

TỐI ƯU HÓA ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY VÀ KHẢO SÁT KHẢ NĂNG PHÂN HỦY DIBENZOFURAN VÀ NAPHTHALENE CỦA CHỦNG VI KHUẨN *Paenibacillus naphthalenovorans* 4B1

Lê Thị Hà Thanh^{1*}, Nguyễn Thị Thanh Thủy², Lê Thị Vân Anh¹, Nguyễn Thị Kiều Giang¹,
Hoàng Dương Thu Hương¹

¹ Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế, 77 Nguyễn Huệ, Huế, Việt Nam

² Trường THPT Nguyễn Bình Khiêm, huyện Chư Sê, tỉnh Gia Lai, Việt Nam

* Tác giả liên hệ Lê Thị Hà Thanh <lethihathanh@hueuni.edu.vn>

(Ngày nhận bài: 21-12-2023; Hoàn thành phản biện: 02-02-2024; Ngày chấp nhận đăng: 28-02-2024)

Tóm tắt. Ô nhiễm các hợp chất hydrocarbon thơm đa vòng gây ra do dư lượng chất độc chiến tranh hoặc từ chất thải của các hoạt động công nghiệp đã để lại nhiều hậu quả nghiêm trọng cho sức khỏe con người và môi trường sinh thái. Phương pháp phục hồi sinh học sử dụng các vi sinh vật có khả năng phân hủy các hợp chất ô nhiễm cho thấy hiệu quả xử lý cao, chi phí thấp, bền vững và thân thiện với môi trường hơn so với các phương pháp lý hóa thông thường. Trong nghiên cứu này, chủng vi khuẩn *Paenibacillus naphthalenovorans* 4B1, phân lập từ đất nhiễm dioxin, được nghiên cứu tối ưu hóa các điều kiện nuôi cấy và đánh giá khả năng phân hủy các hợp chất dibenzofuran và naphthalene. Kết quả nghiên cứu cho thấy chủng vi khuẩn này sinh trưởng tốt nhất trên môi trường muối khoáng bổ sung 1250 mg/L dibenzofuran hoặc 750 mg/L naphthalene, pH 7,0, nuôi cấy ở nhiệt độ 45°C và tốc độ khuấy trộn 180 vòng/phút với mật độ tế bào lần lượt là $9,42 \times 10^7$ và $5,6 \times 10^7$ CFU/mL. Phân tích sắc ký khí hàm lượng cơ chất còn lại trong môi trường nuôi cấy cho thấy chủng 4B1 có khả năng phân hủy dibenzofuran và naphthalene với hiệu suất lần lượt là 79,76% và 83,03% sau 72 giờ nuôi cấy. Kết quả này là cơ sở cho việc ứng dụng chủng vi khuẩn *Paenibacillus naphthalenovorans* 4B1 trong nghiên cứu xử lý các môi trường bị ô nhiễm các hợp chất hydrocarbon thơm đa vòng.

Từ khóa: naphthalene, dibenzofuran, phân hủy, *Paenibacillus*

Optimization of culture conditions and study on naphthalene and dibenzofuran degradation abilities of *Paenibacillus naphthalenovorans* 4B1

Le Thi Ha Thanh^{1*}, Nguyen Thi Thanh Thuy², Le Thi Van Anh¹, Nguyen Thi Kieu Giang¹,
Hoang Duong Thu Huong¹

¹ University of Sciences, Hue University, 77 Nguyen Hue, Hue, Vietnam

² Nguyen Binh Khiem High School, Chu Se, Gia Lai, Vietnam

* Correspondence to Le Thi Ha Thanh <lethihathanh@hueuni.edu.vn>

(Received: 21 December 2023; Revised: 02 February 2024; Accepted: 28 February 2024)

Abstract. The pollution of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds caused by herbicide residues contaminated with dioxin from the war and other wastes from industrial activities has left severe consequences to human health and the environment. Bioremediation using microorganisms capable of decomposing pollutant compounds exhibits more advantages than physicochemical treatment methods as it is highly efficient, economically feasible, sustainable, and eco-friendly. In this study, *Paenibacillus naphthalenovorans* strain 4B1, isolated from dioxin-contaminated soil in Vietnam, was optimized the culture conditions and evaluated its abilities to degrade dibenzofuran and naphthalene. The results revealed that strain 4B1 showed the best growth on mineral salts medium supplemented with dibenzofuran 1250 mg/L or naphthalene 750 mg/L, pH 7.0, incubated at 45°C and 180 rpm with a cell density of $9,42 \times 10^7$ và $5,6 \times 10^7$ CFU/mL, respectively. Gas chromatography analysis of the substrate concentrations indicated that strain 4B1 could degrade 79.76% of 1250 mg/L dibenzofuran and 83.03% of 750 mg/L naphthalene after 72 hours of incubation at optimal conditions. These results make *Paenibacillus naphthalenovorans* 4B1 a potential candidate for application in bioremediation of environments contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbon compounds.

Keywords: naphthalene, dibenzofuran, degradation, *Paenibacillus*

1 Mở đầu

Ô nhiễm môi trường là vấn đề nghiêm trọng đối với toàn cầu, gây ra nhiều hậu quả và hệ lụy không những đến môi trường sinh thái mà còn đến sức khỏe con người. Hiện tượng ô nhiễm đất là do ảnh hưởng từ chất thải trên bề mặt và các chất trong lòng đất. Các hợp chất phổ biến gây ô nhiễm môi trường đất là hydrocarbon dầu, hydrocarbon thơm đa vòng (PAH), dung môi, thuốc trừ sâu, kim loại nặng... Trong đó, các chất ô nhiễm hữu cơ nói chung có độ bền cao, khả năng phân hủy thấp do tính chất kỵ nước cao và ổn định hóa học của chúng. Các hợp chất này có thể bị giữ lại ở các khoáng chất đất trong thời gian dài, sau đó được tích lũy sinh học thông qua chuỗi thức ăn, vì vậy có nguy cơ gây hại cho sức khỏe con người [1].

Ở miền Trung và miền Nam Việt Nam, một trong những nguyên nhân gây ô nhiễm môi trường đất là do dư lượng lớn chất diệt cỏ có chứa các hợp chất dioxin được rải xuống các vùng này trong chiến tranh [2]. Dioxin được xem là hóa chất độc hại nhất đe dọa sức khỏe cộng đồng theo báo cáo của Cục bảo vệ môi trường Hoa Kỳ (EPA) năm 1994 [3]. Ngoài ra, hoạt động của các ngành công nghiệp dầu mỏ, sản xuất giấy, công nghiệp dệt nhuộm... hàng năm đã thải ra một lượng lớn các hợp chất PAH. Naphthalene (Nap) là hợp chất đơn giản nhất trong 16 loại PAH, gồm 2 vòng benzen và ít tan trong nước; chất này và các dẫn xuất methyl hoá của nó đã được EPA xếp vào nhóm các chất ô nhiễm độc hại, gây đột biến và ung thư, ảnh hưởng nghiêm trọng đối với sức khỏe con người... [4].

Mặc dù có nhiều phương pháp xử lý môi trường ô nhiễm dioxin và PAH như phương pháp vật lý, hóa học; tuy nhiên, những phương pháp này tốn kém chi phí và để lại gánh nặng cho môi trường do hủy hoại các thành phần tự nhiên vốn có trong môi trường. Phương pháp phục hồi sinh học (bioremediation) là phương pháp xử lý ô nhiễm được biết đến với hiệu quả cao, chi phí thấp và thân thiện với môi trường, đặc biệt đối với ô nhiễm các hợp chất hữu cơ bền vững về hóa học [5]. Hiện nay, đã có nhiều nghiên cứu về các chủng vi sinh vật có khả năng chuyển hóa sinh học các hợp chất hữu cơ ô nhiễm thành các hợp chất ít độc hơn, hứa hẹn một sự thay thế đầy tiềm năng cho các phương pháp xử lý truyền thống. Một số chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy hợp chất dioxin hoặc tương tự dioxin sử dụng dibenzofuran (DF) là chất thử nghiệm đã được công bố như *Pseudomonas* sp. HH69, *Sphingomonas* sp. RW1 [6], *Comamonas* spp., *Pseudomonas putida* B6-2 [7], *Burkholderia cepacia* DF2 và DF4 [8], *Pseudomonas veronii* Pvy [9]. Tương tự, các vi khuẩn phân hủy Nap cũng đã được phân lập như *Pseudomonas* sp. N7 [10], *Streptomyces* sp. QWE-5 [11], *Rhodococcus* sp. VTPG5 [12], *Ochrobactrum* MB-2 [13].

Việc nghiên cứu tìm kiếm các chủng vi sinh vật mới, nhất là các vi sinh vật bản địa là cần thiết cho việc phục hồi sinh học các vùng đất bị ô nhiễm. Chủng vi khuẩn *Paenibacillus naphthalenovorans* 4B1, phân lập từ đất nhiễm dioxin ở A Lưới, Thừa Thiên Huế, có khả năng sử dụng một số hợp chất PAH làm nguồn carbon để sinh trưởng [14]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy, khảo sát khả năng phân

hủy DF và Nap của chủng vi khuẩn 4B1, từ đó làm cơ sở để định hướng ứng dụng xử lý các vị trí bị ô nhiễm dioxin hoặc PAH.

2 Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1 Đối tượng nghiên cứu

Chủng vi khuẩn *P. naphthalenovorans* 4B1 được phân lập từ đất nhiễm dioxin ở sân bay A So (cũ), huyện A Lưới, tỉnh Thừa Thiên Huế [14]. Chủng 4B1 là vi khuẩn ưa nhiệt có khả năng sinh trưởng trên môi trường muối khoáng tối thiểu có chứa một số hợp chất PAH.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

Môi trường nuôi cấy

Chủng vi khuẩn *P. naphthalenovorans* 4B1 được nuôi cấy trên môi trường muối khoáng cơ bản W [14] gồm: 1,7 g/L KH_2PO_4 , 9,8 g/L Na_2HPO_4 , 1,0 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10,75 mg/L MgO , 2,0 mg/L CaCO_3 , 4,5 mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,44 mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,12 mg/L $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,25 mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,28 mg/L $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,06 mg/L H_3BO_3 , môi trường rắn bổ sung thêm 50 mg/L yeast extract và 15 g/L agar. Nguồn carbon là DF hoặc Nap (Sigma Aldrich, USA).

Phương pháp nuôi cấy [14]

Hút 10 μL dung dịch vi khuẩn từ ống stock vào đĩa petri chứa môi trường W rắn, sau đó cấy ria để thu được khuẩn lạc riêng rẽ. Bổ sung nguồn carbon là Nap (5 mg) hoặc DF (5 mg) ở dạng tinh thể vào nắp đĩa petri để bay hơi lên môi trường nuôi cấy, ủ ở nhiệt độ 40°C. Sau 2 ngày nuôi cấy, trên bề mặt đĩa thạch xuất hiện các khuẩn lạc có màu trắng đục hoặc chuyển qua màu vàng nhạt. Mỗi khuẩn lạc sẽ được cấy chuyển vào ống nghiệm có chứa 5 mL môi trường W bổ sung Nap hoặc DF với nồng độ tương ứng là 500 mg/L và 1000 mg/L, tiếp tục nuôi cấy lắc 150 vòng/phút ở 40°C trong 2 ngày. Sau 2 ngày, tiếp tục làm giàu sinh khối bằng cách chuyển 5% dịch nuôi cấy từ ống nghiệm sang bình tam

giác 100 mL chứa 25 mL môi trường W bổ sung Nap hoặc DF với nồng độ như trên và nuôi cấy trong điều kiện tương tự.

Phương pháp xác định mật độ tế bào và tốc độ sinh trưởng

Thiết lập đường chuẩn giữa giá trị mật độ quang (OD_{600}) và số lượng tế bào trong dịch huyền phù vi khuẩn tương ứng theo phương pháp của Van Alst và cs [15]. Tiến hành nuôi cấy vi khuẩn như phương pháp đã trình bày ở trên, cứ sau 12 giờ nuôi cấy, thu 1 mL dịch huyền phù vi khuẩn, ly tâm ở 13.000 vòng/phút trong 5 phút, rửa sinh khối và tái huyền phù trong 1 mL dung dịch đệm phosphate (8 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 1,44 g/L Na_2HPO_4 , 0,245 g/L KH_2PO_4) để tiến hành đo OD_{600} . Số lượng vi khuẩn (CFU/mL) tương ứng các thời điểm thu mẫu được xác định gián tiếp bằng phương pháp đếm khuẩn lạc trên môi trường W rắn có bổ sung 0,1% glucose. Dụng cụ sinh trưởng dựa trên giá trị OD_{600} và CFU/mL. Tiếp theo, xây dựng đường chuẩn mối liên hệ giữa 2 giá trị này sử dụng các điểm thời gian nằm trong pha tăng trưởng có $\text{OD}_{600} < 1,0$.

Tốc độ sinh trưởng của vi khuẩn được tính toán dựa trên $\log_{10}(\text{CFU/mL})$ thu được ở pha logarit theo công thức [16]:

$$\text{Số thế hệ/giờ } k = (\log_{10}[X_t] - \log_{10}[X_0]) / 0.301 \times t$$

$$\text{Thời gian/thế hệ: } t_{gen} = 1/k$$

trong đó: X_0 là CFU/mL ở thời điểm 0, X_t là CFU/mL ở thời điểm t, t là số giờ chênh lệch giữa 2 thời điểm.

Nghiên cứu ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy đến sự sinh trưởng của chủng vi khuẩn 4B1

Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất

Sinh khối của chủng vi khuẩn sau khi làm giàu được cấy chuyển vào 25 mL môi trường W, nguồn carbon Nap ở các nồng độ tương ứng 100, 250, 500, 750 mg/L hoặc DF ở các nồng độ tương ứng 250, 500, 750, 1000, 1250 mg/L, lắc ở 150 vòng/phút và nuôi cấy ở nhiệt độ 40°C để khảo sát nồng độ cơ chất tối ưu. Mật độ tế bào ban đầu với OD_{600} xấp xỉ 0,06. Sau mỗi 24 giờ

nuôi cấy, xác định số lượng tế bào CFU/mL. Tốc độ sinh trưởng được tính toán theo phương pháp trên.

Ảnh hưởng của nhiệt độ

Nuôi cấy vi khuẩn với OD₆₀₀ ban đầu khoảng 0,06 trong 25 mL môi trường W, nguồn carbon là Nap hoặc DF ở nồng độ tối ưu đã xác định trong thí nghiệm trên, lắc ở 150 vòng/phút và nuôi cấy ở các nhiệt độ tương ứng là 30°C, 37°C, 40°C, 45°C và 50°C. Xác định số lượng tế bào (CFU/mL) sau mỗi thời điểm 24, 48, 72 giờ nuôi cấy.

Ảnh hưởng của độ pH môi trường

Vi khuẩn được nuôi cấy trong các môi trường W có độ pH khác nhau là 5, 6, 7, 8, 9, nguồn carbon là Nap hoặc DF ở nồng độ tối ưu, lắc ở 150 vòng/phút và nuôi cấy ở các nhiệt độ thích hợp đã khảo sát. Xác định số lượng tế bào (CFU/mL) sau mỗi 24 giờ, tính toán tốc độ sinh trưởng ở các điều kiện pH khác nhau.

Ảnh hưởng của tốc độ lắc

Tiến hành nuôi cấy vi khuẩn trong các điều kiện nồng độ cơ chất, độ pH môi trường và nhiệt độ thích hợp, khảo sát ở các tốc độ lắc khác nhau lần lượt là 120, 150 và 180 vòng/phút. Xác định số lượng tế bào (CFU/mL) tại các thời điểm nuôi cấy khác nhau và tính toán tốc độ sinh trưởng.

Khảo sát khả năng phân hủy dibenzofuran và naphthalene

Chúng vi khuẩn 4B1 được nuôi cấy trong các điều kiện thích hợp cho sự sinh trưởng đã khảo sát ở các thí nghiệm trên. Đối chứng là 25 mL môi trường W bổ sung Nap hoặc DF với nồng độ tương tự, không chứa sinh khối của vi khuẩn và nuôi cấy ở cùng điều kiện. Sau 24, 48, 72 giờ, tiến hành thu 25 mL dịch huyền phù nuôi cấy, tách chiết lượng Nap hoặc DF còn lại trong môi trường bằng dung dịch ethyl acetate với thể tích bằng một nửa thể tích nuôi cấy (12,5 mL). Sau khi bổ sung, tiến hành lắc với tốc độ 180 vòng/phút, ở 30°C trong 30 phút. Sau đó, để lắng vài tiếng cho đến khi dung dịch phân tách thành 2 lớp. Hút lớp dịch ở pha trên, chuyển qua ống thủy tinh có nắp và ly tâm nhẹ để

loại bỏ bọt do polysaccharide của vi khuẩn tạo ra trong quá trình nuôi cấy, chuyển sang ống nghiệm sạch có chứa tinh thể sodium sulfate khan để dehydrate hóa trong 10 phút. Mẫu sau khi tách chiết được pha loãng 10 lần trong ethyl acetate (900 µL ethyl acetate và 100 µL mẫu), đựng mẫu trong các ống vial dành cho sắc ký khí [14].

Định lượng dibenzofuran và naphthalene bằng phương pháp sắc ký khí (GC)

Chuẩn bị các dung dịch chuẩn với nồng độ khác nhau của Nap hoặc DF từ 50, 100, 150, 200 và 250 mg/L trong dung môi ethyl acetate để xây dựng đường chuẩn nồng độ cơ chất. Mẫu chuẩn được pha loãng 5 lần trước khi chạy GC. Các ống đựng mẫu và chất chuẩn được bảo quản ở -20°C cho đến khi chạy sắc ký. Lấy 1 mL chất chuẩn, mẫu và đối chứng để tiến hành định lượng bằng phương pháp GC, thí nghiệm sắc ký được thực hiện ở Trung tâm kiểm nghiệm thuốc, mỹ phẩm, thực phẩm Thừa Thiên Huế.

Tiến hành chạy sắc ký trên máy sắc ký GCMS-QP 2010 Plus (Shimadzu, Japan), cột DB-1 fused silica capillary, chiều dài cột 30 m, đường kính bên trong 0,25 mm, độ dày film 0,25 mm. Chương trình chạy sắc ký khí: chế độ bơm mẫu tự động, không chia dòng, lưu lượng khí 1,71 mL/phút, thời gian cân bằng sau mỗi lần bơm là 3 phút, nhiệt độ buồng bơm mẫu 250°C, nhiệt độ ban đầu của cột 50°C, giữ 1 phút, sau đó tăng lên 250°C với tốc độ 10°C/phút, giữ trong 15 phút. Dữ liệu sắc ký được phân tích bằng phần mềm GCMSsolution version 2.53.

Xác định khả năng phân hủy cơ chất theo công thức:

$$\text{Khả năng phân hủy (\%)} = (CI - CF)/CI \times 100$$

trong đó, CI: nồng độ ban đầu, CF: nồng độ còn lại

Xử lý số liệu

Tất cả các thí nghiệm đều được lặp lại 3 lần, số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm Microsoft Excel 2019.

3 Kết quả và thảo luận

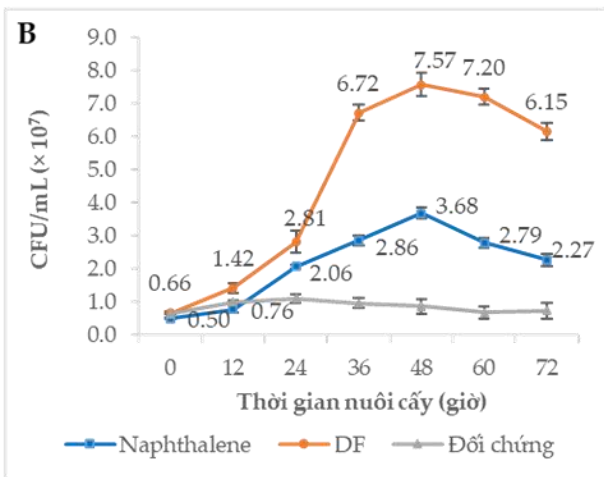
3.1 Đường cong sinh trưởng của chủng vi khuẩn 4B1

Chủng vi khuẩn 4B1 có khả năng sinh trưởng trên cả hai nguồn cơ chất là DF và Nap. Dịch nuôi cấy chuyển thành màu vàng nhạt trong môi trường có Nap hoặc màu vàng đậm trong môi trường có DF, chứng tỏ cơ chất đã bị chuyển hóa bởi các enzyme của vi khuẩn, phân cắt vòng benzen và hình thành các hợp chất trung gian có màu vàng đặc trưng.

Kết quả ở hình 1 cho thấy chủng 4B1 sinh trưởng rất yếu trên môi trường muối khoáng cơ bản



(đối chứng), như vậy chủng này sử dụng DF và Nap như là nguồn năng lượng chính cho tế bào. Sau 12 giờ đầu tiên pha lag của quá trình nuôi cấy, mật độ tế bào tăng dần trong pha logarit và đạt sinh trưởng tối đa lần lượt là $7,57 \times 10^7$ và $3,68 \times 10^7$ CFU/mL sau 48 giờ, tốc độ sinh trưởng trong pha logarit lần lượt đạt 9,34 và 8,3 giờ/thế hệ. Sau đó, sinh khối tế bào giảm dần. Kết quả này cho thấy tốc độ sinh trưởng của 4B1 trong môi trường có DF thấp hơn so với Nap; tuy nhiên mật độ tế bào thu được lại cao gấp đôi sau 48 giờ. Điều này có thể do DF là nguồn cơ chất chính được sử dụng khi phân lập chủng 4B1, đồng thời chủng vi khuẩn này có môi trường sống tự nhiên là đất nhiễm dioxin, do đó ưa thích nguồn carbon DF hơn là Nap.



Hình 1. Sự sinh trưởng của chủng 4B1. A: sinh khối vi khuẩn trên môi trường có DF (trái) và Nap (phải). B: Đường cong sinh trưởng của vi khuẩn trên hai loại cơ chất

3.2 Tối ưu hóa các điều kiện nuôi cấy của chủng vi khuẩn 4B1

Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất

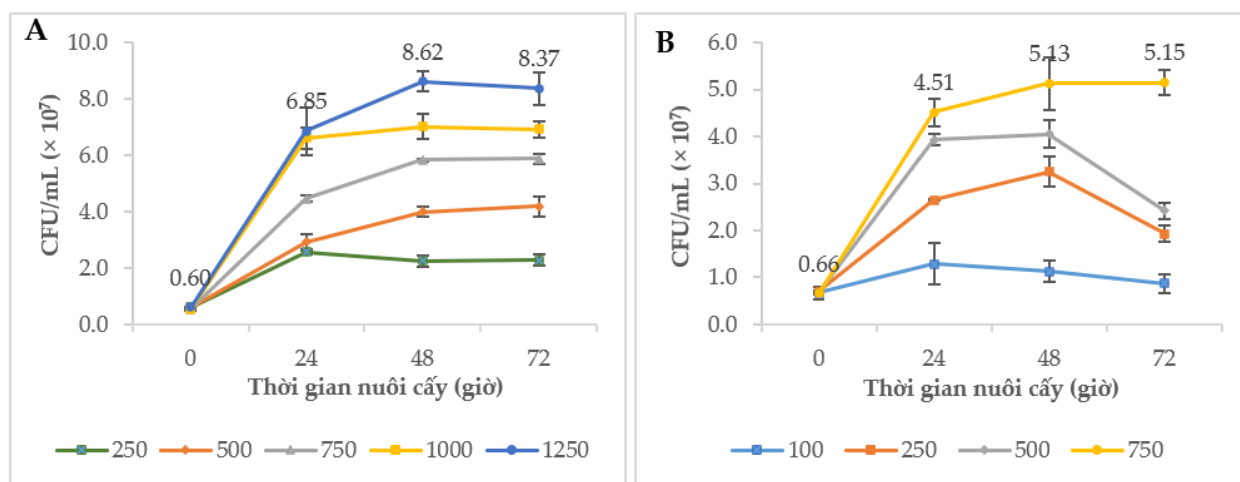
Khi tăng nồng độ cơ chất, tốc độ sinh trưởng của chủng 4B1 tăng theo tương ứng. Ở nồng độ DF 1000 và 1250 mg/L, vi khuẩn sinh trưởng tốt hơn, mật độ tế bào tăng nhanh sau 24 giờ nuôi cấy với tốc độ sinh trưởng tương đương nhau xấp xỉ 6,8 giờ/thế hệ. Tuy nhiên, mật độ tế bào đạt cao nhất sau 48 giờ ở nồng độ 1250 mg/L ($8,6 \times 10^7$ CFU/mL) (Hình 2A). Vì vậy, nồng độ này sẽ được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Tương tự, ở nồng độ 500 và 750 mg/L Nap, số lượng tế bào tăng nhanh sau 24 giờ, tốc độ sinh trưởng pha logarit đạt lần lượt là 9,3 và 8,6 giờ/thế hệ. Sinh trưởng của chủng vi khuẩn 4B1 đạt cao nhất và không có sai khác có ý nghĩa thống kê ở 48 và 72 giờ nuôi cấy với nồng độ 750 mg/L (xấp xỉ $5,1 \times 10^7$ CFU/mL) (Hình 2B). Một số nghiên cứu cho thấy nồng độ cơ chất trong môi trường nuôi cấy ảnh hưởng rõ rệt đến sự sinh trưởng của vi sinh vật vì chúng cung cấp nguồn carbon và năng lượng cho tế bào phát triển. Nuôi cấy chủng *Pseudomonas* sp. ISTDF1 ở các nồng độ 150, 200, 250 mg/L DF cho kết quả sinh trưởng tốt nhất ở 200 mg/L

trong vòng 36 giờ nuôi cấy với hiệu suất phân hủy là 85% [17].

Nghiên cứu ở chủng *Staphylococcus aureu* NS1A và *Pseudomonas fluorescens* MM3 cho thấy chúng sinh trưởng tối đa trong môi trường bổ sung 0,015% Nap sau 72 giờ nuôi cấy với OD₆₀₀ tương ứng là 0,431 và 0,423 [18]. Các chủng vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens* AHB72N và *Pseudomonas gessardii* AHB79N thể hiện

khả năng sinh trưởng tốt trên cơ chất Nap ở nồng độ 600 mg/L với OD₆₀₀ lần lượt là 1,358 và 1,878 [19]. Từ những kết quả nghiên cứu trên cho thấy rằng chủng 4B1 có thể sinh trưởng ở nồng độ cơ chất cao hơn so với đa số các chủng vi khuẩn đã công bố; từ đó cho thấy tiềm năng ứng dụng chủng này trong các thử nghiệm xử lý môi trường bị ô nhiễm.



Hình 2. Khả năng sinh trưởng của chủng 4B1 ở các nồng độ DF (A) và Nap (B) khác nhau.

Ảnh hưởng của nhiệt độ

Nhìn chung, khả năng sinh trưởng của vi khuẩn 4B1 tăng lên khi tăng nhiệt độ nuôi cấy từ 30-45°C, khi nhiệt độ lên đến 50°C thì sự sinh trưởng lại giảm. Trong đó, tốt nhất là trong khoảng 40 - 45°C, số lượng tế bào tối đa đạt được không sai khác nhiều giữa hai nhiệt độ khi nuôi cấy ở 1250 mg/L DF. Tuy nhiên, ở nhiệt độ 45°C tốc độ sinh trưởng (7,67 giờ/thế hệ) nhanh hơn so với 40°C (10,12 giờ/thế hệ) (Hình 3A). Trong môi trường có 750 mg/L Nap, sau 24 giờ vi khuẩn sinh trưởng nhanh ở 45°C và sinh trưởng chậm ở các nhiệt độ còn lại với số lượng tế bào không có sự khác biệt so với thời điểm bắt đầu nuôi cấy. Chỉ quan sát thấy sự khác biệt về sự sinh trưởng của vi khuẩn giữa các nhiệt độ sau 48 giờ nuôi. Số lượng tế bào cao nhất đạt $5,44 \times 10^7$ CFU/mL ở 45°C sau 48 giờ và thời gian nhân đôi thế hệ trong pha logarit là 9,3 giờ (Hình 3B).

Hầu hết các vi khuẩn phân hủy DF và Nap đều là vi khuẩn ưa ấm (mesophile) với nhiệt độ thích hợp

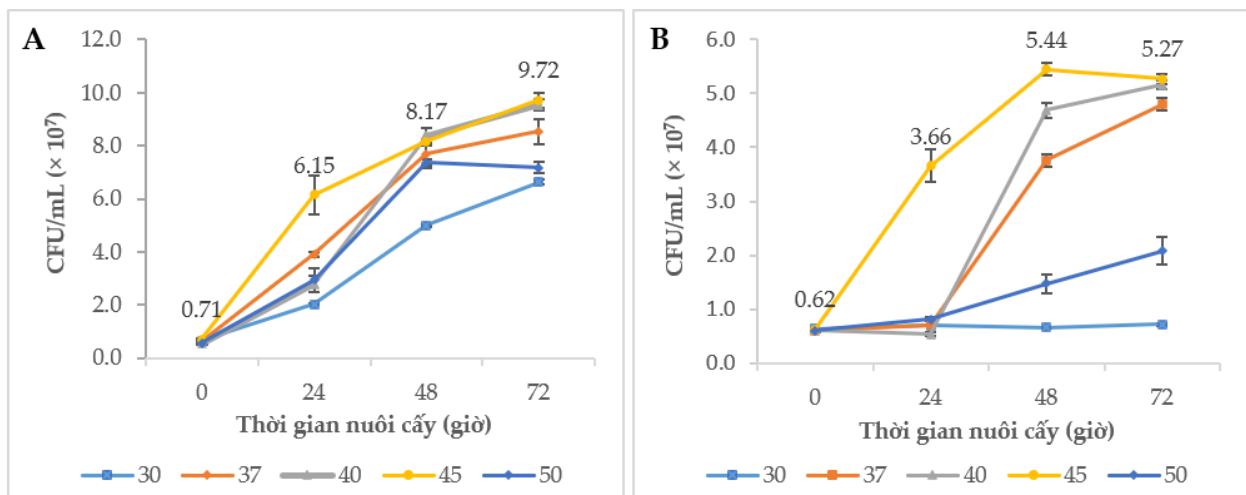
cho sự sinh trưởng và phân hủy sinh học xảy ra trong khoảng từ 25°C-37°C, như *Rhodococcus* sp. P52 [20], *Pseudomonas gessardii* AHB79N [19], *Janibacter terrae* XJ-1 [21], *Agrobacterium* sp. PH-08 [22]. Vi khuẩn 4B1 là một trong số ít chủng có khả năng phân hủy cơ chất ở nhiệt độ cao hơn 40°C. Ngoài ra, chủng này cũng có thể sinh trưởng trong khoảng nhiệt độ 30 - 50°C với nguồn cơ chất DF, chúng tỏ có thể thích nghi ở các môi trường khác nhau với điều kiện nhiệt độ thay đổi.

Ảnh hưởng của pH môi trường

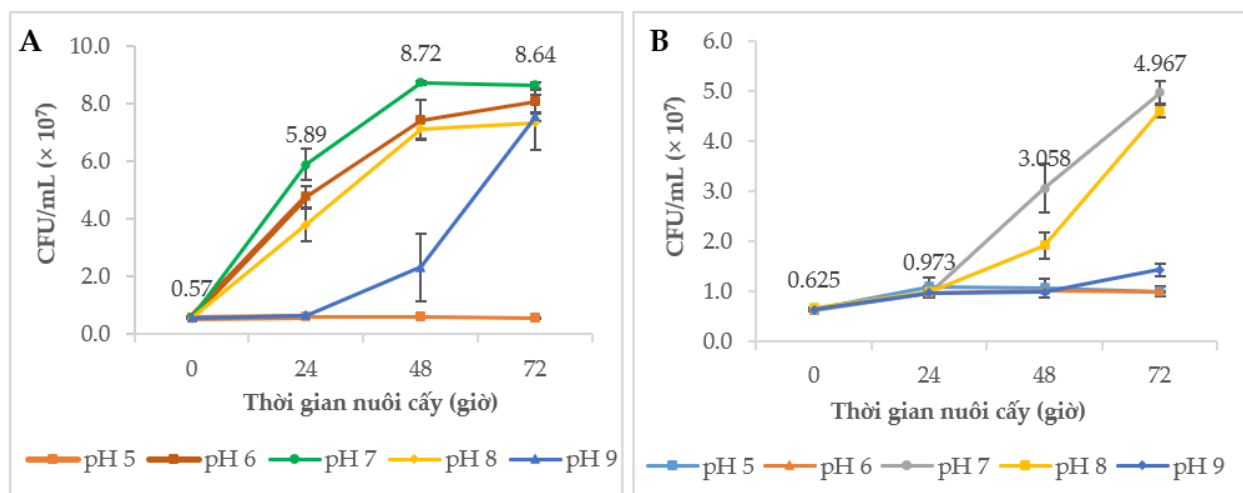
Sự sinh trưởng của chủng vi khuẩn 4B1 tốt nhất trong khoảng pH 6 - 8. Ở pH 5, vi khuẩn hầu như không sinh trưởng, và sự sinh trưởng khá chậm ở pH 9, sau 48 giờ mới bắt đầu đi vào pha logarit. Điều kiện pH tối ưu nhất cho chủng vi khuẩn này sinh trưởng trong môi trường có DF là pH 7 với số lượng tế bào đạt $8,72 \times 10^7$ CFU/mL sau 48 giờ nuôi cấy với tốc độ sinh trưởng là 7,1 giờ/thế hệ (Hình 4A). Tương tự, chủng 4B1 sinh trưởng tốt nhất ở pH 7 và 8 trong môi trường có Nap,

với mật độ tế bào sau 72 giờ nuôi cấy không sai khác có ý nghĩa thống kê. Vi khuẩn sinh trưởng rất chậm ở các pH khác (Hình 4B). Các nghiên cứu về ảnh hưởng của pH môi trường lên sự sinh trưởng và phân hủy các hợp chất DF hoặc Nap cho thấy đa số các chủng vi khuẩn đều có pH tối ưu trong khoảng trung tính 6 - 7. Một vài

nghiên cứu hiếm hoi ở các chủng vi khuẩn ưa kiềm như *Pseudomonas* sp. SA3 phân hủy Nap tốt nhất ở pH môi trường 8.0 [23], chủng *Pseudomonas* sp. ISTDF1 có thể phân hủy DF tăng dần từ pH 6 đến 12 (tối đa ở pH 10) [17].



Hình 3. Khả năng sinh trưởng của chủng 4B1 ở các nhiệt độ khác nhau trong môi trường có DF (A) và Nap (B)



Hình 4. Khả năng sinh trưởng của chủng 4B1 ở các độ pH khác nhau trong môi trường có DF (A) và Nap (B)

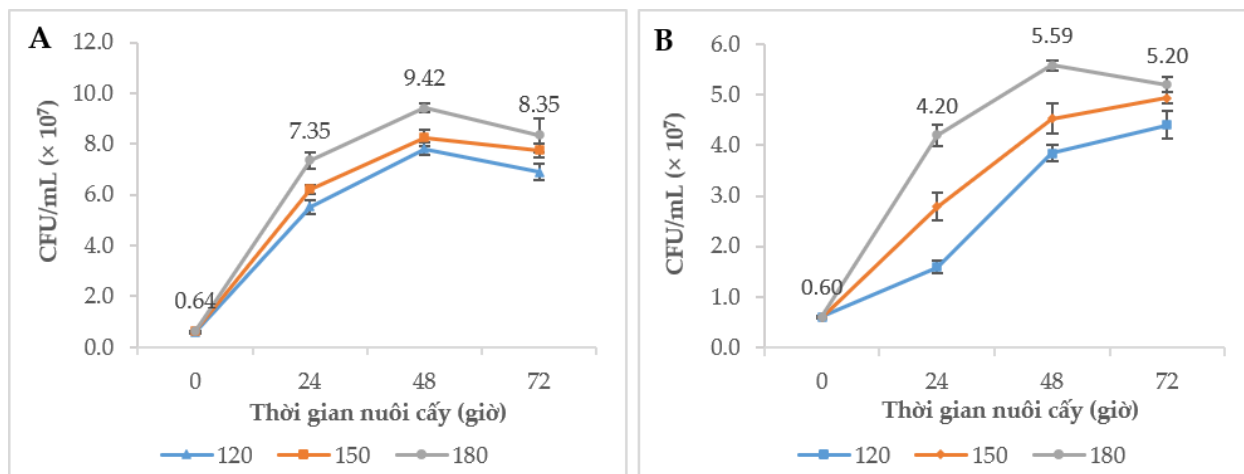
Ảnh hưởng của tốc độ lắc

Kết quả ở hình 5 cho thấy chủng vi khuẩn 4B1 có thể sinh trưởng ở cả 3 tốc độ khuấy trộn thử nghiệm, khi tăng tốc độ lắc tức là tăng nồng độ oxy hòa tan trong môi trường thì sự sinh trưởng của chủng 4B1 cũng tăng lên tương ứng. Trong đó, tốc độ 180

vòng/phút là thích hợp nhất với sinh trưởng đạt tối đa sau 48 giờ cho số lượng tế bào và tốc độ sinh trưởng trong môi trường có DF và Nap lần lượt là $9,42 \times 10^7$ CFU/mL, 6,8 giờ/thế hệ và $5,6 \times 10^7$ CFU/mL, 8,6 giờ/thế hệ. Quá trình phân hủy DF và Nap ở các chủng vi khuẩn thường xảy ra trong điều kiện hiếu khí, vì vậy nồng độ oxy là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến sự

sinh trưởng cũng như phân hủy cơ chất của tế bào vi khuẩn. Oxy đã được chứng minh như là một chất nhận điện tử hiệu quả trong các nghiên cứu về phân hủy sinh học các hợp chất hydrocarbon thơm. Ngoài ra, phản ứng đầu tiên trong con đường phân hủy DF và Nap

liên quan đến việc kết hợp hai nguyên tử oxygen vào một trong các vòng thơm của các hợp chất này, dẫn đến việc hình thành các hợp chất trung gian, và sự phân cắt vòng thơm ở các bước tiếp theo [5].



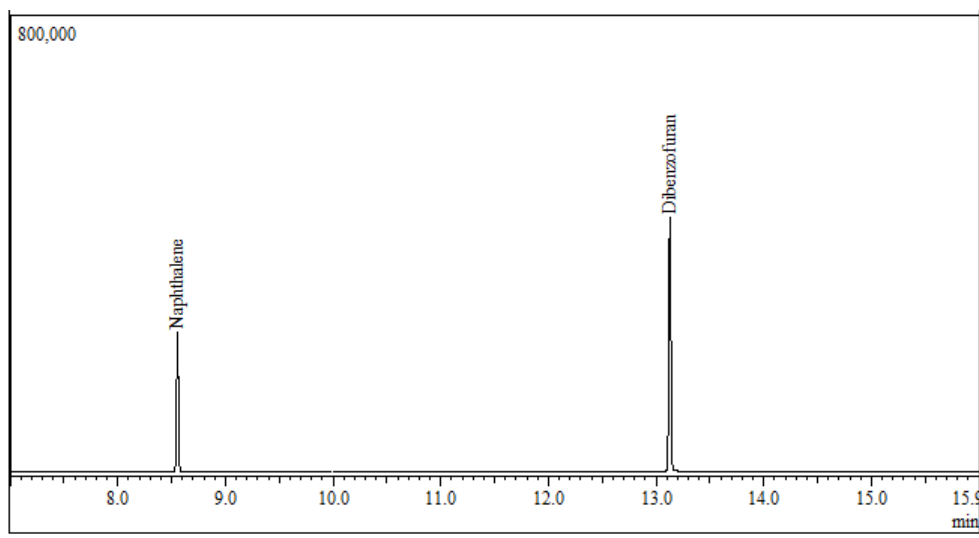
Hình 5. Khả năng sinh trưởng của chủng 4B1 ở các tốc độ lắc khác nhau trong môi trường có DF (A) và Nap (B)

3.3 Khả năng phân hủy dibenzofuran và naphthalene của chủng 4B1

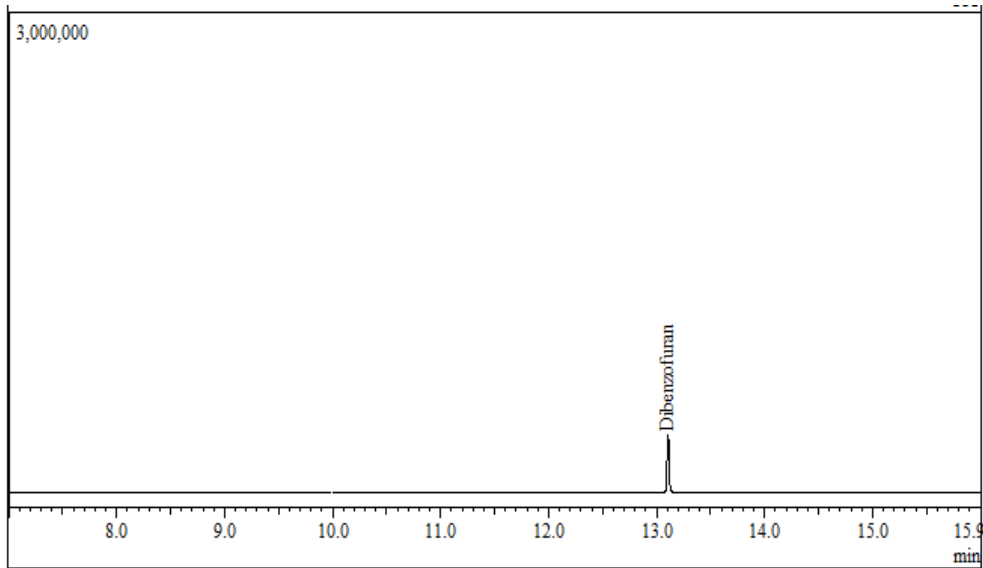
Để xác định khả năng phân hủy DF và Nap của chủng vi khuẩn 4B1, tiến hành nuôi cấy trong môi trường và điều kiện tối ưu đã khảo sát. Sau đó, thu

mẫu, tách chiết lượng cơ chất còn lại trong môi trường nuôi cấy và phân tích bằng GC.

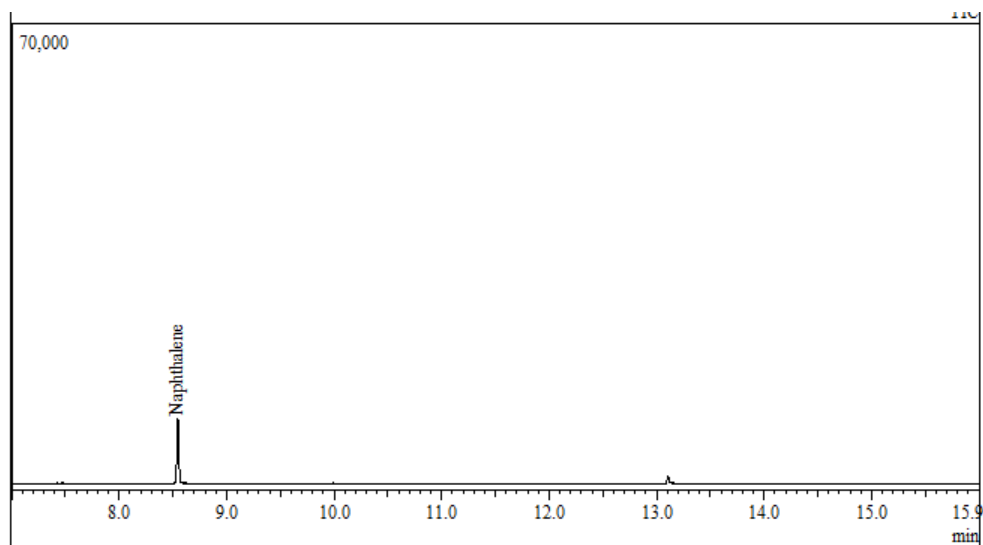
Phổ sắc ký của chất chuẩn Nap và DF nồng độ 250 mg/L ở hình 6 cho thấy Nap và DF xuất hiện ở thời gian lưu lần lượt là 8,555 phút và 13,127 phút.



Hình 6. Phổ sắc ký khí của Nap và DF ở nồng độ 250 mg/L



Hình 7. Phổ sắc ký khí của dịch chiết DF còn lại sau 72 giờ nuôi cấy

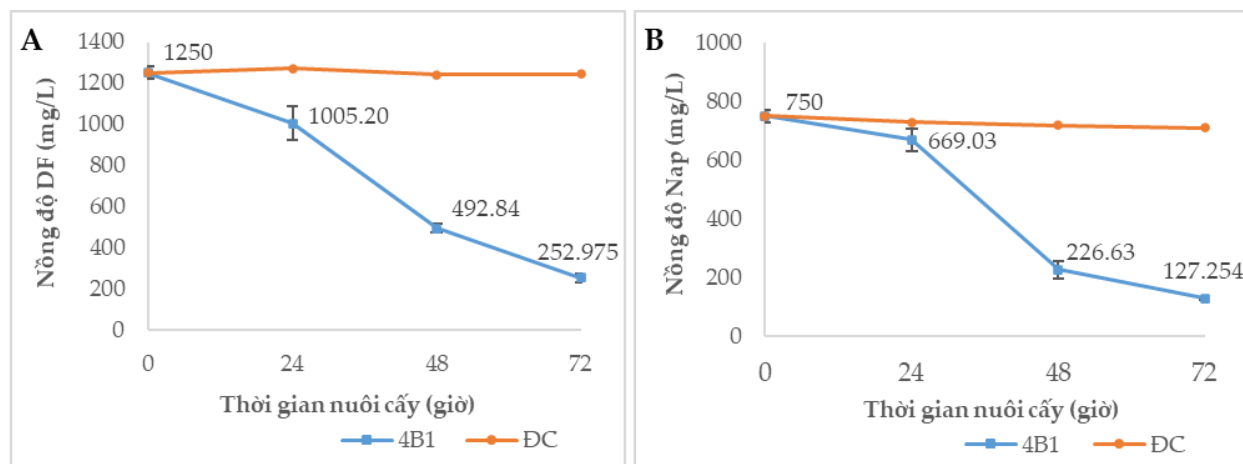


Hình 8. Phổ sắc ký khí của dịch chiết Nap còn lại sau 72 giờ nuôi cấy

Kết quả phân tích nồng độ DF còn lại trong môi trường nuôi cấy ở các điểm khác nhau và mẫu đối chứng cho thấy tất cả phổ sắc ký đều xuất hiện 1 peak với thời gian lưu giống nhau (khoảng 13,1 phút) trùng với peak của mẫu chuẩn (Hình 7).

Sau các khoảng thời gian nuôi cấy, hàm lượng DF còn lại trong môi trường giảm rõ rệt (Hình 9A). Nồng độ DF ban đầu là 1250 mg/L đã được chủng 4B1 phân hủy, sau mỗi 24 giờ nồng độ còn lại tương ứng là 1005,196; 492,841 và 252,975 mg/L. Hiệu suất phân hủy

DF thu được sau 72 giờ là 79,76%. Kết quả nghiên cứu cho thấy rằng chủng 4B1 có hiệu suất phân hủy DF tương đối tốt với nồng độ ban đầu cao hơn và thời gian phân hủy ngắn hơn một số chủng vi khuẩn đã công bố, như chủng *Janibacter terrae* XJ-1 phân hủy hết 100 mg/L DF sau 5 ngày nuôi cấy [21]; sau 100 giờ nuôi cấy, chủng *Paenibacillus* sp. TSY30 chỉ phân hủy hết được 17 mg/L DF [24]; trong khi *Janibacter* sp. YY-1 có hiệu suất phân hủy DF là 94% từ nồng độ ban đầu là 1000 mg/L sau 96 giờ nuôi cấy [25].



Hình 9. Khả năng phân hủy DF (A) và Nap (B) của chủng *P. naphthalenovorans* 4B1

Tương tự, phổ sắc ký của Nap còn lại trong dịch nuôi cấy ở các thời điểm khác nhau và mẫu đối chứng đều xuất hiện 1 peak với thời gian lưu gần giống nhau (khoảng 8,5 phút) trùng với peak của mẫu chuẩn (Hình 8).

Chủng 4B1 có khả năng phân hủy Nap (nồng độ ban đầu là 750 mg/L) sau 24, 48 và 72 giờ với nồng độ còn lại tương ứng là 669,029; 226,635 và 127,254 mg/L. Hiệu suất phân hủy đạt 83,03% (Hình 9B). Khi so sánh kết quả với một số chủng vi khuẩn khác, chúng tôi thấy rằng chủng 4B1 có khả năng phân hủy Nap ở nồng độ ban đầu cao với hiệu suất khá tốt. Hầu hết các chủng vi khuẩn đã công bố có khả năng chuyển hóa ≤ 500 mg/L Nap. Như chủng *Pseudomonas aeruginosa* PTCC 1707 chỉ phân hủy trong khoảng nồng độ 0,5-20 mg/L với lượng cơ chất giảm từ 33,4% - 65,5% sau 3 ngày nuôi cấy [26]. Hai chủng *Bacillus licheniformis* JUG GS2 và *B. sonorensis* JUG RS2(3) phân hủy Nap với hiệu suất lần lượt là 73%, 48% và 52%, 29% với nồng độ ban đầu tương ứng là 100 mg/L và 200 mg/L [27]. Chủng *Achromobacter* sp. FBHYA2 có khả năng phân hủy nhanh 500 mg/L Nap sau 48 giờ nuôi cấy với hiệu suất 96% [28].

Nhìn chung, hầu hết các chủng vi khuẩn đều phân hủy DF và Nap với nồng độ thấp, và những chủng này là vi khuẩn ưa ấm, có nhiệt độ tối ưu cho sự phân hủy trong khoảng 30°C. Chủng vi khuẩn ưa nhiệt 4B1 cho khả năng phân hủy hai hợp chất này với nồng độ ban đầu và hiệu suất khá cao. Một số nghiên cứu

cho thấy rằng khả năng hoạt động sinh học và độ hòa tan của các chất aliphatic và polyaromatic hydrocarbon phụ thuộc vào nhiệt độ. Độ hòa tan tăng ở nhiệt độ cao ảnh hưởng đến độc tính của chúng và khả năng chuyển hóa sinh học các hợp chất này xảy ra trong thời gian ngắn hơn [29].

4 Kết luận

Qua các kết quả nghiên cứu thu được, chúng tôi nhận thấy chủng vi khuẩn 4B1 có khả năng sinh trưởng nhanh trên cả hai cơ chất hydrocarbon thơm đa vòng là DF và Nap với nồng độ tương đối cao so với các nghiên cứu trước đây, lần lượt là 1250 mg/L và 750 mg/L. Các điều kiện nuôi cấy tối ưu cho sự sinh trưởng của chủng 4B1 ở cả hai cơ chất là tương tự nhau (45°C, pH môi trường 7, tốc độ lắc 180 vòng/phút). Tuy nhiên, khả năng sinh trưởng tốt hơn trong môi trường có DF (khoảng 2 lần so với Nap), đồng thời có thể sinh trưởng ở khoảng điều kiện nuôi cấy rộng hơn khi sử dụng cơ chất là DF (nhiệt độ từ 30 - 50°C, pH 6 - 9) so với Nap (nhiệt độ 37 - 45°C, pH 7 - 8). Hiệu quả xử lý cơ chất đạt 79,76% - 83,03% sau 72 giờ nuôi cấy. Các đặc điểm này của chủng vi khuẩn *P. naphthalenovorans* 4B1 cho thấy tiềm năng ứng dụng trong các nghiên cứu xử lý sinh học các môi trường ô nhiễm các hợp chất hydrocarbon thơm đa vòng gây ra do dư lượng chất độc chiến tranh hoặc từ chất thải của các hoạt động công nghiệp.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ từ Đại học Huế qua đề tài khoa học và công nghệ cấp Đại học Huế với mã số DHH2021-01-180.

Tài liệu tham khảo

1. Peng RH, Xiong AS, Xue Y, Fu XY, Gao F, Zhao W, et al. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiol Reviews*. 2008;32:927-955.
2. Stellman JM, Stellman SD, Christian R, Weber T, Tomasallo C. The extent and patterns of usage of Agent Orange and other herbicides in Vietnam. *Nature*. 2003;422:681-687.
3. US Environmental Protection Agency. Analyses of laboratory and field studies of reproductive toxicity in birds exposed to dioxin-like compounds for use in ecological risk assessment. Cincinnati: USEPA Office of Research and Development; 2003.
4. US Environmental Protection Agency. Health effects support document for Naphthalene. Washington DC: USEPA Office of Water, Health and Ecological Criteria Division; 2003.
5. Hiraishi A. Biodiversity of dioxin-degrading microorganisms and potential utilization in bioremediation. *Microbes and Environments*. 2003; 18(3):105-125.
6. Fortnagel P, Harms H, Wittich R-M, Krohn S, Meyer H, Sinnwell V, et al. Metabolism of dibenzofuran by *Pseudomonas* sp. strain HH68 and the mixed culture HH27. *Applied and Environmental Microbiology*. 1990;56(4): 1148-1156.
7. Li Q, Wang X, Yin G, Gai Z, Tang H, Ma C, et al. New metabolites in dibenzofuran cometabolic degradation by a biphenyl-cultivated *Pseudomonas putida* strain B6-2. *Environmental Science and Technology*. 2009;43(22):8635-8642.
8. Sinh ĐĐH, Thi TVN, Thanh LTH, Lan PTN, Loc NH, Huy NĐ. Phân lập một số chủng vi khuẩn phân hủy dibenzofuran từ đất nhiễm dioxin ở A Lưới. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Khoa học tự nhiên*. 2018; 127(1C):141-148.
9. Lopez-Echartea, Suman J, Smrhova T, Ridl J, Pajer P. Genomic analysis of dibenzofuran-degrading *Pseudomonas veronii* strain Pvy reveals its biodegradative versatility. *G3*. 2021;11(2): jkaa030.
10. Jia Y, Yin H, Ye JS, Peng H, He BY, Qin HM, et al. Characteristics and pathway of naphthalene degradation by *Pseudomonas* sp. N7. *Huan Jing Ke Xue*. 2008;29(3):756-762.
11. Xu P, Ma W, Han H, Hou B, Jia S. Characterization of naphthalene degradation by *Streptomyces* sp. QWE-5 isolated from active sludge. *Water Science and Technology*. 2014;70(6):1129-1134.
12. Công LTN, Mai CTN, Huy VN, Tuấn ĐV. Khả năng phân hủy naphthalene của chủng vi khuẩn VTPG5 phân lập tại các mẫu đất nhiễm dầu thu thập tại Bà Rịa – Vũng Tàu. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*. 2016;14(3):573-579.
13. Wang Z, Wang W, Li Y, Yang Q. Co-metabolic degradation of naphthalene and pyrene by acclimated strain and competitive inhibition kinetics. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*. 2019;54(6):505-513.
14. Thanh LTH, Thi TVN, Shintani M, Moriuchi R, Dohra H, Loc NH, et al. Isolation and characterization of a moderate thermophilic *Paenibacillus naphthalenovorans* strain 4B1 capable of degrading dibenzofuran from dioxin-contaminated soil in Vietnam. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2019;128(5):571-577.
15. JoVE Science Education Database. Microbiology. Growth Curves: Generating Growth Curves Using Colony Forming Units and Optical Density Measurements. Cambridge: JoVE; 2024.
16. Madigan MT, Martinko JM, Bender KS, Buckley DH, Stahl DA. Brock Biology of Microorganisms, 14th ed. Glenview (USA): Pearson Education, Inc; 2014.
17. Jaiswal PK, Kohli S, Gopal M, Thakur IS. Isolation and characterization of alkalotolerant *Pseudomonas* sp. strain ISTDF1 for degradation of dibenzofuran. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2011;38(4):503-511.
18. Kumar A, Poswal V, Kaur S, Mahajan A, Begum Z. Isolation and identification of naphthalene degradation bacteria. *International Journal of Innovative Science and Research Technology*. 2018;3(2):682-688.
19. Abarian M, Hassanshahian M, Badoei-Dalfard A. Degradation of naphthalene by bacterial isolates from the Gol Gohar Mine, Iran. *Progress in Biological Sciences*. 2016;6(2):171-180.
20. Peng P, Yang H, Li L. Biodegradation of dioxin by a newly isolated *Rhodococcus* sp. with the involvement of self-transmissible plasmids. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013;97:5585-5595.

21. Jin S, Zhu T, Xu X, Xu Y. Biodegradation of dibenzofuran by *Janibacter terrae* strain XJ-1. *Current Microbiology*. 2006;53(1):30-36.
22. Le TT, Murugesan K, Nam IH, Jeon JR, Chang YS. Degradation of dibenzofuran via multiple dioxygenation by a newly isolated *Agrobacterium* sp. PH-08. *Journal of Applied Microbiology*. 2014;116(3):542-553.
23. Tirkey SR, Ram S, Mishra S. Naphthalene degradation studies using *Pseudomonas* sp. strain SA3 from Alang-Sosiya ship breaking yard, Gujarat. *Heliyon* 7. 2021;e06334.
24. Kaiya S, Utsunomiya S, Suzuki S, Yoshida N, Futamata H, Yamada T, et al. Isolation and functional gene analyses of aromatic-hydrocarbon-degrading bacteria from a polychlorinated-dioxin-dechlorinating process. *Microbes and Environments*. 2012;27:127-135.
25. Yamazoe A, Yagi O, Oyaizu H. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a newly isolated dibenzofuran-utilizing *Janibacter* sp. strain YY-1. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2004;65(2):211-218.
26. Karimi B, Habibi M, Esvand M. Biodegradation of naphthalene using *Pseudomonas aeruginosa* by up flow anoxic-aerobic continuous flow combined bioreactor. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*. 2015;13:26.
27. Rabani MS, Sharma R, Singh R, Gupta MK. Characterization and identification of naphthalene degrading bacteria isolated from petroleum contaminated sites and their possible use in bioremediation. *Polycyclic aromatic compounds*. 2020;42(3): 978-989.
28. Farjadfard S, Borghei SM, Hassani AH, Yakhchali B, Ardjmand M, Zeinali M. Efficient biodegradation of naphthalene by a newly characterized indigenous *Achromobacter* sp. FBHYA2 isolated from Tehran oil refinery complex. *Water Science and Technology*. 2012;66(3):594-602.
29. Margesin R, Schinner F. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2001;56(5-6):650-663.