

PHÂN LẬP VI KHUẨN PHÂN HỦY XYLENE TỪ HỆ THỐNG XỬ LÝ NƯỚC THẢI

Nguyễn Thị Phi Oanh và Nguyễn Vũ Bích Triệu

Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 18/04/2017

Ngày nhận bài sửa: 10/06/2017

Ngày duyệt đăng: 30/10/2017

Title:

Isolation of xylene-degrading bacteria from a wastewater treatment system

Từ khóa:

Hệ thống xử lý nước thải, sắc ký khí, sự phân hủy sinh học, vi khuẩn, xylene

Keywords:

Bacteria, biodegradation, gas chromatography, wastewater treatment system, xylene

ABSTRACT

Xylene is a monoaromatic hydrocarbon which is widely used as solvent in laboratories. The compound is used as solvent in leather, rubber, printing industries as well as one of the major components of gasoline. Due to its water solubility, xylene is considered a contaminant in water reservoirs, especially groundwater, posing risk for human health. Sixteen bacterial isolates grown in minimal medium supplemented with xylene as the only carbon source were isolated from sediment samples in the sedimentation chamber of the wastewater treatment system of College of Natural Sciences, Can Tho University. Among these isolates, strains XL3.1, XL6.2 and XL22.1 were able to degrade more than 95% xylene (0.125% v/v) after 24 hours of incubation. Strain XL6.2 was the best xylene degrader (97.81%) and was genetically identified as *Rhodococcus* sp. XL6.2.

TÓM TẮT

Xylene là một trong những hydrocarbon thơm được sử dụng phổ biến như dung môi trong các phòng thí nghiệm. Trong công nghiệp, xylene được dùng làm dung môi để thuộc da, sản xuất đồ cao su, in ấn và là một trong các thành phần chính của xăng. Do tan trong nước nên xylene được xem là hợp chất gây ô nhiễm nguồn nước đặc biệt là nước ngầm từ đó ảnh hưởng đến sức khỏe cộng đồng. Từ mẫu bùn thu ở bể lắng của hệ thống xử lý nước thải của Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ, mười sáu dòng vi khuẩn phát triển trên môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung xylene như nguồn carbon duy nhất đã được phân lập trong đó ba dòng vi khuẩn XL3.1, XL6.2 và XL22.1 có khả năng phân hủy hơn 95% xylene (0,125% v/v) sau 24 giờ nuôi cấy. Dòng vi khuẩn XL6.2 phân hủy xylene hiệu quả nhất (97,81%) và được định danh khoa học là *Rhodococcus* sp. XL6.2.

Trích dẫn: Nguyễn Thị Phi Oanh và Nguyễn Vũ Bích Triệu, 2017. Phân lập vi khuẩn phân hủy xylene từ hệ thống xử lý nước thải. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 52a: 99-103.

1 GIỚI THIỆU

Xylene là một trong những hydrocarbon thơm hiện diện nhiều trong các nhiên liệu hóa thạch. Hiện nay, xylene được sử dụng phổ biến như dung môi trong các ngành công nghiệp như nhuộm, in,... và trong các phòng thí nghiệm. Do có thể hòa tan trong nước nên xylene được xem là một trong

những hợp chất gây ô nhiễm nước mặt và nước ngầm (Nakhla *et al.*, 2003, Annesser *et al.*, 2008). Ô nhiễm nước ảnh hưởng rất lớn đến quần thể phiêu sinh vật, động thực vật thủy sinh và sức khỏe cộng đồng. Các nghiên cứu cho thấy xylene có thể gây độc cấp tính và gây đột biến gen ở động vật hữu nhũ (Dean, 1985).

Hệ thống xử lý nước thải của Khoa Khoa học Tự nhiên là nơi chứa và xử lý nước thải từ các phòng thực hành và phòng thí nghiệm của Bộ môn Hóa học. Kết quả điều tra cho thấy ngoài thành phần chất thải là các hợp chất vô cơ, nước thải còn chứa một lượng không nhỏ các hợp chất hữu cơ có vòng thơm như benzene, toluene, xylene, phenol, pyridine, ... Hiện tại, nước thải chỉ được xử lý bằng phương pháp hóa học như sục vôi, lưu huỳnh, sau đó nước được bơm qua bể lắng và cuối cùng được chuyển sang bể có chứa than hoạt tính trước khi thoát ra ngoài. Quá trình xử lý này có thể hấp thu tốt các chất thải vô cơ, tuy nhiên, các chất thải hữu cơ vẫn có thể lưu tồn trong nước và đi vào môi trường.

Phương pháp vật lý hoặc phương pháp hóa học được sử dụng để xử lý các chất gây ô nhiễm môi trường. Hiện nay, sử dụng các tác nhân sinh học đang được tập trung nghiên cứu do tính bền vững và thân thiện với môi trường, đặc biệt khi khai thác được nguồn vi sinh vật bản địa để xử lý chất gây ô nhiễm. Một số vi sinh vật có khả năng phân hủy các hợp chất có vòng thơm đã được phân lập và nghiên cứu. Chẳng hạn, vi khuẩn *Pseudomonas putida* CCM1 852 có khả năng phân hủy toluene và xylene (Otenio *et al.*, 2005), *Polaromonas* sp., *Acidobacterium* và các vi khuẩn thuộc họ Sphingomonadaceae có thể phân hủy benzene (Xie *et al.*, 2010), *Rhodococcus pyridinivorans* có khả năng phân hủy pyridine (Yoon *et al.*, 2000), *Streptococcus epidermis* (OCS-B) có thể phân hủy phenol (Mohite *et al.*, 2010). Chính vì vậy, mục tiêu của nghiên cứu này là phân lập các dòng vi khuẩn từ hệ thống xử lý nước thải của Khoa Khoa học Tự nhiên có khả năng phân hủy xylene và khảo sát hiệu quả phân hủy của chúng.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Phân lập vi khuẩn có khả năng phân hủy xylene

Mẫu bùn được thu ở đáy bể lắng của hệ thống xử lý nước thải của Khoa Khoa học Tự nhiên. Cho 5 g bùn vào 20 mL môi trường khoáng tối thiểu (1,42 g Na_2HPO_4 , 1,36 g KH_2PO_4 , 0,3 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 98,5 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5,75 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3,2 mg $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, 2,75 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,7 mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1,16 mg H_3BO_3 , 1,15 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,24 mg CuSO_4 , 0,24 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,1 mg MoO_3 , 1 L nước) có bổ sung nguồn carbon là *m*-xylene ($\geq 99,9\%$, Merck) với hàm lượng 0,2% v/v. Mẫu được thông khí với tốc độ 125 vòng/phút ở 32°C trong một tuần. Sau đó, mẫu được để lắng và chuyển 5 mL mẫu sang 20 mL môi trường khoáng tối thiểu mới

có bổ sung 0,2% v/v xylene. Mẫu được lắc như trên và giai đoạn chuyển mẫu này được lặp lại hai lần. Sau hai lần chuyển mẫu và nuôi cấy, vi khuẩn được pha loãng đến 10^{-4} và trải lên môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung 0,2% v/v xylene. Vi khuẩn được ủ ở 32°C trong hai tuần. Những khuẩn lạc phát triển được tiếp tục cấy chuyển sang môi trường khoáng tối thiểu có chứa 0,4% v/v xylene. Độ thuần của các dòng vi khuẩn được kiểm tra trên môi trường Trypticase soy agar (TSA).

Hiệu quả phân hủy xylene được xác định bằng cách chủng 5 μL vi khuẩn đã nuôi cấy vào 3 mL môi trường khoáng tối thiểu có và không bổ sung xylene. Sự khác biệt về sinh khối vi khuẩn giữa hai nghiệm thức chứng tỏ chúng có khả năng phân hủy xylene. Các khảo sát sơ bộ cho thấy ở nồng độ xylene 0,125% v/v thì vi khuẩn tạo sinh khối nhanh hơn so với nồng độ 0,025%, 0,05% và 0,25% v/v.

2.2 Khảo sát hiệu quả phân hủy xylene của vi khuẩn trong điều kiện phòng thí nghiệm

Chủng 5 μL vi khuẩn đã nuôi cấy ($\text{OD}_{600\text{nm}}$: 1.0) vào 3 mL môi trường khoáng tối thiểu lỏng có bổ sung xylene (0,125% v/v) như nguồn cung cấp carbon duy nhất. Vi khuẩn được thông khí bằng cách lắc với vận tốc 200 vòng/phút ở 32°C. Mỗi nghiệm thức được lặp lại ba lần. Sau 24 giờ nuôi cấy, mẫu vi khuẩn được thu để đo mật độ quang ($\text{OD}_{600\text{nm}}$) và khảo sát khả năng phân hủy xylene của từng dòng vi khuẩn. Đối với mẫu khảo sát khả năng phân hủy xylene, 600 μL mẫu được thu và ly tâm 14.000 vòng/phút trong 5 phút. Xylene còn lại trong dịch lỏng sau khi ly tâm được trích bằng hexane ($\geq 97\%$). Xylene hòa tan trong hexane được định lượng bằng phương pháp sắc ký khí GC-FID (GC-2014, Shimadzu) với cột SPB^{TM-5} fused silica capillary column (30 m x 0,25 mm, 0,25 μm). Các thông số phân tích bao gồm: nhiệt độ bơm 270°C; nhiệt độ phát hiện 290°C; khí mang N_2 ; tốc độ dòng 1,1 mL/phút; tỉ lệ chia dòng 30; thể tích bơm 1 μL . Chu trình nhiệt độ gồm: nhiệt độ ban đầu là 20°C (giữ 5 phút), sau đó nhiệt độ được tăng dần với tốc độ 10°C/phút cho đến 100°C thì dừng lại; thời gian lưu 8,1 phút. Các số liệu được phân tích thống kê bằng phần mềm Minitab 16.

2.3 Định danh vi khuẩn có khả năng phân hủy xylene

Vi khuẩn có khả năng phân hủy hiệu quả xylene được chọn để khuếch đại gen 16S-rRNA sử dụng cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCTGGCTC-3'), 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACT-3') (Wilmutte *et al.*, 1993) và giải trình tự. Trình tự ADN của gen 16S-rRNA được phân tích bằng phần mềm Geneious và được so sánh với cơ sở dữ liệu của

trung tâm quốc gia về thông tin công nghệ sinh học (National Center for Biotechnology Information: NCBI) bằng BlastN (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) để so sánh mức độ tương đồng của gen 16S-rRNA ở vi khuẩn đã phân lập với gen tương ứng của các vi khuẩn hiện có trong cơ sở dữ liệu.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

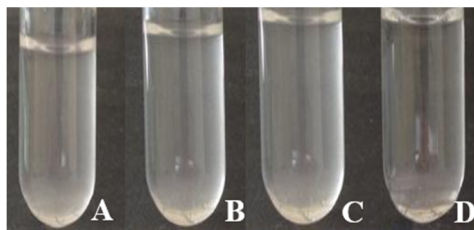
3.1 Vi khuẩn có khả năng phân hủy xylene

Từ mẫu bùn ở bề lắng của hệ thống xử lý nước thải của Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ, mười sáu dòng vi khuẩn phát triển trên

môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung xylene như là nguồn cung cấp carbon duy nhất đã được phân lập. Trong đó, ba dòng XL3.1, XL6.2, XL22.1 có sự khác biệt về sinh khối khi nuôi cấy trong môi trường khoáng tối thiểu có và không bổ sung xylene. Các dòng vi khuẩn này tạo sinh khối trong môi trường có bổ sung xylene nhưng không tạo sinh khối trong nghiệm thức đối chứng không bổ sung xylene chứng tỏ các dòng vi khuẩn này có khả năng phân hủy xylene (Hình 1). Đặc điểm hình thái khuẩn lạc của vi khuẩn được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1: Đặc điểm hình thái khuẩn lạc của vi khuẩn phân hủy xylene

Dòng	Đặc điểm khuẩn lạc					
	Hình dạng	Màu sắc	Bìa	Độ nổi	Đường kính (mm)	Nhảy
XL3.1	tròn	trắng	nguyên	lồi	3	không
XL6.2	không đều	cam	chia thùy	mô	3,5	không
XL22.1	tròn	vàng	nguyên	lồi	3,5	không



Hình 1: Sự khác biệt về sinh khối vi khuẩn khi được nuôi cấy trong môi trường có và không bổ sung xylene

A. Môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung xylene và dòng XL3.1

B. Môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung xylene và dòng XL6.2

C. Môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung xylene và dòng XL22.1

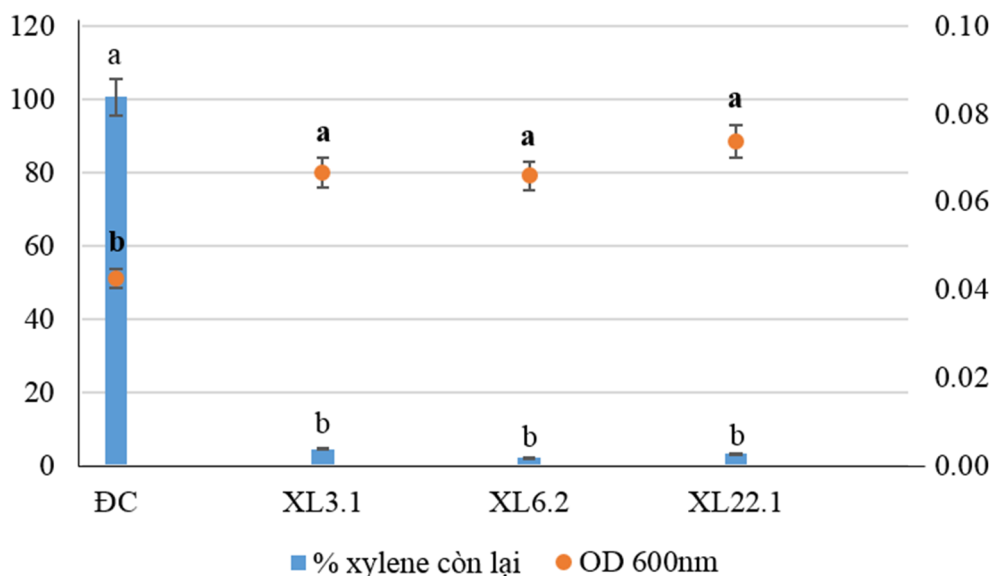
D. Môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung một trong ba dòng vi khuẩn trên và không bổ sung xylene

3.2 Hiệu quả phân hủy xylene của vi khuẩn trong điều kiện phòng thí nghiệm

Sau 24 giờ nuôi cấy ba dòng vi khuẩn XL3.1, XL6.2, XL22.1 trong môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung xylene (0,125% v/v) như là nguồn cung cấp carbon duy nhất, vi khuẩn tăng trưởng làm cho môi trường nuôi cấy trở nên đục. Mật độ quang (OD_{600nm}) ở các nghiệm thức có chủng vi khuẩn

cao hơn so với nghiệm thức đối chứng. Mật độ quang của ba dòng vi khuẩn khác biệt không có ý nghĩa thống kê nhưng khác biệt có ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng chứng tỏ có sự gia tăng mật độ của vi khuẩn trong môi trường bổ sung xylene. Hơn nữa, kết quả phân tích sắc ký khí cho thấy nồng độ xylene giảm đáng kể sau 24 giờ nuôi cấy. Hiệu suất phân hủy xylene của ba dòng vi khuẩn XL3.1, XL6.2 và XL22.1 lần lượt là 95,43%, 97,81% và 96,62%, khác biệt không có ý nghĩa thống kê nhưng khác biệt có ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng không chủng vi khuẩn. Mối liên hệ giữa mật độ quang và hiệu quả phân hủy xylene của các dòng vi khuẩn được minh họa ở Hình 2.

Theo Otenio *et al.* (2005), dòng vi khuẩn *Pseudomonas putida* CCMI 852 có khả năng phân hủy xylene 100 mg/L (0,12 ml/L) được phân lập từ nhà máy xử lý nước thải ở Bồ Đào Nha với hiệu suất 50% sau 24 đến 25 giờ nuôi cấy. Cả ba dòng vi khuẩn phân lập trong nghiên cứu này có khả năng phân hủy hơn 95% xylene (1,25 ml/L) sau 24 giờ nuôi cấy. Các dòng vi khuẩn đã phân lập có hiệu suất phân hủy xylene rất cao nên có thể xem là các dòng vi khuẩn tiềm năng làm cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo để tìm ra giải pháp làm sạch xylene trong hệ thống xử lý nước thải của Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ theo phương pháp sinh học.



Hình 2: Mối liên hệ giữa % xylene còn lại và mật độ quang của dòng vi khuẩn XL3.1, XL22.1 và XL6.2 sau 24 giờ nuôi cấy trong môi trường có bổ sung xylene (1,25 ml/L)

ĐC: Nghiệm thức đối chứng chỉ có xylene, không chủng vi khuẩn. Các chữ cái giống nhau biểu thị sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%

3.3 Định danh khoa học vi khuẩn phân hủy xylene

Trong ba dòng vi khuẩn phân lập từ hệ thống xử lý nước thải, dòng XL6.2 có khả năng phân hủy xylene hiệu quả nhất (97,81% xylene sau 24 giờ nuôi cấy) nên dòng vi khuẩn này được chọn để định danh khoa học. Kết quả giải trình tự gen cho thấy dòng XL6.2 có trình tự gen 16S-rRNA tương đồng 98% với dòng *Rhodococcus ruber* DSM 43338 (NR 118602.1) nên dòng XL6.2 được định danh là *Rhodococcus* sp. XL6.2. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu trước đây của Kim *et al.* (2002) về vi khuẩn *Rhodococcus* sp. DK17 có khả năng phân hủy xylene được phân lập từ đất bị ô nhiễm dầu ở Hàn Quốc. Ngoài ra, trong cộng đồng vi khuẩn được phân lập từ trầm tích bị ô nhiễm xăng, dầu có khả năng phân hủy hỗn hợp gồm benzene, toluene, xylene, ethylbenzene (BTEX) cũng có sự hiện diện của các dòng vi khuẩn thuộc chi *Rhodococcus* (Deeb & Alvarez-Cohen, 1999, Lu *et al.*, 2006).

4 KẾT LUẬN

Từ mẫu bùn ở bề lắng của hệ thống xử lý nước thải của Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ, mười sáu dòng vi khuẩn được phân lập từ môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung xylene trong đó ba dòng XL3.1, XL6.2 và XL22.1 có khả năng phân hủy xylene. Sau 24 giờ nuôi cấy, ba dòng vi khuẩn phân hủy hơn 95% xylene (0,125% v/v). Dòng XL6.2 phân hủy xylene hiệu quả nhất

(97,81%), kế đến là dòng XL22.1 (96,62%) và dòng XL3.1 (95,43%). Dòng XL6.2 có hình thái khuẩn lạc không đều, màu cam, bìa có thùy, khuẩn lạc mô, đường kính 3.5 mm và được định danh khoa học là *Rhodococcus* sp. XL6.2. Dòng vi khuẩn XL6.2 sẽ được tiếp tục khảo sát khả năng phân hủy các hợp chất hữu cơ khác có thể hiện diện trong hệ thống xử lý nước thải như benzene, toluene, phenol, ... trong điều kiện phòng thí nghiệm làm cơ sở cho các nghiên cứu ứng dụng về xử lý sinh học các hợp chất hữu cơ có vòng thơm trong hệ thống xử lý nước thải của Khoa Khoa học Tự nhiên nói riêng và ở các hệ thống xử lý nước thải khác hiện chỉ sử dụng phương pháp vật lý và hóa học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Anneser, B., Einsiedl, F., Meckenstock, R.U., Richters, L., Wisotzky, F., Griebler, C., 2008. High-resolution monitoring of biogeochemical gradients in a tar oil-contaminated aquifer. *Applied Geochemistry*. 23: 1715-1730.
- Dean, B.J., 1985. Recent findings on the genetic toxicology of benzene, toluene, xylene and phenols. *Mutation Research*. 154(3): 153-181.
- Deeb, R.A., Alvarez-Cohen, L., 1999. Temperature effects and substrate interactions during the aerobic biotransformation of BTEX mixtures by toluene-enriched consortia and *Rhodococcus rhodochrous*. *Biotechnology and Bioengineering*. 62(5): 526-536.
- Kim, D., Kim, Y.S., Kim, S.K., Kim, S.W., Zylstra, G.J., Kim, Y.M., Kim, E., 2002. Monocyclic

- aromatic hydrocarbon degradation by *Rhodococcus* sp. strain DK17. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(7): 3270-3278.
- Lu, S.J., Wang, H.Q., Yao, Z.H., 2006. Isolation and characterization of gasoline-degrading bacteria from gas station leaking-contaminated soils. *Journal of Environmental Sciences*. 18(5): 969-972.
- Mohite, B.V., Jalgaonwala, R.E., Pawar, S., Morankar, A., 2010. Isolation and characterization of phenol degrading bacteria from oil contaminated soil. *Innovative Romanian Food Biotechnology*. 7: 61-65
- Nakhla, G., 2003. Biokinetic modeling of in situ bioremediation of BTX compounds - impact of process variable and scaleup implications. *Water Research*. 37(6): 1296-1307.
- Otenio, M.H., Lopes da Silva, M.T., Oliveira Marques, M.L., Roseiro, J.C., Bidoia, E.D., 2005. Benzene, toluene, xylene biodegradation by *Pseudomonas putida* CCMI 852. *Brazilian Journal of Microbiology*. 36(3): 258-261.
- Xie, S.huguang, X., Sun, W., Luo, C., Cupples, A.M., 2010. Novel aerobic benzene degrading microorganisms identified in three soils by stable isotope probing. *Biodegradation*. 22: 71-81.
- Wilmotte, A., Van der Auwera, G., De Wachter, R., 1993. Structure of the 16 S ribosomal RNA of the thermophilic cyanobacterium *Chlorogloeopsis* HTF ('*Mastigocladus laminosus* HTF') strain PCC7518, and phylogenetic analysis. *FEBS Letters*. 317(1-2): 96-100.
- Yoon, J.H., Kang, S.S., Cho, Y.G., Lee, S.T., Kho, Y.H., Kim, C.J., Park, Y.H., 2000. *Rhodococcus pyridinivorans* sp. nov., a pyridine-degrading bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 50: 2173-2180.