

Phân lập vi khuẩn phân hủy toluene và khảo sát khả năng phân hủy hỗn hợp hydrocarbon thơm trong nước thải phòng thí nghiệm

Nguyễn Thị Phi Oanh*, Lê Hoàng Khang

Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

Ngày nhận bài 22/7/2021; ngày chuyển phản biện 25/7/2021; ngày nhận phản biện 30/8/2021; ngày chấp nhận đăng 6/9/2021

Tóm tắt:

Toluene là hydrocarbon thơm được sử dụng phổ biến như dung môi công nghiệp và là một trong những thành phần chính của xăng. Do tan được trong nước nên toluene có thể hiện diện ở nước mặt hoặc len lỏi từ đất xuống mạch nước ngầm, gây ảnh hưởng đến sức khỏe cộng đồng. Từ mẫu bùn thu tại hệ thống xử lý nước thải phòng thí nghiệm, 20 dòng vi khuẩn phát triển trên môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung toluene như nguồn carbon duy nhất đã được phân lập, trong đó 2 dòng vi khuẩn TL5 và TL27 có khả năng phân hủy toluene (0,025% v/v) tương ứng đạt 96,71 và 100% ở thời điểm 24 giờ nuôi cấy. Khảo sát khả năng phân hủy hỗn hợp hydrocarbon thơm hiện diện trong nước thải gồm acetophenone, benzaldehyde, phenol, pyridine, toluene và xylene cho thấy dòng TL27 có khả năng phân hủy hoàn toàn toluene và benzaldehyde, trong khi phenol, xylene, acetophenone và pyridine được phân hủy lần lượt là 88,27, 40,9, 34,67 và 23,26% ở thời điểm 4 ngày nuôi cấy. Dựa vào kết quả phân tích trình tự gen 16S-rRNA, dòng TL27 được xác định thuộc chi *Enterobacter* và được định danh là *Enterobacter* sp. TL27.

Từ khóa: *Enterobacter*, hydrocarbon thơm, nước thải, sự phân hủy sinh học, toluene.

Chỉ số phân loại: 1.6

Đặt vấn đề

Toluene là một trong các thành phần chính của xăng, là dung môi công nghiệp được sử dụng phổ biến trong sơn, sơn mài, keo dán... và cũng là dung môi được sử dụng trong các phòng thí nghiệm hóa học. Toluene là hợp chất dễ tan trong nước, dễ bay hơi và có tính linh động cao nên là một trong những hợp chất gây ô nhiễm mạch nước ngầm [1]. Chính vì vậy, nước thải có chứa toluene nếu không được xử lý đúng cách sẽ gây ô nhiễm môi trường, ảnh hưởng đến hệ sinh thái và sức khỏe cộng đồng. Khi hiện diện trong đất, toluene làm giảm quá trình nitrate hóa của quần thể vi sinh vật đất tham gia vào chu trình tuần hoàn nitơ [2]. Các nghiên cứu ở người cho thấy, phụ nữ bị phơi nhiễm toluene trước và trong khi mang thai sẽ làm cho tử cung chậm phát triển, sinh non, trẻ sơ sinh chậm phát triển... Các hậu quả này cũng được xác định ở chuột và thỏ [3].

Trong tự nhiên, toluene có thể được phân hủy hiếu khí bởi nhiều dòng vi khuẩn khác nhau như *Thauera* sp. DNT-1 [1], *Rhodococcus jostii* RHA1 [4] và *Acinetobacter junii* CH005 [5]. Các dòng vi khuẩn này được phân lập ở những nơi có sự hiện diện của toluene. Hơn nữa, một số dòng vi khuẩn phân hủy toluene như *Stenotrophomonas maltophilia* T3-c [6], *Pseudomonas putida* F1 [7] và *Pseudomonas putida* CCM1 852 [8] cũng được chứng minh có khả năng phân hủy hỗn hợp các hydrocarbon thơm khác nhau. Trong nghiên cứu này,

mẫu bùn lắng được thu từ hệ thống xử lý nước thải phòng thí nghiệm hóa học được sử dụng để phân lập vi khuẩn có khả năng phân hủy toluene và khảo sát khả năng phân hủy hỗn hợp hydrocarbon thơm hiện diện trong nước thải của dòng vi khuẩn đã tuyển chọn.

Nội dung nghiên cứu

Phân lập vi khuẩn có khả năng phân hủy toluene

Mẫu bùn được thu ở ngăn lắng của hệ thống xử lý nước thải phòng thí nghiệm hóa học. Cho 5 g bùn vào 20 ml môi trường khoáng tối thiểu (MM) (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 và 1000 ml nước cất) có bổ sung toluene ($\geq 99,5\%$) với hàm lượng 0,2% (v/v) như nguồn cung cấp carbon duy nhất. Mẫu được thông khí trên máy lắc 125 vòng/phút ở 32°C trong một tuần. Sau đó, mẫu được để lắng, chuyển 5 ml huyền phù vi khuẩn sang 20 ml môi trường MM mới có bổ sung 0,2% (v/v) toluene và được nuôi cấy như trên. Sau 3 lần chuyển mẫu và nuôi cấy, vi khuẩn được pha loãng và cấy trải trên môi trường MM đặc có bổ sung 0,2% (v/v) toluene. Vi khuẩn được ủ ở 32°C trong hai tuần. Những khuẩn lạc phát triển được tiếp tục cấy chuyển sang môi trường MM có chứa 0,2% (v/v) toluene. Độ thuần của các dòng vi khuẩn được kiểm tra trên môi trường

*Tác giả liên hệ: Email: ntpoanh@ctu.edu.vn

Isolation of toluene-degrading bacteria and investigation of the ability to decompose aromatic hydrocarbon mixture in laboratory wastewater

Thi Phi Oanh Nguyen*, Hoang Khang Le

College of Natural Sciences, Can Tho University

Received 22 July 2021; accepted 6 September 2021

Abstract:

Toluene is an aromatic hydrocarbon commonly used as a solvent in industry and as one of the main components of gasoline. Due to its solubility in water, the compound may accumulate in surface water or reach groundwater causing harmful effects on human health. Twenty bacterial strains grown on a minimal medium supplemented with toluene as the sole carbon source were isolated from the sediment samples of a laboratory wastewater treatment system. Among these, strains TL5 and TL27 performed toluene degradation capability. After 24 hours of incubation in a minimal medium supplemented with toluene (0.025% v/v) as the only carbon source, chromatographic data recorded that TL5 and TL27 degraded 96.71 and 100% toluene, respectively. In a minimal medium with a mixture of aromatic hydrocarbons added, after 4 days of incubation, toluene and benzaldehyde were completely degraded while phenol, xylene, acetophenone, and pyridine were degraded 88.27, 40.9, 34.67, and 23.26%, respectively. Based on 16S-rRNA sequence analysis, the potential aromatic hydrocarbon degrader was genetically identified as *Enterobacter* sp. TL27.

Keywords: aromatic hydrocarbon, biodegradation, *Enterobacter*, toluene, wastewater.

Classification number: 1.6

Trypticase soy agar (TSA, gồm 30 g/l Trypticase soy broth và 15 g/l agar).

Khả năng phân hủy toluene của vi khuẩn phân lập được xác định bằng cách chủng 5 μ l dịch vi khuẩn đã được nuôi cấy trong môi trường Trypticase soy broth (TSB, 30 g/l) ($OD_{600\text{ nm}}=1,0$) vào 3 ml môi trường MM có và không bổ sung toluene. Sự khác biệt về sinh khối vi khuẩn giữa hai nghiệm thức sau thời gian nuôi cấy chứng tỏ vi khuẩn có khả năng phân hủy toluene. Các khảo sát cho thấy ở nồng độ toluene 0,025% (v/v) thì vi khuẩn tạo sinh khối nhanh hơn so với các nồng độ 0,05; 0,125 và 0,25% (v/v). Do đó, nồng độ toluene 0,025% (v/v) được sử dụng để khảo sát sự phân hủy của vi khuẩn ở các thí nghiệm tiếp theo.

Khảo sát khả năng phân hủy toluene của vi khuẩn

Chủng 5 μ l vi khuẩn đã được nuôi cấy trong môi trường TSB ($OD_{600\text{ nm}}=1,0$) vào 3 ml môi trường MM có bổ sung toluene 0,025% (v/v) như nguồn cung cấp carbon duy nhất. Vi khuẩn được thông khí trên máy lắc với vận tốc 200 vòng/phút ở 32°C. Hai nghiệm thức đối chứng được thực hiện đồng thời gồm (1) Môi trường MM có bổ sung toluene nhưng không chủng vi khuẩn và (2) Môi trường MM không bổ sung toluene nhưng có chủng vi khuẩn. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần.

Sau mỗi 24 giờ nuôi cấy, thu 600 μ l mẫu và ly tâm ở tốc độ 14000 vòng/phút trong 5 phút. Sau khi ly tâm, toluene hiện diện trong phần dung dịch phía trên được ly trích bằng hexane ($\geq 97\%$) và được định lượng bằng thiết bị phân tích 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 μ m). Các thông số phân tích bao gồm: nhiệt độ bơm 270°C; nhiệt độ phát hiện 290°C; khí mang N₂; tốc độ dòng 1,1 ml/phút; tỷ lệ chia dòng 30; thể tích bơm 1 μ l. Chu trình nhiệt bao gồm nhiệt độ ban đầu là 50°C và giữ 5 phút, sau đó nhiệt độ được tăng dần với tốc độ 10°C/phút cho đến 100°C thì dừng lại. Toluene được phát hiện ở bước sóng 200 nm với thời gian lưu là 5,4 phút.

Khảo sát khả năng phân hủy hỗn hợp hydrocarbon thơm hiện diện trong nước thải của vi khuẩn

Chủng một khuẩn lạc vi khuẩn vào 4 ml môi trường TSB và nuôi cấy qua đêm. Điều chỉnh mật độ quang của vi khuẩn để $OD_{600\text{ nm}}$ đạt giá trị 1,0. Sau đó, chủng 75 μ l vi khuẩn vào 45 ml môi trường MM có bổ sung hỗn hợp 6 hydrocarbon thơm gồm acetophenone, benzaldehyde, phenol, pyridine, toluene và xylene với nồng độ 0,0125% (v/v) mỗi loại. Nghiệm thức đối chứng được thực hiện tương tự nhưng không chủng vi khuẩn. Mẫu được nuôi cấy trên máy lắc với tốc độ 200 vòng/phút ở 32°C. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần.

Acetophenone, benzaldehyde, phenol, pyridine, toluene và (*m*-, *p*-, *o*-) xylene được định lượng bằng phương pháp sắc ký khí GC-FID với cột SPB^{TM-5} fused silica capillary column (30 m x 0,25 mm; 0,25 μ m). Các thông số phân tích bao gồm nhiệt độ bơm 250°C, nhiệt độ phát hiện 250°C, khí mang N₂, tốc độ dòng 1 ml/phút, tỷ lệ chia dòng 40, thể tích bơm 1 μ l. Chu trình nhiệt gồm nhiệt độ ban đầu 50°C và giữ 5 phút, sau đó nhiệt độ được tăng dần với tốc độ 10°C/phút cho đến 200°C thì dừng lại. Thời gian lưu của toluene là 4,8 phút; pyridine 5,1 phút; *p*-xylene 7,4 phút; *m*-xylene 7,7 phút; *o*-xylene 8,6 phút; phenol 11,7 phút; benzaldehyde 12,6 phút; và acetophenone 15,5 phút ở bước sóng 200 nm. Để thuận tiện cho việc trình bày và so sánh các số liệu, hàm lượng xylene được thể hiện trong biểu đồ ở phần kết quả là tổng hàm lượng của 3 đồng phân *p*-xylene, *m*-xylene và *o*-xylene.

Định danh vi khuẩn phân hủy hiệu quả toluene và hỗn hợp hydrocarbon thơm

Vi khuẩn có khả năng phân hủy hiệu quả toluene và hỗn hợp hydrocarbon thơm được giải trình tự gen 16S-rRNA sử dụng cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC-3') và

1492R (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACT-3') [9]. Trình tự 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 (NCBI) bằng BlastN (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) để so sánh mức độ tương đồng của gen 16S-rRNA ở vi khuẩn phân lập với gen tương ứng ở các vi khuẩn hiện có trên cơ sở dữ liệu.

Kết quả và bàn luận

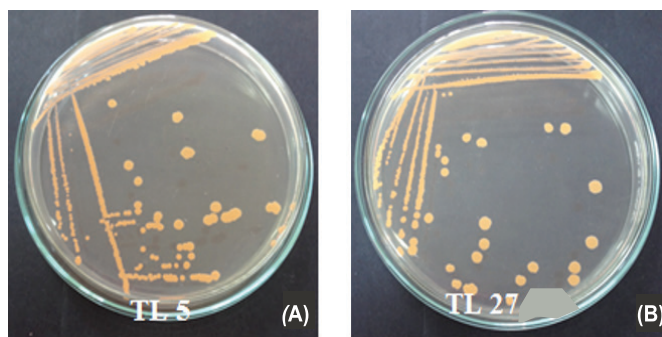
Vi khuẩn có khả năng phân hủy toluene

Từ mẫu bùn thu ở ngăn lắng của hệ thống xử lý nước thải, 20 dòng vi khuẩn phát triển trên môi trường MM có bổ sung toluene như là nguồn cung cấp carbon duy nhất đã được phân lập. Trên môi trường TSA, khuẩn lạc của các dòng vi khuẩn có hình tròn hoặc không đều; bìa nguyên hoặc chia thùy; màu vàng, cam hoặc trắng; độ nổi từ lồi đến mô; đường kính 1,5-6,5 mm ở thời điểm 4 ngày nuôi cấy (bảng 1). Trong 20 dòng vi khuẩn phân lập, hai dòng TL5 và TL27 có sự khác biệt về sinh khối khi được nuôi cấy trong môi trường MM lỏng có và không bổ sung toluene 0,025% (v/v). Ở thời điểm 24 giờ nuôi cấy, cả 2 dòng vi khuẩn đều tạo sinh khối trong môi trường có bổ sung toluene và không tạo sinh khối trong môi trường không bổ sung toluene, chứng tỏ vi khuẩn đã sử dụng toluene cho sự sinh trưởng và phát triển.

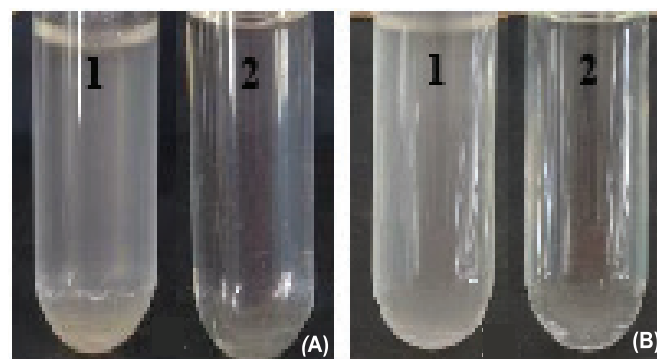
Bảng 1. Hình thái khuẩn lạc của vi khuẩn phân lập có khả năng phân hủy toluene.

TT	Dòng vi khuẩn	Hình dạng	Màu sắc	Bìa	Độ nổi	Đường kính (mm)
1	TL1	không đều	vàng nhạt	chia thùy	lồi	5
2	TL2	không đều	cam đậm	chia thùy	mô	6-6,5
3	TL3	tròn	vàng nhạt	nguyên	lồi	4,5
4	TL4	tròn	trắng trong	nguyên	lồi	4
5	TL5	không đều	cam đậm	chia thùy	mô	4
6	TL7	tròn	vàng đục	nguyên	lồi	1,5
7	TL9	không đều	trắng đục	chia thùy	mô	6-6,5
8	TL12	không đều	trắng đục	chia thùy	mô	5-5,5
9	TL15	không đều	trắng đục	chia thùy	lồi	3,5-4
10	TL18	không đều	trắng đục	chia thùy	lồi	4-4,5
11	TL20	không đều	trắng đục	chia thùy	lồi	4,5-5
12	TL21	tròn	vàng nhạt	nguyên	mô	3
13	TL24	tròn	trắng trong	nguyên	lồi	2,5
14	TL27	không đều	cam đậm	chia thùy	mô	4,5
15	TL28	tròn	vàng nhạt	chia thùy	lồi	3
16	TL29	tròn	vàng nhạt	nguyên	lồi	3
17	TL30	tròn	vàng nhạt	nguyên	lồi	2
18	TL35	không đều	vàng nhạt	chia thùy	lồi	5
19	TL36	tròn	trắng đục	nguyên	lồi	3
20	TL39	tròn	vàng trong	nguyên	lồi	3

Về đặc điểm hình thái, ở thời điểm 3 ngày nuôi cấy trên môi trường TSA, khuẩn lạc của dòng TL5 có màu cam, đường kính 4,2 mm, khuẩn lạc có hình dạng không đều, độ nổi mô, bìa chia thùy. Dòng TL27 có khuẩn lạc màu cam đậm, đường kính 4,5 mm, không đều, độ nổi mô, bìa chia thùy. Hình thái khuẩn lạc và sự khác biệt về sinh khối của 2 dòng vi khuẩn TL5 và TL27 được minh họa ở hình 1 và hình 2.



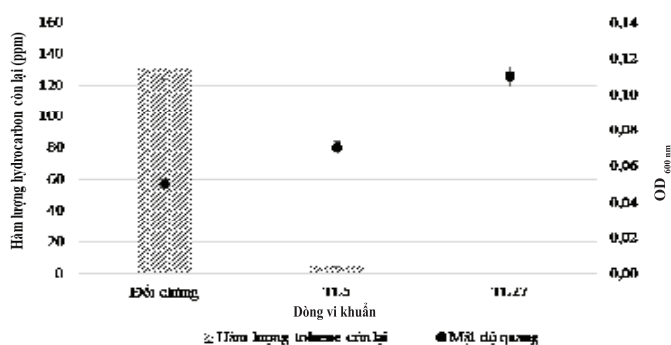
Hình 1. Hình thái khuẩn lạc vi khuẩn phân hủy toluene khi được nuôi cấy trên môi trường TSA. (A) Dòng TL5, (B) Dòng TL27.



Hình 2. Sự khác biệt về sinh khối vi khuẩn khi được nuôi cấy trong môi trường MM có (1) hoặc không bổ sung toluene (2). (A) Dòng TL5, (B) Dòng TL27.

Hiệu quả phân hủy toluene của vi khuẩn

Kết quả nghiên cứu ở thời điểm 24 giờ nuôi cấy vi khuẩn TL5 và TL27 trong môi trường MM có bổ sung toluene 0,025% (v/v) cho thấy có sự gia tăng mật độ quang của vi khuẩn so với nghiệm thức đối chứng không bổ sung toluene, chứng tỏ vi khuẩn đã sử dụng toluene trong môi trường như nguồn carbon cho sự tăng trưởng (hình 3). Điều này cũng được khẳng định qua kết quả phân tích sắc ký khí GC-FID, hàm lượng toluene giảm đáng kể ở thời điểm 24 giờ nuôi cấy, trong đó, dòng TL27 có khả năng phân hủy 100% và dòng TL5 có khả năng phân hủy 96,71% toluene. Đồng thời, so với dòng vi khuẩn TL5, dòng TL27 cũng có sự gia tăng sinh khối nhanh hơn trong môi trường MM lỏng có bổ sung toluene (hình 3).



Hình 3. Mối liên hệ giữa hàm lượng toluene còn lại và mật độ quang của dòng vi khuẩn TL5 và TL27 ở thời điểm 24 giờ nuôi cấy trong môi trường MM có bổ sung toluene 0,025% (v/v).

Đối chứng: môi trường MM có bổ sung toluene nhưng không chủng vi khuẩn.

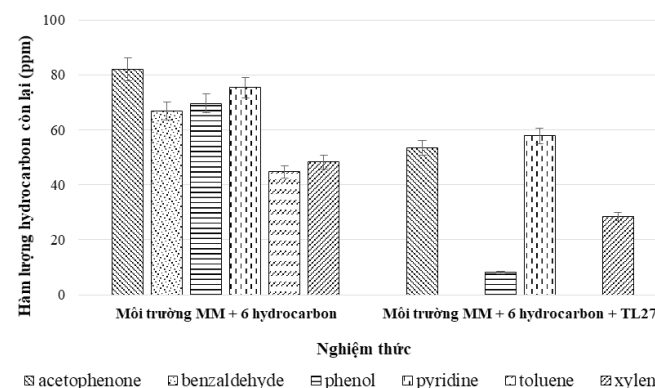
Các dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy toluene chủ yếu được phân lập từ đất nhiễm xăng, dầu hoặc trong nước thải. Chẳng hạn, hai dòng vi khuẩn Gram dương gồm *Rhodococcus jostii* RHA1 được phân lập từ mẫu đất thu ở nơi sửa ô tô [4] và Ex-DG74 được phân lập trong nước thải, trong đó dòng Ex-DG74 phân hủy 79% toluene (1%, v/v) ở thời điểm 24 giờ nuôi cấy trong điều kiện hiếu khí [9]. Các dòng vi khuẩn Gram âm như *Thauera* sp. DNT-1 được phân lập từ hệ thống xử lý nước thải [1] và dòng *Acinetobacter junii* CH005 được phân lập từ đất nhiễm dầu [5] cũng được chứng minh có khả năng phân hủy toluene hiệu quả. Trong nghiên cứu này, dòng vi khuẩn TL27 có khả năng phân hủy hoàn toàn 0,025% (v/v) toluene ở thời điểm 24 giờ nuôi cấy. Như vậy, so với dòng Ex-DG74, dòng vi khuẩn TL27 phân hủy toluene hiệu quả ở nồng độ thấp hơn. Trong xử lý nước bằng biện pháp sinh học, vi khuẩn có khả năng phân hủy các chất hữu cơ ở nồng độ thấp là những dòng vi khuẩn được ứng dụng trong xử lý nước dùng cho sinh hoạt do khả năng phát hiện và phân hủy được các hợp chất ô nhiễm ngay cả khi các chất này hiện diện ở nồng độ rất thấp. Như vậy, dòng vi khuẩn TL27 được xem là dòng vi khuẩn tiềm năng có thể được tiếp tục nghiên cứu để xử lý toluene trong nước thải.

Khả năng phân hủy hỗn hợp hydrocarbon thơm của vi khuẩn

Trong 2 dòng vi khuẩn được tuyển chọn, dòng TL27 có khả năng phân hủy toluene hiệu quả hơn nên dòng vi khuẩn này được tiếp tục sử dụng để khảo sát khả năng phân hủy hỗn hợp hydrocarbon thơm hiện diện trong hệ thống xử lý nước thải phòng thí nghiệm hóa học gồm acetophenone, benzaldehyde, phenol, pyridine, toluene và xylene.

Ở thời điểm 4 ngày nuôi cấy trong môi trường MM có bổ sung hỗn hợp 6 hydrocarbon thơm, dòng TL27 đã phân hủy 100% toluene và benzaldehyde, kể đến là phenol (88,27%), xylene (40,9%), acetophenone (34,67%) và pyridine (23,26%) so với nghiệm thức đối chứng không chủng vi khuẩn. Như vậy, dòng vi khuẩn TL27 ngoài khả năng phân hủy hiệu quả toluene còn có khả năng phân hủy các hydrocarbon thơm khác hiện diện trong nước thải, trong

đó benzaldehyde được phân hủy hiệu quả nhất, kể đến là phenol, xylene, acetophenone và pyridine (hình 4).



Hình 4. Hàm lượng hydrocarbon thơm còn lại ở thời điểm 4 ngày trong môi trường MM có và không chủng vi khuẩn TL27.

Trong tự nhiên, một số dòng vi khuẩn cũng được chứng minh có khả năng phân hủy các chất hữu cơ đồng đẳng do mỗi dòng vi khuẩn có lộ trình phân hủy các hợp chất này tương tự nhau. Chẳng hạn, dòng *Stenotrophomonas maltophilia* T3-c có khả năng phân hủy toluene, benzene và ethylbenzene [6]; *Pseudomonas putida* F1 có thể phân hủy benzene, toluene và o-xylene [7]; *Pseudomonas putida* CCMI 852 có thể sử dụng benzene, toluene và xylene như nguồn carbon cho sự tăng trưởng và phát triển [8]. Trong nghiên cứu này, dòng vi khuẩn TL27 được phân lập từ nước thải phòng thí nghiệm có khả năng phân hủy hỗn hợp 6 hydrocarbon thơm hiện diện trong nước thải, bao gồm acetophenone, benzaldehyde, phenol, pyridine, toluene và xylene. Như vậy, ngoài khả năng phân hủy hợp chất hữu cơ có cấu tạo hóa học tương tự như toluene và xylene, dòng vi khuẩn TL27 còn có khả năng phân hủy những hydrocarbon thơm có nhóm chức khác nhau như acetophenone, benzaldehyde, phenol và pyridine. Điều này có thể được giải thích là do các hợp chất có vòng thơm được vi khuẩn phân hủy theo 2 lộ trình chung: (1) oxy hóa vòng thơm nhờ các enzyme oxygenase tạo thành hợp chất trung gian catechol và (2) cắt vòng thơm thành những hợp chất có thể tham gia vào chu trình Krebs [10]. Trên cơ sở các tài liệu đã tham khảo, có thể kết luận TL27 là dòng vi khuẩn đầu tiên được phân lập có khả năng phân hủy nhiều loại hợp chất có vòng thơm hiện diện trong nước thải nơi dòng vi khuẩn này đã được phân lập. Vi khuẩn phân hủy được nhiều hợp chất khác nhau là những dòng vi khuẩn được quan tâm nghiên cứu để xử lý các chất ô nhiễm trong môi trường.

Định danh vi khuẩn phân hủy hiệu quả toluene và hỗn hợp hydrocarbon thơm

Kết quả phân tích trình tự gen 16S-rRNA cho thấy, dòng vi khuẩn TL27 có trình tự gen tương đồng 99,15% so với dòng vi khuẩn *Enterobacter* sp. dòng M332 (accession number MH669192.1) (bảng 2), do đó dòng TL27 thuộc chi *Enterobacter*, họ Enterobacteriaceae, bộ Enterobacteriales, lớp α -Proteobacteria và được định danh là *Enterobacter* sp. TL27.

Bảng 2. Sự tương đồng về trình tự gen 16S-rRNA của dòng vi khuẩn TL27 so với các dòng vi khuẩn trên cơ sở dữ liệu.

Các dòng vi khuẩn tương đồng	Độ phủ (%)	Độ tương đồng (%)	Accession number
<i>Enterobacter cloacae</i> dòng OsEp_Plm_30P18	100	98,73	MT367828.1
<i>Enterobacter</i> sp. dòng L32	100	98,87	MT505114.1
<i>Enterobacter cancerogenus</i> dòng ILQ201	100	98,73	MN826153.1
<i>Enterobacter</i> sp. dòng M332	100	99,15	MH669192.1
<i>Enterobacter asburiae</i> dòng M424	100	98,73	MH669138.1
<i>Enterobacter asburiae</i> dòng EB137	100	98,73	MH127569.1

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh vi khuẩn thuộc chi *Enterobacter* có khả năng phân hủy nhiều loại hợp chất hữu cơ gây ô nhiễm khác nhau, như polychlorinated biphenyls [11], chất gây độc cho hệ thần kinh và có khả năng gây ung thư acrylamide [12], dầu thô [13], thuốc diệt côn trùng chlorpyrifos [14], *N*-methylated carbamates [15], hydrocarbon đa vòng thơm [16], nhựa polyethylene [17], chất hóa dẻo trong sản xuất nhựa di(2-ethylhexyl)phthalate [18]. Dòng vi khuẩn *Enterobacter* sp. TL27 được chứng minh có khả năng phân hủy toluene hiệu quả nhất trong các dòng vi khuẩn phân lập và có thể phân hủy nhiều loại hydrocarbon thơm khác nhau. Kết quả này bổ sung thông tin về khả năng phân hủy sinh học đa dạng của các vi khuẩn thuộc chi *Enterobacter*. Tuy nhiên cần có những nghiên cứu tiếp theo về điều kiện tối ưu cho sự phân hủy của vi khuẩn như nhiệt độ, pH, sự thông khí, đồng thời nghiên cứu chất mang phù hợp để tồn trữ vi khuẩn dòng TL27 làm cơ sở cho việc tổng hợp chế phẩm vi sinh để xử lý hydrocarbon thơm trong nước và trong đất.

Kết luận

Dòng vi khuẩn *Enterobacter* sp. TL27 được phân lập từ hệ thống xử lý nước thải phòng thí nghiệm có thể phân hủy 100% toluene (0,025% v/v) ở thời điểm 24 giờ nuôi cấy và có khả năng phân hủy hiệu quả các hydrocarbon thơm khác hiện diện trong nước thải như acetophenone, benzaldehyde, phenol, pyridine và xylene. Điều này cho thấy vi khuẩn *Enterobacter* sp. TL27 thích nghi và có khả năng sử dụng các nguồn carbon trong môi trường sống của chúng cho sự sinh trưởng và phát triển. Vi khuẩn có khả năng phân hủy nhiều hợp chất hữu cơ khác nhau là những dòng vi khuẩn được đặc biệt quan tâm trong các nghiên cứu ứng dụng để xử lý chất ô nhiễm bằng biện pháp sinh học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Y. Shinoda, Y. Sakai, H. Uenishi, Y. Uchihashi, A. Hiraishi, H. Yukawa, H. Yurimoto, N. Kato (2004), "Aerobic and anaerobic toluene degradation by a newly isolated denitrifying bacterium, *Thauera* sp. strain DNT-1", *Applied and Environmental Microbiology*, **70**(3), pp.1385-1392.
- [2] M.E. Fuller, K.M. Scow (1996), "Effects of toluene on microbially-mediated processes involved in the soil nitrogen cycle", *Microbial Ecology*, **32**(2), pp.171-184.
- [3] J.M. Donald, K. Hooper, C. Hopenhayn-Rich (1991), "Reproductive and developmental toxicity of toluene: a review", *Environmental Health Perspectives*, **94**, pp.237-244.

- [4] A. Woods, M. Watwood, E. Schwartz (2011), "Identification of a toluene-degrading bacterium from a soil sample through $H_2^{18}O$ DNA stable isotope probing", *Applied and Environmental Microbiology*, **77**(17), pp.5995-5999.

- [5] P. Singh, V.K. Singh, R. Singh, A. Borthakur, A. Kumar, D. Tiwary, P.K. Mishra (2018), "Biological degradation of toluene by indigenous bacteria *Acinetobacter junii* CH005 isolated from petroleum contaminated sites in India", *Energy, Ecology and Environment*, **3**, pp.162-170.

- [6] E.Y. Lee, Y.S. Jun, K.S. Cho, H.W. Ryu (2002), "Degradation characteristics of toluene, benzene, ethylbenzene, and xylene by *Stenotrophomonas maltophilia* T3-c", *Journal of the Air & Waste Management Association*, **52**, pp.400-406.

- [7] J.R. Robledo-Ortiz, D.E. Ramírez-Arreola, A.A. Pérez-Fonseca, C. Gómez, O. González-Reynoso, J. Ramos-Quirarte, R. González-Núñez (2011), "Benzene, toluene, and o-xylene degradation by free and immobilized *Pseudomonas putida* F1 of postconsumer agave-fiber/polymer foamed composites", *International Biodeterioration & Biodegradation*, **65**, pp.539-546.

- [8] M.H. Otenio, M.T. Lopes da Silva, M.L.O. Marques, J.C. Roseiro, E.D. Bidoia (2005), "Benzene, toluene and xylene biodegradation by *Pseudomonas putida* CCM1 852", *Brazilian Journal of Microbiology*, **36**, pp.258-261.

- [9] H.A. Afrouzossadat, G. Emtiazi, S.M. Ghasemi, R. Roghanian (2013), "Isolation and characterization of a novel toluene-degrading bacterium exhibiting potential application in bioremediation", *Jundishapur Journal of Microbiology*, **6**(3), pp.256-261.

- [10] F.L.G. Arengi, D. Berlanda, E. Galli, G. Sello, P. Barbieri (2001), "Organization and regulation of *meta* cleavage pathway genes for toluene and o-xylene derivative degradation in *Pseudomonas stutzeri* OX1", *Applied and Environmental Microbiology*, **67**(7), pp.3304-3308.

- [11] L.Y. Jia, A.P. Zheng, L. Xu, X.D. Huang, Q. Zhang, F.L. Yang (2008), "Isolation and characterization of comprehensive polychlorinated biphenyl degrading bacterium, *Enterobacter* sp. LY402", *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **18**(5), pp.952-957.

- [12] K. Buranasilp, J. Charoenpanich (2011), "Biodegradation of acrylamide by *Enterobacter aerogenes* isolated from wastewater in Thailand", *Journal of Environmental Sciences*, **23**(3), pp.396-403.

- [13] A.W. Ahmed, F.S. Alzubaidi, S.J. Hamza (2014), "Biodegradation of crude oil in contaminated water by local isolates of *Enterobacter cloacae*", *Iraqi Journal of Science*, **55**(3A), pp.1025-1033.

- [14] B.K. Singh, A. Walker, J.A.W. Morgan, D.J. Wright (2004), "Biodegradation of chlorpyrifos by *Enterobacter* strain B-14 and its use in bioremediation of contaminated soils", *Applied and Environmental Microbiology*, **70**(8), pp.4855-4863.

- [15] A. Fareed, H. Zaffar, A. Rashid, M.M. Shah, T.A. Naqvi (2017), "Biodegradation of *N*-methylated carbamates by free and immobilized cells of newly isolated strain *Enterobacter cloacae* strain TA7", *Bioremediation Journal*, **21**(3-4), pp.119-127.

- [16] Z.D. Umar, N.A.A. Aziz, S.Z. Zulkifli, M. Mustafa (2018), "Effective phenanthrene and pyrene biodegradation using *Enterobacter* sp. MM087 (KT933254) isolated from used engine oil contaminated soil", *Egyptian Journal of Petroleum*, **27**(3), pp.349-359.

- [17] L. Ren, L. Men, Z. Zhang, F. Guan, J. Tian, B. Wang, J. Wang, Y. Zhang, W. Zhang (2019), "Biodegradation of polyethylene by *Enterobacter* sp. D1 from the guts of wax moth *Galleria mellonella*", *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **16**(11), pp.1941.

- [18] I. Lamraoui, A. Eltouky, J. Wang, M. Lamraoui, A. Ahmed, Y. Jia, T. Lu, Y. Yan (2020), "Biodegradation of di(2-ethylhexyl) phthalate by a novel *Enterobacter* spp. strain YC-IL1 isolated from polluted soil, Mila, Algeria", *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **17**(20), pp.7501.