KHẢ NĂNG PHÂN HUỶ MỘT SỐ THÀNH PHẦN HYDROCARBON CÓ TRONG DẦU MỎ CỦA CHỦNG *Rhizobium* sp. DG2 TẠO MÀNG SINH HỌC VÀ ĐƯỢC PHÂN LẬP TỪ KHO XĂNG ĐỨC GIANG HÀ NỘI

Trần Thị Mai[1], Cung Thị Ngọc Mai[1], Đỗ Thị Liên[1], Trần Thị Đào[2], Nguyễn Huyền Anh[3], Lê Thị Nhi Công[1,4*]

[1]Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
[2]Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam
[3]Trường THPT Chuyên Nguyễn Huệ, Hà Đông, Hà Nội
[4]Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

[*]Tác giả liên hệ: lenhicong@ibt.ac.vn

Ngày nhận bài: 25.09.2023 Ngày chấp nhận đăng: 05.01.2024

TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu này là lựa chọn ra chủng vi khuẩn tạo màng sinh học (biofilm) có khả năng phân huỷ và chuyển hoá các thành phần hydrocarbon có trong dầu mỏ, từ đó gợi mở một phương pháp xử lý ô nhiễm môi trường do quá trình khai thác, vận chuyển và sử dụng dầu và các sản phẩm từ dầu gây ra. Các phương pháp nghiên cứu được sử dụng gồm: làm giàu để phân lập và phân loại các chủng vi khuẩn có khả năng sử dụng các thành phần có trong dầu; đánh giá khả năng tạo biofilm; từ đó đánh giá hiệu quả phân huỷ dầu của các chủng vi sinh vật ở trạng thái tạo biofilm so với ở trạng thái tự do của chủng. Kết quả, từ các mẫu đất nhiễm dầu lấy tại kho xăng Đức Giang, Hà Nội đã phân lập được chủng *Rhizobium* sp. DG2 tạo biofilm và có khả năng phân huỷ 44,8; 76,0; 62,0; 73,0 và 75,0% dầu diesel, anthracene; naphthalene; phenanthrene và pyrene với nồng độ ban đầu là 4,786 g/l (10% thể tích) đối với dầu diesel và 200ppm đối với 4 thành phần còn lại. Trong khi đó, chủng DG2 ở dạng tế bào tự do chỉ phân huỷ được tương ứng là 35,4; 65,1; 54,5; 54,6 và 64,2% các thành phần này. Kết quả đã mở ra tiềm năng ứng dụng vi khuẩn tạo biofilm và *Rhizobium* sp. nói riêng trong xử lý ô nhiễm dầu.

Từ khóa: Hydrocarbon thơm đa vòng, màng sinh học, ô nhiễm dầu, phân huỷ sinh học, *Rhizobium* sp.

Degradation of Hydrocarbon Components by Biofilm-forming *Rhizobium* sp. DG2 Isolated from Petroleum Storage Tank in Ducgiang, Hanoi

ABSTRACT

The purpose of this investigation was to select biofilm-forming bacteria which can degrade or transform crude oil components leading to the solution of oil contamination causing by exploitation, transportation and use of oil and oil products. To gain this aim, several approaches such as enrichment to isolate and identify the bacteria that can utilize oil components and form biofilm and to assess oil degradation capacity of biofilm type in comparison with planktonic type of the strains. As results, the biofilm–forming *Rhizobium* sp. DG2 was isolated from oil contaminated sediment samples taken in petroleum storage in Ducgiang, Hanoi. The biofilm of this strain was capable of degrading 44.8; 76.0, 62.0, 73.0 and 75.0 % of diesel oil, anthracene, naphthalene, phenanthrene and pyrene, respectively, with the initial concentrations of 4.786 g/L for diesel oil and 200 ppm for the others. In contrast, the plantonik *Rhizobium* sp. DG2 in free form degraded only 35.4; 65.1; 54.5; 54.6 and 64.2 % of these components. The obtained results suggest the potential of using biofilm-forming bacteria in general and *Rhizobium* sp. in particular to treat oil pollution.

Keywords: Biodegradation, biofilm, oil pollution, polycyclic aromatic hydrocarbons, *Rhizobium* sp.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, vấn đề ô nhiễm môi trường nói chung và ô nhiễm dầu nói riêng đang là một trong những vấn đề đáng quan tâm trên toàn cầu. Yêu cầu đặt ra là cần phải có những giải pháp bảo vệ môi trường hiệu quả và bền vững (Sayed & cs., 2021). Tại Việt Nam, một số công nghệ xử lý ô nhiễm dầu đã được áp dụng (như tuyển nổi, lắng lọc, chưng cất) và có hiệu quả nhất định (Phan Văn Hưng & Nguyễn Mạnh Cường, 2019). Các phương pháp này có ưu điểm là xử lý nhanh, tuy nhiên quá trình xử lý không được triệt để và thường tạo ra các sản phẩm phụ thứ cấp ảnh hưởng tới môi trường xung quanh đồng thời đòi hỏi đầu tư ban đầu lớn, diện tích nhiều hoặc phải dùng năng lượng và hóa chất thường xuyên nên có nguy cơ gây ô nhiễm thứ cấp. Phương pháp phân hủy sinh học sử dụng các chủng vi sinh vật và các chất có hoạt tính sinh học do vi sinh vật sản sinh ra đã được sử dụng ngày càng rộng rãi do hiệu quả cao, chi phí thấp và thân thiện với môi trường. Đặc biệt, đối với các vi sinh vật có khả năng hình thành màng sinh học (biofilm) thì hiệu suất phân hủy các hợp chất ô nhiễm cao hơn khi ở dạng tế bào tự do (Alessandrello & cs., 2017b).

Biofilm là một tập hợp các vi sinh vật bám trên một bề mặt của vật thể rắn hoặc bề mặt chất lỏng, tạo thành lớp màng bao phủ bề mặt đó. Khu hệ vi sinh vật trong biofilm có khả năng chống chịu các điều kiện khắc nghiệt của môi trường (sự thay đổi về pH, nhiệt độ, sự thẩm thấu hay sự mất nước của tế bào…) tốt hơn, hỗ trợ trao đổi chất tốt hơn và hạn chế sự cạnh tranh của các vi sinh vật khác từ đó làm tăng hiệu suất phân hủy các hợp chất ô nhiễm khi xử lý ngoài hiện trường. Do vậy, công nghệ sử dụng biofilm đã được ứng dụng thành công trong xử lý nước thải ô nhiễm dầu tại một số nước trên thế giới và hứa hẹn trở thành một công nghệ mới đem lại hiệu quả kinh tế cao và thân thiện với môi trường (Alessandrello & cs., 2017a).

Tại Việt Nam, các nghiên cứu về hiệu quả xử lý ô nhiễm dầu bằng các vi khuẩn bản địa tạo biofilm để tăng hiệu quả xử lý đất/nước nhiễm dầu còn hạn chế. Những nghiên cứu mới được thực hiện trong những năm gần đây và chỉ tập trung vào một vài tác giả. Hoàng Phương Hà & cs. (2016) đã nghiên cứu phát triển công nghệ biofilm trong xử lý nước nuôi trồng thủy sản bị ô nhiễm ammonium. Đỗ Khắc Uẩn & cs. (2009) đã nghiên cứu ứng dụng hệ thống màng lọc vật lý gồm các đơn nguyên màng vi lọc (kích thước lỗ 0,22µm) để xử lý nitrogen, phosphorus và các chất ô nhiễm trong nước thải đô thị. Vì vậy, việc tìm kiếm được các chủng vi khuẩn có khả năng sử dụng đa dạng nguồn hợp chất hydrocarbon khó phân huỷ có trong thành phần của dầu mỏ, lại vừa có khả năng tạo biofilm là rất cần thiết. Nghiên cứu này nhằm chứng minh khả năng xử lý các thành phần có trong dầu mỏ của chủng *Rhizobium* sp. DG2 tạo màng sinh học được phân lập từ các mẫu đất nhiễm dầu lấy tại kho xăng Đức Giang, Hà Nội.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Các mẫu đất nhiễm dầu lấy tại kho xăng Đức Giang, Hà Nội theo TCVN 7538-6:2010 (ISO 10381-6:2009).

Chủng *Acinetobacter calcoacetius* P23 được nhóm nghiên cứu của GS. TS. Morikawa, Khoa Khoa học Trái đất Môi trường, Đại học Hokkaido, tặng và được sử dụng làm đối chứng dương.

Hóa chất: Các môi trường nuôi cấy sử dụng trong nghiên cứu như LB (10g Tryptone+ 5g cao nấm men + 10g NaCl), muối khoáng Gost (0,7g Na_2HPO_4 + 0,3g KH_2PO_4 + 3g KNO_3 + 0,4g $MgSO_4$ + 1g NaCl); MPA (3g cao thịt + 5g peptone + 13g agar + 5g NaCl). Các môi trường sau khi chuẩn bị được điều chỉnh tới pH 6,9-7.2. Các hóa chất sử dụng đều là hóa chất của các hãng Sigma, Merk (Đức).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Làm giàu và phân lập

Từ mẫu ban đầu, chúng tôi đã tiến hành làm giàu 3 lần trong 50ml môi trường muối khoáng Gost có bổ sung 0,1% vitamin, 50ppm hỗn hợp hydrocarbon thơm gồm anthracene; naphthalene; phenanthrene và pyrene - mỗi loại

là 50ppm (v/v), nuôi lắc ở 200 vòng/phút, 37°C trong 7 ngày (Cung Thị Ngọc Mai & cs., 2011). Để sử dụng cơ chế đồng trao đổi chất, hai nhóm thí nghiệm được thiết kế với việc có bổ sung và không bổ sung 10% glucose. Sau mỗi lần làm giàu, cấy gạt kiểm tra thu được tập đoàn vi sinh vật và làm sạch để có các chủng đơn. Để khảo sát khả năng sử dụng hỗn hợp hydrocarbon thơm (polycyclic aromatic hydrocarbon - PAH) của từng chủng, chúng tôi nuôi đơn chủng trên 20ml môi trường muối khoáng Gost có bổ sung hỗn hợp hydrocarbon thơm với nồng độ tăng dần từ 50, 100, 150, 200 và 250ppm. Quan sát độ đục dịch nuôi và đo mật độ quang học ở bước sóng 600nm (OD_{600}) theo ngày, thí nghiệm được tiến hành trong 7 ngày để đánh giá khả năng sinh trưởng trên các nguồn cơ chất PHA của các vi sinh vật được phân lập.

2.2.2. Đánh giá khả năng tạo màng sinh học của chủng vi khuẩn

Các chủng vi sinh vật được đánh giá khả năng tạo biofilm theo mô tả của Morikawa & cs. (2006) và O'Toole & Kolter (1998).

Nguyên lý:

Thành tế bào vi khuẩn được xem là nhân tố để tạo thành biofilm và thành tế bào có thành phần chủ yếu là các lớp polysaccharide. Lớp polysaccharide ngoại bào này có khả năng bắt giữ tím tinh thể sau khi nhuộm cố định ở nhiệt độ phòng. Sau khi rửa lại hai lần bằng nước cất nhằm loại bỏ tím tinh thể bên ngoài, tiếp tục bổ sung thêm axit acetic 33% nhằm loại bỏ tím tinh thể còn sót lại ở thành tế bào và sẽ được giải phóng hòa tan vào trong dung môi axit acetic này. Đo OD ở bước sóng 570nm, OD_{570} thể hiện độ hấp thụ ánh sáng của dung dịch tím tinh thể và tỷ lệ với lượng tím tinh thể được cố định. Đây chính là giá trị đặc trưng cho mật độ tế bào trong cấu trúc biofilm hay khả năng tạo biofilm của chủng vi sinh vật.

Phương pháp thực hiện như sau:

Nuôi các chủng vi khuẩn trên môi trường MPA dịch thể với mật độ OD_{600} ban đầu là 0,3. Sau 16 giờ nuôi, ly tâm 1ml dịch nuôi, loại bỏ dịch và thu sinh khối (ly tâm ở 4.000rpm, 4°C trong vòng 10 phút, Sau đó lại bổ sung 1ml nước cất, ly tâm, loại bỏ nước cất và thu sinh khối; lặp lại 3 lần để loại bỏ hoàn toàn môi trường nuôi cấy). Hòa tan sinh khối trong 1ml nước cất vô trùng và tiến hành pha loãng để đạt OD_{600} là 0,3. Thêm 3µl dịch này vào các ống eppendorf 1,5ml chứa 297µl môi trường MPA. Cứ sau 24 giờ, lấy các ống eppendorf chứa mẫu nuôi để đánh giá khả năng tạo biofilm (mỗi chủng tương ứng với 3 ống eppendorf cho mỗi ngày trong 3 ngày liên tiếp). Dùng pipetman hút nhẹ hết dịch nuôi (không làm vỡ biofilm), rửa biofilm bằng 500µl nước cất vô trùng (lặp lại hai lần). Sau đó, bổ sung 300µl dung dịch tím kết tinh 0,1% vào các ống eppendorf, cố định 10 phút ở nhiệt độ phòng và rửa hai lần bằng nước cất vô trùng. Tiếp theo, bổ sung 300 µl dung dịch axit acetic 33% trộn đều rồi pha loãng và đo OD ở bước sóng 570nm. Giá trị OD_{570} tỉ lệ thuận với khả năng tạo biofilm của các chủng vi khuẩn. Khả năng tạo biofilm của các chủng vi sinh vật được kiểm tra sau 24, 48 và 72 giờ nuôi cấy. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

2.2.3. Định danh vi sinh vật

Chủng vi khuẩn được định tên bằng phương pháp giải trình tự một phần gen mã hóa cho tiểu phần ribosome 16S. So sánh trình tự nucleotide 16S rRNA của chủng vi khuẩn mục tiêu với trình tự nucleotide của các chủng vi khuẩn chuẩn trên LPSN, dựa vào phần mềm Clustal X và Treeview để xây dựng cây phát sinh chủng loại của chủng vi khuẩn này

2.2.4. Đánh giá khả năng phân huỷ các thành phần hydrocarbon của chủng phân lập được

a. Xác định khả năng phân hủy dầu diesel

Chủng vi khuẩn có khả năng tạo biofilm tốt được chọn lựa để nuôi cấy trên 50ml môi trường muối khoáng Gost, bổ sung 10% dầu diesel. Sau 7 ngày nuôi lắc ở 37°C, 200 vòng/phút, tiến hành định lượng hàm lượng dầu diesel của mẫu chứa chủng vi khuẩn (gọi là mẫu tế bào tự do) và mẫu đối chứng (không có vi sinh vật). Thí nghiệm về khả năng phân huỷ của biofilm được tiến hành song song bằng cách tạo biofilm trên các bình

nuôi rồi bổ sung lượng cơ chất tương tự vào. Sau 7 ngày nuôi tĩnh thì mẫu được mang đi phân tích như mẫu tế bào tự do phía trên. Lượng dầu diesel được xác định bằng phương pháp phân tích khối lượng theo tiêu chuẩn TCVN 4582 - 1988 về phương pháp xác định hàm lượng dầu mỏ và các sản phẩm dầu mỏ. Thí nghiệm được thực hiện tại Viện Hóa công nghiệp.

b. Xác định khả năng phân hủy hydrocarbon thơm

Dựa trên phương pháp của Alessandrello & cs. (2017a) có cải tiến, khả năng phân huỷ PAH được tiến hành như sau:, thí nghiệm với hỗn hợp các thành phần PAH như anthracene; naphthalene; phenanthrene và pyrene với nồng độ ban đầu là 200ppm trên hai nhóm thí nghiệm tế bào tự do và biofilm đã được thiết kế tương tự mục 2.2.4.1. Dịch nuôi cấy sau 7 ngày thí nghiệm sẽ được chiết 3 lần bằng dung môi ethylacetat với tỷ lệ 1:1. Phân tích dịch chiết bằng phương pháp HPLC trên máy Hewlett-Packard (Bad Homburg, Germany). Nhờ hệ thống LiChroCart 125-4 RP-18 end-capped (5µm) column (Merck, Darmstadt, Germany), các sản phẩm của quá trình chuyển hoá các thành phần dầu mỏ sẽ được phân tách. Nồng độ dung môi chạy mẫu ban đầu gồm 30% methanol - 70% axit phosphoric (0,1%), sau 14 phút thì đạt 100% methanol, tốc độ chảy 1 ml/phút. Tùy vào điều kiện cụ thể, các chương trình chạy để phân tích mẫu sẽ có những thay đổi cho phù hợp. Các thí nghiệm đều được lặp lại 3 lần.

Hiệu quả phân huỷ dầu diesel cũng như các thành phần PAH được tính toán dựa trên công thức sau:

$$\text{Hiệu quả phân hủy} = \frac{\text{Hàm lượng hydrocarbon ban đầu - Hàm lượng hydrocarbon còn lại}}{\text{Hàm lượng hydrocarbon ban đầu}} \times 100$$

2.2.5. Xử lý thống kê

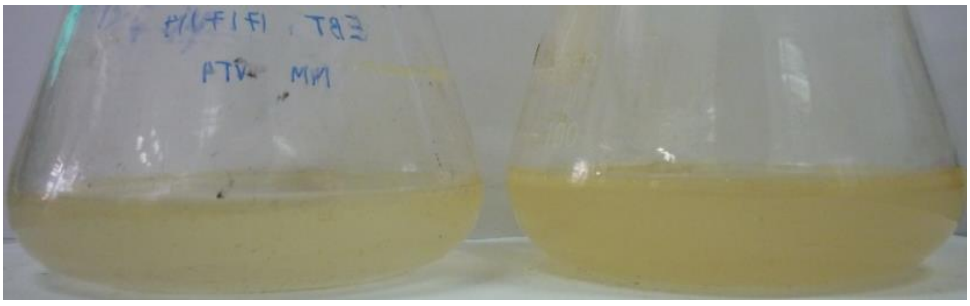
Số liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình của các lần lặp lại thí nghiệm ± độ lệch chuẩn (SD) được thực hiện bằng phần mềm Excel (version 2019).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy hydrocarbon thơm

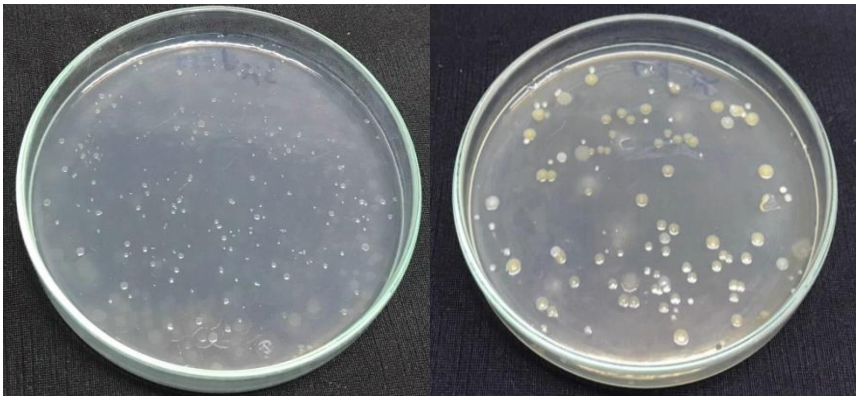
Sau 3 lần làm giàu trên hai dải thí nghiệm có bổ sung và không bổ sung glucose, kết quả lần làm giàu thứ 3 được thể hiện trên hình 1.

Việc sử dụng glucose làm nguồn cơ chất bổ sung để giúp cho các vi sinh vật có trong mẫu được kích thích sinh trưởng theo cơ chế đồng trao đổi chất (Nzila, 2013). Mẫu sau cả 3 lần làm giàu được sử dụng để phân lập các chủng vi khuẩn có khả năng phân huỷ các thành phần PAH. Kết quả cho thấy, ở mẫu được bổ sung glucose có sự đa dạng về mặt số lượng các nhóm vi sinh vật hơn ở mẫu không bổ sung glucose. Cụ thể, trong mẫu bổ sung glucose có 5 chủng khác nhau, còn ở mẫu không có glucose thì chỉ có 3 chủng (Hình 2). Nên có mũi tên chỉ rõ các khuẩn lạc khác nhau vì hình 2a các khuẩn lạc bé nên khó nhận biết sự khác biệt.



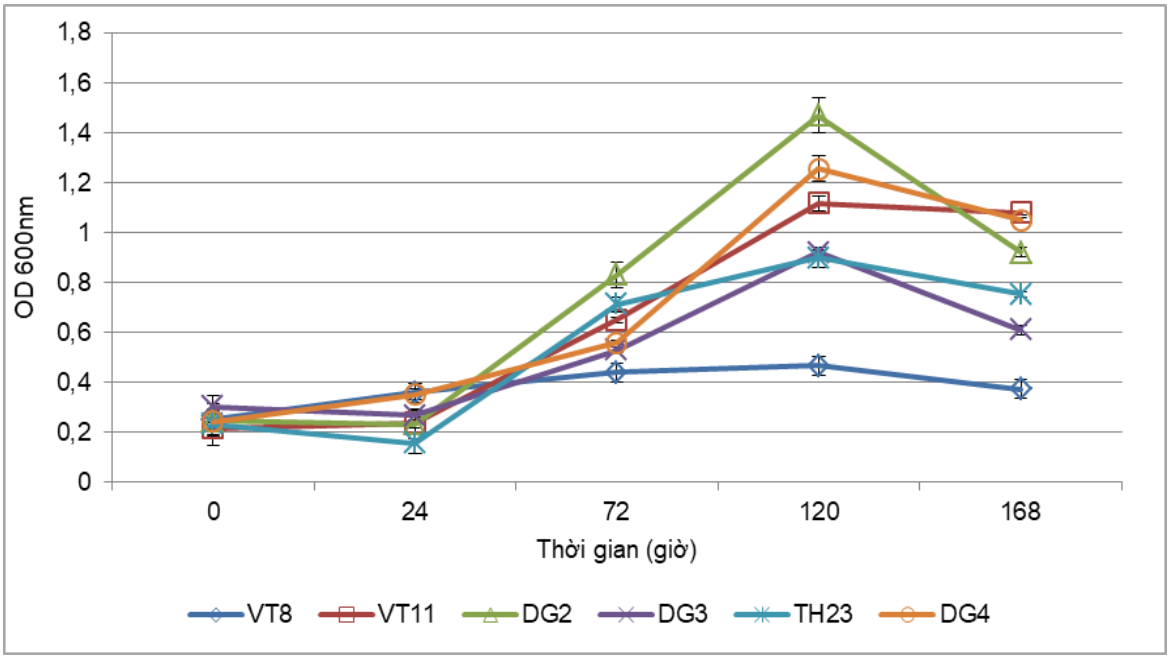
(a) Không glucose (b) Có bổ sung glucose

Hình 1. Kết quả sau 3 lần làm giàu của mẫu đất nhiễm dầu lấy tại kho xăng Đức Giang, Hà Nội



(a) Không glucose (b) Có bổ sung glucose

Hình 2. Hình thái khuẩn lạc có trong mẫu làm giàu lần thứ 3



Hình 3. Khả năng sinh trưởng trên PAH của các chủng vi khuẩn trong mẫu đất nhiễm dầu

Giữa hai mẫu này có sự trùng lặp về các chủng, do đó, 6 chủng từ cả hai mẫu này đã được chọn lọc để làm sạch và thử nghiệm khả năng phân huỷ PAH (Hình 3).

Kết quả cho thấy, chủng DG2 có khả năng sinh trưởng trên nguồn PAH với nồng độ ban đầu 200ppm là tốt nhất.

3.2. Đánh giá khả năng tạo biofilm của các chủng phân lập được

Kết quả về khả năng tạo biofilm của các chủng được thể hiện trên hình 4 cho thấy, chủng VT8, DG2, DG3 và DG4 có khả năng tạo biofilm tốt hơn chủng đối chứng dương; còn đối chứng âm cho thấy không có hiện tượng tạo biofilm trong môi trường nuôi cấy khi không có các vi sinh vật.

Sáu chủng vi khuẩn phân lập được đã được đánh giá khả năng tạo biofilm theo mô tả của Morikawa & cs. (2006) và O'Toole & Kolter (1998). Đối chứng dương là chủng *Acinetobacter calcoaceticus* P23 được cung cấp bởi Morikawa (trường Đại học Hokkaido, Nhật Bản) là một chủng có khả năng tạo màng sinh học tốt (Morikawa & cs., 2006); đối chứng âm là môi trường nuôi cấy không bổ sung vi sinh vật.

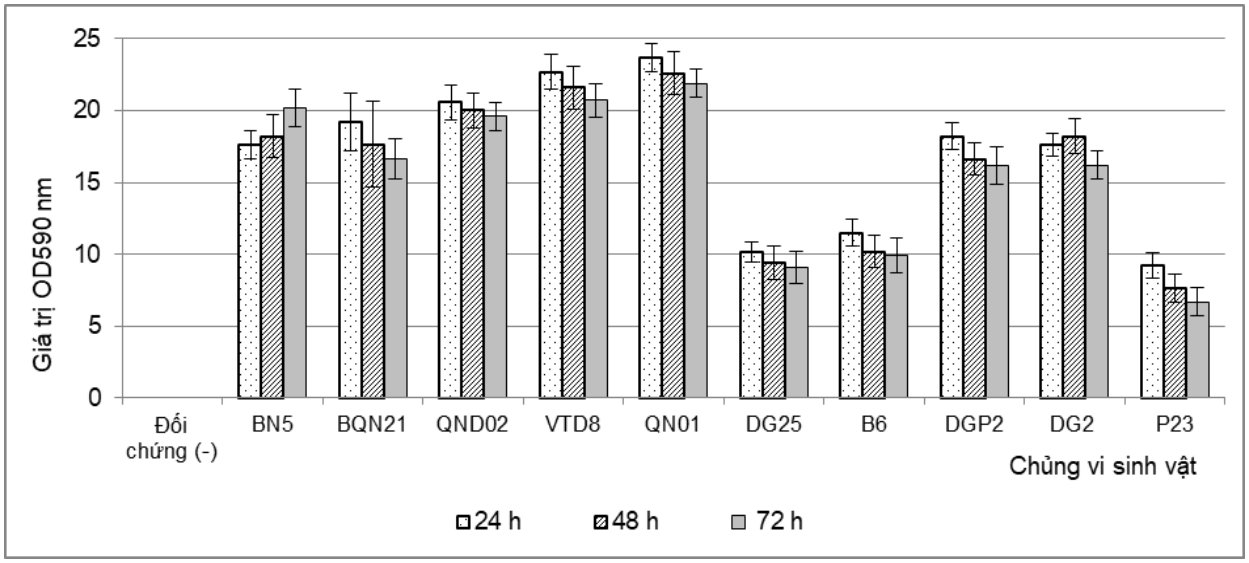
3.3. Phương pháp phân loại vi sinh vật

Dựa vào kết quả về khả năng sinh trưởng trên hỗn hợp PAH và khả năng tạo biofilm, chủng DG2 đã được lựa chọn và được định danh bằng phương pháp giải trình tự một phần gen mã hóa cho tiểu phần ribosome 16S. So sánh trình tự 16S rRNA của chủng vi khuẩn mục tiêu với các chủng vi khuẩn chuẩn trên LPSN, dựa vào phần mềm Clustal X và Treeview. Kết quả chủng DG2 đã được định dạnh là *Rhizobium* sp. DG2 (Hình 5).

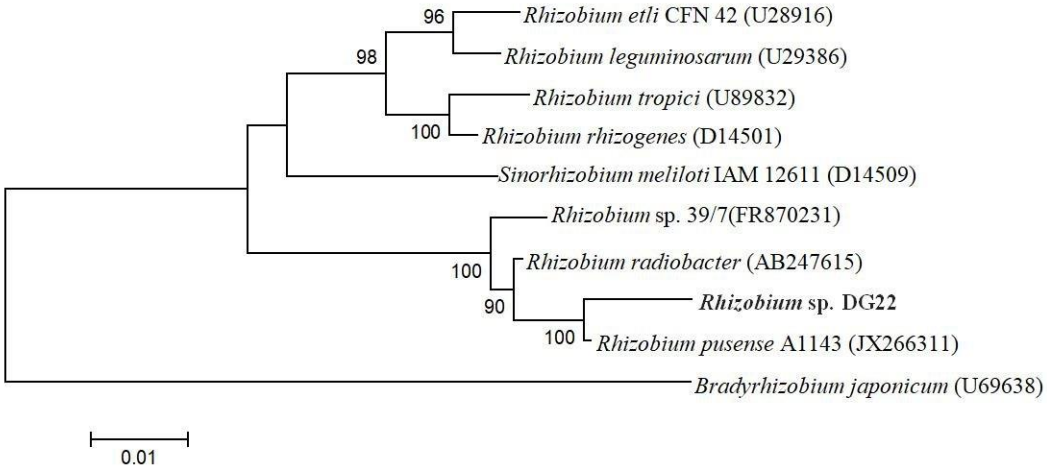
Loài *Rhizobium* được đánh giá là một trong những nhóm vi khuẩn có trong rễ cây, đóng vai trò quan trọng trong kỹ thuật xử lý ô nhiễm bằng thực vật (phytoremediation) (Sharma, 2022). Sharma (2022) đã cho thấy một số nhóm vi sinh vật như *Rhizobium, Bacillus*, và *Pseudomonas* tạo biofilm trên bề mặt rễ của thực vật. Nhờ đó khu hệ rễ thực vật được làm gia tăng khả năng xử lý kim loại nặng cũng như nhiều hợp chất gây ô nhiễm trong đất khác. Bên cạnh đó, Tripathi & cs. (2022) cũng đã chứng minh *Rhizobium* sp. và một số nhóm vi sinh vật tạo biofilm khác có khả năng sản xuất các tín hiệu (quorum sensing - QS) để giúp cho việc hoà tan và chuyển hoá hoàn toàn các hợp chất vòng thơm khó phân huỷ và gây ô nhiễm môi trường nghiêm trọng. Chattopadhyay & cs. (2022) đã nêu lên vai trò của các vi sinh vật tạo biofilm trong xử lý nước thải công nghiệp. Nghiên cứu cho thấy loài *Rhizobium* có các gene chức năng liên quan tới việc tạo biofilm và ở trạng thái tạo biofilm, loài có khả năng tham gia vào quá trình phân huỷ sinh học đối với các hợp chất hydrocarbon khá tốt. Trong cấu trúc biofilm, enzyme oxidoreductase như laccase, polyphenoloxidase, và catalase cũng như enzyme hydrolyase có trong lớp polysaccharide ngoại bào có thể dễ dàng phá vỡ cấu trúc vòng thơm của pyrene.

3.4. Đánh giá khả năng phân huỷ các thành phần hydrocarbon của biofilm do chủng *Rhizobium* sp. DG2 tạo thành

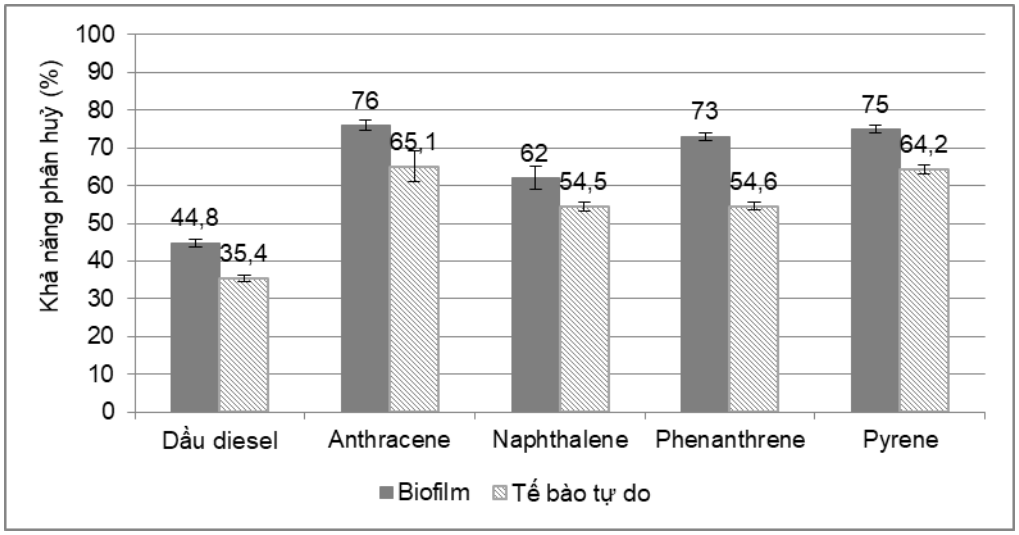
Sau 7 ngày thử nghiệm ở trạng thái tế bào tự do và trạng thái tạo biofilm với nồng độ cơ chất ban đầu là 4,786 g/l (10% thể tích) đối với dầu diesel và 200ppm đối với 4 thành phần hydrocarbon thơm còn lại; kết quả được thể hiện trên hình 6. Cụ thể, ở trạng thái tạo biofilm, chủng có khả năng phân huỷ 44,8; 76,0; 62,0; 73,0 và 75,0% dầu diesel, anthracene; naphthalene; phenanthrene và pyrene với nồng độ ban đầu là 4,786 g/l (10% thể tích) đối với dầu diesel và 200 ppm đối với 4 thành phần còn lại. Trong khi đó, chủng DG2 ở dạng tế bào tự do chỉ phân huỷ được tương ứng là 35,4; 65,1; 54,5; 54,6 và 64,2% các thành phần này.



Hình 4. Khả năng tạo biofilm của các chủng phân lập được



Hình 5. Cây phát sinh chủng loại của chủng DG2



Hình 6. Khả năng phân huỷ các thành phần hydrocarbon có trong dầu mỏ của chủng DG2

Kết quả trên hình 6 cho thấy, ở trạng thái tạo biofilm, khả năng phân huỷ hydrocarbon của chủng DG2 tốt hơn ở trạng thái tế bào tự do. Điều này được giải thích là do lớp polysaccharide ngoại bào được các vi sinh vật tạo thành trong quá trình hình thành biofilm. Lớp biofilm này sẽ giúp chúng liên kết chặt chẽ với nhau, chống được các điều kiện ngoại cảnh bất lợi (Shimada & cs., 2012). Bên cạnh đó, lớp polysaccharide có tính kết dính cao, sẽ giúp vi sinh vật dễ tiếp cận với nguồn ô nhiễm và sử dụng chính các hydrocarbon trong nguồn ô nhiễm là nguồn cacbon giúp chúng sinh trưởng và phát triển từ đó tăng cường hiệu quả xử lý (Xue & cs., 2015).

Chủng *Rhizobium* sp. DG2 được thử nghiệm khả năng sinh trưởng trên các nguồn cơ chất khác nhau như dầu diesel, anthracene; naphthalene; phenanthrene và pyrene. Đây được xem là các thành phần phổ biến có trong dầu mỏ và một số trong đó là các hydrocarbon thơm đa vòng (PAH) khó phân huỷ (Alessandrello & cs., 2017a).

Hiện nay, trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu về các chủng vi sinh vật tạo màng sinh học nhằm ứng dụng trong xử lý các hydrocarbon thơm như benzen, naphtalen, phenol, toluen, xilen… (Shimada & cs., 2012). Chủng vi khuẩn *Acinetobacter calcoaceticus* P23 được phân lập từ khu hệ rễ bèo *Lemna aoukikusa* có khả

năng tạo biofilm và phân hủy phenol tốt hơn dạng tế bào tự do (Yamaga & cs., 2010). Shimada & cs. (2012) đã sử dụng chủng vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* T102 phân lập từ các mẫu đất nhiễm dầu để tạo biofilm và chứng minh khả năng phân hủy tốt naphtalene của chủng này ở dạng tạo biofilm hơn ở dạng tế bào tự do. Đặc biệt, biofilm đa chủng được tạo thành từ 5 chi vi khuẩn *Polaromonas*, *Sphingomonas, Alcaligenes, Caulobacter* và *Variovorax* phân lập từ các mẫu lấy ở Bắc cực có khả năng phân hủy 20 µg/ml pyrene và 39 µg/ml phenanthrene sau 60 ngày nuôi cấy (Eriksson & cs., 2003). Bằng phương pháp nuôi cấy vi sinh thông thường, 2 chủng vi khuẩn thuộc chi *Pseudomonas* có khả năng phân hủy pyrene rất tốt đã được phân lập từ biofilm này (Alessandrello & cs., 2017). Tuy nhiên, các công bố về khả năng phân huỷ các hydrocarbon như dầu diesel, anthracene; naphthalene; phenanthrene và pyrene bởi chi *Rhizobium* ở trạng thái tạo biofilm vẫn chưa có nhiều công bố. Vì vậy, nghiên cứu đã này góp phần bổ sung các thông tin về tiềm năng của biofilm do chi *Rhizobium* tạo thành trong lĩnh vực xử lý ô nhiễm dầu mỏ.

4. KẾT LUẬN

Từ các mẫu đất nhiễm dầu lấy tại kho xăng Đức Giang, Hà Nội, nghiên cứu này đã phân lập được chủng *Rhizobium* sp. DG2 tạo màng sinh học và có khả năng phân huỷ đa dạng các nguồn hydrocarbon khác nhau, góp phần mở ra tiềm năng ứng dụng các vi sinh vật tạo biofilm trong xử lý ô nhiễm đất và nước bị ô nhiễm dầu.

LỜI CẢM ƠN

Công trình được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ Nhiệm vụ Phát triển công nghệ mã số UDPTCN 01/21-23 do Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VAST) tài trợ và sử dụng các trang thiết bị tại Phòng Công nghệ sinh học môi trường, Viện Công nghệ sinh học (VAST).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Alessandrello M.J., Parellada E.A., Juárez Tomás M.S., Neske A., Vullo D.L. & Ferrero M.A. (2017a). Polycyclic aromatic hydrocarbons removal by immobilized bacterial cells using annonaceous acetogenins for biofilm formation stimulation on polyurethane foam. Journal of Environmental Chemical Engineering. 5: 189-195. doi.org/10.1016/j.jece.2016.11.037

Alessandrello M.J., Tomás M.S.J., Raimondo E.E., Vullo D.L. & Ferrero M.A. (2017b). Petroleum oil removal by immobilized bacterial cells on polyurethane foam under different temperature conditions. Marine Pollution Bullentin, http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.06.040.

Bộ Khoa học và Công nghệ (2010). TCVN 7538-6:2010 (ISO 10381-6:2009) về thu thập, xử lý và bảo quản mẫu đất ở điều kiện hiếu khí để đánh giá các quá trình hoạt động, sinh khối và tính đa dạng của vi sinh vật trong phòng thí nghiệm.

Chattopadhyay I., Banu R.J., Usma T.M.M. & Varjani S. (2022). Exploring the role of microbial biofilm for industrial effluents treatment. Bioengineered. 13(3): 6420-6440. doi.org/10.1080/21655979. 2022.2044250

Cung Thị Ngọc Mai, Nguyễn Thùy Linh, Nguyễn Văn Bắc, Vũ Thị Thanh & Nghiêm Ngọc Minh (2011). Nghiên cứu khả năng phân hủy diesel của chủng vi khuẩn BTL5 phân lập từ nước thải công nghiệp. Tạp chí Sinh học. 33(4): 86-91.

Đỗ Khắc Uẩn, Rajesh B., Kaliappan S. & Ick-Tae Y. (2009), Ứng dụng công nghệ lọc màng trong xử lý nitơ, phôtpho và các chất hữu cơ trong nước thải đô thị bằng phương pháp sinh học yếm khí - thiếu khí - hiếu khí, Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc. tr. 950-958.

Eriksson M., Sodersten E., Yu Z.T., Dalhammar G. & Mohn W.W. (2003). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons at low temperature under aerobic and nitrate-reducing conditions in enrichment cultures from northern soils. Applied Environmental Microbiology 69: 275-284.

Hoàng Phương Hà, Nguyễn Hồng Thu, Trần Trung Thành, Trần Thanh Tùng & Lê Thị Nhi Công (2016). Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn nitrate hóa hình thành màng sinh học để xử lý nước nuôi trồng thủy sản bị ô nhiễm ammonium. Journal of Vietnamese Environment. 8(1): 2193.

Morikawa M., Kagihiro S., Haruki M., Takano K., Branda S., Kolter R. & Kanaya S. (2006). Biofilm formation by a Bacillus subtilis strain that produces gamma-polyglutamate. Microbiology. 152: 2801-7.

Nzila A. (2013). Update on the cometabolism of organic pollutants by bacteria. Environmental pollution. 17: 474-482.

O'Toole G.A., Kaplan H.B. & Kolter R. (2000). Biofilm formation as microbial development. Annual Review Microbiology. 54: 49-79.

Phan Văn Hưng & Nguyễn Mạnh Cường (2019). Nghiên cứu về các khoá đào tạo và huấn luyện ứng phó sự cố tràn dầu trên biển: Đề xuất áp dụng tại Việt Nam. Tạp chí Khoa học Công nghệ Hàng hải. 59: 96-101.

Sayed K., Baloo L. & Sharma N.K. (2021). Bioremediation of Total Petroleum Hydrocarbons (TPH) by Bioaugmentation and Biostimulation in Water with Floating Oil Spill Containment Booms as Bioreactor Basin. International Journal of Environmental Research and Public Health. 18: 2226. /doi.org/10.3390/ijerph18052226

Sharma P. (2022). Roleandsignificanceofbiofilm-formingmicrobesin phytoremediation-Areview. Environmental Technology & Innovation. 25: 102182. doi.org/10.1016/j.eti.2021.102182.

Shimada K., Itoh Y., Washio K. & Morikawa M. (2012). Efficacy of forming biofilms by naphthalene degrading *Pseudomonas stutzeri* T102 toward bioremediation technology and its molecular mechanisms. Chemosphere. 87: 226-233.

Tripathi S., Chandra R., Purchase D., Bilal M., Mythili R. & Yadav S. (2022). Quorum sensing - a promising tool for degradation of industrial waste containing persistent organic pollutants. Environmental Pollution. 292: 118342. doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118342.

TCVN 4582 –1988 về phương pháp xác định hàm lượng dầu mỏ và các sản phẩm dầu mỏ - do Viện Tiêu chuẩn chất lượng Việt Nam, Bộ Khoa học và Công nghệ, ban hành.

Xue J., Yu Y., Bai Y., Wang L & Wu Y. (2015). Marine oil - degrading microorganisms and biodegradation process of petroleum hydrocarbon in marine environment: A review. Current Microbiology 71(2): 220-8. doi: 10.1007/s00284-015-0825-7.

Yamaga F., Washio K. & Morikawa M. (2010). Sustainable biodegradation of phenol by *Acinetobacter calcoacetius* P23 isolated from rhizosphere of Duckweed Lenma aoukikusa. Journal of Environmental Science Technology. 44: 6470-6474.