

DOI:10.22144/ctu.jvn.2021.006

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG PHÂN HỦY VÀ HÓA HƯỚNG ĐỘNG THEO DẦU NHỚT

Lê Hữu Nhân¹, Nguyễn Thị Ánh Tuyết² và Nguyễn Thị Phi Oanh^{3*}

¹Học viên Cao học ngành Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

²Sinh viên ngành Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

³Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Nguyễn Thị Phi Oanh (email: ntpoanh@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 11/09/2020

Ngày nhận bài sửa: 27/10/2020

Ngày duyệt đăng: 27/03/2021

Title:

Isolation and selection of bacteria capable of degrading and performing chemotaxis towards lubricating oil

Từ khóa:

Dầu nhờn, hóa hướng động, khoáng hóa, phân lập, vi khuẩn

Keywords:

Bacteria, chemotaxis, isolation, lubricating oil, mineralization

ABSTRACT

Lubricating oil are petroleum-based hydrocarbons that are widely used to lubricate machines, equipments, tools and engines. In soils, lubricating oil is mobile and can reach the water bodies hence affecting human health. This study aimed at isolating and selecting indigenous bacteria capable of mineralizing and performing chemotaxis towards lubricating oil. From the 3 lubricating oil contaminated soil samples collected in Can Tho city, 43 bacterial isolates able to grow on minimal medium supplemented with lubricating oil (1% v/v) as the only carbon source for bacterial growth were isolated. Among these, 27 isolates were Gram-negative bacteria and 16 isolates were Gram-positive bacteria. All isolates were able to grow on minimal medium with Tween 80 (1% v/v) addition. Three out of 43 isolates including GS20, GS21, and GS38 produced their biomass faster than the others. After 3 days of inoculating in minimal medium with lubricating oil added (2% v/v), GS20 showed its highest lubricating oil mineralization, via CO₂ evolved, with the efficiency of 93.4% significantly different ($p < 0.05$) from GS21 and GS38 that showed 72.9% and 54.9% of CO₂ production, respectively. Chemotaxis test of the 3 isolates indicated that only GS38 performed chemotaxis activity towards lubricating oil.

TÓM TẮT

Dầu nhờn là hỗn hợp gồm nhiều hydrocarbon được sử dụng rộng rãi để bôi trơn máy móc, thiết bị và động cơ của phương tiện giao thông. Khi thấm vào đất, dầu nhờn có thể di chuyển vào nguồn nước từ đó ảnh hưởng đến sức khỏe cộng đồng. Nghiên cứu được thực hiện nhằm phân lập và tuyển chọn các dòng vi khuẩn bản địa có khả năng khoáng hóa và hóa hướng động theo dầu nhờn. Từ ba mẫu đất nhiễm dầu nhờn thu ở nội ô Thành phố Cần Thơ, 43 dòng vi khuẩn (gồm 27 dòng Gram âm và 16 dòng Gram dương) phát triển trong môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung dầu nhờn (1% v/v) đã được phân lập. Các dòng vi khuẩn đều có khả năng sinh trưởng trong môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung Tween 80 (1% v/v), trong đó, 3 dòng GS20, GS21 và GS38 có khả năng phát triển mật số nhanh hơn so với các dòng vi khuẩn khác. Sau 3 ngày nuôi cấy trong môi trường khoáng tối thiểu bổ sung dầu nhờn (2% v/v), dòng GS20 có khả năng khoáng hóa dầu nhờn tạo ra khí CO₂ cao nhất, đạt hiệu suất sinh khí CO₂ là 93,4%, khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với dòng GS21 và GS38 với hiệu suất tích lũy CO₂ lần lượt là 72,9% và 54,9%. Kết quả khảo sát khả năng hóa hướng động của 3 dòng vi khuẩn GS20, GS21 và GS38 cho thấy chỉ có dòng GS38 có khả năng hóa hướng động theo dầu nhờn.

1. GIỚI THIỆU

Dầu nhớt là một hỗn hợp gồm 73 - 80% hydrocarbon không vòng, 11 - 15% hydrocarbon đơn vòng và 4 - 8% hydrocarbon đa vòng hoặc phân cực (Bhattacharya *et al.*, 2005) được sử dụng để phủ quanh các phần chuyển động của thiết bị nhằm giảm thiểu ma sát, tránh trầy xước các bộ phận của máy, rửa sạch cặn carbon và hạt vi mô, chống ăn mòn và làm mát thiết bị (Nowak, 2019). Trong quá trình sản xuất, vận chuyển, sử dụng, và tồn trữ thì sự rò rỉ dầu nhớt là không tránh khỏi. Dầu nhớt có thể làm tắc nghẽn các khoảng trống trong đất gây giảm sự thông khí và sự lưu thông của nước trong đất gây thoái hóa đất (Abosedo, 2013). Dầu nhớt có thể len lỏi trong các phân tử đất đi vào môi trường nước gây ảnh hưởng đến sinh vật thủy sinh và sức khỏe cộng đồng. Do đặc tính không tan trong nước nên dầu nhớt hình thành một lớp màng bao phủ mặt nước từ đó làm giảm lượng oxy hòa tan vào nước, giảm độ chiếu sáng gây ảnh hưởng đến hệ sinh thái (Nowak, 2019).

Sự ô nhiễm hydrocarbon, đặc biệt là các hydrocarbon có vòng thơm đang được tập trung nghiên cứu do các hợp chất này có thể trực tiếp hoặc gián tiếp ảnh hưởng đến sức khỏe cộng đồng. Khi người bị phơi nhiễm hydrocarbon đa vòng thơm trong thời gian dài có thể bị ung thư da hoặc ung thư dạ dày (Ambrosoli *et al.*, 2005; Veyrand *et al.*, 2013; Zafra *et al.*, 2015) do các hợp chất này có thể gắn với phân tử DNA hoặc protein gây ức chế miễn dịch hoặc phát sinh đột biến gen (Bumpus, 1989; Clemente *et al.*, 2001; Cerniglia and Sutherland, 2001; Zafra *et al.*, 2015; Desforges *et al.*, 2016).

Trong tự nhiên, một số vi khuẩn có khả năng sử dụng dầu nhớt như nguồn carbon và năng lượng cho sự tăng trưởng đã được công bố, chẳng hạn, vi khuẩn có khả năng phân hủy dầu nhớt được phân lập từ môi trường ô nhiễm dầu nhớt chủ yếu thuộc các chi *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Micrococcus* và *Bacillus* (Batista *et al.*, 2006; Ron and Rosenberg, 2014). Hiện nay, việc xử lý chất các hợp chất ô nhiễm bằng phương pháp sinh học thông qua sử dụng các dòng vi khuẩn bản địa phân hủy tốt các độc chất này được xem là một trong những biện pháp được ưu tiên lựa chọn do chi phí thấp và thân thiện với môi trường (Singh *et al.*, 2009).

Cần Thơ là một thành phố lớn với nhiều khu công nghiệp và phương tiện giao thông nên dầu nhớt được tiêu thụ một lượng rất lớn và rất thường xuyên. Chính vì vậy, sự rò rỉ dầu nhớt ra môi trường đất và nước là điều không thể tránh khỏi. Nhiều nghiên cứu

đã chứng minh dầu nhớt có ảnh hưởng đến hệ sinh thái và sức khỏe cộng đồng (Veyrand *et al.*, 2013; Zafra *et al.*, 2015). Tuy nhiên, cho đến nay hầu như chưa có các nghiên cứu về mức độ ô nhiễm nhớt trong đất và nước cũng như nghiên cứu về phân lập và tuyển chọn vi khuẩn có khả năng phân hủy dầu nhớt ở Cần Thơ nói riêng và Đồng bằng sông Cửu Long nói chung để xử lý môi trường đất và nước ô nhiễm dầu nhớt được công bố. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân lập và tuyển chọn các dòng vi khuẩn bản địa có khả năng phân hủy và hóa hướng động theo dầu nhớt để làm cơ sở cho các nghiên cứu ứng dụng tiếp theo trong việc xử lý ô nhiễm dầu nhớt trong môi trường đất và nước.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Phân lập vi khuẩn có khả năng phân hủy dầu nhớt từ đất ô nhiễm

Mẫu đất bị ô nhiễm với dầu nhớt trong thời gian dài được thu tại ba địa điểm trong nội ô thành phố Cần Thơ gồm hai cửa hàng sửa xe (cửa hàng 1: số 52 đường Hùng Vương, phường An Hội và cửa hàng 2: số 162/16b đường Trần Ngọc Quế, phường Xuân Khánh) và một xưởng cơ khí (số 47 đường Ngô Đức Kế, phường Tân An). Tại mỗi điểm thu mẫu, 3 mẫu đất mặt ở cạnh cống thoát nước có nhiễm dầu nhớt được thu bằng spatula sạch, các mẫu này được trộn đều trên một mâm sạch, sau đó thu một mẫu đất đại diện cho mỗi điểm, cho vào túi nylon và mang về phòng thí nghiệm. Mẫu đất sau khi thu được loại bỏ đá nhỏ, sỏi, lá cây,... trước khi tiến hành phân lập vi khuẩn. Quy trình phân lập vi khuẩn có khả năng khoáng hóa dầu nhớt được thực hiện như sau: Cho 5 g mẫu đất vào bình tam giác 100 mL chứa 45 mL môi trường khoáng tối thiểu (MM) lỏng. Thành phần của 1 lít môi trường MM gồm 1,4196 g Na_2HPO_4 ; 1,3609 g KH_2PO_4 ; 0,3 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,0985 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 5,75 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 3,2 mg Na_2EDTA ; 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 ; 0,235 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,125 mg $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 1000 mL H_2O ; pH=7±0,2 và bổ sung 1% (v/v) dầu nhớt (Dầu nhớt xe số, 4T SL10W-30, Honda) như là nguồn carbon duy nhất cho vi khuẩn sử dụng. Môi trường MM được khử trùng nhiệt ướt ở 121°C trong 20 phút dưới áp suất 1 atm. Mẫu được lắc 200 vòng/phút trên máy lắc tròn ở nhiệt độ phòng thí nghiệm (30 - 32°C). Sau một tuần nuôi cấy, chuyển 5 mL dịch huyền phù vi khuẩn sang bình tam giác 100 mL chứa 45 mL môi trường MM mới có bổ sung 1% (v/v) dầu nhớt và mẫu được đặt trên máy lắc tròn với tốc độ 200 vòng/phút ở nhiệt độ phòng

thí nghiệm. Lặp lại quy trình chuyển mẫu trong 3 lần liên tiếp. Sau 3 lần chuyển mẫu và nuôi cấy, mẫu được để yên 30 phút, chuẩn bị dãy nồng độ dịch huyền phù vi khuẩn pha loãng với môi trường MM đến 10^{-5} (hệ số pha loãng 10). Hút 10 μ L dịch huyền phù vi khuẩn của từng nồng độ pha loãng và trải lên bề mặt môi trường MM đặc (1,5% agar) có bổ sung Tween 80 (1% v/v) và ủ ở 32°C. Sau 4 ngày ủ, chọn những khuẩn lạc rời rạc, khác nhau về hình thái để phân lập thuần vi khuẩn bằng phương pháp cấy rìa trên môi trường Peptone-Tween 80 (peptone 10 g/L, NaCl 5 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1g/L, Tween 80 10 mL/L, agar 15g/L). Thí nghiệm phân lập vi khuẩn trong môi trường MM sử dụng Tween 80 thay dầu nhớt do thành phần của Tween 80 có cấu trúc mạch hydrocarbon thẳng tương tự dầu nhớt, đồng thời Tween 80 là chất nhũ hóa nên hòa tan hoàn toàn trong môi trường MM. Các dòng vi khuẩn có khả năng tạo vòng trong suốt quanh khuẩn lạc khi được nuôi cấy trên môi trường MM đặc hoặc Peptone có bổ sung Tween 80 là các dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy Tween 80 và cũng được xem là có khả năng phân hủy dầu nhớt. Các dòng vi khuẩn thuần được mô tả các đặc điểm về hình thái khuẩn lạc, tế bào và nhuộm Gram sau 4 ngày nuôi cấy trên môi trường Peptone-Tween 80.

2.2. Khảo sát sự tăng trưởng của các dòng vi khuẩn phân lập trong môi trường khoáng tối thiểu lỏng có bổ sung Tween 80

Chung một khuẩn lạc của mỗi dòng vi khuẩn phân lập vào ống nghiệm 12 mL có chứa 4 mL môi trường Tryptone Soya Broth (TSB, 30 g TSB/L). Môi trường TSB lỏng được khử trùng nhiệt uớt ở 121°C trong 20 phút dưới áp suất 1 atm. Mẫu được lắc với tốc độ 200 vòng/phút trên máy lắc tròn ở nhiệt độ phòng thí nghiệm trong 24 giờ. Sau thời gian ủ, điều chỉnh mật độ quang của mẫu ($\text{OD}_{600\text{nm}}$) về giá trị 0,8 (tương đương 10^9 CFU/mL) bằng nước khử khoáng vô trùng. Chung 40 μ L dịch huyền phù vi khuẩn sau khi điều chỉnh mật độ quang vào ống nghiệm 12 mL chứa 4 mL môi trường MM lỏng có bổ sung Tween 80 (1% v/v). Mẫu được lắc với tốc độ 200 vòng/phút trên máy lắc tròn ở nhiệt độ phòng thí nghiệm. Hai nghiệm thức đối chứng được thực hiện đồng thời gồm nghiệm thức 1 có chủng vi khuẩn nhưng không bổ sung Tween 80, nghiệm thức 2 có bổ sung Tween 80 nhưng không chủng vi khuẩn. Sau 3 ngày nuôi cấy, đo mật độ quang ($\text{OD}_{600\text{nm}}$) và so sánh sự khác nhau về độ đục (sinh khối) của từng dòng vi khuẩn so với hai nghiệm thức

đối chứng. Các dòng vi khuẩn tạo sinh khối cao (có giá trị mật độ quang cao) khi môi trường nuôi cấy có bổ sung Tween 80 so với môi trường không bổ sung Tween sẽ được tuyển chọn để sử dụng cho thí nghiệm tiếp theo.

2.3. Khảo sát khả năng khoáng hóa dầu nhớt của các dòng vi khuẩn phân lập

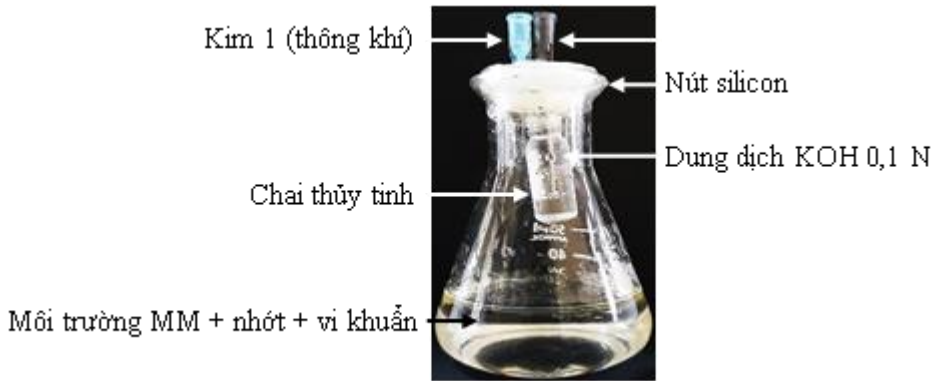
Khả năng khoáng hóa dầu nhớt của các dòng vi khuẩn phân lập được xác định thông qua hiệu suất tạo ra khí CO_2 từ quá trình khoáng hóa dầu nhớt và sự phát triển về mật số vi khuẩn trong môi trường nuôi cấy lỏng.

2.3.1. Xác định hiệu suất khí CO_2 sinh ra từ sự khoáng hóa sinh học dầu nhớt

Chung một khuẩn lạc của mỗi dòng vi khuẩn thuần (đã được tuyển chọn ở Mục 2.2) vào ống nghiệm 12 mL chứa 4 mL môi trường TSB tiệt trùng. Mẫu được lắc trên máy lắc tròn với tốc độ 200 vòng/phút trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng thí nghiệm. Tiến hành ly tâm với tốc độ 12.000 vòng/phút trong 5 phút, thu sinh khối vi khuẩn và hiệu chỉnh dịch huyền phù vi khuẩn về mật độ quang ($\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,8$) bằng môi trường MM. Sau đó, hút 300 μ L huyền phù vi khuẩn đã được điều chỉnh và chủng vào bình tam giác 50 mL chứa 30 mL môi trường MM tiệt trùng có bổ sung 2% (v/v) dầu nhớt. Hai nghiệm thức đối chứng được thực hiện song song gồm nghiệm thức 1 có chủng vi khuẩn nhưng không bổ sung dầu nhớt và nghiệm thức 2 có bổ sung dầu nhớt nhưng không chủng vi khuẩn. Đậy kín miệng bình bằng nút silicon và bơm 1,5 mL dung dịch KOH 0,1 N (thông qua kim 2) vào chai thủy tinh đã được gắn bên trong bình để cố định khí CO_2 sinh ra từ sự phân hủy dầu nhớt của vi khuẩn (Hình 1). Sau mỗi 24 giờ, thu thể tích KOH trong chai thủy tinh bằng ống tiêm sau đó bổ sung 1,5 mL dung dịch KOH 0,1 N mới vào chai thủy tinh (thông qua kim 2). Các bước bơm và hút KOH được thực hiện nhờ sự thông khí của kim 1. Trong suốt quá trình thí nghiệm, phần nhựa của kim 1 và 2 luôn được bao kín bằng paraffin để hạn chế tối đa khí CO_2 từ môi trường ngoài có thể khuếch tán vào bình tam giác.

Lượng KOH còn dư (chưa phản ứng với CO_2) được chuẩn độ bằng HCl 0,1N với chất chỉ thị màu là phenolphthalein. Hiệu suất sinh khí CO_2 sinh ra từ quá trình phân hủy dầu nhớt của vi khuẩn trong môi trường nuôi cấy lỏng theo thời gian thí nghiệm được tính tích lũy và xác định theo công thức sau:

$$\text{H\%} = \left(1 - \frac{\text{Thể tích HCl dùng để chuẩn độ ở nghiệm thức có chủng vi khuẩn}}{\text{Thể tích HCl dùng để chuẩn độ ở nghiệm thức đối chứng không chủng vi khuẩn}} \right) \times 100$$



Hình 1. Hệ thống phân hủy sinh học đơn giản để khảo sát khả năng khoáng hóa dầu nhớt của vi khuẩn

(mô phỏng theo hệ thống phân hủy sinh học đơn giản của phòng thí nghiệm Quản lý Đất và Nước, Bộ môn Khoa học đất và Môi trường, khoa Công nghệ Sinh học, Đại học Leuven, Bỉ).

2.3.2. Xác định mật số vi khuẩn trong môi trường nuôi cấy lỏng

Thí nghiệm được thực hiện tương tự và cùng thời điểm với thí nghiệm ở Mục 2.3.1 để khảo sát mật số vi khuẩn vào các thời điểm thu mẫu xác định lượng CO₂ phóng thích ra từ môi trường nuôi cấy lỏng thông qua tiến trình khoáng hóa. Vào mỗi thời điểm thu mẫu, hút 100 µL môi trường nuôi cấy lỏng của từng dòng vi khuẩn và cho vào eppendorf 2 mL có chứa 900 µL dung dịch phosphate buffered saline (PBS). Thành phần của 1 lít dung dịch PBS gồm 8 g NaCl, 200 mg KCl, 1,44 g Na₂HPO₄, 245 mg KH₂PO₄, 1000mL H₂O và pH 7,4. Thực hiện dãy nồng độ pha loãng dịch vi khuẩn đến 10⁻⁸ bằng dung dịch PBS (hệ số pha loãng 10). Hút 10 µL huyền phù vi khuẩn ở từng độ pha loãng và nhỏ 3 giọt (10 µL/giọt) lên 1/3 đĩa petri có chứa môi trường TSA (mỗi đĩa petri được chia làm 3 phần bằng nhau) và mẫu được ủ ở 32°C. Thành phần của 1 lít môi trường TSA gồm 30 g TSB và 15 g agar. Sau 24 giờ ủ, đếm số khuẩn lạc được hình thành trên bề mặt môi trường nuôi cấy và tính mật số vi khuẩn theo công thức:

$$\text{Mật số vi khuẩn (CFU/mL)} = \frac{\text{Số khuẩn lạc đếm được}}{\text{Độ pha loãng}} \times 100$$

2.4. Khảo sát khả năng khoáng hóa hướng động theo dầu nhớt của các dòng vi khuẩn tuyển chọn

Dựa vào kết quả thí nghiệm khảo sát khả năng khoáng hóa của các dòng vi khuẩn ở Mục 2.3.1, tuyển chọn các dòng vi khuẩn khoáng hóa dầu nhớt tốt nhất trong môi trường nuôi cấy lỏng. Các dòng vi khuẩn này được nuôi cấy trên môi trường TSA trong 1 ngày. Sau đó, chủng một khuẩn lạc của mỗi dòng vi khuẩn vào vào ống nghiệm 12 mL có chứa

4 mL môi trường TSB. Mẫu được lắc trên máy lắc tròn với tốc độ 200 vòng/phút trong 24 giờ. Điều chỉnh mật độ quang (OD_{600nm}) của dịch nuôi cấy vi khuẩn về giá trị 0,8. Sau đó, hút 1mL dịch vi khuẩn và cho vào eppendorf 2 mL, ly tâm mẫu ở 4°C với vận tốc 12.000 vòng/phút trong 5 phút. Sau đó, loại bỏ phần dung dịch phía trên. Sinh khối vi khuẩn được rửa 3 lần bằng dung dịch đệm. Thành phần của 1 lít dung dịch đệm gồm 6,1 mM K₂HPO₄; 3,9 mM KH₂PO₄; 20 µM EDTA và pH 7,0 (Ortega-Calvo et al., 2003).

Cho agar 2% có bổ sung 1 - 2 hạt crystal violet vào 5 mL nước cất và khuấy đều. Sau đó, đun nóng hỗn hợp 1 phút trong lò vi sóng và bổ sung 10 µL dầu nhớt vào dung dịch agar. Nhỏ 20 µL hỗn hợp dầu nhớt và agar lên kính mang vật (lame) sao cho giọt hỗn hợp nằm giữa hai thanh thủy tinh đã khử trùng (kích thước mỗi thanh thủy tinh tương ứng với chiều dài x rộng x cao là 75 x 25 x 1.2 mm) và để yên trong 1 giây. Đậy giọt hỗn hợp bằng kính đậy vật (lamelle) sao cho kính đậy vật nằm trên hai thanh thủy tinh. Dùng micropipette chuyển 500 µL dịch vi khuẩn đã được rửa và pha loãng trong dung dịch đệm vào khe trống giữa kính đậy vật và kính mang vật. Thí nghiệm được thực hiện với ba nghiệm thức: (1) nhỏ dung dịch vi khuẩn quanh giọt agar có bổ sung nhớt; (2) nhỏ dung dịch đệm quanh giọt agar có bổ sung nhớt và (3) nhỏ dung dịch huyền phù vi khuẩn quanh giọt agar không bổ sung nhớt. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Mẫu được để yên trong khoảng thời gian từ 5 - 30 phút. Sự tập trung tế bào vi khuẩn xung quanh giọt agar được quan sát dưới kính hiển vi (phóng đại 100 lần). Vi khuẩn có khả năng khoáng hóa hướng động theo dầu nhớt sẽ tập trung thành vòng trắng đục quanh giọt agar có bổ sung dầu nhớt trong khi ở các nghiệm thức đối chứng không

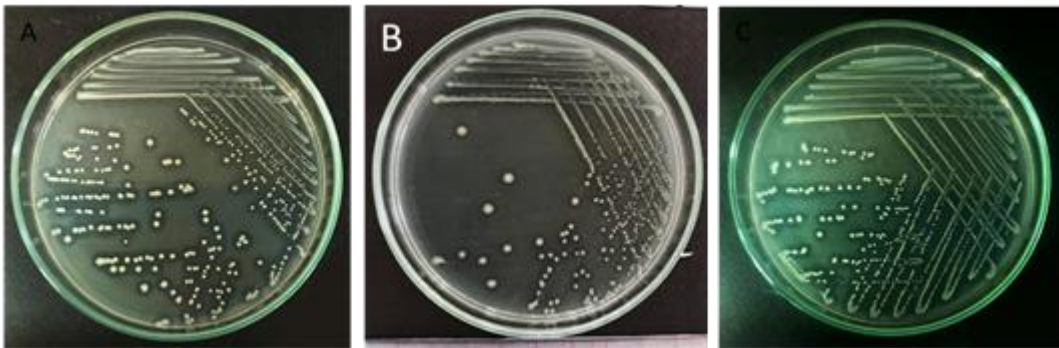
quan sát được hiện tượng này (Parales and Harwood, 2002).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập vi khuẩn có khả năng phân hủy dầu nhớt từ đất ô nhiễm dầu nhớt

Từ 3 mẫu đất được thu ở hai cửa hàng sửa xe và một xưởng cơ khí thuộc thành phố Cần Thơ, tổng cộng có 43 dòng vi khuẩn tạo vòng trong suốt quanh khuẩn lạc trên môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung Tween 80 (1% v/v) đã được phân lập. Trong đó, 27 dòng là vi khuẩn Gram âm và 16 dòng là vi khuẩn Gram dương. Về đặc điểm hình thái, 26 dòng vi khuẩn có khuẩn lạc dạng tròn (60,5%) và 17 dòng vi khuẩn có khuẩn lạc dạng không đều (39,5%); 34

dòng vi khuẩn tạo khuẩn lạc có màu trắng đục (79%), 8 dòng vi khuẩn có khuẩn lạc màu trắng trong (18,6%) và 1 dòng vi khuẩn có khuẩn lạc màu vàng (2,4%). Khuẩn lạc vi khuẩn có dạng bia nguyên là 21 dòng (48,8%), bia răng cưa là 13 dòng (30,2%) và bia có chia thùy là 9 dòng (21%). Về độ nổi, 29 dòng vi khuẩn tạo khuẩn lạc có độ nổi lồi (67,4%), 11 dòng vi khuẩn có khuẩn lạc phẳng (25,6%) và 3 dòng vi khuẩn có độ nổi mô (7%). Trong số 43 dòng vi khuẩn phân lập, 15 dòng được phân lập ở cửa hàng sửa xe 1 (34,8%), 14 dòng được phân lập ở cửa hàng sửa xe 2 (32,6%) và 14 dòng được phân lập ở xưởng cơ khí (32,6%). Hình thái khuẩn lạc của một số dòng vi khuẩn đại diện được minh họa ở Hình 2.



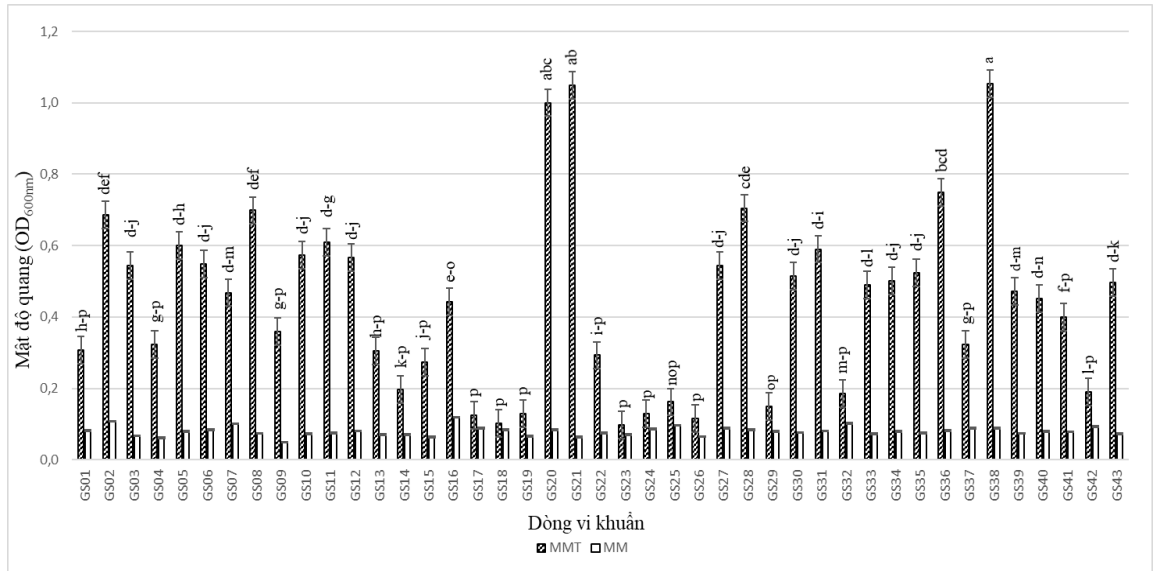
Hình 2. Hình thái khuẩn lạc của một số dòng vi khuẩn đại diện có khả năng phân hủy dầu nhớt được phân lập trên môi trường Tween-Peptone

A: dòng GS29; B: dòng GS41 và C: dòng GS43

3.2. Sự tăng trưởng về sinh khối của các dòng vi khuẩn phân lập trong môi trường khoáng tối thiểu lỏng có bổ sung Tween 80

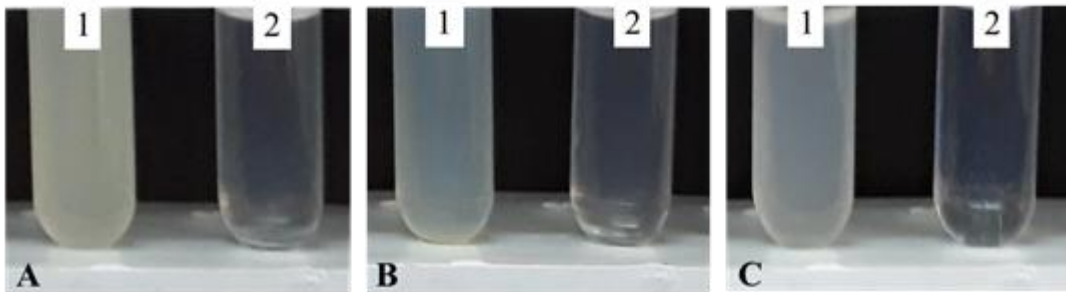
Kết quả khảo sát sự tăng trưởng về sinh khối của các dòng vi khuẩn phân lập trong môi trường khoáng tối thiểu lỏng bổ sung Tween 80 (1% v/v) cho thấy có sự khác nhau về sinh khối của các dòng vi khuẩn phân lập khi được nuôi cấy trong môi trường MM có bổ sung Tween 80 so với nghiệm thức đối chứng không bổ sung Tween 80. Tất cả 43 dòng vi khuẩn khảo sát đều tạo sinh khối vi khuẩn trong môi trường MM có bổ sung Tween 80 cao hơn rất nhiều so với môi trường MM không bổ sung Tween 80 (Hình 3). Trong các dòng vi khuẩn thử nghiệm, ba dòng GS20, GS21 và GS38 có giá trị mật độ quang lần lượt là 1,000; 1,049 và 1,053 sau 3 ngày khảo sát. Mật độ quang của 3 dòng vi khuẩn này trong môi trường MM bổ sung Tween 80 (1%

v/v) cao hơn so với 40 dòng vi khuẩn thử nghiệm còn lại, tuy nhiên, chỉ có dòng GS38 có giá trị mật độ quang khác biệt ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với 40 dòng vi khuẩn này. Mật độ quang của 3 dòng vi khuẩn GS20, GS21 và GS38 không khác biệt thống kê ($p < 0,05$) khi so sánh với nhau. Sự khác nhau về sinh khối của 3 dòng vi khuẩn GS20, GS21 và GS38 trong môi trường MM có và không bổ sung Tween 80 được minh họa ở Hình 4. Các dòng vi khuẩn có khả năng tạo sinh khối trong môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung Tween 80 chứng tỏ chúng có khả năng phân hủy và sử dụng Tween 80 như nguồn carbon cho quá trình sinh trưởng và phát triển trong thời gian thí nghiệm. Vì vậy, 3 dòng vi khuẩn GS20, GS21 và GS38 được tuyển chọn để tiến hành khảo sát khả năng khoáng hóa dầu nhớt. Các đặc điểm về hình thái khuẩn lạc và tế bào của 3 dòng vi khuẩn tuyển chọn GS20, GS21 và GS38 được trình bày ở Bảng 1 và minh họa ở Hình 5.



Hình 3. Giá trị mật độ quang của 43 dòng vi khuẩn phân lập sau 3 ngày nuôi cấy trong môi trường khoáng tối thiểu lỏng có bổ sung Tween 80 (MMT) và không bổ sung Tween 80 (MM)

Các giá trị trung bình theo sau có các mẫu tự giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%.

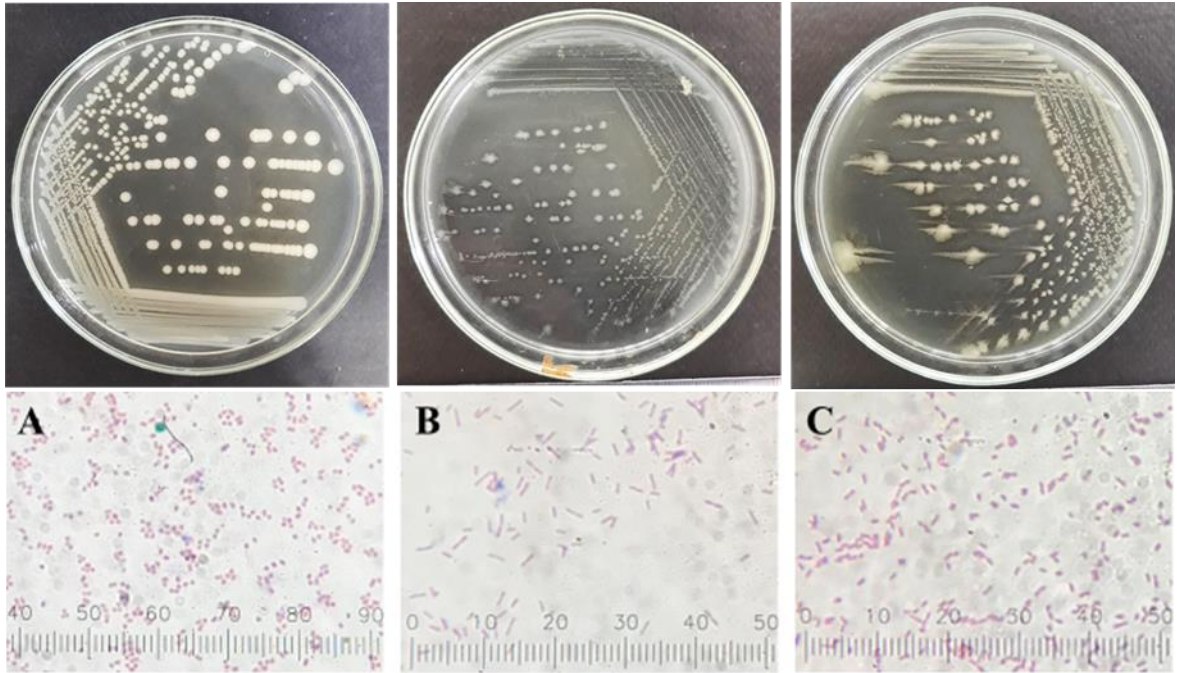


Hình 4: Sự khác biệt về sinh khối của 3 dòng vi khuẩn tiêu biểu nhất khi được nuôi cấy trong môi trường khoáng tối thiểu lỏng có (1) và không (2) bổ sung Tween 80

A: dòng GS20; B: dòng GS21 và C: dòng GS38

Bảng 1. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào của 3 dòng vi khuẩn tuyển chọn tạo sinh khối cao trong môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung Tween 80

Dòng	Đặc điểm khuẩn lạc					Đặc điểm tế bào			
	Hình dạng	Màu sắc	Chia thùy	Độ nổi	φ khuẩn lạc (mm)	φ vòng trong suốt (mm)	Hình dạng	Gram	Kích thước (μm)
GS20	tròn	trắng đục	nguyên	lồi	7	8,5	cầu	-	1
GS21	không đều	trắng đục	răng cưa	lồi	2,5	4	que	+	3x1
GS38	không đều	trắng đục	răng cưa	phẳng	6	6,5	que	-	1,5x1



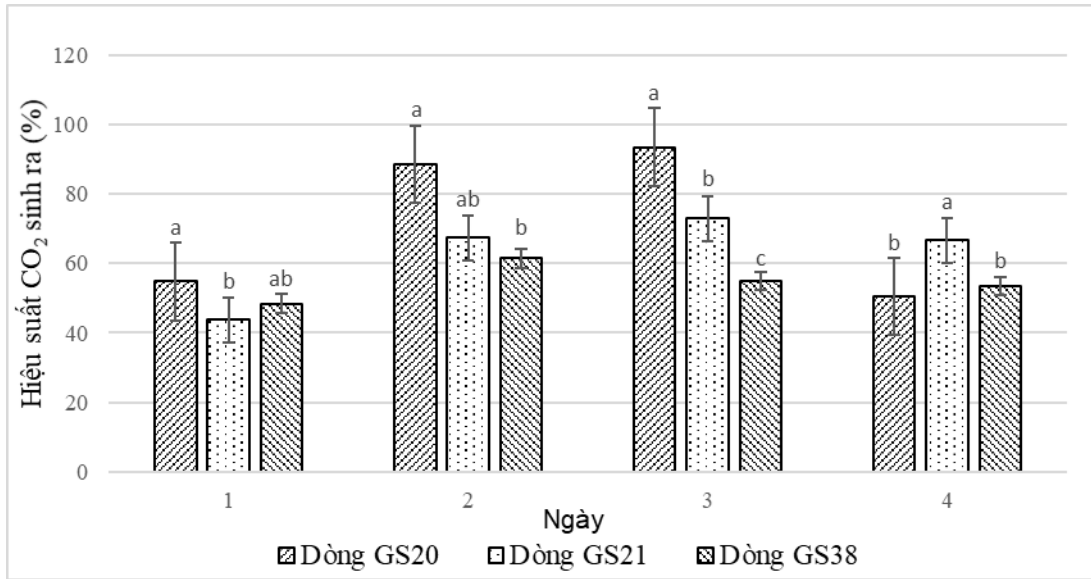
Hình 5. Hình thái khuẩn lạc và tế bào (phóng đại 1000 lần) của 3 dòng vi khuẩn tuyển chọn trên môi trường Tween-Peptone

A: dòng GS20, B: dòng GS21 và C: dòng GS38

3.3. Khả năng khoáng hóa dầu nhớt của 3 dòng vi khuẩn tuyển chọn

Ba dòng vi khuẩn được tuyển chọn gồm GS20, GS21 và GS38 được nuôi cấy trong môi trường khoáng tối thiểu lỏng có bổ sung dầu nhớt (2% v/v) như là nguồn cung cấp carbon duy nhất. Kết quả khảo sát khả năng khoáng hóa dầu nhớt thông qua chỉ tiêu CO₂ phóng thích ra từ môi trường nuôi cấy của 3 dòng vi khuẩn sau 4 ngày được trình bày trong Hình 6. Nhìn chung, lượng CO₂ sinh ra thông qua quá trình khoáng hóa dầu nhớt của cả 3 dòng vi khuẩn có xu hướng tăng trong thời gian thí nghiệm. Điều này cho thấy vi khuẩn có khả năng sử dụng dầu nhớt như là nguồn carbon cho sự sinh trưởng và phát triển. Ở mỗi thời điểm thu mẫu, các nghiệm thức được chủng vi khuẩn có lượng CO₂ sinh ra khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Dòng vi khuẩn GS20

có lượng CO₂ tích lũy cao hơn ở 3 ngày thu mẫu đầu tiên với hiệu suất lũy CO₂ cao nhất ở ngày thứ 3, đạt 93,4%, khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nghiệm thức có chủng dòng vi khuẩn GS21 và GS38 với hiệu suất CO₂ tích lũy lần lượt là 72,9% và 54,9%. Trong 3 dòng vi khuẩn khảo sát, dòng GS38 đạt hiệu suất tích lũy CO₂ cao nhất vào ngày 2, đạt 61,4%, trong khi hai dòng vi khuẩn GS20 và GS21 tích lũy CO₂ cao nhất vào ngày 3, đạt hiệu suất lần lượt là 93,4% và 72,9%. Vào thời điểm 4 ngày nuôi cấy, lượng CO₂ phóng thích bởi 3 dòng vi khuẩn có xu hướng giảm so với ngày thứ 3, điều này cho thấy cả 3 dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy nhớt hiệu quả ở thời điểm từ 2 - 3 ngày nuôi cấy. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy ở nghiệm thức đối chứng không chủng vi khuẩn, không phát hiện được CO₂ sinh ra trong thời gian thí nghiệm.

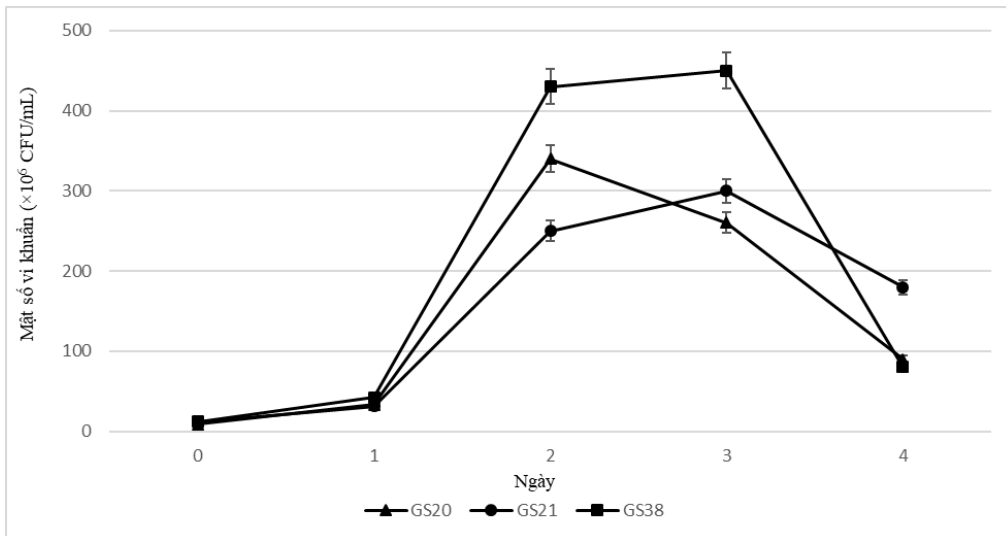


Hình 6. Lượng CO₂ tích lũy sinh ra từ sự khoáng hóa dầu nhớt trong môi trường MM lỏng có bổ sung dầu nhớt (2% v/v) của 3 dòng vi khuẩn sau 4 ngày nuôi cấy

Trong cùng một thời điểm, các giá trị trung bình theo sau có các mẫu tự giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%.

Kết quả khảo sát mật số vi khuẩn trong môi trường nuôi cấy lỏng theo thời gian bố trí thí nghiệm được trình bày trong Hình 7. Kết quả cho thấy nghiệm thức chủng dòng GS20 đạt mật số cao nhất vào thời điểm sau 2 ngày nuôi cấy, trong khi đó, cả hai nghiệm thức chủng dòng vi khuẩn GS21 và GS38 đạt mật số cao nhất sau 3 ngày nuôi cấy. Trong số 3 dòng vi khuẩn thử nghiệm, dòng GS38 có mật số vi khuẩn cao nhất, đạt $4,5 \times 10^8$ CFU/mL

sau 3 ngày nuôi cấy. Sau thời gian này, mật số vi khuẩn giảm mạnh. Như vậy, kết quả khảo sát khả năng khoáng hóa dầu nhớt thông qua việc xác định lượng khí CO₂ sinh ra có mối liên hệ với kết quả về mật số vi khuẩn trong thời gian thí nghiệm, điều này có nghĩa là khi mật số vi khuẩn tăng nhanh thì lượng CO₂ được sinh ra cũng tăng lên do vi khuẩn đã khoáng hóa được dầu nhớt hiện diện trong môi trường nuôi cấy lỏng.

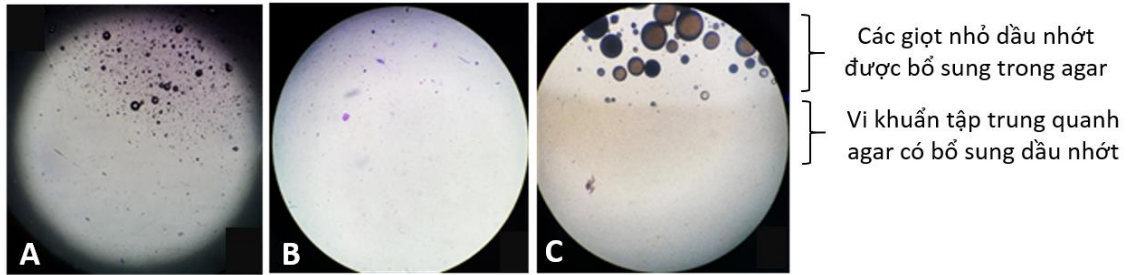


Hình 7. Mật số vi khuẩn trong môi trường MM lỏng bổ sung dầu nhớt (2% v/v) sau 4 ngày nuôi cấy

3.4. Khả năng hóa hướng động của 3 dòng vi khuẩn tuyển chọn theo dầu nhớt

Kết quả khảo sát khả năng hóa hướng động của 3 dòng vi khuẩn GS20, GS21 và GS38 (Hình 8) cho thấy chỉ có dòng vi khuẩn GS38 thể hiện có khả năng hóa hướng động theo dầu nhớt. Dưới kính hiển vi, khi được tiếp xúc với giọt agar có bổ sung dầu

nhớt (Hình 8.C), vi khuẩn tập trung tạo thành vòng trắng đục quanh giọt agar. Ngược lại, đặc điểm này không ghi nhận được ở nghiệm thức đối chứng khi cho vi khuẩn tiếp xúc với giọt agar không bổ sung dầu nhớt (Hình 8.B) và ở nghiệm thức đối chứng khi cho dung dịch đệm tiếp xúc với giọt agar có bổ sung dầu nhớt (Hình 8.A).



Hình 8. Khả năng hóa hướng động theo dầu nhớt của dòng vi khuẩn GS38 khi quan sát dưới kính hiển vi (phóng đại 100 lần)

A: đối chứng (giọt agar có bổ sung dầu nhớt + dung dịch đệm); B: đối chứng (giọt agar không bổ sung dầu nhớt + vi khuẩn); C: giọt agar có bổ sung dầu nhớt + huyền phù vi khuẩn

Hóa hướng động theo một hợp chất hữu cơ là đặc điểm thuận lợi của vi khuẩn trong quá trình sống. Vi khuẩn có khả năng phân hủy và có khả năng hóa hướng động theo một hợp chất nào đó giúp chúng có thể tìm đến và phân hủy hợp chất đó ở môi trường xung quanh ngay cả khi nồng độ của hợp chất đó rất thấp. Một số nghiên cứu trước đây của nhóm nghiên cứu cũng đã cho thấy dòng vi khuẩn TN3 được phân lập từ đất trồng nhãn ở Thốt Nốt thể hiện khả năng phân hủy và hóa hướng động theo hoạt chất kích thích ra hoa nhãn, $KClO_3$ (Trần Thị Diệu Nguyễn và ctv., 2017). Ngoài ra, vi khuẩn *Novosphingobium* sp. KN65.2 thể hiện khả năng phân hủy hiệu quả và hóa hướng động theo thuốc trừ sâu carbofuran (Nguyễn et al., 2014). Bên cạnh đó, dòng vi khuẩn *Pseudomonas putida* G7 có khả năng phân hủy phenanthrene cũng được chứng minh là có đặc tính hóa hướng động theo hợp chất hydrocarbon đa vòng thơm này (Grimm and Harwood, 1997). Trong nghiên cứu này, dòng vi khuẩn GS38 đã được chứng minh có khả năng khoáng hóa và hóa hướng động theo dầu nhớt. Do đó, dòng vi khuẩn GS38 được xem là dòng vi khuẩn tiềm năng nhất trong số các dòng vi khuẩn phân lập được và làm tiền đề cho các nghiên cứu ứng dụng tiếp theo để xử lý ô nhiễm dầu nhớt.

4. KẾT LUẬN

Từ 3 mẫu đất nhiễm dầu nhớt thu được tại 3 phường An Hội, Xuân Khánh và Tân An thuộc thành phố Cần Thơ, 43 dòng vi khuẩn khác nhau đã

được phân lập trong đó 15 dòng được phân lập ở cửa hàng sửa xe 1, 14 dòng được phân lập ở cửa hàng sửa xe 2 và 14 dòng được phân lập ở xưởng cơ khí. Trong 43 dòng vi khuẩn phân lập, 27 dòng là vi khuẩn Gram âm và 16 dòng là vi khuẩn Gram dương. Tất cả các dòng vi khuẩn đều có khả năng sinh trưởng trong môi trường khoáng tối thiểu lỏng có bổ sung Tween 80 (1% v/v), trong đó 3 dòng vi khuẩn ký hiệu GS20, GS21 và GS38 thể hiện khả năng phát triển sinh khối cao nhất. Sau 4 ngày nuôi cấy trong môi trường khoáng tối thiểu lỏng có bổ sung dầu nhớt, cả 3 dòng vi khuẩn này đều tăng sinh khối và sinh CO_2 cao, trong đó dòng GS20 có khả năng sinh CO_2 cao nhất với lượng CO_2 tích lũy đạt 93,4% sau 3 ngày nuôi cấy, khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với 2 dòng GS21 và GS38, đạt hiệu suất lần lượt là 72,9% và 54,9%. Trong 3 dòng vi khuẩn khảo sát, chỉ có dòng vi khuẩn Gram âm GS38 thể hiện khả năng hóa hướng động theo dầu nhớt, do đó dòng GS38 được xem là dòng vi khuẩn tiềm năng nhất sẽ được tiếp tục nghiên cứu nhằm có thể ứng dụng trong xử lý sinh học môi trường bị ô nhiễm dầu nhớt.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abosedo, E. E. (2013). Effect of crude oil pollution on some soil physical properties. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science*, 6: 14-17.
- Ambrosoli, R., Petruzzelli, L., Minati, J. R., & Minati, J. L. (2005). Selected PAHs concentration changes under nitrate and sulphate reducing conditions. *Chemosphere*, 60: 1231-1236.

- Batista, S. B., Mountee, A. H., Amorim, F. R., & Totola, M. R. (2006). Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. *Bioresource Technology*, 97: 868-875.
- Bhattacharya, M., Biswas, D., Sana, S., & Datta, S. (2005). Biodegradation of waste lubricants by a newly isolated *Ochrobactrum* sp. C1.3 *Biotechnology*, 5: 807-817.
- Bumpus, J. A. (1989). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(1): 154-158.
- Cerniglia, C. E. & Sutherland, J. B. (2001). Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by ligninolytic and non-ligninolytic fungi. In G. Gadd (Ed), *Fungi in bioremediation* (British Mycological Society Symposia, pp 136-187). Cambridge University Press. doi:10.1017/CBO9780511541780.008.
- Clemente, A. R., Anazawa, T. A., & Durrant, L. R. (2001). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by soil fungi. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32(4): 255-261.
- Desforges, J. W., Sonne, C., Levin, M., Siebert, U., Guise, S. D., & Dietz, R. (2016). Immunotoxic effects of environmental pollutants in marine mammals. *Environment International*, 86: 126-139.
- Grimm, A. C. & Harwood, C. S. (1997). Chemotaxis of *Pseudomonas* spp. to the polyaromatic hydrocarbon naphthalene. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(10): 4111-4115.
- Nguyen, T. P. O., Helbling, D. E., Bers, K., Fida, T. T., Wattiez, R., Kohler, H. P. E., ... & De Mot, R. (2014). Genetic and metabolic analysis of the carbofuran catabolic pathway in *Novosphingobium* sp. KN65. 2. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(19), 8235-8252.
- Nowak, P., Kucharska, K., & Kamiński, M. (2019). Ecological and health effects of lubricant oils emitted into the environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(16): 3002.
- Parales, R. E. & Harwood, C. S. (2002). Bacterial chemotaxis to pollutants and plant-derived aromatic molecules. *Current Opinion in Microbiology*, 5(3): 266-273.
- Ron, E. Z. & Rosenberg, E. (2014). Enhanced bioremediation of oil spills in the sea. *Current Opinion in Biotechnology*, 27: 191-194.
- Singh A., Kuhad R. C., and Ward O. P. (2009). Biological remediation of soil: An overview of global market and available technologies. In A. Singh, R. Kuhad, & O. Ward (Eds), *Advances in Applied Bioremediation. Soil Biology* (vol 17). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-89621-0_1
- Trần Thị Diệu Nguyễn, Nguyễn Thị Quỳnh Anh & Nguyễn Thị Phi Oanh (2017). Phân lập vi khuẩn có khả năng phân hủy chlorate kali từ đất trồng nhãn ở quận Thốt Nốt, Cần Thơ. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 53: 65-73
- Veyrand, B., Sirot, V., Durand, S., Pollono, C., Marchand, P., Dervilly-Pinel, G., ... & Le Bizec, B. (2013). Human dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: results of the second French Total Diet Study. *Environment International*, 54, 11-17.
- Zafra, G., Moreno-Montaña, A., Absalón, Á., & Cortés-Espinosa, D. (2015). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by a tolerant strain of *Trichoderma asperellum*. *Environmental Science and Pollution Research*, 22: 1034-1042.