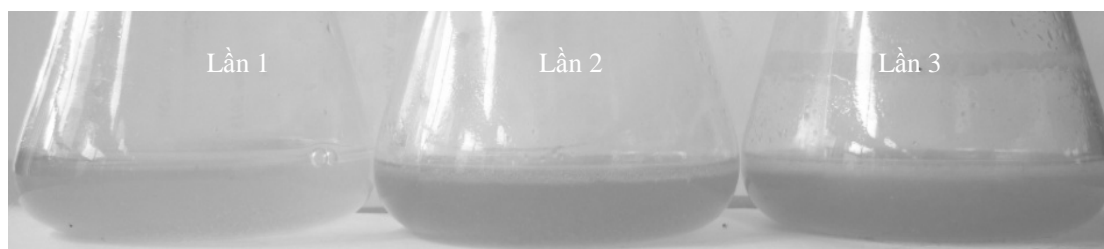
### Nghiên cứu khả năng phân hủy phenol của chủng vi khuẩn DX3

Chủng vi khuẩn DX3 được nuôi lắc trên môi trường khoáng Gost dịch có bổ sung 150 mg/l phenol được nuôi lắc với tốc độ 200 vòng/phút ở 30°C. Khả năng phân hủy phenol của chủng vi khuẩn được xác định bằng phương pháp đo quang theo Standard Method SMEWW 5530 C (Choloroform Extraction Method). Tương đương với tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 6216:1996 (ISO 6439-1990) - Phương pháp trắc phổ dùng 4-aminoantipyrin. Quá trình phân tích phenol được thực hiện với sự phối hợp của Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

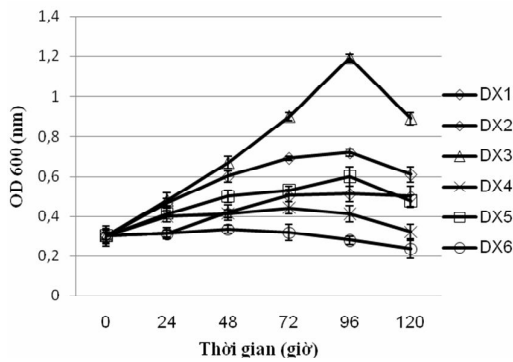
## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Phân lập chủng DX3 từ nước thải kho xăng dầu

Sau 3 lần làm giàu liên tiếp, chúng tôi nhận thấy màu sắc và độ đục của môi trường thay đổi rõ rệt so với mẫu nước thải ban đầu. So sánh kết quả các lần làm giàu thứ nhất, lần làm giàu thứ 2 và thứ 3 sau 24 giờ, màu môi trường thay đổi rõ rệt và sinh khối bám trên thành bình ngày càng tăng lên, điều đó cho thấy sự sinh trưởng nhanh chóng của các chủng vi sinh vật trong mẫu nước thải (hình 1).



Hình 1. Mẫu làm giàu sau 3 lần liên tiếp trên môi trường khoáng Gost dịch có bổ sung 50 mg/l phenol



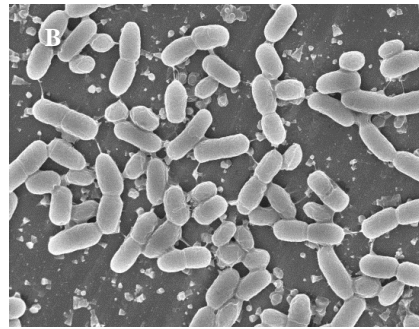
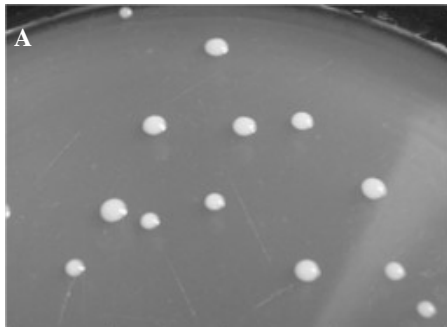
Hình 2. Khả năng sinh trưởng của các chủng vi khuẩn trên môi trường Gost có bổ sung 50 mg/l phenol

Sau khi pha loãng lần làm giàu thứ 3 và cấy gạt trên môi trường khoáng Gost thạch có bổ sung 50 mg/l phenol, chúng tôi đã phân lập được 6 chủng vi khuẩn. Sau đó, 6 chủng vi khuẩn này

được cấy chuyển sang môi trường khoáng Gost dịch có bổ sung 50 mg/l phenol, chúng tôi nhận thấy chủng DX3 là chủng vi khuẩn sinh trưởng nhanh nhất. Sau 24 giờ nuôi cấy, lượng sinh khối của chủng này bám trên thành bình khá lớn và thời gian sinh trưởng mạnh nhất là trong vòng 96 giờ (hình 2). Vì vậy, chúng tôi sử dụng chủng vi khuẩn này để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo.

### Hình thái khuẩn lạc và hình thái tế bào của chủng vi khuẩn DX3

Trên môi trường khoáng Gost thạch có bổ sung 50 mg/l phenol, chủng DX3 có khuẩn lạc tròn, màu trắng đục, nhớt, đường kính khoảng 1,5-2 mm, không ăn sâu vào thạch (hình 3A). Dưới kính hiển vi điện tử quét với độ phóng đại 7.500 lần, tế bào có dạng hình que ngắn, kích thước tế bào vi khuẩn  $1,14 \mu\text{m} \times 2,67 \mu\text{m}$ . Hai đầu vi khuẩn tròn, màng tế bào mỏng, nhăn, có tiên mao ngắn xung quanh, không có màng nhầy (hình 3B).



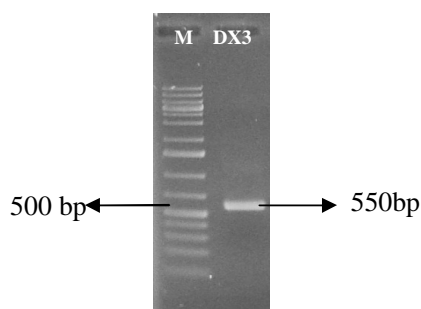
Hình 3. A. Hình thái khuẩn lạc; B. Hình thái tế bào với độ phóng đại 7.500 lần của chủng vi khuẩn DX3

### Phân loại chủng DX3 dựa trên trình tự đoạn gene 16S rRNA

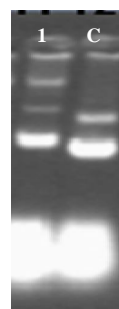
DNA tổng số của chủng DX3 được tách chiết, nhân đoạn gene 16S rRNA bằng cặp mồi 341f và 907r với chu trình nhiệt phản ứng như đã nêu ở phần phương pháp. Điện di đồ sản phẩm PCR thu được 1 băng rõ nét, đặc hiệu, có kích thước khoảng 550 bp, hoàn toàn phù hợp với tính toán lý thuyết (hình 4).

Sản phẩm PCR được tinh sạch, gắn vào vector tách dòng pBT và biến nạp vào tế bào

khả biến *E. coli* DH5 $\alpha$ . Một dòng khuẩn lạc trắng được tách chiết DNA plasmid (hình 5). DNA plasmid của dòng khuẩn lạc này được kiểm tra bằng cách PCR lần 2 với cặp mồi 341f và 907r với DNA plasmid của dòng khuẩn lạc số 2 làm khuôn (thành phần phản ứng và chu trình nhiệt như lần PCR thứ nhất), kết quả cho thấy dòng khuẩn lạc trắng đó chứa đựng đoạn gene cần thiết (550 bp). Do đó, DNA plasmid của dòng khuẩn lạc đó được tách chiết, tinh sạch và xác định trình tự gene.



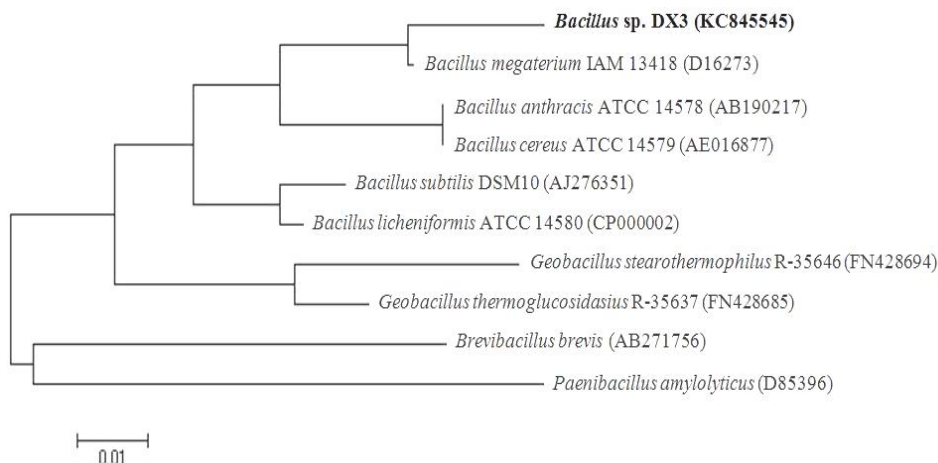
Hình 4. Sản phẩm nhân đoạn gene mã hóa 16S rRNA của chủng DX3  
M. Thang DNA chuẩn kích thước 100 bp;  
DX3. Sản phẩm PCR của chủng DX3



Hình 5. Sản phẩm điện di DNA plasmid của dòng số 2 trên gen agarose 1%  
C. DNA plasmid dòng khuẩn lạc xanh (đối chứng); 1. DNA plasmid dòng khuẩn lạc số 2

Dựa vào việc so sánh trình tự đoạn gene 16S rRNA của chủng DX3 với trình tự của các vi sinh vật prokaryote khác được công bố trên GeneBank, chúng tôi đã xây dựng được cây phát sinh chủng loại của chủng DX3 (hình 6). Từ hình 6, có thể nhận thấy, chủng DX3 có quan hệ gần gũi với một số chủng thuộc chi

*Bacillus*. Trình tự đoạn gene 16S rRNA của chủng DX3 có độ tương đồng cao tới 99% với loài *Bacillus megaterium* IAM 13418. Vì vậy, chúng tôi tạm đặt tên chủng vi khuẩn này là *Bacillus* sp. DX3. Gene 16S rRNA của chủng vi khuẩn này được đăng ký trên Genbank (NCBI) với mã số KC845545.



Hình 6. Cây phát sinh chủng loại của chủng *Bacillus* sp. DX3

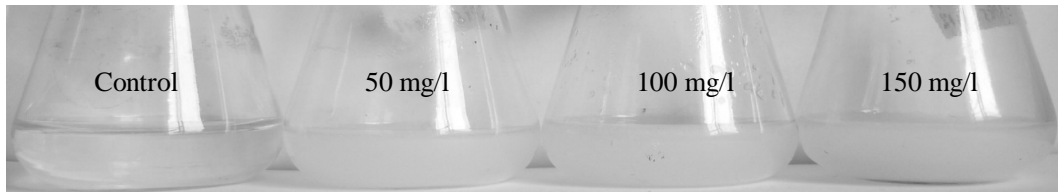
#### Khả năng phân hủy phenol của chủng vi khuẩn DX3

Trong nước thải kho xăng dầu ngoài các cặn hữu cơ, hợp chất lưu huỳnh, nitơ, hợp chất chứa nitơ và các hydrocarbon thơm, đặc biệt, mẫu nước thải mà chúng tôi thu thập được có nồng độ phenol khá cao (8 mg/l). Để xác định xem ở nồng độ nào chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. DX3 có khả năng sử dụng phenol là tốt nhất, chúng

tôi lựa chọn các nồng độ 50, 100 và 150 mg/l bổ sung vào môi trường nuôi cấy của chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. DX3 và nuôi ở 30°C. Kết quả về cảm quan cho thấy, tại nồng độ 150 mg/l, chủng *Bacillus* sp. DX3 sinh trưởng nhanh, màu sắc môi trường cũng thay đổi rõ rệt (từ màu trắng trong chuyển sang màu trắng đục) và lượng sinh khối bám trên thành bình khá lớn (hình 7). Vì vậy, chúng tôi đã lựa chọn nồng độ

150 mg/l để đánh giá khả năng phân hủy phenol của chủng *Bacillus* sp. DX3. Kết quả cho thấy, sau 7 ngày nuôi cấy trên môi trường khoáng

dịch với 150 mg/l, hàm lượng phenol đã giảm xuống còn 0,067 mg/l so với control là 143,061 mg/l, đạt hiệu suất 99,95%.



Hình 7. Khả năng sinh trưởng của chủng *Bacillus* sp. DX3 trên môi trường muối khoáng Gost có bổ sung phenol ở các nồng độ khác nhau

Hiện nay, trên thế giới cũng có một số chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* có khả năng phân hủy phenol đã được công bố. Shail et al. (2009) [7] đã công bố chủng vi khuẩn *Bacillus cereus* (DQ002384) có khả năng phân hủy 91,63% phenol với hàm lượng ban đầu 500 (mg/l) có bổ sung 1% glucose sau 7 ngày nghiên cứu. Trong nghiên cứu của Banerjee & Ghoshal (2010), chủng *Bacillus cereus* AKG1 MTCC9817 có khả năng phân hủy 99,6% phenol cũng với hàm lượng ban đầu là 500 mg/l trong vòng 26 ngày [1]. Lu et al. (2012) [5] đã phân lập được chủng *Bacillus amyloliquefaciens* từ mẫu nước thải bị ô nhiễm phenol có khả năng phân hủy hoàn toàn phenol ở nồng độ 200 mg/l. Như vậy, so sánh với các chủng vi khuẩn khác trên thế giới khả năng phân hủy phenol của chủng *Bacillus* sp. DX3 là khá cao. Điều này cũng hoàn toàn phù hợp bởi các chủng vi khuẩn trên được phân lập từ các nguồn nước thải bị ô nhiễm phenol cao hơn so với nguồn nước bề chứa nước thải kho xăng dầu Đỗ Xá, vì vậy, trong nguồn lấy mẫu đã có sẵn lượng lớn chủng vi sinh vật tồn tại. Mặt khác, các nghiên cứu đó hoặc đã có bổ sung thêm glucose (1% w/v) làm nguồn carbon bổ sung, hoặc thời gian nuôi cấy khá lâu (26 ngày) trong khi chủng *Bacillus* sp. DX3 chúng tôi mới thử nghiệm sau 7 ngày trên 150 mg/l phenol là nguồn carbon và năng lượng duy nhất.

#### KẾT LUẬN

Chủng vi khuẩn DX3 phân lập từ bể chứa nước thải kho xăng dầu Đỗ Xá, Thường Tín, Hà Nội có khuẩn lạc tròn, màu trắng đục, nhớt, đường kính khoảng 1,5-2 mm, không ăn sâu vào

thạch. Dưới kính hiển vi điện tử quét với độ phóng đại 7500 lần, tế bào có dạng hình que ngắn, kích thước tế bào vi khuẩn 1,14  $\mu\text{m} \times 2,67 \mu\text{m}$ . Hai đầu vi khuẩn tròn, màng tế bào mỏng, nhẵn, có tiên mao ngắn xung quanh, không có màng nhầy. So sánh trình tự gene 16S rRNA, chủng DX3 có độ tương đồng cao tới 99% với loài *Bacillus megaterium* IAM 13418 và được đặt tên là *Bacillus* sp. DX3. Trình tự gene 16Sr RNA của chủng *Bacillus* sp. DX3 đã được đăng ký trên ngân hàng gene NCBI với mã số KC845545. Chủng *Bacillus* sp. DX3 có khả năng phân hủy 99,95% phenol với hàm lượng ban đầu là 150 mg/l ở 30°C sau 7 ngày nuôi cấy.

**Lời cảm ơn:** Công trình được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài do Bộ Khoa học và Công nghệ cấp, mã số KC04.21/11-15 và sử dụng trang thiết bị Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Banerjee A., Ghoshal A. K., 2010. Biodegradation of phenol by isolated *Bacillus cereus* Immobilized in Alginate. Conference paper of Genman National library of Science and Technology. 394-401.
2. Nguyễn Bá Diên, 2008. Tổng quan pháp luật Việt Nam về phòng, chống ô nhiễm dầu ở các vùng biển. Tạp chí Khoa học, Đại học Quốc Gia Hà Nội, Kinh tế-Luật, 24: 224-238.
3. Đinh Thúy Hằng, Lê Gia Hy, Lưu Thị Bích Thảo, 1998. Vi sinh vật phân hủy

- hydrocarbon dầu mỏ. Tạp chí Khoa học và Công nghệ, 16(3): 1-12.
4. Trương Thế Kỹ, 2000. Hóa hữu cơ 1: Hợp chất hữu cơ đơn chức và đa chức. Nxb. Y học.
  5. Lu D., Zhang Y., Niu S., Wang L., Lin S., Wang C., Ye W., Yan C., 2012. Study of phenol biodegradation using *Bacillus amyloliquefaciens* strain WJDB-1 immobilized in alginate-chitosan-alginate (ACA) microcapsules by electrochemical method. Apr., 23(2): 209-219.
  6. Mendoca E., Anselmo A. M., Martins A., 2004. Biodegradation of natural phenolic compounds as single mixed substrates by *Fussarium flocciferum*, EJB, 6(2): 1-8.
  7. Shail S., Berr B., Ram C., 2009. Biodegradation of Phenol in Batch Culture by Pure and Mixed Strains of *Paenibacillus* sp. and *Bacillus cereus*. Polish Journal of Microbiology., 58(4): 319-325.
  8. Zhou J., Bruns M. A., Tiedje J. M., 1996. DNA Recovery from soils of diverse composition, Appl Environ Microbiol, 62(2): 316-322.

### STUDY ON PHENOL BIODEGRADATION OF THE BACTERIAL STRAIN DX3 ISOLATED FROM WASTEWATER COLLECTED IN PETROLEUM STORAGE TANKS IN DO XA, HANOI

Vu Thi Thanh, Le Thi Nhi Cong, Nghiem Ngoc Minh

Institute of Biotechnology, VAST

#### SUMMARY

Recently, universal and domestic scientists have been interested in the handling of phenol according to biodegradable methods. The bacterial strain DX3 was isolated from wastewater samples collected in Do Xa petroleum warehouse in Thuong Tin district, Hanoi city after triplicate enrichments in liquid mineral salt medium Gost supplemented with 50 mg/l phenol. Colonies of the DX3 with 1.5 mm to 2 mm in diameter were milky white, round, and mucilaginous but did not root in agar. The observation of DX3 cell morphology by SEM showed a rod shape of 1.14-2.67  $\mu\text{m}$ . The bacterium was round, smooth with thin membrane, short flagellum around. Based on the morphological characteristics and sequence alignment of 16S rRNA encoding gene, strain DX3 was identified to have a high sequence homology up to 99% with *Bacillus megaterium* IAM 13418 and then named *Bacillus* sp. DX3. This sequence was submitted to the GenBank with Accession Number KC845545. This strain was able to biodegrade 99.95% of total phenol with the initial concentration of 150 mg/l in the medium after 7 days of cultivation at 30°C. From these obtained results, the *Bacillus* sp. DX3 has contributed to enriching the number of bacteria of the genus *Bacillus* in particular and microorganisms in general which are capable of highly decomposing phenol from oil contaminated wastewater to develop phenol biodegradable technology.

*Keywords:* *Bacillus*, bacteria, biodegradation, oil pollution.

*Ngày nhận bài:* 15-7-2013