

DOI:10.22144/ctu.jvn.2022.163

## ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY TỐI ƯU CHO SỰ PHÂN HỦY BENZENE, TOLUENE VÀ XYLENE CỦA VI KHUẨN *Rhodococcus* sp. XL6.2

Nguyễn Thị Phi Oanh<sup>1\*</sup>, Võ Phát Tài<sup>1</sup>, Nguyễn Ngọc Mẫn<sup>2</sup>, Bùi Doãn Thành Trường<sup>3</sup>, Lê Thị Thùy Dương<sup>3</sup> và Đỗ Thị Kim Tro<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup>Học viên ngành Sinh thái học K27, Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>3</sup>Sinh viên ngành Sinh học K43, Khoa 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: 01/03/2022

Ngày nhận bài sửa: 23/03/2022

Ngày duyệt đăng: 28/03/2022

### Title:

Optimal culture conditions for the degradation of benzene, toluene and xylene (BTX) by *Rhodococcus* sp. XL6.2

### Từ khóa:

Benzene, BTX, phân hủy, *Rhodococcus* sp. XL6.2, toluene, xylene

### Keywords:

Benzene, BTX, degradation, *Rhodococcus* sp. XL6.2, toluene, xylene

### ABSTRACT

Aromatic hydrocarbons like benzene, toluene and xylene (BTX) are major components of gasoline, and they have been used widely as solvents for industrial products. BTX are also considered as the commonly detected contaminants in surface water and ground water. *Rhodococcus* sp. XL6.2 isolated from a wastewater treatment system was able to effectively degrade xylene. The results showed that *Rhodococcus* sp. XL6.2 also degraded benzene, toluene and the mixture of BTX at different substrate concentrations. The optimal conditions for growth of *Rhodococcus* sp. XL6.2 and its degradation of BTX in mineral salt medium were at pH ranging from 7 to 8 when being aerated and supplemented with 0.1% (v/v) BTX.

### TÓM TẮT

Các hydrocarbon thơm như benzene, toluene và xylene (BTX) là thành phần chính của xăng và là dung môi được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp. BTX cũng được xem là những hợp chất ô nhiễm phổ biến đối với nước mặt và nước ngầm. Dòng vi khuẩn *Rhodococcus* sp. XL6.2 được phân lập từ hệ thống xử lý nước thải có khả năng phân hủy xylene hiệu quả. Kết quả nghiên cứu cho thấy dòng vi khuẩn *Rhodococcus* sp. XL6.2 cũng có khả năng phân hủy benzene, toluene và hỗn hợp BTX ở các nồng độ khác nhau, trong đó 0,1% (v/v) BTX là nồng độ tối ưu cho sự tăng trưởng của vi khuẩn sau 24 giờ nuôi cấy. Dòng vi khuẩn *Rhodococcus* sp. XL6.2 có khả năng tăng trưởng và phân hủy hỗn hợp BTX hiệu quả trong môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung BTX như là nguồn cung cấp carbon duy nhất ở nồng độ 0,1% (v/v) trong điều kiện pH = 7 - 8 và được thông khí.

## 1. GIỚI THIỆU

Sự phát triển của các ngành công nghiệp đã và đang thải ra môi trường nhiều hợp chất gây hại. Các hợp chất này nếu không được xử lý sẽ gây mất cân

bằng sinh thái và ảnh hưởng đến sức khỏe cộng đồng (Minh & Mai, 2010). Hydrocarbon thơm là một nhóm chất hữu cơ có nguồn gốc tự nhiên và nhân tạo, hiện diện trong môi trường đất, không khí, nước, các lớp trầm tích và có khả năng gây ô nhiễm

môi trường (Cerniglia, 1993). Các hydrocarbon thơm như benzene, toluene và xylene (BTX) là thành phần của xăng. Trong công nghiệp, BTX được dùng làm dung môi trong thuốc da, sản xuất đồ nhựa và in ấn. BTX cũng được sử dụng phổ biến như dung môi trong các phòng thí nghiệm. Ngoài ra, quá trình đốt cháy và sự rò rỉ của xăng cũng là nguồn phát sinh BTX trong môi trường (Kha, 2015).

Sử dụng vi sinh vật để xử lý chất ô nhiễm được xem là biện pháp xử lý sinh học an toàn và thân thiện với môi trường. Trong các nhóm vi khuẩn đã được phân lập và nghiên cứu, vi khuẩn thuộc chi *Rhodococcus* là nhóm vi khuẩn hiện diện trong đất, phần lớn không gây độc, trong đó một số dòng vi khuẩn tiềm năng được nghiên cứu ứng dụng để xử lý các chất ô nhiễm môi trường. Chính vì vậy, vi khuẩn thuộc chi *Rhodococcus* được xem là một trong những vi sinh vật công nghiệp thích hợp cho sự phân hủy nhiều hợp chất hữu cơ (Martínková et al., 2009, Kim et al., 2018). Thêm vào đó, nhóm nghiên cứu đã phân lập được dòng vi khuẩn *Rhodococcus* sp. XL6.2 từ hệ thống xử lý nước thải phòng thí nghiệm cũng có khả năng phân hủy xylene hiệu quả (Oanh & Triệu, 2017). Kế đến, dòng vi khuẩn BTX-S21 được phân lập trong nước thải nhiễm xăng có khả năng phân hủy hỗn hợp BTX (Tài & Oanh, 2019). Chính vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định khả năng phân hủy hỗn hợp BTX của vi khuẩn *Rhodococcus* sp. XL6.2, đồng thời khảo sát điều kiện nuôi cấy tối ưu cho sự phân hủy hỗn hợp BTX của vi khuẩn, làm tiền đề cho các nghiên cứu ứng dụng dòng vi khuẩn này vào quá trình xử lý sinh học BTX trong nước thải.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Khảo sát sự tăng trưởng của vi khuẩn *Rhodococcus* sp. XL6.2 trong môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung BTX ở các nồng độ khác nhau

Khuẩn lạc sau 72 giờ nuôi cấy trên môi trường TSA của dòng vi khuẩn *Rhodococcus* sp. XL6.2 (dòng vi khuẩn XL6.2) được chủng vào 4 mL môi trường Trypticase soy broth (TSB, 30 g/L) và lắc mẫu 200 vòng/phút trên máy lắc tròn trong 24 giờ. Sau đó, mật độ quang của mẫu ( $OD_{600nm}$ ) được điều chỉnh về 0,7 (tương đương  $1,7 \times 10^8$  CFU/mL). Chủng 40  $\mu$ L huyền phù vi khuẩn sau khi điều chỉnh mật độ quang vào các ống nghiệm chứa 4 mL môi trường MM có bổ sung từng loại hydrocarbon (benzene/toluene/xylene) ở các nồng độ lần lượt là 0,01, 0,025, 0,05, 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 và 1% (v/v). Mỗi nồng độ của từng hydrocarbon khảo sát được xem là một nghiệm thức và được lặp lại 3 lần.

Nghiệm thức đối chứng được thực hiện tương tự nhưng không bổ sung hydrocarbon. Thành phần môi trường MM gồm 1,4196 g  $Na_2HPO_4$ , 1,3609 g  $KH_4PO_4$ , 0,3 g  $(NH_4)_2SO_4$ , 0,0985 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 5,75 mg  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 3,2 mg  $Na_2 \cdot EDTA$ , 2,75 mg  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1,7 mg  $MnSO_4 \cdot H_2O$ , 1,16 mg  $H_3BO_3$ , 1,15 mg  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,24 mg  $CuSO_4$ , 0,235 mg  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ , 0,125 mg  $(NH_4)_6Mo_{24} \cdot 4H_2O$ , 1000 mL  $H_2O$ ; pH=7 $\pm$ 0,2 (Nguyen et al., 2014).

Vi khuẩn được nuôi cấy bằng cách thông khí trên máy lắc với tốc độ 200 vòng/phút ở nhiệt độ phòng thí nghiệm (30 - 32°C). Sau 5 ngày nuôi cấy, sự tăng trưởng của vi khuẩn được xác định thông qua giá trị mật độ quang ở bước sóng 600 nm ( $OD_{600nm}$ ).

### 2.2. Khảo sát sự tăng trưởng của dòng vi khuẩn XL6.2 trong môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung hỗn hợp BTX ở các nồng độ khác nhau

Thí nghiệm được tiến hành tương tự như mô tả ở Mục 2.1, tuy nhiên nguồn carbon được bổ sung là hỗn hợp của 3 loại hydrocarbon gồm BTX với các nồng độ từng chất trong hỗn hợp lần lượt là 0,01, 0,025, 0,05, 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 và 1% (v/v) của từng hydrocarbon. Nghiệm thức đối chứng được thực hiện tương tự nhưng không bổ sung các loại hydrocarbon, mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Sau 5 ngày nuôi cấy, sự tăng trưởng của vi khuẩn được xác định thông qua giá trị mật độ quang ( $OD_{600nm}$ ).

### 2.3. Khảo sát ảnh hưởng của pH đến sự phân hủy BTX của dòng vi khuẩn XL6.2

Huyền phù vi khuẩn được chuẩn bị tương tự như mô tả ở Mục 2.1. Chủng 40  $\mu$ L huyền phù vi khuẩn ( $1,7 \times 10^8$  CFU/mL) vào các ống nghiệm chứa 4 mL môi trường MM đã được điều chỉnh pH ở các giá trị khác nhau gồm 5, 6, 7 và 8. Nồng độ hỗn hợp BTX được bổ sung vào môi trường nuôi cấy là nồng độ mà vi khuẩn tăng trưởng tối ưu dựa vào kết quả khảo sát ở Mục 2.2. Sau 24 giờ nuôi cấy, sự tăng trưởng của vi khuẩn trong môi trường và mật số vi khuẩn được xác định thông qua giá trị mật độ quang ( $OD_{600nm}$ ) và đếm sống nhỏ giọt (Hoben & Somasegaram, 1982). Hàm lượng mỗi hydrocarbon còn lại trong môi trường nuôi cấy được định lượng bằng phương pháp sắc ký khí GC-FID.

### 2.4. Khảo sát ảnh hưởng của sự thông khí đến khả năng phân hủy BTX của dòng vi khuẩn XL6.2

Huyền phù vi khuẩn được chuẩn bị tương tự như mô tả ở Mục 2.1. Chủng 40  $\mu$ L huyền phù vi khuẩn

( $1,7 \times 10^8$  CFU/mL) vào các ống nghiệm chứa 4 mL môi trường MM với nồng độ hỗn hợp BTX được bổ sung và giá trị pH của môi trường được điều chỉnh dựa vào kết quả khảo sát ở Mục 2.2 và 2.3. Vi khuẩn được nuôi cấy ở 2 điều kiện gồm: (1) thông khí (lắc trên máy lắc tròn với tốc độ 200 vòng/phút) và (2) không thông khí (để yên). Sau 24 giờ nuôi cấy, sự tăng trưởng của vi khuẩn trong môi trường và mật số vi khuẩn được xác định thông qua giá trị mật độ quang ( $OD_{600nm}$ ) và đếm sống nhỏ giọt (Hoben & Somasegaram, 1982). Hàm lượng mỗi hydrocarbon còn lại trong môi trường nuôi cấy được định lượng bằng phương pháp sắc ký khí GC-FID.

**2.5. Định lượng BTX bằng phương pháp sắc ký khí GC-FID**

*Trích mẫu:* Tùy theo thời gian khảo sát của từng thí nghiệm, 500  $\mu$ L huyền phù vi khuẩn được thu và ly tâm 13.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. Toàn bộ dịch trong thu được chuyển vào eppendorf 2 mL có chứa sẵn 500  $\mu$ L hexane và loại bỏ phần sinh khối tế bào. Dung dịch hexane được lắc 200 vòng/phút trong 5 phút trên máy lắc tròn. Sau đó, 500  $\mu$ L pha lỏng phía trên (BTX còn lại trong mẫu nuôi cấy (nếu có) được hoà tan trong hexane) được hút và cho vào eppendorf 2 mL. Các bước trích BTX được lặp lại bằng dung môi hexane trong 3 lần liên tiếp (Tài & Oanh, 2019).

*Định lượng hydrocarbon:* Hàm lượng BTX còn lại trong mẫu được định lượng bằng phương pháp sắc ký khí GC-FID (GC-2014, Shimadzu) với cột SPBTM-5 fused silica capillary column (30 m x 0,25 mm, 0,25  $\mu$ m). Các thông số phân tích bao gồm nhiệt độ bơm 250°C, nhiệt độ phát hiện 250°C, khí mang  $N_2$ , tốc độ dòng 1,1 mL/phút, tỉ lệ chia dòng 40, thể tích bơm 1  $\mu$ L. Chu trình nhiệt độ gồm: nhiệt độ ban đầu là 50°C (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 benzene là 3,3 phút, toluene là 5,2 phút, *p*-xylene là 7,8 phút, *m*-xylene là 8,0 phút và *o*-xylene là 8,6 phút (Tài & Oanh, 2019). Các số liệu về hàm lượng xylene được trình bày trong phần kết quả là tổng hàm lượng của 3 đồng phân *p*-, *m*- và *o*-xylene.

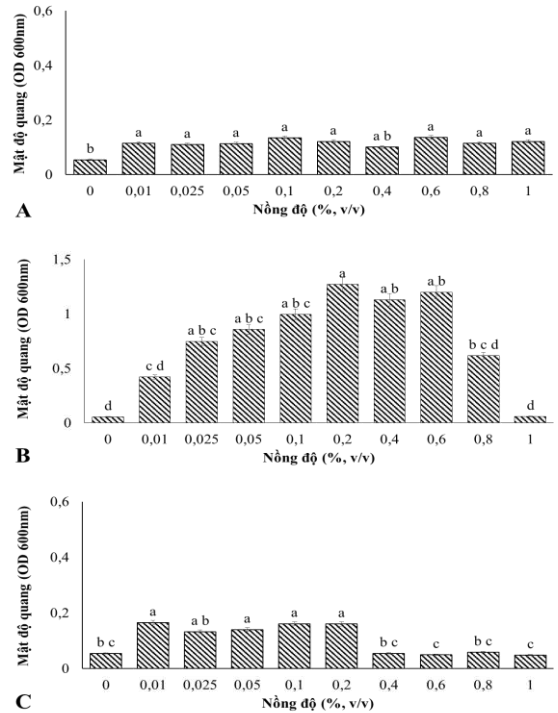
**2.6. Phương pháp phân tích số liệu**

Phần mềm Microsoft Excel 2010 được sử dụng để nhập và xử lý số liệu thô, tính các trung bình và vẽ biểu đồ. Phần mềm Minitab 16 được dùng để phân tích ANOVA và trung bình của các nghiệm thức được phân tích bằng kiểm định Tukey.

**3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU**

**3.1. Sự tăng trưởng của dòng vi khuẩn XL6.2 trong môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung BTX ở các nồng độ khác nhau**

Kết quả khảo sát cho thấy có sự khác biệt về khả năng tăng trưởng của dòng vi khuẩn XL6.2 trong môi trường MM có bổ sung từng loại hydrocarbon riêng lẻ với các nồng độ khác nhau (Hình 1). Khi môi trường nuôi cấy có bổ sung benzene như là nguồn carbon duy nhất, dòng vi khuẩn XL6.2 sinh trưởng và tạo sinh khối ở các nồng độ khảo sát gồm 0,01, 0,025, 0,05, 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 và 1% (v/v), khác biệt so với đối chứng (ý nghĩa thống kê 5%). Tuy nhiên, ở nồng độ 0,4%, sinh khối vi khuẩn cũng cao hơn so với nghiệm thức đối chứng nhưng sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê (Hình 1A). Ở thời điểm 5 ngày nuôi cấy, sinh khối vi khuẩn khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở các nồng độ benzene khảo sát. Như vậy, dòng vi khuẩn XL6.2 có khả năng tạo sinh khối trong môi trường có bổ sung benzene với nồng độ từ 0,01 đến 1% (v/v).



**Hình 1. Mật độ quang của vi khuẩn sau 5 ngày nuôi cấy trong môi trường MM có bổ sung BTX ở các nồng độ khác nhau (A: benzene, B: toluene, C: xylene)**

Các số liệu trong hình đi kèm chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5% ( $P < 0,05$ )

Khi được nuôi cấy trong môi trường có bổ sung toluene với các nồng độ khác nhau, dòng vi khuẩn XL6.2 cũng tạo sinh khối khác biệt so với đối chứng (ý nghĩa thống kê 5%). Vi khuẩn có khả năng tăng trưởng từ nồng độ 0,01% và tăng dần đến nồng độ 0,6%, trong đó ở nồng độ 0,2% dòng vi khuẩn XL6.2 tăng trưởng cao nhất. Tuy nhiên, ở nồng độ toluene 0,01, 0,8 và 1%, sinh khối của vi khuẩn khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với đối chứng, chúng tỏ 3 nồng độ này không phù hợp cho sự tăng trưởng của dòng vi khuẩn XL6.2 (Hình 1B).

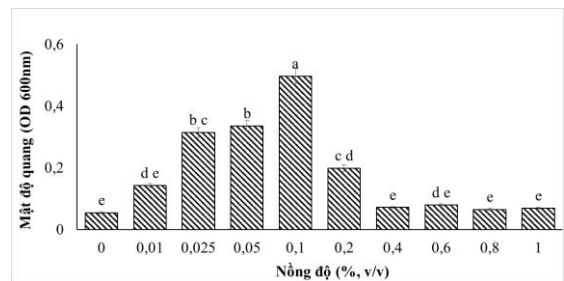
Khi được nuôi cấy trong môi trường MM có bổ sung các nồng độ xylene khác nhau, dòng vi khuẩn XL6.2 tăng trưởng hiệu quả từ nồng độ xylene 0,01% đến 0,2% (v/v), khác biệt so với đối chứng và với các nồng độ còn lại (ý nghĩa thống kê 5%). Ở nồng độ 0,025%, vi khuẩn cũng tạo sinh khối cao hơn so với đối chứng và các nghiệm thức bổ sung xylene từ 0,4% đến 1%, tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê (Hình 1C). Như vậy, vi khuẩn có khả năng tăng trưởng trong môi trường MM có chứa 3 hợp chất khảo sát chúng tỏ dòng vi khuẩn XL6.2 có khả năng phân hủy cả 3 hợp chất này.

**3.2. Sự tăng trưởng của dòng vi khuẩn XL6.2 trong môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung hỗn hợp BTX ở các nồng độ khác nhau**

Kết quả khảo sát khả năng tăng trưởng của dòng vi khuẩn XL6.2 trong môi trường MM có bổ sung hỗn hợp BTX với nồng độ từng chất trong hỗn hợp lần lượt là 0, 0,01, 0,025, 0,05, 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 và 1% (v/v) cho thấy sinh khối vi khuẩn có khác biệt so với đối chứng (Hình 2). Khi hỗn hợp BTX được bổ sung ở nồng độ 0,025 đến 0,1% (v/v), vi khuẩn tăng trưởng tạo sinh khối tăng dần theo nồng độ BTX, trong đó ở nồng độ 0,1%; vi khuẩn đạt sinh khối cao nhất, khác biệt so với các nghiệm thức còn lại (ý nghĩa thống kê 5%). Tuy nhiên, sự tăng trưởng của vi khuẩn giảm ở nồng độ 0,2% và rất thấp ở nồng độ 0,4% đến 1%, khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với đối chứng. Như vậy, việc bổ sung hỗn hợp BTX với nồng độ từng hợp chất 0,1% (v/v) vào môi trường nuôi cấy là tối ưu cho sự tăng trưởng của dòng vi khuẩn XL6.2.

Một số dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy hỗn hợp BTX cũng đã được công bố. Theo Nagarajan and Loh (2015), dòng vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* OX1 được phân lập từ bùn lắng của hệ thống xử lý nước thải có khả năng phân hủy BTX sau 24 giờ nuôi cấy ở nồng độ 0,13 - 0,22% (v/v). Dòng vi khuẩn *Pseudomonas* sp. BTEX-30 phân hủy BTX

có nồng độ 0,125% (v/v) ở thời điểm 45 giờ (Kamal et al., 2017). Theo nghiên cứu của Tài và Oanh (2019), dòng vi khuẩn BTX-S21 được phân lập từ hệ thống xử lý nước thải cũng phân hủy BTX với nồng độ (%) từng hydrocarbon là 0,01, 0,05, 0,1 và 0,25 (v/v) sau 24 giờ nuôi cấy. Trong nghiên cứu này, dòng vi khuẩn *Rhodococcus* sp. XL6.2 được chứng minh có khả năng tăng trưởng cao nhất ở nồng độ 0,1% (v/v) từng hydrocarbon trong hỗn hợp BTX là phù hợp với các nghiên cứu trước đây về khả năng tăng trưởng và phân hủy BTX của vi khuẩn.

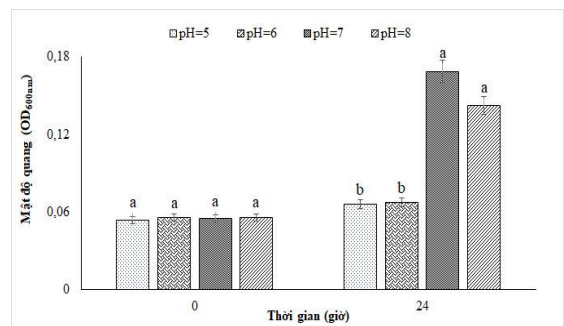


**Hình 2. Mật độ quang của vi khuẩn sau 5 ngày nuôi cấy trong môi trường MM có bổ sung hỗn hợp BTX ở các nồng độ khác nhau**

Các số liệu trong hình đi kèm chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5% (P<0,05)

**3.3. Ảnh hưởng của pH đến sự phân hủy BTX của dòng vi khuẩn XL6.2**

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của pH đến sự tăng trưởng của dòng vi khuẩn XL6.2 theo thời gian cho thấy khi môi trường có độ pH đạt giá trị 7 và 8, dòng vi khuẩn đạt sinh khối cao nhất, khác biệt so với các nghiệm thức còn lại (ý nghĩa thống kê 5%) ở thời điểm 24 giờ sau khi chủng (Hình 3).



**Hình 3. Mật độ quang của vi khuẩn sau 24 giờ nuôi cấy trong môi trường MM có bổ sung hỗn hợp BTX ở các điều kiện pH khác nhau**

Trong cùng một thời điểm, các số liệu trong hình đi kèm chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5% (P<0,05)

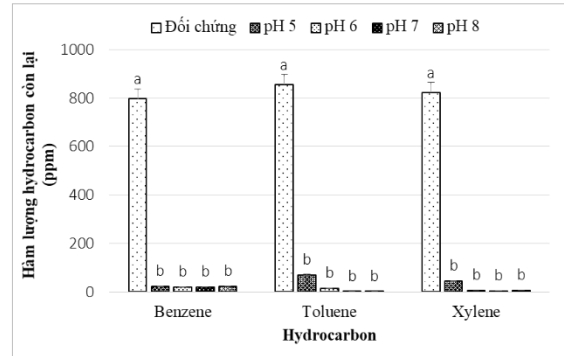
Kết quả đếm sống cho thấy mật số vi khuẩn cũng đạt tối đa trong môi trường có giá trị pH = 7 và pH = 8 vào thời điểm 24 giờ nuôi cấy, khác biệt so với các nghiệm còn lại (ý nghĩa thống kê 5%) (Bảng 1). Trong đó, ở điều kiện pH = 7, mật số vi khuẩn cao nhất, đạt  $83,92 \times 10^6$  CFU/mL.

**Bảng 1. Sự khác biệt về mật số vi khuẩn *Rhodococcus sp.* XL6.2 khi được nuôi cấy trong môi trường MM có bổ sung hỗn hợp BTX ở các điều kiện pH khác nhau**

pH môi trường	Mật số vi khuẩn ( $\times 10^6$ CFU/mL)	
	0 giờ	24 giờ
5	$0,05^a \pm 0,01$	$0,62^b \pm 0,40$
6	$0,05^a \pm 0,01$	$0,67^b \pm 0,053$
7	$0,08^a \pm 0,05$	$83,92^a \pm 19,92$
8	$0,07^a \pm 0,03$	$67,13^a \pm 24,44$

Trong cùng một thời điểm, các số liệu trong bảng đi kèm chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5% ( $P < 0,05$ )

Độ pH có ảnh hưởng đến hiệu quả phân hủy hỗn hợp BTX của dòng vi khuẩn XL6.2. Ở các điều kiện pH khác nhau, hỗn hợp BTX được phân hủy cũng khác nhau. Ở pH = 7 và pH = 8, hiệu quả phân hủy hỗn hợp BTX cao hơn so với điều kiện pH = 5 và pH = 6. Kết quả phân tích sắc ký khí cho thấy hàm lượng hydrocarbon còn lại trong môi trường nuôi cấy có sự khác biệt giữa các nghiệm thức khảo sát. Ở thời điểm 24 giờ nuôi cấy, hiệu suất phân hủy BTX của dòng vi khuẩn XL6.2 khi được nuôi trong môi trường MM có pH = 7 là cao nhất, đạt 97,33% benzene, 99,75% toluene và 99,50% xylene. Ở điều kiện pH = 8, hiệu suất phân hủy BTX của vi khuẩn XL6.2 đạt lần lượt là 97,19, 99,7 và 99,08% (Hình 4). Kết quả khảo sát sự phân hủy BTX của vi khuẩn cũng phù hợp với kết quả khảo sát mật độ quang và đếm sống (Hình 3 và Bảng 1), vi khuẩn tăng trưởng nhanh và phân hủy hiệu quả ở môi trường có pH = 7 và pH = 8, trong đó, ở pH = 7, vi khuẩn đạt mật số và hiệu suất phân hủy cao hơn. Kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu khảo sát về ảnh hưởng của pH đến sự phân hủy BTX của vi khuẩn. Theo Lee et al. (2002), vi khuẩn *Stenotrophomonas maltophilia* T3-c được phân lập từ hệ thống xử lý nước thải có khả năng phân hủy hỗn hợp BTX cao nhất khi được nuôi cấy ở pH = 7. Vi khuẩn *Pseudomonas putida* YNS1 được phân lập từ đất ô nhiễm dầu có khả năng phân hủy benzene hiệu quả trong môi trường pH từ 6 đến 8 (You et al., 2013). Như vậy, ở nghiên cứu này, pH = 7 được tuyển chọn là điều kiện nuôi cấy tối ưu cho sự tăng trưởng của dòng vi khuẩn XL6.2 trong môi trường MM có bổ sung hỗn hợp BTX 0,1% (v/v) sau 24 giờ.

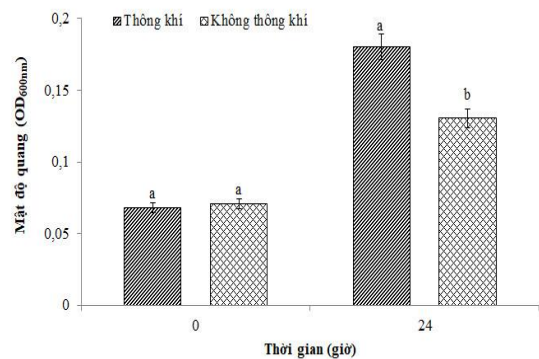


**Hình 4. Ảnh hưởng của pH đến sự phân hủy BTX**

Các số liệu trong hình đi kèm chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5% ( $P < 0,05$ )

### 3.4. Ảnh hưởng của sự thông khí đến khả năng phân hủy BTX của dòng vi khuẩn XL6.2

Mật độ quang của dòng vi khuẩn XL6.2 khi được nuôi cấy 24 giờ trong môi trường MM có bổ sung hỗn hợp BTX (0,1% (v/v) từng hydrocarbon) ở điều kiện thông khí trên máy lắc và không thông khí được minh họa ở Hình 5. Kết quả nghiên cứu cho thấy dòng vi khuẩn XL6.2 tăng trưởng, tạo sinh khối cao nhất khi được thông khí trên máy lắc, khác biệt so với nghiệm thức không thông khí (ý nghĩa thống kê 5%).



**Hình 5. Ảnh hưởng của sự thông khí đến mật độ quang của dòng vi khuẩn XL6.2 sau 24 giờ nuôi cấy trong môi trường MM**

Trong cùng một thời điểm, các số liệu trong hình đi kèm chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5% ( $P < 0,05$ )

Kết quả đếm sống cũng phù hợp với kết quả đo mật độ quang của vi khuẩn nghĩa là có sự khác nhau về mật số vi khuẩn ở từng điều kiện khảo sát (Bảng 2). Sau 24 giờ nuôi cấy, mật số vi khuẩn ở nghiệm



thức được thông khí đạt giá trị cao nhất  $97,01 \times 10^6$  CFU/mL, khác biệt so với nghiệm thức không thông khí (ý nghĩa thống kê 5%).

**Bảng 2. Ảnh hưởng của sự thông khí đến mật số của dòng vi khuẩn XL6.2**

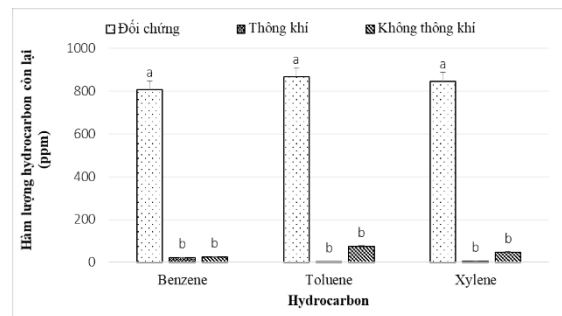
Điều kiện	Mật số vi khuẩn ( $\times 10^6$ CFU/mL)	
	0 giờ	24 giờ
Thông khí	$0,87^a \pm 0,16$	$97,01^a \pm 12,19$
Không thông khí	$0,79^a \pm 0,32$	$3,9^b \pm 2,37$

Trong cùng một thời điểm, các số liệu trong bảng đi kèm chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5% ( $P < 0,05$ )

Thêm vào đó, kết quả phân tích sắc ký khí cho thấy hàm lượng BTX giảm đáng kể trong thời gian khảo sát, trong đó, vi khuẩn được nuôi cấy ở điều kiện thông khí cũng có hiệu quả phân hủy cao nhất. Tuy nhiên, khả năng phân hủy BTX của vi khuẩn trong hai điều kiện nuôi cấy khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Ở thời điểm 24 giờ, khi được nuôi cấy thông khí, hiệu suất phân hủy BTX của dòng vi khuẩn XL6.2 lần lượt là 97,32, 99,75 và 99,24%. Trong điều kiện không thông khí, vi khuẩn phân hủy BTX với hiệu suất lần lượt là 96,99, 91,56 và 94,45% ở cùng thời điểm khảo sát (Hình 6). Kết quả nghiên cứu cho thấy dòng vi khuẩn *Rhodococcus* sp. XL6.2 sinh sản nhanh hơn khi được nuôi cấy thông khí, tuy nhiên, khả năng phân hủy BTX (0,1% v/v từng chất) của dòng vi khuẩn này trong điều kiện thông khí và không thông khí khác biệt không có ý nghĩa. Điều này có thể do khi được nuôi cấy trong điều kiện không thông khí, dòng vi khuẩn XL6.2 vẫn có thể sử dụng oxy hòa tan trong môi trường cho sự hô hấp tế bào để phân hủy BTX, tuy nhiên, hiệu suất phân hủy thấp hơn so với nuôi cấy thông khí. Chính vì vậy, môi trường được thông khí được xem là điều kiện tối ưu cho sự sinh trưởng và phân hủy BTX của dòng vi khuẩn XL6.2.

Theo Otenio et al. (2005), dòng vi khuẩn *Pseudomonas putida* CCM1852 được phân lập tại hệ thống xử lý nước thải có khả năng phân hủy 0,03% (v/v) BTX với hiệu suất lần lượt là 0, 57 và 49% sau 16 giờ nuôi cấy. Nghiên cứu của Kamal et al. (2017) chứng minh dòng vi khuẩn *Pseudomonas* sp. BTEX-30 đã phân hủy 99% benzene, 99% toluene, 86% ethylbenzene và 82% xylene với nồng độ

0,125% (v/v) sau 45 giờ nuôi cấy. Dòng vi khuẩn BTX-S21 được phân lập từ hệ thống xử lý nước thải có thể phân hủy hoàn toàn benzene và toluene, hơn 92% xylene ở các nồng độ 0,01, 0,05, 0,1 và 0,25% (v/v) sau 24 giờ nuôi cấy (Tài & Oanh, 2019). Trong nghiên cứu này, dòng vi khuẩn XL6.2 có khả năng phân hủy BTX với hiệu suất phân hủy lần lượt là 97,32, 99,75 và 99,24% ở nồng độ 0,1% (v/v) sau 24 giờ nuôi cấy. Như vậy, dòng vi khuẩn XL6.2 là vi khuẩn bản địa có hiệu suất phân hủy BTX cao nên được xem là dòng vi khuẩn tiềm năng có thể tiếp tục nghiên cứu để ứng dụng xử lý BTX trong nước thải tại địa phương.



**Hình 6. Ảnh hưởng của sự thông khí đến khả năng phân hủy BTX của dòng vi khuẩn XL6.2**

Các số liệu trong hình đi kèm chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5% ( $P < 0,05$ )

#### 4. KẾT LUẬN

Dòng vi khuẩn *Rhodococcus* sp. XL6.2 có khả năng sử dụng BTX hoặc hỗn hợp 3 hydrocarbon ở các nồng độ khác nhau cho sự tăng trưởng, trong đó nồng độ 0,1% (v/v) từng hợp chất trong hỗn hợp BTX là nồng độ tối ưu cho sự tăng trưởng của dòng vi khuẩn này. Kết quả khảo sát cho thấy môi trường nuôi cấy có giá trị pH = 7 hoặc pH = 8 và được thông khí là điều kiện tối ưu cho sự phân hủy BTX của dòng vi khuẩn XL6.2.

#### LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện từ nguồn kinh phí của đề tài Khoa học và Công nghệ Thành phố Cần Thơ: Nghiên cứu tạo chế phẩm sinh học chứa vi khuẩn *Rhodococcus* sp. phân hủy các hợp chất hữu cơ có vòng thơm trong nguồn nước thải, mã số đề tài DP2020-16.

Hoben, H. J., & Somasegaran, P. (1982).

Comparison of the pour, spread, and drop plate methods for enumeration of *Rhizobium* spp. in inoculants made from presterilized peat. *Applied*

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

Cerniglia, C. E. (1993). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon. *Current Opinion in Biotechnology*, 4, 331-338. [https://doi.org/10.1016/0958-1669\(93\)90104-5](https://doi.org/10.1016/0958-1669(93)90104-5)

- and *Environmental Microbiology*, 44(5), 1246-1247. <https://doi.org/10.1128/aem.44.5.1246-1247.1982>
- Kamal, K., Hamid, R. N., Mahnaz, M. A., Hossein, M., & Mojtaba, G. M. (2017). BTEX biodegradation on contaminated groundwater using a novel strain (*Pseudomonas* sp. BTEX-30). *International Biodeterioration and Biodegradation*, 116, 234-242. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.11.001>
- Kim, D., Choi, K. Y., Yoo, M., Zylstra, G. J., & Kim, E. (2018). Biotechnological potential of *Rhodococcus* biodegradative pathways. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(7): 1037-1051. <https://doi.org/10.4014/jmb.1712.12017>
- Lee, E. Y., Jun, Y. S., Cho, K. S., & Ryu, H. W. (2002). Degradation characteristics of toluene, benzene, ethylbenzene, and xylene by *Stenotrophomonas maltophilia* T3-c. *Journal of the Air & Waste Management Association*, 52(4), 400-406. doi: 10.1080/10473289.2002.10470796
- Martínková, L., Uhnáková, B., Pátek, M., Nesvera, J., & Kren, V. (2009). Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. *Environment International*, 35(1), 162-177. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2008.07.018>
- Nagarajan, K., & Loh, K. C. (2015). Formulation of microbial cocktails for BTEX biodegradation. *Biodegradation*, 26, 51-63. <https://doi.org/10.1007/s10532-014-9715-0>
- Minh, N. N., & Mai, C. T. N. (2010). Hợp chất hydrocarbon thơm đa nhân (PAHs) và khả năng phân hủy sinh học bởi vi khuẩn. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 8(1), 1-11.
- Nguyen, T. P. O., Helbling, D. E., Bers, K., Fida, T. T., Wattiez, R., Kohler, H. P. E., Springael, D., & 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. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5858-5>
- Oanh, N. T. P., & Triệu, N. V. B. (2017). Phân lập vi khuẩn phân hủy xylene từ hệ thống xử lý nước thải. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 52a, 99-103. <https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2017.115>
- Otenio, M. H., Lopes, S. M. T., Oliveira, M. M. L., Roseiro, J. C., & Bidoia, E. D. (2005). Benzene, toluene, xylene biodegradation by *Pseudomonas putida* CCMI852. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36(3), 258-261. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822005000300010>
- Kha, P. T. (2015). Hàm lượng hydrocarbon đa vòng thơm (PAHs) trong trầm tích đầm Thị Nại tỉnh Bình Định. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Biển*, 15(3), 288-293. <https://doi.org/10.15625/1859-3097/15/3/5946>
- Tài, V. P., & Oanh, N. T. P. (2019). Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn trong bùn lắng của bể chứa nước thải nhà máy lọc hóa dầu có khả năng phân hủy hỗn hợp benzene, toluene và xylene. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 55(5), 18-23. <https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2019.123>
- You, Y., Shim, J., Cho, C. H., Ryu, M. H., Shea, P. J., Kamala-Kannan, S., & Oh, B. T. (2013). Biodegradation of BTEX mixture by *Pseudomonas putida* YNS 1 isolated from oil-contaminated soil. *Journal of Basic Microbiology*, 53(5), 469-475. <https://doi.org/10.1002/jobm.201200067>